

MARIANA DULCE DELLE VEDOVE ORTOLAN SAYEG

**Uso de dispositivo monitor de atividade como preditor de estro  
em vacas de leite**

São Paulo

2020

MARIANA DULCE DELLE VEDOVE ORTOLAN SAYEG

**Uso de dispositivo monitor de atividade como preditor de estro em vacas de leite**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Departamento:**

Reprodução Animal (VRA)

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo

2020

**Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3995 FMVZ	Sayeg, Mariana Dulce Delle Vedove Ortolan Uso de dispositivo monitor de atividade como preditor de estro em vacas de leite / Mariana Dulce Delle Vedove Ortolan Sayeg. – 2020. 121 f. : il.  Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2020.  Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal. Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.  1. Estro. 2. Monitor de atividade. I. Título.
-----------------	--

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Uso de dispositivo monitor de atividade como preditor de estro em vacas de leite", protocolada sob o CEUA nº 4792300118 (ID 007347), sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli e equipe; Mariana Dulce Delle Vedove Ortolan Sayeg** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/12/2019.

We certify that the proposal "Use of an automated monitoring device to predict estrus in dairy cows.", utilizing 616 Bovines (616 females), protocol number CEUA 4792300118 (ID 007347), under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli and team; Mariana Dulce Delle Vedove Ortolan Sayeg** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/17/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 05/2018 a 01/2020      Área: Reprodução Animal

Origem:	Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga	sexo:	Fêmeas	idade:	2 a 8 anos	N:	36
Espécie:	Bovinos			Peso:	400 a 700 kg		
Linhagem:	holandesa						
Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais	sexo:	Fêmeas	idade:	2 a 8 anos	N:	80
Espécie:	Bovinos			Peso:	400 a 700 kg		
Linhagem:	GIR						
Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais	sexo:	Fêmeas	idade:	3 a 8 anos	N:	500
Espécie:	Bovinos			Peso:	350 a 800 kg		
Linhagem:	Girolando						

Local do experimento: Experimento 1 Usp Pirassununga Experimento 2: Fazendas do Basa Experimento 3: Fazenda Boa Fé - Uberaba

São Paulo, 25 de maio de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coodenador  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SAYEG, Mariana Dulce Delle Vedove Ortolan

Título: **Uso de dispositivo monitor de atividade como preditor de estro em vacas de leite**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nome do Programa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

*Ao meu marido Felipe e ao meu filho Fábio, que sempre me incentivaram e apoiaram independente das dificuldades. A minha mãe pelo amor incondicional dedicado a mim durante toda a minha vida.*

*DEDICO*

## *Agradeço*

*Primeiramente a Deus por me permitir realizar esse sonho.*

*Ao meu marido Felipe por toda paciência, apoio e incentivo durante toda minha jornada. Ao meu filho Fábio, que por vezes foi privado da minha presença para que eu pudesse concluir esse trabalho.*

*Aos meus pais, Eliana e Marco e minha irmã Paulina por me guiarem pelo caminho do bem e por sempre acreditarem em mim.*

*Ao meu orientador Pietro Sampaio Baruselli por me aceitar como orientanda, por todos os ensinamentos, pelo exemplo de pessoa e profissional, por toda sua gentileza e paciência.*

*Aos pós graduandos Flávia, Laísa, Laís, Badá, Marcão, Bernardo, Valter, Rômulo, Renan, Fábio, Mariana, Ana Luíza, Augusto, Gabriel, Emíliana e Luana pela amizade.*

*Aos amigos Carlos Godoy, Gabriela Dalmaso, Marina Passarelli, Cátia Ferreira e Léo pela ajuda nos experimentos...sem vocês nada seria possível.*

*A USP campus de Pirassunga, Fazendas do Basa e Fazenda Boa Fé por acreditarem no projeto e permitirem que os experimentos fossem feitos.*

*Aos funcionários do setor de leite da USP de Pirassununga pela ajuda durante os manejos e pela amizade.*

*Ao meu amigo Diego Gerra pela amizade sincera, apoio e por acreditar mais em mim do que eu mesma.*

*Aos amigos Luiz Fernando Féres, Simião Féres, Messias, Dona Marta e todos da fazenda do Basa, que não mediram esforços que para que tudo ocorresse bem durante os experimentos.*



*Ao Sr Evandro do Carmo Guimarães pela confiança e receptividade e por colocar a sua fazenda a disposição da ciência.*

*Ao Sr Jônadan Min Ma por abrir as portas da fazenda para esse projeto.*

*A Joice (Boa Fé) que me “aturou” por mais de seis meses e que sem a boa vontade e disposição dela nada seria possível.*

*A CRV Lagoa e ao amigo Leonardo Maia, pelos equipamentos, confiança no meu trabalho e pela amizade.*

*Ao professor Dr Ricardo Chebel por me receber em seu grupo de pesquisa, me mostrar que sempre dá para fazer melhor e por conseguir a proeza de me ensinar estatística!*

*A minha amiga querida Vitória Merenda pela amizade, ajuda e paciência. Aos meus amigos da Universidade da Flórida (Caio, Tomaz, Ana...) pelas risadas.*

*A Bete Cebim e Roberto por acolher a mim e minha família tão carinhosamente quando chegamos em Gainesville, vocês moram em meu coração.*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.*

"Se tudo parece estar sob controle, então, você não está indo rápido o suficiente."

(Mário Andretti)

## RESUMO

ORTOLAN, M.D.D.V. **Uso de dispositivo monitor de atividade como preditor de estro em vacas de leite**. 2020. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O presente estudo foi composto por 3 experimentos. O experimento 1 foi realizado com 81 novilhas da raça Gir (*Bos indicus*) e os objetivos foram mensurar a eficiência do colar monitor de atividade (CMA) em detectar estro e avaliar se há relação entre a intensidade e a atividade de estro com o diâmetro máximo do folículo ovulatório em animais *Bos indicus* (Gir). Para avaliar a eficiência do CMA a ovulação foi usada como referência. O experimento 2 foi realizado com 91 vacas Holandesas lactantes (*Bos taurus*) e os objetivos foram mensurar a eficiência do CMA para detecção de estro além de avaliar a influência da temperatura vaginal nas variáveis reprodutivas associados ao estro. No experimento 3, 404 estros de vacas Girolando (*Bos indicus* x *Bos taurus*) lactantes sincronizadas para transferência de embrião em tempo fixo (TETF) foram avaliados pelo CMA e pelo pedômetro quanto a intensidade, atividade e duração. A relação das características de estro foi associada à probabilidade de prenhez após TETF. No experimento 1, a sensibilidade foi de 95,2%, a especificidade de 5,3%, o valor preditivo positivo de 76,6%, o valor preditivo negativo de 25% e a acurácia de 74,1% para o CMA. Não foram encontradas correlações significativas entre a máxima atividade de estro (MAE) e o diâmetro do maior folículo 24 horas após a retirada do dispositivo de P4 ( $R^2 = 0,16$ ;  $P = 0,17$ ) ou o diâmetro máximo do folículo ovulatório ( $R^2 = 0,12$ ;  $P = 0,31$ ). Porém, correlações positivas, ainda que fracas, entre a máxima intensidade de estro (MIE) e o diâmetro do folículo no D9 ( $R^2 = 0,27$ ;  $P = 0,02$ ) e o diâmetro máximo do folículo ovulatório ( $R^2 = 0,23$ ;  $P = 0,04$ ) foram verificadas. No experimento 2, a sensibilidade foi de 68,9%, a especificidade de 82,4%, o valor preditivo positivo de 94,4%, valor preditivo negativo de 37,8% e a acurácia de 71,4% para o CMA. Além disso, foi verificado que, conforme aumenta a temperatura vaginal, há redução na taxa de ovulação ( $P = 0,03$ ), aumento na taxa de dupla ovulação ( $P = 0,02$ ) e redução da duração de estro ( $P = 0,04$ ). A identificação de estro pelo CMA não foi influenciada pela temperatura vaginal ( $P = 0,76$ ). Entretanto, foi observada redução na detecção do estro pelo adesivo identificador de monta (AIM) ( $P=0,02$ ) e pela observação visual ( $P=0,06$ ) conforme o aumento da temperatura vaginal. No experimento 3, os animais que se tornaram

prenhes após a TETF apresentaram maior atividade de estro pelo CMA do que os animais que não emprenharam ( $82,43 \pm 31,2$  vs.  $74,15 \pm 33,4$ , respectivamente;  $P = 0,02$ ). Ao dividir os animais em grupos de alta e baixa atividade e intensidade de estro detectada pelo CMA, verificou-se maior P/TE ( $P < 0,01$ ) nos animais com alta atividade de estro (AMAEc; 39,0%) comparados aos animais com baixa intensidade de estro (BMAEc; 22,8%). Já para a atividade de estro mensurada pelo pedômetro, houve tendência ( $P = 0,06$ ) de aumento na P/TE para animais de alta (AMAEp; 39,0%) quando comparados com animais de baixa atividade de estro (BMAEp; 30,8%). A intensidade de estro tanto do colar como do pedômetro não foi associada a P/TE. Baseado nos resultados dos experimentos, pode-se concluir que o CMA é eficiente para detectar estro em Gir (*Bos indicus*), Girolando (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) e em Holandês (*Bos taurus*) criadas em condições tropicais.

**Palavras-chave:** estro; monitor de atividade.

## ABSTRACT

ORTOLAN, M.D.D.V. **Use of an automated monitoring device to predict estrus in dairy cows** 2020. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The present study consisted of 3 experiments. Experiment 1 was used 81 Gir heifers (*Bos indicus*) and the objectives were to measure the efficiency of the activity monitor collar (CMA) in detecting estrus and assessing whether there is a correlation between the intensity and the estrus activity with the maximum diameter of the ovulatory follicle in *Bos indicus* (Gir) animals. To assess the efficiency of CMA, ovulation was used as a reference. Experiment 2 was carried out with 91 lactating Holstein cows (*Bos taurus*) and the objectives were to measure the efficiency of CMA to detect estrus in addition to assessing the influence of vaginal temperature on reproductive parameters associated with estrus. In experiment 3, 404 estrous of lactating Girolando cows (*Bos indicus* x *Bos taurus*) submitted to synchronization to fixed time embryo transfer (FTET) were evaluated by CMA or/and pedometer for intensity, activity and duration. The relation of estrus characteristics was associated with the probability of pregnancy after FTET). In experiment 1, the sensitivity was 95.2%, the specificity was 5.3%, the positive predictive value was 76.6%, the negative predictive value was 25% and the accuracy was 74.1% for CMA. No significant correlations were found between maximum estrus activity (WEM) and the diameter of the largest follicle 24 hours after removal of the P4 device ( $R^2 = 0.16$ ;  $P = 0.17$ ) or the maximum diameter of the ovulatory follicle ( $R^2 = 0.12$ ;  $P = 0.31$ ). However, positive correlations, albeit weak, between the maximum intensity of estrus (LEM) and the diameter of the follicle at D9 ( $R^2 = 0.27$ ;  $P = 0.02$ ) and the maximum diameter of the ovulatory follicle ( $R^2 = 0.23$ ;  $P = 0.04$ ) were verified. In experiment 2, the sensitivity was 68.9%, specificity of 82.4%, positive predictive value of 94.4%, negative predictive value of 37.8% and accuracy of 71.4% for CMA. In addition, it was found that, as the vaginal temperature increases, there is a reduction in the ovulation rate ( $P = 0.03$ ), an increase in the double ovulation rate ( $P = 0.02$ ) and a reduction in estrus duration ( $P = 0.04$ ). The identification of estrus by CMA was not influenced by vaginal temperature ( $P = 0.76$ ). However, a reduction in the detection of estrus was observed by breed indicator patch AIM ( $P = 0.02$ ) and by visual observation ( $P = 0.06$ ) according to the increase in vaginal temperature. In

experiment 3, animals that became pregnant after TETF showed greater estrus activity by CMA than animals that did not become pregnant ( $82.43 \pm 31.2$  vs.  $74.15 \pm 33.4$ , respectively;  $P = 0.02$ ). When dividing the animals into groups of high and low activity and intensity of estrus detected by CMA, there was a higher P / TE ( $P < 0.01$ ) in animals with high estrus activity (AMAEC; 39.0%) compared to animals with low estrus intensity (BMAEC; 22.8%). As for the estrus activity measured by the pedometer, there was a trend ( $P = 0.06$ ) of increase in P / TE for discharge animals (AMAEp; 39.0%) when compared to animals with low estrus activity (BMAEp; 30.8%). The estrus intensity of both the collar and the pedometer was not associated with P / TE. 06) increase in P / TE for high animals (AMAEp; 39.0%) when compared to animals with low estrus activity (BMAEp; 30.8%). The estrus intensity of both the collar and the pedometer was not associated with P / TE. 06) increase in P / TE for high animals (AMAEp; 39.0%) when compared to animals with low estrus activity (BMAEp; 30.8%). The estrus intensity of both the collar and the pedometer was not associated with P / TE. Results of the experiments support that the CMA is efficient to detect estrus in Gir (*Bos indicus*), Girolando (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) and in Holstein (*Bos taurus*) maintained in tropical conditions.

**Key words:** estrus; activity monitor.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> -	Ilustração da hipótese 1 - O colar monitor de atividade (CMA) é eficiente na detecção de estro de novilhas Gir ( <i>Bos indicus</i> ).....	34
<b>Figura 2</b> -	Ilustração da hipótese 2 – Há relação positiva entre o diâmetro do folículo ovulatório e a atividade e intensidade de estro em novilhas Gir ( <i>Bos indicus</i> ). .....	35
<b>Figura 3</b> -	Novilhas Gir ( <i>Bos indicus</i> ) do experimento 1. ....	36
<b>Figura 4</b> -	Adesivo identificador de monta.....	36
<b>Figura 5</b> -	Esquema do protocolo hormonal utilizado para sincronização das novilhas Gir ( <i>Bos indicus</i> ). .....	37
<b>Figura 6</b> -	Ilustração dos componentes e modo de funcionamento dos colares monitores de atividade (CMA). .....	38
<b>Figura 7</b> -	Novilha Gir com colar monitor de atividade.....	39
<b>Figura 8</b> -	Novilhas Gir com colar monitor de atividade. ....	39
<b>Figura 9</b> -	Ultrassonografia utilizada para a dinâmica folicular. ....	40
<b>Figura 10</b> -	Matriz de confusão usada para determinar os animais verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falso positivos e falso negativos. ....	43
<b>Figura 11</b> -	Curva ROC para a estimativa da ovulação em novilhas Gir ( <i>Bos indicus</i> ).....	46
<b>Figura 12</b> -	Probabilidade de ovulação (%) em relação ao diâmetro (mm) do folículo ovulatório no D9 (24 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de P4) em novilhas Gir ( <i>Bos indicus</i> ). Efeito do diâmetro do folículo de conforme regressão logística multivariada (N = 81). Equação de probabilidade de ovulação = $1/1 + \exp(-9,6507 + 1,2181 \times \text{Diâmetro do folículo no D9})$ ; P = 0,01).....	46
<b>Figura 13</b> -	Relação entre o intervalo retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8) e o estro (horas) com o diâmetro (mm) do maior folículo 24 horas após a	



retirada do dispositivo de P4 (D9) em novilhas Gir (*Bos indicus*) submetidas a protocolo de sincronização do estro e da ovulação. Efeito do diâmetro do folículo de acordo com a regressão logística multivariada (N = 81). Equação da estimativa do intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 e o estro =  $66,469 + 0.2188 \times \text{diâmetro do folículo no D9}^2 - 5.8851 \times \text{diâmetro do folículo no D9}$ ;  $P < 0,01$ .....52

**Figura 14 -** Correlações entre a duração de estro e as variáveis que compuseram o modelo final. **a:** Relação da estimativa de duração de estro (horas) com a máxima atividade de estro (MAE) registrada pelo colar monitor de atividade (CMA) em novilhas Gir (*Bos indicus*). Efeito da MAE conforme a regressão logística multivariada (N = 77). Equação da estimativa de duração de estro =  $6,9229 + 0,4455 * \text{MAE} + 0,8312 * \text{Diâmetro folículo no D9}$  ( $P < 0,0$ ).1). **b:** Relação da estimativa da duração do estro (horas) e do diâmetro (mm) do maior folículo 24 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 em novilhas Gir (*Bos indicus*). Efeito do diâmetro do folículo 24h conforme a regressão logística multivariada. (N = 77). Equação Estimativa de duração de estro =  $6,9229 + 0,4455 * \text{MAE} + 0,8312 * \text{Diâmetro folículo no D9}$ . ( $P < 0,01$ ).....54

**Figura 15 -** Relação entre o intervalo retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8) e a ovulação (horas) com o diâmetro (mm) do maior folículo 24 horas após a retirada do dispositivo de P4 (D9) em novilhas Gir (*Bos indicus*) submetidas a protocolo de sincronização do estro e da ovulação. Efeito do diâmetro do folículo de acordo com a regressão logística multivariada (N = 77). Equação da estimativa do intervalo retirada de P4 – ovulação =  $57.9257 - 1.4201 \times \text{diâmetro do folículo no D9} + 0.8299 \times \text{intervalo retirada de P4-estro}$ . ( $P < 0,01$ ).....55

**Figura 16 -** Relação entre o intervalo (horas) retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8) e ovulação com o intervalo (horas) entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e o início de estro em novilhas Gir (*Bos indicus*) submetidas a protocolo de sincronização do estro e da ovulação. Efeito do intervalo D8-estro de acordo com a regressão logística multivariada (N = 77). Equação da estimativa do intervalo retirada de P4 – ovulação =  $57.9257 - 1.4201 \times \text{diâmetro do folículo no D9} + 0.8299 \times \text{intervalo retirada de P4-estro}$ . ( $P < 0,01$ ).....56

**Figura 17 -** Ilustração da hipótese 1 - O colar monitor de atividade (CMA) é eficiente na detecção de estro em vacas Holandesas lactantes (*Bos taurus*). .....63

**Figura 18 -** Ilustração da hipótese 2 – Altas temperaturas interferem negativamente no diâmetro do folículo ovulatório, intensidade e atividade de estro,

	expressão de estro e aumenta a ocorrência de dupla ovulação em vacas Holandesas lactantes ( <i>Bos taurus</i> ). .....	63
<b>Figura 19</b>	- Vaca Holandesa com CMA. ....	65
<b>Figura 20</b>	- Esquema do protocolo hormonal utilizado para sincronização de estro de vacas Holandesas lactantes ( <i>Bos taurus</i> ). ....	65
<b>Figura 21</b>	- Identificação visual de estro. ....	66
<b>Figura 22</b>	- Termômetro vaginal e alma plástica já com o termômetro acoplado. ....	67
<b>Figura 23</b>	- Ultrassonografia transretal para realização da dinâmica folicular.....	69
<b>Figura 24</b>	- Relação entre a probabilidade de ovulação e a temperatura vaginal (mensurada do D8 ao D14) em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ) lactantes que manifestaram (linha superior) ou não (linha inferior) estro. Efeito da temperatura vaginal conforme regressão logística multivariada (N = 84). Equação da probabilidade de Ovulação = $1 / 1 + \exp 103,57 - 2,6416 \times \text{temperatura vaginal média (}^{\circ}\text{C)} + 2,5547 \times 1$ se animal apresentou estro pelo CMA (P = 0,05).....	78
<b>Figura 25</b>	- Curva ROC para a estimativa da ovulação em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ) lactantes. ....	78
<b>Figura 26</b>	- Curva ROC para a estimativa de dupla ovulação em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ) lactantes. ....	79
<b>Figura 27</b>	- <b>a:</b> Relação entre a probabilidade de dupla ovulação e a temperatura vaginal (mensurada do D8 ao D14) em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ) lactantes. Efeito da temperatura vaginal de acordo regressão logística multivariada. (N=47). Equação da probabilidade de dupla ovulação = $1 / 1 + \exp -125,89 + 3,1926 \times \text{temperatura vaginal média} + 0,02497 \times \text{MAE}$ (P = 0,03). <b>b:</b> Relação entre a probabilidade de dupla ovulação e máxima atividade de estro (MAE) em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ) lactantes. Efeito da MAE de acordo regressão logística multivariada (N=47). Equação da probabilidade de dupla ovulação = $1 / 1 + \exp -125,89 + 3,1926 \times \text{temperatura vaginal média} + 0,02497 \times \text{MAE}$ (P = 0,09). <b>Erro! Indicador não definido.</b>	

<b>Figura 28 - a:</b> Relação entre a duração do estro em horas e o diâmetro máximo do folículo (mm) em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ; N = 47). Estimativa duração de estro = $271,21 + 5,5666 \times \text{diâmetro máximo do folículo} - 0,1543 \times \text{diâmetro máximo do folículo}^2 - 8,0445 \times \text{temperatura vaginal média} + 0,07390 \times \text{MAE}$ (P = 0,05). <b>b:</b> Relação entre a duração do estro em horas e temperatura vaginal em °C (mensurada do D8 ao D14) em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ) lactantes. Efeito da temperatura vaginal de acordo regressão logística multivariada. (N=47). Estimativa duração de estro = $271,21 + 5,5666 \times \text{diâmetro máximo do folículo} - 0,1543 \times \text{diâmetro máximo do folículo}^2 - 8,0445 \times \text{temperatura vaginal média} + 0,07390 \times \text{MAE}$ (P = 0,07). <b>c:</b> Relação entre a duração do estro em horas e a atividade máxima de estro (MAE) vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ) lactantes (N = 47). Efeito da temperatura vaginal de acordo regressão logística multivariada. (N=47). Estimativa duração de estro = $271,21 + 5,5666 \times \text{diâmetro máximo do folículo} - 0,1543 \times \text{diâmetro máximo do folículo}^2 - 8,0445 \times \text{temperatura vaginal média} + 0,07390 \times \text{MAE}$ (P < 0,01).....	82
<b>Figura 29 -</b> Ilustração da hipótese de que a atividade e a intensidade do estro afetem positivamente o estabelecimento da gestação em vacas Girolando ( <i>Bos taurus x Bos indicus</i> ) lactantes submetidas a protocolo de TETF. ....	88
<b>Figura 30 -</b> Vacas Girolando ( <i>Bos taurus x Bos indicus</i> ) lactantes mantidas em freestall. ....	90
<b>Figura 31 -</b> Esquema do protocolo hormonal utilizado na TETF de vacas holandesas lactantes ( <i>Bos taurus x Bos indicus</i> ). ....	90
<b>Figura 32 -</b> Controlador e processador do dispositivo de monitoramento de atividade (DMA). ....	92
<b>Figura 33 -</b> Matriz de confusão do experimento com vacas Girolando lactantes.....	95
<b>Figura 34 -</b> P/TE por tipo de embrião (fresco e congelado) em vacas Girolando ( <i>Bos taurus x Bos indicus</i> ) em lactação (N = 394).....	99
<b>Figura 35 -</b> Relação entre probabilidade de prenhez na TETF de acordo com o tipo de embrião (embrião fresco: linha superior e embrião direct transfer (DT): linha inferior) e a MAEc em vacas Girolando ( <i>Bos taurus x Bos indicus</i> ) em lactação. Efeito do tipo de embrião e MAEc de acordo com a regressão logística multivariada (n = 385). Probabilidade de prenhez = $1 / 1 + \exp (-$	

	1,1890 + 0,009033 x máxima atividade de estro colar - 0,7934 se embrião for do tipo DT); (P = 0,01 para MAEc e 0,02 para tipo de embrião).....	99
<b>Figura 36</b>	- MAEc das vacas Girolando ( <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i> ) lactantes que engravidaram ou que permaneceram vazias após TETF (N = 398).....	102
<b>Figura 37</b>	- MAEp das vacas Girolando ( <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i> ) lactantes que engravidaram ou que permaneceram vazias após TETF (n = 398).....	103
<b>Figura 38</b>	- Produção de leite das vacas Girolando lactantes ( <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i> ) que apresentaram perda gestacional ou não entre 30 e 60 dias após a TETF (n = 133) (P = 0,01).....	104
<b>Figura 39</b>	- MAEc das vacas Girolando lactantes ( <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i> ) que apresentaram perda gestacional ou não entre 30 e 60 dias após TETF (n = 133) (P = 0,03). ....	104
<b>Figura 40</b>	- <b>a:</b> Probabilidade de perda gestacional (entre 30 e 60 dias) de acordo com a máxima atividade de estro avaliada pelo colar (MAEc) em vacas Girolando ( <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i> ) em lactação que receberam TE. Efeito da MAEc de acordo com a regressão logística multivariada. (N = 382). Probabilidade de perda gestacional = $1 / 1 + \exp(-2,8079 + 0,06756 \times \text{produção média de leite} - 0,01930 \times \text{máxima atividade de estro do colar})$ ; (P = 0,05). <b>b:</b> Probabilidade de perda gestacional (entre 30 e 60 dias) de acordo com a produção de leite em vacas Girolando ( <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i> ) em lactação que receberam TE. Efeito da produção de leite de acordo com a regressão logística multivariada. (N = 382) Probabilidade de perda gestacional = $1 / 1 + \exp(-2,8079 + 0,06756 \times \text{produção média de leite} - 0,01930 \times \text{máxima atividade de estro do colar})$ ; (P = 0,05). ....	105

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Taxa de detecção do estro e frequência diurna e noturna do início do estro conforme análise dos dados gerados pelo colar monitor de atividade (CMA) e da leitura do adesivo identificador de monta (AIM) em novilhas Gir ( <i>Bos indicus</i> ). .....	44
<b>Tabela 2 -</b>	Resultados da máxima atividade de estro, máxima intensidade de estro, soma da atividade de estro e soma da intensidade de estro entre os animais que ovularam (Ov+) e animais que apresentaram que não ovularam (Ov - ). .....	47
<b>Tabela 3 -</b>	Resultados da detecção de estro pelo colar monitor de atividade (CMA) utilizando o adesivo identificador de monta (AIM) como “padrão ouro” em novilhas Gir ( <i>Bos indicus</i> ) submetidas a protocolo de sincronização de estro e da ovulação. ....	49
<b>Tabela 4 -</b>	Resultados da detecção de estro pelo colar monitor de atividade (CMA) e adesivo identificador de monta (AIM) utilizando ovulação como “padrão ouro” em novilhas Gir ( <i>Bos indicus</i> ) submetidas a protocolo de sincronização do estro e da ovulação. ....	49
<b>Tabela 5 -</b>	Resultados do diâmetro do folículo no D9, diâmetro máximo do folículo, duração de estro, intervalo retirada de P4-Estro, MAE e MIE entre os grupos que expressaram estro pelo CMA e ovularam (Es-tro/Ov (+)) e animais que apresentaram estro pelo CMA e não ovularam (Estro/Ov (-)). .....	50
<b>Tabela 6 -</b>	Detecção de estro e do momento do início de estro após protocolo de sincronização em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ). .....	72
<b>Tabela 7 -</b>	Resultados do teste de Chi-Quadrado para detecção de estro pelo CMA e observação visual, utilizando o AIM como referência em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ). .....	73
<b>Tabela 8 -</b>	Resultados da detecção de estro pelo CMA e AIM utilizando a ovulação como referência em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ). .....	74

<b>Tabela 9</b> -	Resultados do teste de Chi-Quadrado para detecção de estro pelo CMA e AIM utilizando a ovulação como referência em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ).....	74
<b>Tabela 10</b> -	Resultados do teste de Chi-Quadrado para detecção de estro pelo CMA e observação visual, utilizando a ovulação como referência em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ). .....	74
<b>Tabela 11</b> -	Resultados do teste de Chi-Quadrado para detecção de estro pelo AIM e observação visual, utilizando a ovulação como referência em vacas Holandesas ( <i>Bos taurus</i> ). .....	75
<b>Tabela 12</b> -	Características do estro detectado pelo colar (CMA) e pelo pedômetro em vacas Girolando ( <i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i> ) em lactação.....	96
<b>Tabela 13</b> -	Características do estro de acordo com a alta e baixa atividade e intensidade detectada pelo Colar Monitor de Atividade (CMA) e pelo pedômetro. ....	98
<b>Tabela 14</b> -	Taxa de prenhez (P/TE) de acordo com o perfil da manifestação de estro mensurado pelo colar e pelo pedômetro em vacas Girolando lactantes submetidas a TETF.....	103

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>26</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>27</b>
<b>3.. EXPERIMENTO 1: Validação de sistemas monitores de atividades para predição de estro em novilhas Gir (<i>Bos indicus</i>).....</b>	<b>32</b>
3.1. RESUMO.....	32
3.2. INTRODUÇÃO .....	33
3.3. HIPÓTESE E OBJETIVO.....	34
3.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
<b>3.4.1. Animais, manejo e protocolo hormonal.....</b>	<b>35</b>
<b>3.4.2. Colar monitor de atividade (CMA) .....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.3. Ultrassonografia .....</b>	<b>40</b>
<b>3.4.4. Análises estatísticas .....</b>	<b>41</b>
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	43
<b>3.5.1. Animais e eventos de estro .....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.2. Avaliações ultrassonográficas .....</b>	<b>44</b>
<b>3.5.3. Avaliação da eficiência do dispositivo eletrônico na detecção de estro .....</b>	<b>47</b>
<b>3.5.4. Relação entre os máximos valores de atividade (MAE) e de intensidade (MIE) com o diâmetro do folículo ovulatório .....</b>	<b>51</b>
<b>3.5.5. Fatores que afetam o intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e o início e a duração do estro e a ovulação .....</b>	<b>52</b>
<b>3.5.6 Conclusão.....</b>	<b>58</b>
<b>4. EXPERIMENTO 2: Validação de sistemas monitores de atividades para predição do estro em vacas Holandesas (<i>Bos taurus</i>): influência da temperatura nos parâmetros estrais</b>	

4.1. RESUMO.....	59
4.2. INTRODUÇÃO .....	60
4.3. HIPÓTESES E OBJETIVOS .....	61
4.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
<b>4.4.1. Animais, produção de leite, protocolo hormonal e identificação de estro .....</b>	<b>64</b>
<b>4.4.2. Termômetro vaginal.....</b>	<b>66</b>
<b>4.4.3. Colar Monitor de Atividade (CMA) .....</b>	<b>67</b>
<b>4.4.4. Ultrassonografia .....</b>	<b>68</b>
<b>4.4.5. Análises estatísticas .....</b>	<b>69</b>
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
<b>4.5.1. Animais, número de eventos de estro e avaliações ultrassonográficas .....</b>	<b>71</b>
<b>4.5.2. Avaliação da eficiência do CMA na detecção de estro.....</b>	<b>72</b>
<b>4.5.3. Influência da temperatura vaginal nos parâmetros estrais .....</b>	<b>75</b>
<b>4.5.4 Conclusão .....</b>	<b>85</b>
<b>5..EXPERIMENTO 3: Efeito da atividade e intensidade do estro (avaliados pelo colar e pedômetro) na eficiência reprodutiva de vacas Girolando em lactação (<i>Bos taurus x Bos indicus</i>) submetidas à transferência de embriões em tempo fixo (TETF).....</b>	<b>86</b>
5.1. RESUMO.....	86
5.2. INTRODUÇÃO .....	87
5.3. HIPÓTESE E OBJETIVO.....	88
5.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	88
<b>5.4.1. Animais, produção de leite, protocolo hormonal e identificação de estro .....</b>	<b>88</b>
<b>5.4.2. Dispositivo de monitoramento de atividade (DMA) e eventos de estro .....</b>	<b>91</b>
<b>5.4.3. Ultrassonografia .....</b>	<b>92</b>
<b>5.4.4. Transferência de embriões.....</b>	<b>93</b>
<b>5.4.5. Análises estatísticas .....</b>	<b>93</b>



5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
<b>5.5.1. Número de animais, eventos de estro e eficiência do colar (CMA).....</b>	<b>95</b>
<b>5.5.2. Descrição dos eventos de estro .....</b>	<b>96</b>
<b>5.5.3. Caracterização dos eventos de estro de acordo com a atividade e intensidade....</b>	<b>97</b>
<b>5.5.4. Fatores que afetam a taxa de prenhez e perda gestacional.....</b>	<b>98</b>
<b>5.5.5 Conclusão .....</b>	<b>106</b>
<b>6. IMPLICAÇÕES PRÁTICAS: .....</b>	<b>107</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>108</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Segundo relatório da ONU (Organização das Nações Unidas) publicado em 2019 a população mundial deve crescer 2 bilhões de pessoas nos próximos 30 anos, passando dos atuais 7,7 bilhões para 9,7 bilhões de habitantes em 2050. De acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) os padrões de consumo de alimentos no mundo estão se tornando similares entre os países, deslocando-se em direção a alimentos de maior qualidade e valor nutricional, como os produtos derivados de carne e leite. O consumo de carne nos países em desenvolvimento, por exemplo, aumentou de 10 quilos por habitante por ano em 1964-66 para 26 quilos habitante por ano em 1997-99. A projeção é que este consumo aumente para 37 quilos per capita por ano até 2030. O leite e os produtos lácteos também têm apresentado rápido crescimento, com o consumo per capita passando de 28 quilos por ano em 1964-66 para 45 quilos por ano em 2003, e deverá aumentar para 66 quilos por habitante por ano até 2030 (BRUINSMA et al., 2003).

Para que a produção de alimento consiga atender a futura demanda é necessário que a agricultura e a pecuária sejam mais eficientes. Gröhn e Rajala-Schultz (2000) afirmam que a reprodução impacta diretamente na eficiência de produção de leite, pois altera a proporção de vacas em lactação no rebanho e modifica o número médio de dias em lactação. Um baixo desempenho reprodutivo determina menor produção de leite e de bezerros, incremento nas despesas de manutenção com vacas secas, maiores taxas de descarte e maior número de doses de sêmen por concepção.

Propriedades com sistemas comerciais de produção de leite requerem atenção especial com as questões reprodutivas tais como, manejo reprodutivo, controle do ciclo estral e infecções pós-parto com vistas à obtenção de índices reprodutivos sustentáveis. Wiltbank et al. (2006) relataram que elevados níveis de produção de leite são associados a maior ingestão de nutrientes e aumento da atividade metabólica, que afetam a eficiência reprodutiva pela redução na taxa de detecção do estro e redução das chances de prenhez após a inseminação. Segundo Gaines (1994), o ganho potencial resultante do incremento na taxa reprodutiva é cinco vezes maior que o esperado pelo aumento da qualidade do leite e três vezes maior que o esperado pelo melhoramento genético, sendo apenas inferior aos ganhos que podem ser obtidos pela melhoria da nutrição. Estudos estimam que a infertilidade resulta em perda líquida média de US\$ 116 por vaca leiteira, totalizando

prejuízos de quase US \$ 1,3 bilhão na indústria láctea do EUA (PELISSIER, 1982). O autor ainda enfatiza que a melhora nas taxas de detecção do estro e de concepção poderiam reduzir drasticamente as perdas causadas por distúrbios reprodutivos. Por outro lado, a detecção de estro é um problema que decorre não só devido à baixa intensidade de manifestação dos sinais externos (DOBSON et al., 2007), mas também devido à baixa disponibilidade de mão de obra para realizar esse serviço (RUTTEN et al., 2013). Nesse contexto, o uso de tecnologias de automação para mensurar os aspectos fisiológicos, comportamentais e indicadores de produção é uma relevante estratégia para melhorar o manejo e a eficiência das propriedades, diminuindo a necessidade de detecção de estro por observação visual para o emprego de biotecnologias da reprodução e, conseqüentemente, melhorando a produtividade e rentabilidade de fazendas leiteiras (BEWLEY, 2010).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Estro ou cio é o período da fase reprodutiva da fêmea em que ela demonstra receptividade sexual. Todas as fêmeas domésticas, independentemente da espécie, aceitam a monta pelo macho nesse período. As vacas, particularmente, se deixam montar por machos ou outras vacas. Além disso outras alterações podem ser observadas, tais como: hiperemia vaginal, redução no consumo de alimento, inquietude, corrimento vaginal com muco cristalino, monta em outros animais e vocalização. Há, ainda nesse período, liberação de feromônios que são percebidos pelos outros animais e estimulam o comportamento de interesse sexual e monta (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Nessa fase do ciclo estral a fêmea bovina encontra-se sob influência do estrógeno produzido pelo folículo ovariano. O aumento crescente de estrógeno atua como feedback negativo na liberação de hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise. O folículo dominante, ao contrário dos folículos subordinados, possui receptores de hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa e por isso continuam a crescer na ausência de FSH e respondem ao aumento da pulsatilidade de LH (XU et al., 1995). A ovulação ocorre por volta de 30 horas após o início do comportamento de estro (ROELOFS et al., 2005), quando o estrógeno (E2) promove feedback

positivo no hipotálamo e na pituitária anterior, estimulando a liberação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e que estimula a liberação de LH induzindo a maturação e ovulação do folículo dominante (ROCHE, 1996; WALKER et al., 1996). Após a ovulação, o LH atua na formação do corpo lúteo (CL), luteinizando as células da teca e da granulosa do folículo dominante ovulado (FORDE et al., 2011). O CL produz progesterona (P4) que é fundamental para a manutenção da gestação (SENGER, 2005).

Em vacas de leite, especialmente as de alta produção, há redução na manifestação dos sinais de estro, dificultando a identificação das fêmeas em estro e impactando negativamente na performance reprodutiva da fazenda. De acordo com Dobson et al. (2007), nos últimos 50 anos houve redução de 80% para 50% na manifestação de estro em vacas de leite, associada a redução na duração do estro de 15 para apenas 5 horas. Fatores como a produção de leite, o tipo de piso onde as vacas estão alojadas, a ocorrência de problemas de casco e a ordem de parto, afetam a manifestação dos comportamentos de estro e a sua duração (DISKIN; SREENAN, 2000; DOBSON et al., 2007; WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011). Em estudos realizados por Lopez, Satter e Wiltbank (2004) vacas de leite com produção superior a 39,5kg leite/dia apresentaram estros mais curtos do que aquelas de menor produção ( $6.2 \pm 0.5h$  versus  $10.9 \pm 0.7h$ ;  $P < 0.0001$ ). Além disso a duração ( $21.7 \pm 1.3s$  versus  $28.2 \pm 1.9s$ ;  $P = 0.007$ ) e a quantidade ( $6.3 \pm 0.4$  versus  $8.8 \pm 0.6$ ;  $P = 0.001$ ) dos episódios de estro também foram menores para o grupo com maior produção de leite, respectivamente. Uma das explicações para a menor duração e intensidade da manifestação do estro são as menores concentrações plasmáticas de estrógeno, decorrentes de maior “clearance” hepático de esteróides em vacas de leite de alta produção (WILTBANK et al., 2006).

Assim como a produção de leite, a temperatura é um dos importantes fatores ambientais que interferem significativamente na reprodução (LEE, 1965). Ela afeta direta e indiretamente os parâmetros produtivos, fisiológicos, de saúde e comportamentais (THATCHER, 1974; COOK et al., 2007; TUCKER; ROGERS; SHUTZ, 2008; RHOADS et al., 2009). Animais expostos à altas temperaturas, elevam sua temperatura corporal central e tendem a passar mais tempo em pé (ANDERSON et al., 2013; IGONO et al., 1985; ZAHNER et al., 2004), acarretando maior prevalência de casos de laminite, além de perdas na produção de leite (LEONARD; O’CONNELL; O’FARRELL, 1996; COOK et al., 2007). St-Pierre, Cobanov e Schnitkey (2003) apontam que o estresse calórico é o responsável por perdas na ordem de \$900 milhões por ano na produção leiteira

nos Estados Unidos. O estresse térmico afeta a atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) e, conseqüentemente, a função reprodutiva, mostrando haver uma possível relação com a liberação dos hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) (SELYE, 1936). Os hormônios relacionados ao estresse podem influenciar a função sexual em três níveis do eixo HHG: no hipotálamo, por meio do CRH (hormônio liberador de corticotrofina), inibindo a secreção de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) e, conseqüentemente, na hipófise anterior, diminuindo a liberação de LH (hormônio luteinizante) e de FSH (hormônio folículo estimulante), alterando nas gônadas o efeito estimulatório das gonadotrofinas (PEREIRA, 2005) e, assim, prejudicando a reprodução animal. Com a diminuição da liberação das gonadotrofinas (LH e FSH), a produção de estrógenos também será afetada, o que irá acarretar diversos transtornos reprodutivos como: falhas na detecção do estro ocasionadas pela diminuição dos comportamentos característicos da fase estrogênica do ciclo estral, falhas no desenvolvimento, na qualidade e na fertilização do oócito, comprometimentos na implantação do embrião principalmente devido à preparação inadequada do útero e a formação de um corpo lúteo de má qualidade (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003). Ainda, esses transtornos podem levar a fêmea a uma condição de anestro ou ninfomania (GRUNERT; BIRGE; VALE, 2005). Em estudos realizados por Wilson et al. (1998), o estresse calórico inibiu o crescimento folicular e a dominância durante o período pré-ovulatório. Vacas submetidas ao estresse térmico apresentaram função ovariana anormal, com menor concentração de estradiol durante o período de pró-estro, maior número de ondas foliculares por ciclo estral e fases luteínicas mais longas. Her et al. (1988) relatam que vacas com maior temperatura corporal tendem a demonstrar menos comportamento de estro e apresentam mais ovulações sem manifestação de estro. Torres-Júnior (2007), ao avaliar o efeito do estresse calórico na produção *in vitro* de embriões em vacas *Bos indicus* observou que animais em estresse diminuíram o consumo de matéria seca, apresentaram longos períodos de ausência de ciclicidade ( $P_4 < 1\text{ng/mL}$ ), maior diâmetro folicular e co-dominância, além de comprometimento na produção *in vitro* de embriões por um período superior a 105 dias.

Devido à crescente dificuldade na disponibilidade de mão de obra no campo, aliada a menor expressão de estro, como descrito anteriormente, tecnologias de precisão que dispensam à necessidade de observação visual do estro e automatizam sua detecção vêm sendo desenvolvidas há alguns anos. A primeira patente de um equipamento com essa finalidade foi concedida em 1974 (POLSON, 1974) e descreve um aparato eletrônico para a detecção e registro do comportamento

de estro baseado em um sensor de pressão fixado na garupa da vaca e que transmite um sinal de rádio quando a vaca recebe a monta por outros animais. Nos dias de hoje, dispositivos mais modernos avaliam o comportamento das atividades dos animais. A relação entre o aumento da atividade física e a manifestação do estro é conhecida há bastante tempo (FARRIS, 1954). Trabalho realizado em 1977 por Kiddy, foi um dos pioneiros a utilizar pedômetros, que inicialmente haviam sido desenvolvidos para uso humano, para registrar a variação na atividade física durante o estro de vacas da raça Holandesa. Nesse estudo, observou-se aumento de 393% na atividade física dos animais durante o estro. Trabalhos como esse foram a base para o desenvolvimento de equipamentos próprios para o monitoramento da atividade física e da detecção do estro em bovinos. Atualmente existem dois tipos de monitores de atividade disponíveis: 1) pedômetros, que são usualmente utilizados na perna do animal e 2) acelerômetros, que tem sido utilizado no pescoço, perna ou orelha (SAINT-DIZIER; CHASTANT-MAILLARD, 2012). Os pedômetros medem o número de passos dados e os acelerômetros medem um movimento tridimensional, estimando a atividade geral do animal (FRICKE et al., 2014). Além dos equipamentos, algoritmos foram desenvolvidos usando ferramentas de computação científica, como *machine learning* que consideram, entre outros parâmetros, a média da atividade física do animal nos dias que precedem o estro, o intervalo do último estro e/ou inseminação e o ritmo circadiano da atividade física (LØVENDAHL; CHAGUNDA, 2010) para determinar o momento ótimo para a realização da inseminação artificial. Roelofs e Van Erp-van der Kooij (2015) ao compilarem estudos utilizando monitores de atividade para detecção de estro entre 2010 e 2014, verificaram que a sensibilidade dos equipamentos variou de 36 a 78% e foram superiores às encontradas para observação visual (20 a 59%). Encontraram, também, que o valor preditivo positivo (VPP) variou entre 74 e 97%, porém não foram superiores à observação visual. Corroborando com os achados de outros autores, Chanvallon et al. (2014) constataram sensibilidade de 62% para os colares e 71% para os pedômetros e VPP de 83% para os colares e 71% para os pedômetros. Madureira (2016) encontrou VPP de 89,6 e 85,5% para dois diferentes monitores que detectam a atividade de estro. Altos valores de sensibilidade garantem que haja menos casos de animais falso negativos, ou seja, que estavam em estro, porém o equipamento foi incapaz de determinar. Além disso, altos valores preditivos positivos garantem que haja menos casos de falso positivos, ou seja, menos alertas são gerados quando a vaca não se encontra realmente em estro.

Os efeitos da condição metabólica do animal e a dinâmica do crescimento folicular e a taxa de prenhez tem sido extensivamente estudada em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). No entanto, existem limitadas informações científicas disponíveis que associam tais efeitos com a intensidade de estro, assim como a intensidade de estro com a fertilidade. Informações quantitativas sobre a intensidade do estro mensurada por monitores de atividade podem ser usadas para melhorar a acurácia da detecção de estro, prever os resultados na prenhez, e especialmente ser usada como ferramenta estratégica para melhorar a tomada de decisões em programas reprodutivos (ex: utilização de sêmen ou embrião de melhor qualidade, re-sincronização, avaliação histórica do animal, etc) (MADUREIRA, 2016).

### 3. EXPERIMENTO 1: Validação de sistemas monitores de atividades para predição de estro em novilhas Gir (*Bos indicus*)

#### 3.1. RESUMO

O objetivo desse estudo foi validar a precisão de colares monitores de atividade (CMA) para detecção de estro em novilhas Gir (*Bos indicus*) através da análise da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia. Além disso, procurou-se avaliar a relação entre a intensidade e a atividade de estro com o diâmetro do folículo ovulatório. A taxa de detecção de estro pelo CMA foi de 95% (77/81). Quando o adesivo identificador de monta (AIM) foi usado como teste de referência, a sensibilidade do CMA foi de 95,0%, o valor preditivo positivo de 98,7% e a acurácia de 93,8%. A especificidade e o valor preditivo negativo não puderam ser calculados pois não houve animais verdadeiros negativos (negativos pelo AIM e pelo CMA). Quando a ovulação foi usada como teste referência para análise do CMA, a sensibilidade foi 95,2%, a especificidade 5,3%, o valor preditivo positivo 76,6%, o valor preditivo negativo 25,0% e a acurácia 74,1%. Para o AIM, a sensibilidade foi 98,0%, o valor preditivo positivo 76,0% e a acurácia 75,0%. Para o AIM a especificidade e o valor preditivo negativo não puderam ser calculados pois não houve animais verdadeiros negativos. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre o CMA e o AIM para a sensibilidade ( $P = 0,31$ ), VPP ( $P = 0,96$ ) e acurácia ( $P = 0,86$ ). Não foram encontradas relações significativas entre a máxima atividade de estro (MAE) e o diâmetro do maior folículo 24 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 ( $R^2 = 0,16$ ;  $P = 0,17$ ) e o diâmetro máximo do folículo ovulatório ( $R^2 = 0,12$ ;  $P = 0,31$ ). Relações significativas foram encontradas entre os valores de máxima intensidade de estro (MIE) e o diâmetro do maior folículo 24 horas após a retirada de P4 ( $R^2 = 0,27$ ;  $P = 0,02$ ) e o diâmetro máximo do folículo ovulatório ( $R^2 = 0,23$ ;  $P = 0,04$ ). Entretanto as correlações foram fracas (baixo de  $R^2 = 0,3$ ). Os resultados encontrados são indicativos de que a eficiência do CMA foi semelhante a eficiência do AIM, podendo ser usado como método eletrônico de detecção de estro em novilhas Gir (*Bos indicus*). Ainda, parâmetros como a máxima atividade de estro MAE e máxima intensidade de estro (MIE) não foram validados como métodos indiretos de avaliação de diâmetro folicular.



### 3.2. INTRODUÇÃO

De acordo com Senger (1994), um sistema de detecção de estro deve ter como princípio uma elevada acurácia na detecção, com reduzido uso de mão de obra e com uma indicação apropriada do momento ótimo para realização da inseminação artificial. Dessa forma, um sistema automático de detecção de estro deve garantir um monitoramento contínuo e confiável de mudanças fisiológicas ou comportamentais que ocorrem durante o estro. Inúmeros trabalhos indicam que o uso de acelerômetros na forma de colar é eficiente na detecção de estro em animais *Bos taurus* (MADUREIRA, 2016). Entretanto, não há relatos na literatura se essas tecnologias têm a mesma eficiência em animais *Bos indicus*.

Vacas leiteiras *Bos taurus* se diferenciam de vacas leiteiras *Bos indicus* em diversos aspectos reprodutivos, como na duração da receptividade sexual, que é de 30 minutos a 27 horas em vacas leiteiras taurinas (LOPEZ et al., 2004) e 1,3 e 20 horas em vacas zebuínas (revisado por BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003). Adicionalmente, diferenças no comportamento estral podem ser notadas entre diferentes grupos genéticos (*Bos indicus* vs *Bos taurus*). Sugere-se que fêmeas *Bos indicus* apresentem estro de duração mais curta (em média de 10 horas), o que dificulta sua detecção (GALINA; ARTUR, 1990 - revisado em (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003)). Adicionalmente, foi verificado que mais de 50% dos animais desse grupo genético iniciam a manifestação de estro no período noturno (entre 6:00h da tarde e 6:00 h da manhã) (PINHEIRO et al. 1998; MEMBRIVE, 2000), sendo que cerca de 30% iniciam e encerram o estro durante a noite (PINHEIRO et al. 1998), dificultando o manejo e a eficácia da detecção de estro.

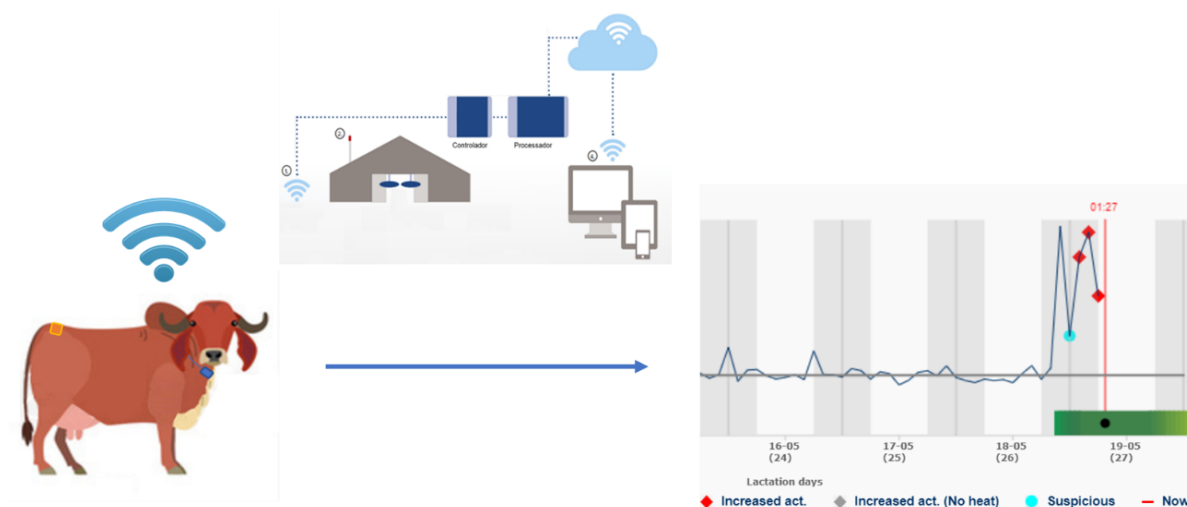
Ainda não são claros na literatura os efeitos do grupo genético (*Bos indicus* ou *Bos taurus*) e do diâmetro folicular pré-ovulatório na intensidade e duração do estro. Além disso, a tecnologia eletrônica de detecção de atividade de estro utilizada atualmente evoluiu significativamente, os sensores tornaram-se mais sensíveis e diferentes algoritmos são usados para analisar os dados brutos, o que pode alterar a interpretação e a relação das informações com as medidas fenotípicas.

Tendo em vista as diferenças entre os grupos genéticos e a dificuldade de detecção do estro, trabalhos que validam o uso de colares com acelerômetros como ferramenta de detecção de estro em animais *Bos indicus* são relevantes, uma vez que possibilitam o uso e a difusão de biotecnologias da reprodução nas fazendas leiteiras que possuem rebanhos de animais zebuínos e/ou cruzados (Girolando).

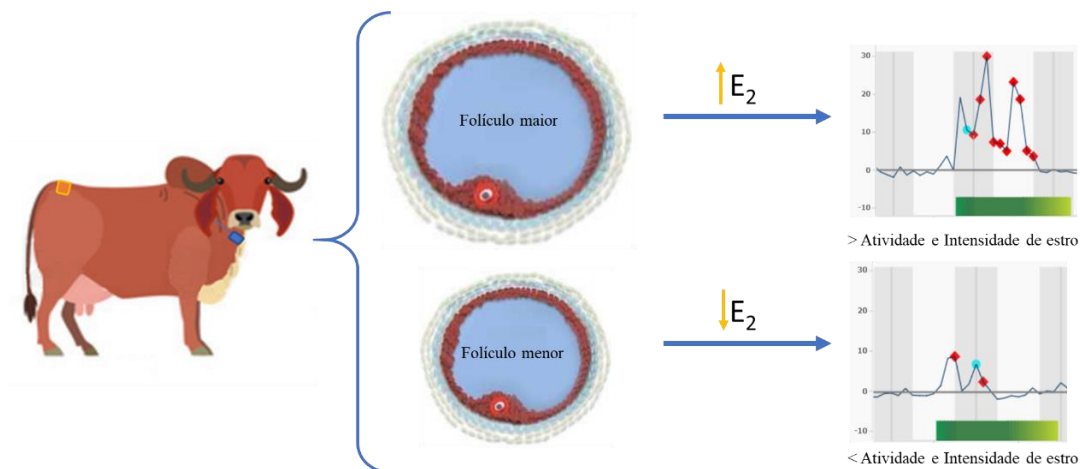
### 3.3. HIPÓTESE E OBJETIVO

Esse experimento possui duas hipóteses. A primeira é que o CMA é eficiente na detecção do estro de animais *Bos indicus* (Gir Leiteiro; Figura 1) e a segunda é que existe relação positiva ( $R^2 > 0,7$ ) entre o tamanho máximo do maior folículo presente no ovário e a atividade e intensidade de estro mensurada pelo equipamento (Figura 2).

Os objetivos desse experimento foram: 1) mensurar a eficiência do CMA em detectar estro em animais *Bos indicus* pela sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia e, 2) verificar se há relação entre a intensidade e a atividade de estro com o diâmetro máximo do folículo ovulatório.



**Figura 1** - Ilustração da hipótese 1 - O colar monitor de atividade (CMA) é eficiente na detecção de estro de novilhas Gir (*Bos indicus*).



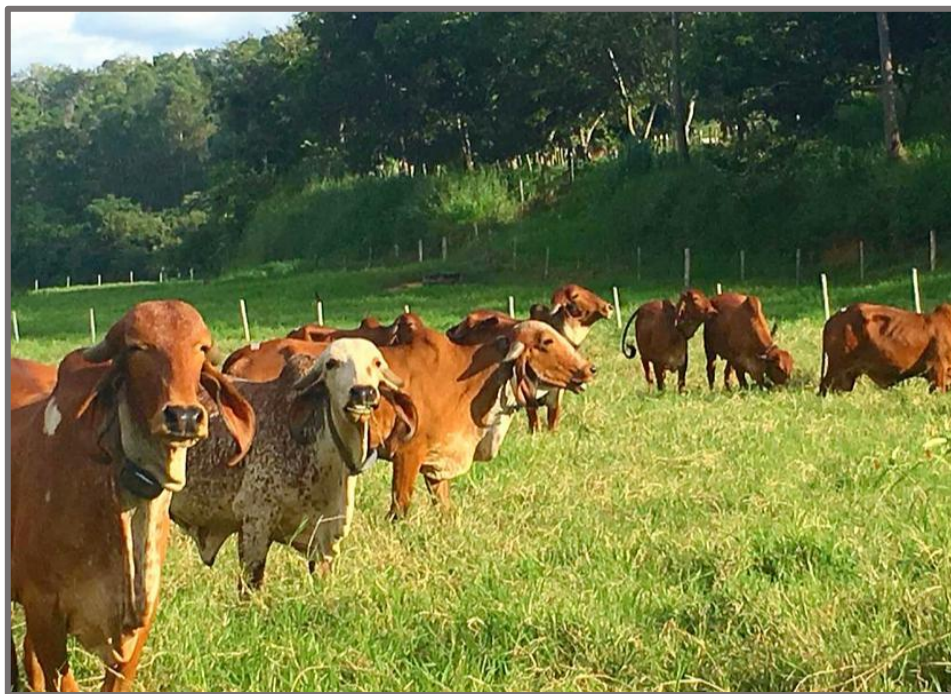
**Figura 2** - Ilustração da hipótese 2 – Há relação positiva entre o diâmetro do folículo ovulatório e a atividade e intensidade de estro em novilhas Gir (*Bos indicus*).

### 3.4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.4.1. Animais, manejo e protocolo hormonal

O experimento foi realizado nas Fazendas do Basa localizada na cidade de Leopoldina estado de Minas Gerais. Foram utilizadas 81 novilhas da raça Gir Leiteiro entre os meses de fevereiro e maio de 2019. Todos os animais foram mantidos a pasto e receberam no cocho mix de concentrado e volumoso formulado para exceder os requerimentos da categoria. O piquete contava com sombra e água *ad libitum*. A idade das novilhas variou de 23 até 41 meses com média de 28 meses. Somente novilhas púberes foram utilizadas nesse estudo (Figura 3).

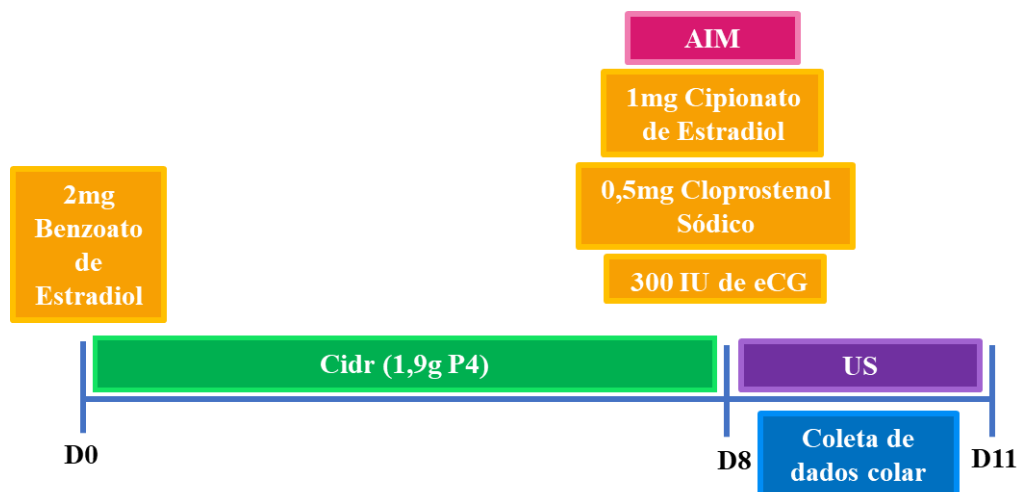
Para sincronizar o estro e a ovulação dos animais, no dia 0 do experimento os animais receberam 2 mg de Benzoato de estradiol (RicBE®, Tecnopec, Brasil) e um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; Cidr ® Zoetis, Brasil). No d8, o dispositivo de P4 foi retirado e todas as fêmeas receberam um adesivo identificador de monta (AIM, Estrotect™, EUA) (Figura 4), que foi avaliado 2x ao dia, 0,5mg de Clorprostenol sódico (Ciosin®, MSD, São Paulo, Brasil), 1mg de cipionato de estradiol (ECP®, Zoetis, Brasil) e 300 IU de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Folligon®, MSD, Brasil) (Figura 5).



**Figura 3** - Novilhas Gir (*Bos indicus*) do experimento 1.



**Figura 4** - Adesivo identificador de monta.



**Figura 5** - Esquema do protocolo hormonal utilizado para sincronização das novilhas Gir (*Bos indicus*).

### 3.4.2. Colar monitor de atividade (CMA)

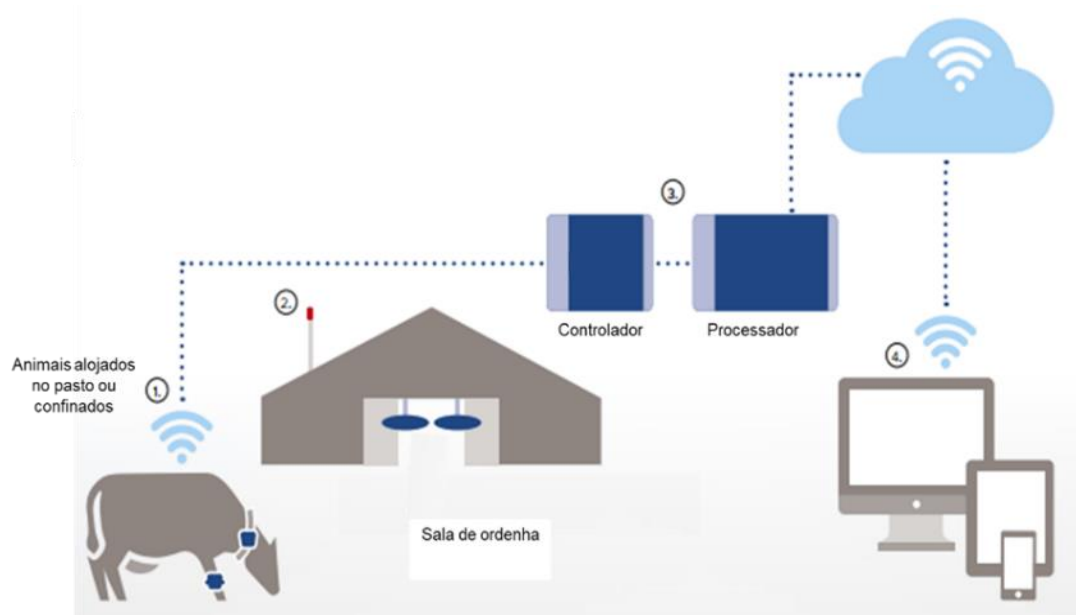
O CMA é composto por 4 componentes, uma antena, um controlador, um processador e os colares (Figura 6). Antes dos animais receberem os colares, o equipamento foi instalado na fazenda 30 dias antes do início da primeira rodada do experimento. A antena foi disposta de forma a captar os sinais dos colares 24 horas por dia. Conectado a ela foi instalado o controlador que é responsável por captar todas as informações da antena e o processador que é o equipamento que lê os dados e os transforma em informações. O processador foi conectado a um notebook com acesso à internet e todas as informações de estro puderam ser acessadas na plataforma online do CMA.

O colar funciona com base em um acelerômetro que fica disposto em seu interior. Esse acelerômetro é capaz de reconhecer quais os movimentos de cabeça são específicos de estro e quão intensos esses movimentos são. Os dados de atividade e intensidade foram registrados a cada 2 horas e enviados para a antena, controlador, processador e finalmente para a plataforma online. A atividade medida pelo equipamento é baseada no número de movimentos de cabeça relacionados a estro (repouso de queixo, monta, movimentos inquietos de cabeça) que o animal apresentou no

período de 2 horas e a intensidade é calculada pelo score  $Z$ , que é o quanto uma medida se afasta da média em termos de desvios padrão.

Todos os animais do experimento receberam o CMA no dia 0 do protocolo de sincronização (Figura 7 e 8).

O dispositivo CMA indica os eventos baseados em duas variáveis: atividade e intensidade. A atividade é estabelecida pela quantidade de movimentos de cabeça que correspondem ao estro, avaliada em um período de 2 horas. A atividade é apresentada em números absolutos, enquanto a intensidade leva em consideração o quão intensos são esses movimentos e é apresentada na forma de desvio padrão.



**Figura 6** - Ilustração dos componentes e modo de funcionamento dos colares monitores de atividade (CMA).





**Figura 7** - Novilha Gir com colar monitor de atividade (CMA).



**Figura 8** - Novilhas Gir com colar monitor de atividade (C

### 3.4.3. Ultrassonografia

O diâmetro do folículo dominante foi mensurado por ultrassonografia Modo B (Mindray DP 2220, Mindray Bio-Medical Electronics, China) duas vezes ao dia a partir do dia 9 do protocolo (24 horas após a retirada da P4) até a ovulação ou até dia 11 (Figura 9). Dia 20 do protocolo novos exames ultrassonográficos foram realizados para determinar a presença de corpo lúteo (CL) e confirmar a ovulação. Animais que apresentaram CL no d20, porém não ovularam até d11, foram classificados não sincronizados e sua ovulação não foi considerada nas análises.



**Figura 9** - Ultrassonografia utilizada para a dinâmica folicular.



#### 3.4.4. Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Raleigh, NC). Variáveis contínuas foram analisadas por ANOVA (análise de variância) com o PROC MIXED. Os dados binários foram analisados por regressão logística com o PROC GLIMMIX. Para a construção do modelo foi utilizado réplica e estação do ano como variáveis classificatórias.

Para cada um dos resultados avaliados, foram realizadas análises univariáveis para determinar se outras variáveis explicativas deveriam constar no modelo multivariável. As variáveis contínuas foram testadas para efeitos linear e quadrático. Todas as variáveis com  $P \leq 0.10$  na análise univariável foram adicionadas no modelo multivariável. Procedimento REG com “collin” e *variance inflation factor* (VIF) foi usado para testar colinearidade entre as variáveis para cada modelo multivariável. Variáveis com  $VIF \geq 5$  foram consideradas colineares e foram retiradas do modelo. Ao realizar as análises do modelo multivariado as variáveis que apresentaram valores de  $P > 0,10$  foram retiradas do modelo uma a uma em ordem crescente.

A curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi calculada pelo software MedCalc (MedCalc software, Mariakerke, Bélgica) e foi utilizada para testar quanto a sensibilidade, especificidade e valor de P, o modelo matemático da variável binomial ovulação e também para determinar o ponto de corte para o diâmetro do folículo 24 horas após a retirada da P4. As análises de correlações foram realizadas no Excel® (Microsoft Office 365, Washington, Estados Unidos). Diferenças com  $P \leq 0,05$  foram consideradas significativas enquanto  $0,05 > P < 0,10$  foi considerado tendência.

Os dados de atividade e intensidade de estro foram analisados com base na variável máxima de atividade e intensidade que o animal apresentou durante o período de estro. A relação entre a intensidade de estro e a atividade com a tamanho do folículo foi verificada utilizando o procedimento PROC CORR do SAS.

Para verificar se havia diferença estatística entre a taxa de detecção de estro do CMA, AIM e observação visual foi utilizado PROC GENMOD do SAS.

A fim de analisar as variáveis diâmetro do folículo no D9 do protocolo, diâmetro máximo do folículo, duração de estro, MAE e MIE entre os animais que demonstraram estro pelo CMA e ovularam (EpOp) e animais que demonstram estro pelo CMA porém não ovularam (EpOn) foram formados dois grupos. Foi realizada análise de variância utilizando o PROC GLIMMIX do SAS com ajuste para Tukey.

Para calcular a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia foi estabelecida uma matriz de confusão (Figura 10) que consistiu em classificar os eventos de estro identificados pelo CMA em verdadeiros positivos (VP), verdadeiros negativos (VN), falso positivos (FP) e falso negativos (FN). Duas análises foram realizadas, a primeira o AIM foi escolhido como padrão “ouro” para o CMA e na segunda foi a ovulação a referência para o CMA e para o AIM. As fórmulas para cálculo das características do teste estão representadas abaixo.

- Sensibilidade =  $VP / (VP + FN)$  - É a capacidade que o teste (CMA ou AIM) tem de detectar em estro os animais que realmente estão em estro.
- Especificidade =  $VN / (VN + FP)$  - É a capacidade que o teste tem de detectar os verdadeiros negativos, isto é, de diagnosticar corretamente os indivíduos fora de estro.
- Valor Preditivo Negativo (VPN) =  $VN / (VN + FN)$  - É a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado positivo estar realmente em estro
- Valor Preditivo Positivo (VPP) =  $VP / (VP + FP)$  - É a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado negativo não estar realmente em estro
- Acurácia =  $(VP + VN) / (VP + FP + VN + FN)$  - Identifica a porcentagem de animais que foram corretamente classificados (em estro ou não) pelo teste.

		Valores preditos pelo padrão ouro	
		Positivo	Negativo
Valores do teste	Positivo	Verdadeiro Positivo (VP)	Falso positivo (FP)
	Negativo	Falso negativo (FN)	Verdadeiro Negativo (VN)

**Figura 10** - Matriz de confusão usada para determinar os animais verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falso positivos e falso negativos.

As sensibilidades, especificidades, VPN, VPP e acurácia entre os métodos de detecção de estro (CMA e AIM) foram comparadas pelo teste de Chi-Quadrado e calculadas através da calculadora do site: [www.socscistatistics.com/tests/chisquare/default2.aspx](http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/default2.aspx).

### 3.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.5.1. Animais e eventos de estro

Durante o experimento, 95% (77/81) das novilhas foram detectadas em estro pelo CMA, enquanto 98,7% (80/81) ativaram o adesivo identificador de monta (AIM). Não se verificou diferenças entre os dispositivos de detecção de estro ( $P = 0,29$ ).

Dos 77 estros detectados pelo CMA, 63,4% (49/77) tiveram início entre 6:00h e 17:59h (durante o dia), enquanto 36,4% (28/77) tiveram início entre 18:00h e 5:59h (durante a noite). Dos 80 estros detectados pelo AIM, 48,8% (39/80) foram ativados entre 6:00h e 17:59h e 51,1% (41/80) entre 18:00h e 5:59h. Os dados levantados pelo dispositivo AIM corroboram com os achados de Pinheiro et al. (1998) e Membrive (2000), que verificaram mais de 50% de fêmeas *Bos indicus* com início de manifestação de cio no período noturno (entre 18:00 e 6:00 h; Tabela 1).

**Tabela 1** - Taxa de detecção do estro e frequência diurna e noturna do início do estro conforme análise dos dados gerados pelo colar monitor de atividade (CMA) e da leitura do adesivo identificador de monta (AIM) em novilhas Gir (*Bos indicus*).

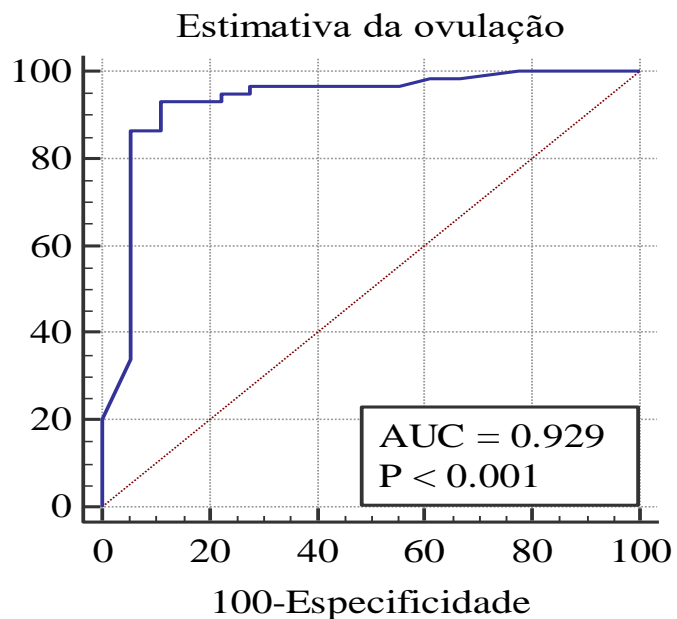
	CMA	AIM	Valor de P
Detecção de estro	95% (77/81)	98,7% (80/81)	0,29
Estro diurno (6:00 às 17:59h)	63,4% (49/77)	48,8% (39/80)	-
Estro noturno (18:00 às 5:59h)	36,4% (28/77)	51,1% (41/80)	-

### 3.5.2. Avaliações ultrassonográficas

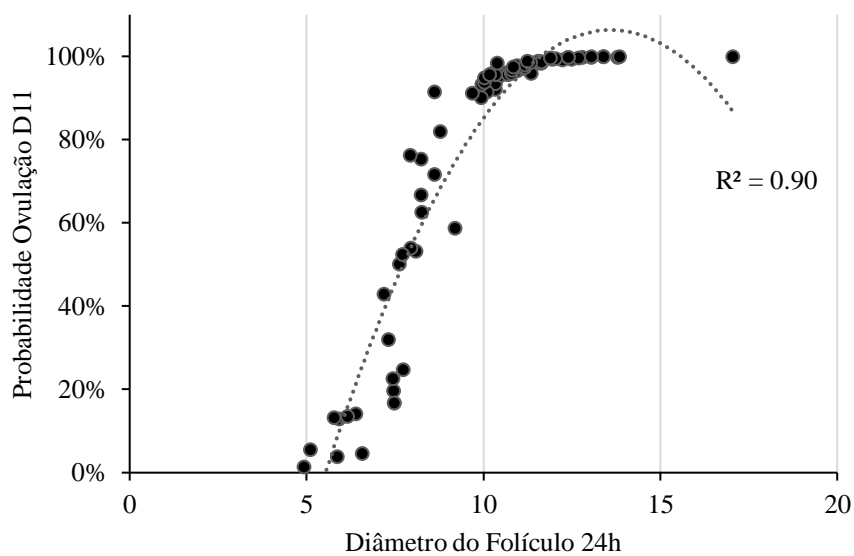
A taxa de ovulação ao final do protocolo de sincronização foi de 76,5% (62/81). O diâmetro médio do folículo ovulatório foi de  $12,1 \pm 1,55$  mm. Dos 19 animais que não ovularam até o final das avaliações ultrassonográficas (dia 11 do protocolo), 6 (31,6%) apresentaram CL no dia 18. Porém, essas ovulações não foram consideradas nas análises por terem ocorrido em dessincronia com as demais.

Ao analisar os dados por regressão logística multivariada, o diâmetro do folículo 24 h após a retirada do dispositivo de P4 foi a única variável significativa que permaneceu no modelo estatístico final da estimativa da ovulação ( $P < 0,01$ ). Essa variável foi testada quanto a sensibilidade e especificidade pela curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*; Figura 11). Foi encontrada sensibilidade de 93,2 e especificidade de 88,9 ( $P < 0,01$ ) e área sob a curva de 0,93 (95% intervalo de confiança (CI) = 0.847 a 0.975). A análise da curva ROC também foi utilizada para determinar o ponto de “corte” do diâmetro do folículo 24 horas após retirada da P4. Verificou-se maximização da soma da sensibilidade e especificidade quando o folículo possui diâmetro maior que 7,95 mm [95% intervalo de confiança (CI) = 0.6380 a 0.947;  $P < 0,01$ ]. Também, foi observada forte relação positiva entre o diâmetro do maior folículo 24 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e a probabilidade de ovulação ( $R^2 = 0,90$ ; Figura 12). Estes resultados coincidem com outros

estudos realizados em *Bos taurus* (VASCONCELOS et al., 1999, 2001; MUSSARD et al., 2007) e *Bos indicus* (MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010a). Sá Filho et al. (2010a) verificaram que a ovulação de animais *Bos indicus* submetidos a protocolo de IATF foi associada ( $P < 0,001$ ) ao diâmetro do folículo dominante no momento da inseminação e que a probabilidade de ovulação aumentou conforme aumentou o diâmetro folicular. Entretanto, os autores relatam que os efeitos positivos do tamanho do maior folículo atingiram um platô após 12–13 mm de diâmetro. Vasconcelos et al. (2001) relataram que quando os folículos de vacas Holandesas foram aspirados no meio de um protocolo de IATF, resultando no surgimento de uma nova onda de crescimento folicular e na redução do diâmetro do folículo ovulatório, verificou-se redução nas concentrações circulantes de estradiol ao final do protocolo de sincronização, com reduções na concentração de progesterona no diestro subsequente e na taxa de prenhez à inseminação artificial. Mussard et al. (2007) demonstraram que a ovulação prematura de um folículo dominante induzida por GnRH reduziu o diâmetro do folículo ovulatório, a fertilidade e a função luteal subsequente. Essas informações evidenciam a importância do diâmetro do folículo ovulatório na eficiência dos programas de reprodução assistida que empregam protocolos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação.



**Figura 11** - Curva ROC para a estimativa da ovulação em novilhas Gir (*Bos indicus*).



**Figura 12** - Probabilidade de ovulação (%) em relação ao diâmetro (mm) do folículo ovulatório no D9 (24 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de P4) em novilhas Gir (*Bos indicus*). Efeito do diâmetro do folículo de conforme regressão logística multivariada (N = 81). Equação de probabilidade de ovulação =  $1/1 + \exp(-9,6507 + 1,2181 \times \text{Diâmetro do folículo no D9})$ ; P = 0,01).

A fim de estudar melhor as diferenças nos parâmetros de estro mensurados pelo CMA nos animais que ovularam e que não ovularam, outra análise estatística foi realizada. Dessa vez, foi usada ANOVA. Os animais foram divididos em 2 grupos: 1) Ovulação Positiva (Ov+) 2) Ovulação Negativa (Ov-) e os parâmetros máxima atividade de estro (MAE), soma da atividade de estro (SAE), máxima intensidade de estro (MIE) e soma da intensidade de estro (SIE) foram avaliadas dentro dos grupos. Não houve diferença estatística entre MAE ( $P = 0,26$ ) e MIE ( $P = 0,18$ ) nos grupos Ov+ e Ov-, entretanto os animais que ovularam apresentaram maiores valores de SAE ( $363 \pm 17,0$  vs  $255,3 \pm 39,3$ ;  $P = 0,01$ ) e SIE ( $63,6 \pm 3,2$  vs  $40,7 \pm 5,5$ ;  $P < 0,01$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Resultados da máxima atividade de estro, máxima intensidade de estro, soma da atividade de estro e soma da intensidade de estro entre os animais que ovularam (Ov+) e animais que apresentaram que não ovularam (Ov -).

Parâmetros Estrais	Ov+	Ov-	Valor de P
Máxima Atividade de Estro	71,8±2,6	65,1±5,3	0,26
Máxima Intensidade de Estro	15,2±0,9	13,0±1,3	0,18
Soma da Atividade de Estro	363±17,0	255,3±39,3	0,01
Soma da Intensidade de Estro	63,6±3,2	40,7±5,5	<0,01

### 3.5.3. Avaliação da eficiência do dispositivo eletrônico na detecção de estro

A eficiência do CMA foi avaliada pelo cálculo de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. Na primeira análise o AIM foi usado como referência “padrão ouro” e na segunda análise a referência foi a ovulação para avaliar o CMA e o AIM.

Quando o AIM foi usado como referência (Tabela 3), a sensibilidade foi de 95,0%, o valor preditivo positivo de 98,7% e a acurácia de 93,8%. A especificidade e o valor preditivo negativo não puderam ser calculados pois não houve animais verdadeiros negativos (sem estro no AIM e no CMA).

Quando a ovulação foi usada como referência (Tabela 4), a sensibilidade foi de 95,2%, a especificidade de 5,3%, o valor preditivo positivo de 76,6%, o valor preditivo negativo de 25% e

a acurácia de 74,1% para o CMA. Para o AIM a sensibilidade foi de 98,4%, o valor preditivo positivo de 76,3% e a acurácia de 75,3%. A especificidade e o valor preditivo negativo não puderam ser calculados pois não houve animais verdadeiros negativos (ou seja, que não ovularam e que não ativaram o AIM). Não foram verificadas diferenças estatísticas entre o CMA e o AIM para a sensibilidade ( $P = 0,31$ ), o VPP ( $P = 0,96$ ) e a acurácia ( $P = 0,86$ ), confirmando a hipótese de que o colar pode ser usado com eficiência como identificador de estro em animais *Bos indicus* (Tabela 4).

Valores preditivos positivos semelhantes foram encontrados por Burnett et al. (2018) (VPP = 87,8%), quando avaliaram a eficiência do uso de colares eletrônicos para detecção de estro em vacas Holandesas lactantes. Roelofs e Van Erp-van der Kooij (2015), ao compilarem estudos realizados entre 2010 e 2014 com monitores de atividade para detecção de estro, verificaram que a sensibilidade dos equipamentos variou de 36 a 78% e foram superiores às encontradas para observação visual (20 a 59%). Encontraram, também, que o valor preditivo positivo (VPP) variou entre 74 e 97%, porém não foram superiores a observação visual. Corroborando com os achados de outros autores, Chanvallon et al. (2014) constaram sensibilidade de 62% para os colares e 71% para os pedômetros e VPP de 83% para os colares e 71% para os pedômetros, Madureira (2016) encontrou VPP de 89,6 para colar e 85,5% para pedômetro, ambos em animais holandeses.



**Tabela 3** - Resultados da detecção de estro pelo colar monitor de atividade (CMA) utilizando o adesivo identificador de monta (AIM) como “padrão ouro” em novilhas Gir (*Bos indicus*) submetidas a protocolo de sincronização de estro e da ovulação.

Detector de estro	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
CMA	95,2%	.	98,7%	.	93,8%

**Tabela 4** - Resultados da detecção de estro pelo colar monitor de atividade (CMA) e adesivo identificador de monta (AIM) utilizando ovulação como “padrão ouro” em novilhas Gir (*Bos indicus*) submetidas a protocolo de sincronização do estro e da ovulação.

Detector de estro	CMA	AIM	Valor Chi-Quadrado	Valor de P
Sensibilidade	95,2%	98,0%	1,03	0,31
Especificidade	5,3%	-	-	-
VPP	76,6%	76,0%	0,003	0,96
VPN	25,0%	-	-	-
Acurácia	74,1%	75,0%	0,03	0,86

Apesar da especificidade e do VPN do CMA terem sido baixos, quando a ovulação foi escolhida como padrão ouro, validamos o uso do CMA em novilhas *Bos indicus*. Ao analisar o porquê de alguns animais terem demonstrado estro pelo CMA, porém sem ovulação, sugere-se que houve estro farmacológico associado a falhas na sincronização da nova onda folicular durante o protocolo de TETF. Nesse caso, o estro identificado pelo CMA poderia ser proveniente da aplicação do cipionato de estradiol no D8 do protocolo. Na literatura há diversos estudos que correlacionam a aplicação de estradiol exógeno com a manifestação de estro em bovinos (HANLON et al., 1996; LAMMOGLIA et al., 1998; SALES et al., 2012; PITALUGA et al., 2013) e também trabalhos que relataram falhas na sincronização da nova onda de crescimento folicular e da ovulação em protocolos de IATF e TETF (MONTEIRO JÚNIOR, 2014).

A fim de estudar detalhadamente esses achados, os animais foram divididos em 2 grupos: 1) animais que apresentaram estro pelo CMA e ovularam; Estro/Ov (+) e, 2) animais que apresentam estro, porém não ovularam; Estro/Ov (-). O diâmetro dos folículos, a duração de estro, o intervalo

retirado de P4-Estro, a MAE e a MIE foram comparados entre os grupos. Dessa análise foram excluídos 4 animais, 1 que não apresentou nem estro nem ovulação e 3 que ovularam sem apresentar estro, totalizando 77 animais avaliados. Verificou-se diferença significativa nas seguintes variáveis: diâmetro do folículo D9 ( $P < 0,01$ ), diâmetro máximo do folículo ( $P < 0,01$ ), duração de estro ( $P = 0,03$ ) e intervalo retirada de P4-Estro ( $P < 0,01$ ). Entretanto, não houve diferenças entre os grupos para MAE ( $P=0,26$ ) e para MIE ( $P=0,18$ ). Os dados estão apresentados na Tabela 5.

Os dados encontrados corroboram com a hipótese levantada no presente estudo. Animais do grupo Estro/Ov (-) apresentaram folículos menores quando comparados com animais do grupo Estro/Ov (+). Além disso, esses animais apresentaram valores menores de soma de atividade de estro (SAE) e soma de intensidade de estro (SIE), demoram mais para manifestar o estro após o protocolo de sincronização e o estro detectado foi de menor duração. Esses dados sugerem que o estro detectado pelo CMA nos animais do grupo Estro/Ov (-) pode ter sido farmacológico e não fisiológico, uma vez que os animais apresentavam folículos com diâmetro médio de  $7,1 \pm 0,3$ mm (Tabela 4). Segundo Gimenes et al. (2008), a divergência folicular, que está associada à produção de estrógeno pelo folículo dominante, é estabelecida em zebuínos somente quando o folículo atinge 6,2 mm de diâmetro. Esses dados são indicativos de que, mesmo com o tratamento exógeno com estrógeno, os animais que ovulam após um tratamento de sincronização apresentam um folículo de maior diâmetro que produz quantidade de estrógeno suficientes para desencadear a sintomatologia de estro.

**Tabela 5** - Resultados do diâmetro do folículo no D9, diâmetro máximo do folículo, duração de estro, intervalo retirada de P4-Estro, MAE e MIE entre os grupos que expressaram estro pelo CMA e ovularam (Es-tro/Ov (+)) e animais que apresentaram estro pelo CMA e não ovularam (Estro/Ov (-)).

Variáveis	Estro/Ov (+)	Estro/Ov (-)	Valor de P
Número de animais	59 (76,6%)	18 (23,4%)	-
Diâmetro do maior folículo no D9 (mm)	$11,0 \pm 0,2^a$	$7,1 \pm 0,3^b$	$< 0,01$
Diâmetro máximo do folículo (mm)	$12,0 \pm 0,1^a$	$8,5 \pm 0,3^b$	$< 0,01$
Duração de estro (h)	$19,0 \pm 0,5^a$	$15,0 \pm 1,7^b$	0,03
Intervalo retirada de P4 – Início do estro (h)	$28,0 \pm 0,6^a$	$36,2 \pm 1,1^b$	$< 0,01$
Máxima atividade de estro (MAE)	$71,8 \pm 2,6^a$	$65,1 \pm 5,3^a$	0,26
Máxima intensidade de estro (MIE)	$15,2 \pm 0,9^a$	$13,0 \pm 1,3^a$	0,18

### **3.5.4. Relação entre os máximos valores de atividade (MAE) e de intensidade (MIE) com o diâmetro do folículo ovulatório**

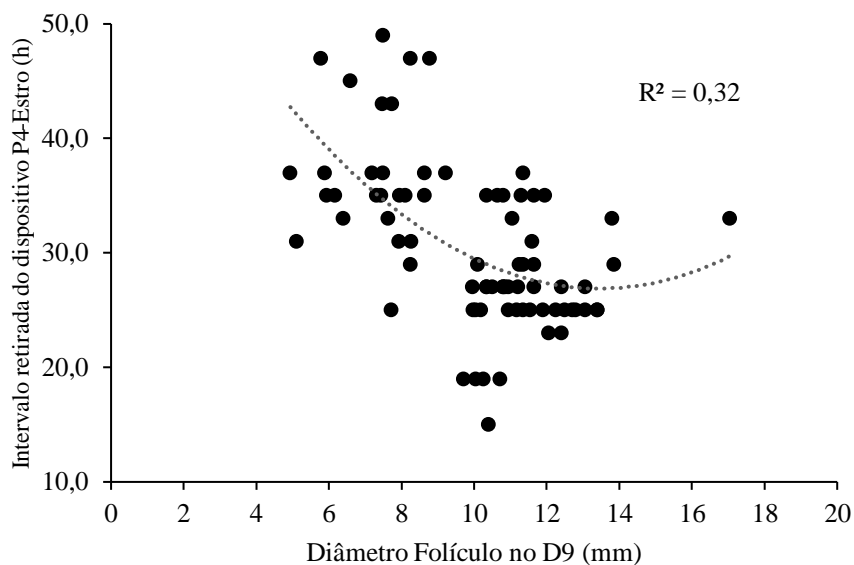
No presente estudo foi considerada a variável máxima de atividade e intensidade apresentada pelo animal durante o período de estro. A média dos máximos valores de atividade (MAE) foi de  $72,8 \pm 27,9$  e a de intensidade (MIE) de  $16,1 \pm 8,7$ .

Um dos objetivos desse experimento foi determinar se a MAE e a MIE podem ser correlacionadas com o diâmetro do folículo ovulatório. Sabe-se que a concentração de esteróides no sangue pode ser correlacionada positivamente com o tamanho das estruturas ovarianas (folículo dominante e CL (VASCONCELOS et al., 2001) e que a manifestação do estro é associada à concentração de estradiol durante o proestro (MANN; LAMMING, 1999). Diversos trabalhos relatam que o tamanho do folículo ovulatório afeta a taxa de prenhez (SÁ FILHO et al. 2010a; PFEIFER et al., 2012) e que vacas que ovulam folículos pequenos (<11,5 mm) desenvolvem corpos lúteos pequenos que secretam menos progesterona (VASCONCELOS et al., 2001; SÁ FILHO et al., 2010a) e, conseqüentemente, apresentam menor taxa de prenhez (LAMB et al., 2001) e maior morte embrionária (PERRY et al., 2005). Pereira et al. (2016), no entanto, relataram que a redução na perda gestacional em vacas que expressavam estro na IA ocorreu independentemente do diâmetro do folículo pré-ovulatório.

No presente estudo não foram encontradas correlações significativas entre a MAE e o diâmetro do folículo 24 horas após a retirada do dispositivo de P4 ( $R^2 = 0,16$ ;  $P = 0,17$ ) e o diâmetro máximo do folículo ovulatório ( $R^2 = 0,12$ ;  $P = 0,31$ ). Porém, foi verificada relação positiva, ainda que fraca, entre MIE e o diâmetro do folículo 24 horas após a retirada do dispositivo de P4 ( $R^2 = 0,27$ ;  $P = 0,02$ ) e o diâmetro máximo do folículo ovulatório ( $R^2 = 0,23$ ;  $P = 0,04$ ), corroborando com o que foi verificado por MacMillan et al. (2020). No entanto, Madureira et al. (2019) não verificaram relação entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório e a atividade de estro. Porém, esses autores relataram maiores concentrações de estradiol em vacas com maior atividade de estro quando comparadas às vacas com baixa atividade de estro ( $9.5 \pm 0.3$  vs.  $8.2 \pm 0.2$  pg/mL  $P < 0.02$ ).

### 3.5.5. Fatores que afetam o intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e o início e a duração do estro e a ovulação

O intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8 do experimento) e o início do estro foi de  $30,6 \pm 7,1$  horas. Ao analisar as variáveis que influenciaram o tempo entre a retirada do dispositivo de P4 e o início de estro foi verificado que o diâmetro do maior folículo no D9 apresentou influência negativa linear ( $P < 0,01$ ) e quadrática ( $P = 0,01$ ), ou seja, quanto maior o folículo mensurado no D9 menor foi o intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 (D8) e o início do estro (Figura 13). Entretanto, a influência do diâmetro do folículo no intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 e a ovulação não foi verificada nos folículos de maior diâmetro.



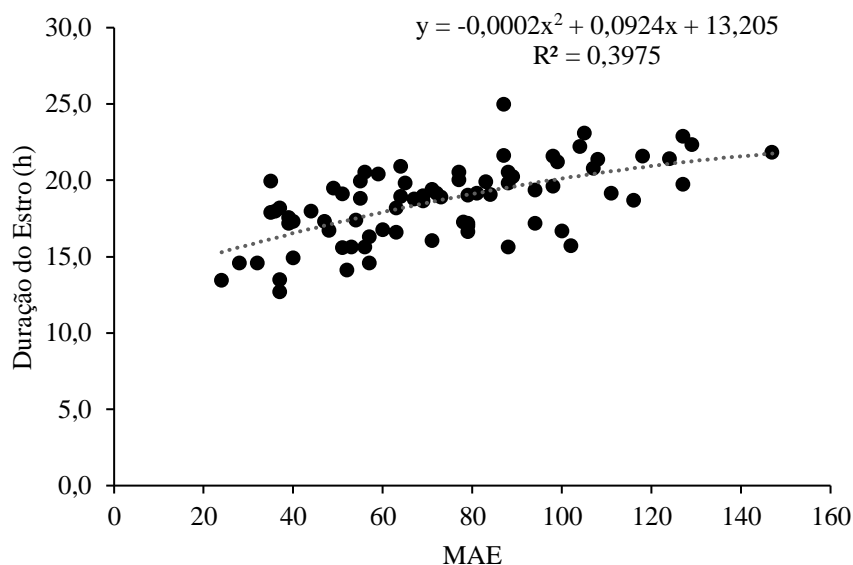
**Figura 13** - Relação entre o intervalo retirado do dispositivo intravaginal de P4 (D8) e o estro (horas) com o diâmetro (mm) do maior folículo 24 horas após a retirada do dispositivo de P4 (D9) em novilhas Gir (*Bos indicus*) submetidas a protocolo de sincronização do estro e da ovulação. Efeito do diâmetro do folículo de acordo com a regressão logística multivariada ( $N = 81$ ). Equação da estimativa do intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 e o estro =  $66,469 + 0.2188 \times \text{diâmetro do folículo no D9}^2 - 5.8851 \times \text{diâmetro do folículo no D9}$ ;  $P < 0,01$ .

A duração de estro das novilhas Gir mensurada pelo equipamento foi de  $18 \pm 6,5$  horas, semelhante ao encontrado por Valenza et al. (2012) ( $16,1 \pm 4,7$ h) que também utilizou colares com acelerômetros. Mizuta (2003) ao avaliar características de estro de animais *Bos taurus* e *Bos indicus* utilizando *Heat Watch* descreveu que a duração de estro em vacas Nelore (*Bos indicus*) foi de  $12,9 \pm 2,9$ h, que em vacas mestiças foi de (*Bos indicus* x *Bos taurus*)  $12,4 \pm 3,3$ h que em vacas angus (*Bos taurus*) a duração foi de  $15,6 \pm 4,8$ h. Supõe-se que a discrepância na duração do estro entre os dados do presente estudo e os outros de literaturas mais antigas (VOH et al., 1987; LAMOTHE-ZAVALETA; FREDRIKSSON; KINDAHL, 1991; PINHEIRO et al., 1998; ORIHUELA, 2000) se deu porque os colares são equipamentos mais modernos, que usam dados retrospectivos do indivíduo para gerar a informação de início de estro, o que os torna mais sensível e possivelmente mais capazes em detectar os sinais de estro antes do que outros equipamentos como por exemplo o *Heat Watch*.

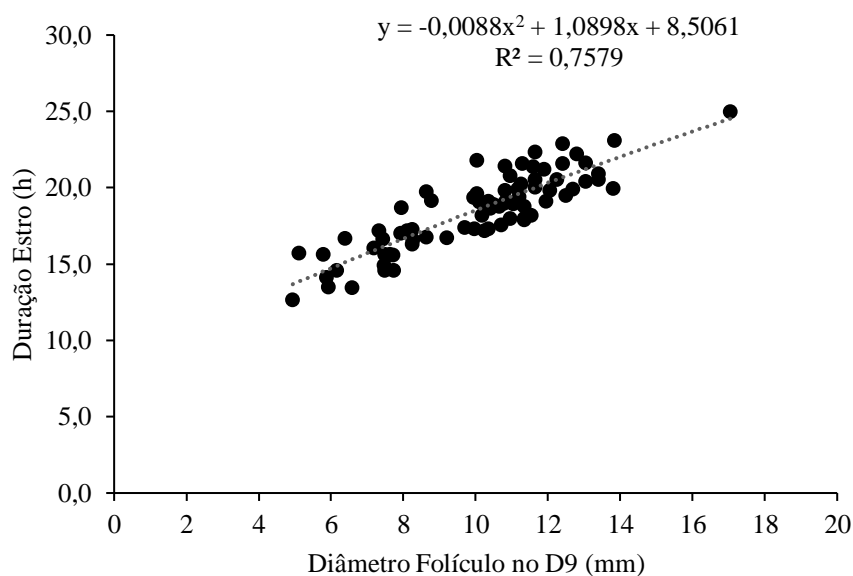
O intervalo entre o início do estro e a ovulação foi de  $29,6 \pm 10,3$  horas, concordando com os achados de Aungier et al. (2015) e Burnett et al. (2018) em vacas Holandesas lactantes, que verificaram intervalos entre o alerta de estro pelo collar e a ovulação de  $27 \pm 1$  e  $25,8 \pm 10,2$  horas respectivamente e Mizuta (2003) que também reportou intervalos entre o estro (identificado pelo heat watch) e a ovulação bem próximos aos desse estudo ( *Bos taurus* –  $26,1 \pm 6,3$ h; *Bos indicus* –  $27,1 \pm 3,3$ h e *Bos taurus* x *Bos indicus*  $25,7 \pm 7,6$ h).

Ao analisar as variáveis que influenciaram a duração do estro foi verificada relação positiva e significativa ( $P < 0,01$ ) entre a MAE e diâmetro do folículo 24 horas após a retirada do dispositivo de P4. O modelo final da duração de estro foi composto pela atividade máxima ( $P < 0,09$ ) e pelo diâmetro do folículo 24 horas após a retirada do dispositivo de P4 ( $P = 0,01$ ). As correlações entre a duração de estro e as variáveis que compuseram o modelo final estão apresentadas figura 14 a e b. Esses achados não corroboram com os achados de Madureira et al. (2019) que não verificaram relação entre a duração e a intensidade de estro e o diâmetro do folículo pré-ovulatório.

a.

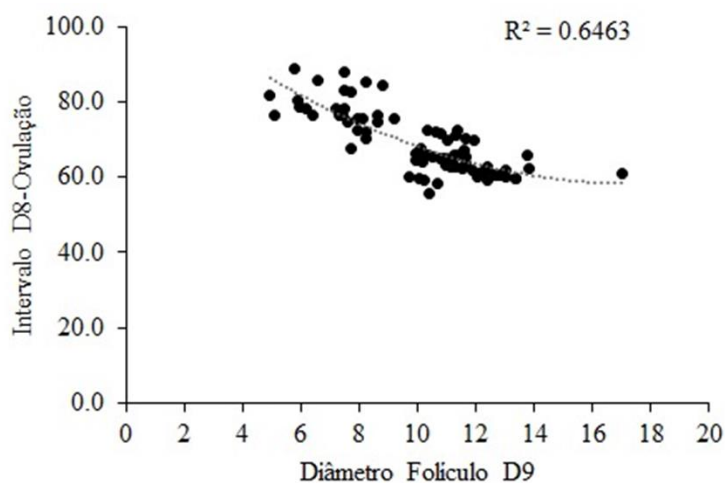


b.



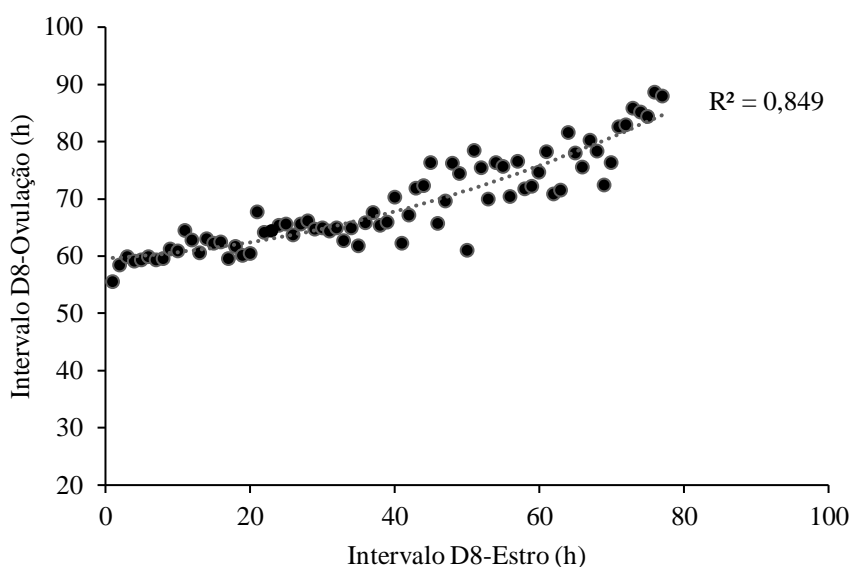
**Figura 14** - Correlações entre a duração de estro e as variáveis que compuseram o modelo final. **a:** Relação da estimativa de duração de estro (horas) com a máxima atividade de estro (MAE) registrada pelo colar monitor de atividade (CMA) em novilhas Gir (*Bos indicus*). Efeito da MAE conforme a regressão logística multivariada (N = 77). Equação da estimativa de duração de estro =  $6,9229 + 0,4455 * MAE + 0,8312 * \text{Diâmetro foliculo no D9}$  (P < 0,0).1). **b:** Relação da estimativa da duração do estro (horas) e do diâmetro (mm) do maior foliculo 24 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 em novilhas Gir (*Bos indicus*). Efeito do diâmetro do foliculo 24h conforme a regressão logística multivariada. (N = 77). Equação Estimativa de duração de estro =  $6,9229 + 0,4455 * MAE + 0,8312 * \text{Diâmetro foliculo no D9}$ . (P < 0,01).

O intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 e a ovulação também foi influenciado pelo diâmetro do FD no D9 (Figura 15). O intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (D8) e a ovulação foi de  $67,4 \pm 12,3$  horas. Verificou-se efeito significativo na análise multivariada para relação entre o diâmetro do maior folículo no D9 e o intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e a ovulação. Novilhas com maior folículo no D9 ovularam antecipadamente quando comparadas com novilhas que possuem folículos de menor diâmetro.



**Figura 15** - Relação entre o intervalo retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8) e a ovulação (horas) com o diâmetro (mm) do maior folículo 24 horas após a retirada do dispositivo de P4 (D9) em novilhas Gir (*Bos indicus*) submetidas a protocolo de sincronização do estro e da ovulação. Efeito do diâmetro do folículo de acordo com a regressão logística multivariada (N = 77). Equação da estimativa do intervalo retirada de P4 – ovulação =  $57.9257 - 1.4201 \times$  diâmetro do folículo no D9 +  $0.8299 \times$  intervalo retirada de P4-estro. (P < 0,01).

Ainda, verificou-se que os animais que demonstraram estro antecipadamente após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 também apresentaram ovulação antecipada em relação ao momento da retirada da fonte de P4 (Figura 16).



**Figura 16** - Relação entre o intervalo (horas) retirada do dispositivo intravaginal de P4 (D8) e ovulação com o intervalo (horas) entre a retirada do dispositivo intravaginal de P4 e o início de estro em novilhas Gir (*Bos indicus*) submetidas a protocolo de sincronização do estro e da ovulação. Efeito do intervalo D8-estro de acordo com a regressão logística multivariada (N = 77). Equação da estimativa do intervalo retirada de P4 – ovulação =  $57.9257 - 1.4201 \times$  diâmetro do folículo no D9 +  $0.8299 \times$  intervalo retirada de P4-estro. (P < 0,01).

Estudos evidenciaram que a presença de folículos com maior diâmetro na IATF foi associada a maior manifestação de estro, taxa de ovulação e taxa de prenhez após a IATF (SÁ FILHO et al., 2010b). Esses autores verificaram que a ocorrência de estro entre a remoção da fonte de progesterona e a inseminação é indicativo de maior taxa de prenhez à IATF. Em outro estudo (SÁ FILHO et al., 2011), os autores verificaram que vacas que apresentaram estro já possuíam folículo dominante de maior diâmetro no momento da remoção do dispositivo de P4. Ainda, foi constatado que vacas que manifestam estro apresentaram maior taxa de ovulação, maior diâmetro do CL e maior concentração de P4 7 dias após a inseminação quando comparadas com vacas que não manifestam estro. Esses dados são sugestivos de que existe benefícios significativos da presença de um folículo com maior diâmetro ao final de um protocolo de sincronização da ovulação. Esses estudos são indicativos de que em programas de sincronização do crescimento folicular e da ovulação baseados em progesterona e estrógenos, como o utilizado no presente estudo em novilhas *Bos indicus*, métodos que melhoram a manifestação do estro e aumentam o diâmetro da FD após protocolos de sincronização podem ser importantes para melhorar a fertilidade.



O presente estudo demonstrou que animais com folículos acima de 7,95 mm no D9 manifestaram estro mais cedo, tiveram maior duração de estro e ovularam antes do que animais com os folículos menores. Também, foi verificado que os animais que manifestaram estro antecipadamente ovularam antes e que os animais que ovularam possuíam folículos maiores no D9 quando comparados com animais que não ovularam. A partir desses achados, pode-se sugerir que, em protocolos de IATF a base de progesterona e estrógeno, o momento da ocorrência de estro detectado e/ou o diâmetro do folículo no D9 do protocolo podem ser empregados como critérios de ajuste de estratégias reprodutivas. Como exemplo, a utilização de sêmen sexado em animais que apresentam folículos de maior diâmetro no D9 e/ou que apresentaram sintomatologia de estro antecipada podem ser adotadas para melhorar a eficiência dos programas reprodutivos. Estudos prévios (SÁ FILHO et al., 2010b, 2012; SALES et al., 2011) verificaram aumento da taxa de prenhez de animais com folículos dominantes acima de 9 mm no dia da IATF quando inseminados com sêmen sexado. Inclusive, a taxa de prenhez se assemelhou à dos animais inseminados com sêmen convencional (58,9% e 56,8%, respectivamente.  $P = 0,65$ ). Estudos evidenciaram que houve aumento significativo na taxa de prenhez de animais inseminados com sêmen sexado quando a IA é realizada próxima ao momento da ovulação (SÁ FILHO et al., 2012).

### 3.5.6 Conclusão

Os resultados do presente estudo confirmaram parcialmente as hipóteses levantadas. O colar monitor de atividade (CMA) foi eficiente na detecção do estro de animais *Bos indicus*. Quando o AIM foi usado como referência, a sensibilidade foi de 95,0%, o valor preditivo positivo de 98,7% e a acurácia de 93,8%. A especificidade e o valor preditivo negativo não puderam ser calculados pois não houve animais verdadeiros negativos (sem estro no AIM e no CMA). Quando a ovulação foi usada como referência, a sensibilidade foi de 95,2%, a especificidade de 5,3%, o valor preditivo positivo de 76,6%, o valor preditivo negativo de 25% e a acurácia de 74,1% para o CMA.

Em relação a segunda hipótese, houve relação positiva, ainda que fraca, entre a intensidade de estro, MIE, e o diâmetro do folículo 24 horas após a retirada do dispositivo de P4 ( $R^2 = 0,27$ ;  $P = 0,02$ ) e o diâmetro máximo do folículo ovulatório ( $R^2 = 0,23$ ;  $P = 0,04$ ) entretanto, não houve relação positiva entre o tamanho do folículo 24h após a retirada de P4 ( $R^2 = 0,16$ ;  $P = 0,17$ ) máximo do maior folículo presente no ovário e a atividade de estro, MAE.

#### **4. EXPERIMENTO 2: Validação de sistemas monitores de atividades para predição do estro em vacas Holandesas (*Bos taurus*): influência da temperatura nos parâmetros estrais**

##### **4.1. RESUMO**

O presente estudo teve como objetivos validar a eficiência do colar monitor de atividade (CMA) para detectar o estro em vacas Holandesas lactantes comparando-o com os resultados de estro pelo AIM e observação visual além de avaliar o efeito da temperatura vaginal nos parâmetros de comportamento estral. Para isso, foram utilizadas 91 vacas da raça Holandesa lactantes que receberam o CMA. As vacas foram sincronizadas com dispositivo intravaginal contendo 750mg de progesterona, associado ao tratamento com 2mg de Benzoato de Estradiol i.m. no dia 0. No dia 8 o dispositivo de progesterona foi removido e os animais receberam 0,5mg i.m. de Cloprostenol Sódico, nenhum indutor de ovulação foi utilizado nesse experimento. Nesse momento, um adesivo identificador de monta (AIM) foi fixado na garupa e um termômetro para aferir a temperatura foi introduzido na vagina. O diâmetro do folículo dominante foi mensurado por ultrassonografia duas vezes ao dia a partir do dia 8 do protocolo (retirada da P4) até a ovulação. Outra avaliação foi realizada no dia 20 para confirmar a presença de corpo lúteo nos animais ovulados. O estro foi observado visualmente por 1 hora duas vezes ao dia (manhã – das 6:00 às 7:00h e tarde das 17:00 às 18:00h) do dia 8 até ao dia 14 do protocolo. A eficiência do CMA foi avaliada mensurando a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia quando comparado a adesivo identificador de monta (AIM) e a ovulação. Quando o adesivo identificador de monta (AIM) foi usado como referência, a sensibilidade do CMA foi de 79,3%, a especificidade de 80,6%, o valor preditivo positivo de 88,5%, o valor preditivo negativo de 67,6% e a acurácia de 79,8%. Quando a ovulação foi usada como referência, a sensibilidade foi 68,9%, a especificidade 82,4%, o valor preditivo positivo 94,4%, o valor preditivo negativo 37,8% e a acurácia 71,4% para o CMA. Valores próximos foram encontrados para o AIM, que apresentou sensibilidade de 73,6%, especificidade de 70,6%, valor preditivo positivo de 91,4%, valor preditivo negativo de 38,7% e acurácia de 73,0%. Ao comparar o CMA e o AIM não houve diferença estatística em nenhuma das variáveis analisadas, porém, foi verificada significância entre as sensibilidades e acurácia do CMA

e da observação visual ( $P < 0,01$ ; Tabela 9) e entre as sensibilidades e acurácia do AIM e da observação visual ( $P < 0,01$ ). Verificou-se que 4 variáveis foram afetadas pela temperatura vaginal ( $\leq 39^{\circ}\text{C}$  vs.  $> 39^{\circ}\text{C}$ ). Animais com temperatura elevada apresentaram menor taxa de ovulação ( $P = 0,03$ ), maior taxa de ovulação dupla ( $P = 0,02$ ), menor duração do estro ( $P = 0,04$ ) e menor identificação de estro pelo AIM ( $P = 0,02$ ). Ainda, com o aumento da temperatura houve tendência ( $P = 0,06$ ) de redução na identificação de estro pela observação visual. Não foi verificado efeito significativo da temperatura vaginal na identificação de estro pelo CMA ( $P = 0,76$ ). Não foram identificados efeitos significativos da temperatura na MAE ( $P = 0,26$ ), na MIE ( $P = 0,62$ ) e no diâmetro máximo do folículo ovulatório ( $P = 0,43$ ). Conclui-se que o CMA pode ser considerado um método eficiente de detecção de estro em vacas Holandesas lactantes (*Bos taurus*), com eficiência semelhante ao AIM, método de detecção já comprovado e amplamente utilizado nas fazendas. Além disso, a temperatura vaginal acima de  $39^{\circ}\text{C}$  afeta negativamente os parâmetros reprodutivos.

## 4.2. INTRODUÇÃO

A observação de estro é um dos principais desafios encontrados nas propriedades de leite em todo o Brasil. De acordo com Dobson et al. (2007), nos últimos 50 anos houve uma redução de 80% para 50% na manifestação de estro em vacas de leite, associada a uma redução na sua duração do estro de 15 para apenas 5 horas. Fatores como o tipo de piso onde as vacas estão alojadas, a ordem de parto, a produção de leite e a ocorrência de problemas de casco afetam a manifestação dos comportamentos de estro e a sua duração (PENNINGTON et al., 1985; DISKIN; SREENAN, 2000; DOBSON et al., 2007; WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011). Outro fator que afeta negativamente e de várias maneiras o desempenho reprodutivo de vacas leiteira é o estresse calórico. Evidências sugerem que existem diferenças entre os ruminantes domesticados, espécie, raça e nível de produção no que diz respeito à suscetibilidade ao estresse térmico (SILANIKOVE, 2000b; KADZERE et al., 2002). Isso se deve principalmente às diferenças entre as espécies na capacidade de reduzir a produção de calor metabólico e endógeno e aumentar a dissipação de calor (GAUGHAN et al., 2009). Animais com temperatura corporal acima de  $38,9^{\circ}\text{C}$  tenderam a passar mais tempo em pé e se deitar menos (ALLEN et al., 2015), afetando a manifestação de estro

(GWAZDAUSKAS; LINEWEAVER.; MCGILLIARD, 1983; PENNINGTON et al., 1985). Além disso, os níveis de prolactina circulante aumentam durante o estresse térmico em uma variedade de mamíferos, incluindo ruminantes (COLLIER et al., 1982a; RONCHI et al., 2001; ROY E PRAKASH, 2007) afetando negativamente a libido (PFAUS; EVERITT, 1995). O estresse térmico também tem efeitos negativos importantes na qualidade folicular e nos padrões hormonais em vacas de leite. Estes incluem menor tamanho folículo dominante e, portanto, menor dominância folicular (WOLFENSON; ROTH; MEIDAN., 2000), diminuição das concentrações séricas de estradiol (WILSON et al., 1998), diminuição da concentração plasmática de LH e alterações na secreção de progesterona (WILSON et al., 1998; WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000). A manifestação menos evidente e a menor duração do estro têm dificultado sua detecção em vacas de leite. Devido a essas evidências, o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos monitores de atividade que apresentam alta acurácia e precisão na detecção do estro pode ser uma solução para esse problema.

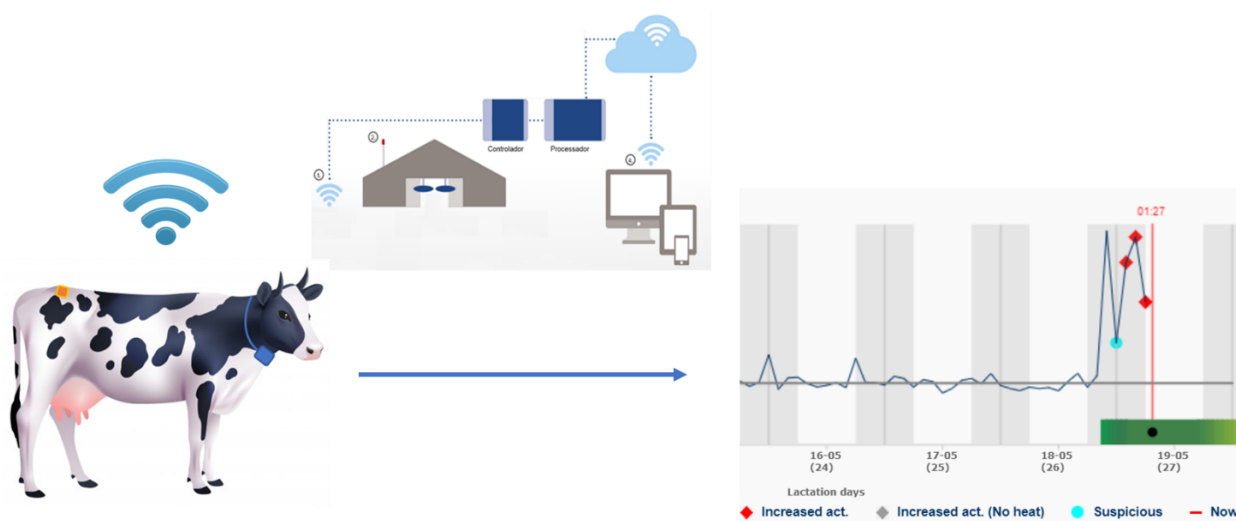
A relação entre o aumento da atividade física e a manifestação do estro é conhecida há bastante tempo (FARRIS, 1954). Em 1977, foram utilizados pedômetros desenvolvidos para uso humano para registrar a variação na atividade física durante o estro de vacas da raça Holandesa. Observou-se um aumento de 393% na atividade física dos animais durante o cio (KIDDY, 1977). Esses trabalhos foram a base para o desenvolvimento de equipamentos próprios para o monitoramento da atividade física e detecção do estro em bovinos. De acordo com Senger (1994), um sistema de detecção de estro deve ter como princípio uma elevada acurácia na detecção, com reduzido uso de mão de obra e com uma indicação apropriada do momento mais adequado para realização da inseminação artificial. Dessa forma, um sistema automático de detecção de estro deve garantir o monitoramento contínuo e confiável das mudanças fisiológicas e comportamentais que ocorrem durante o estro. Esse sistema também deve promover a identificação automática do animal e ser capaz de armazenar informações e apresentar custo-benefício favorável.

#### 4.3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

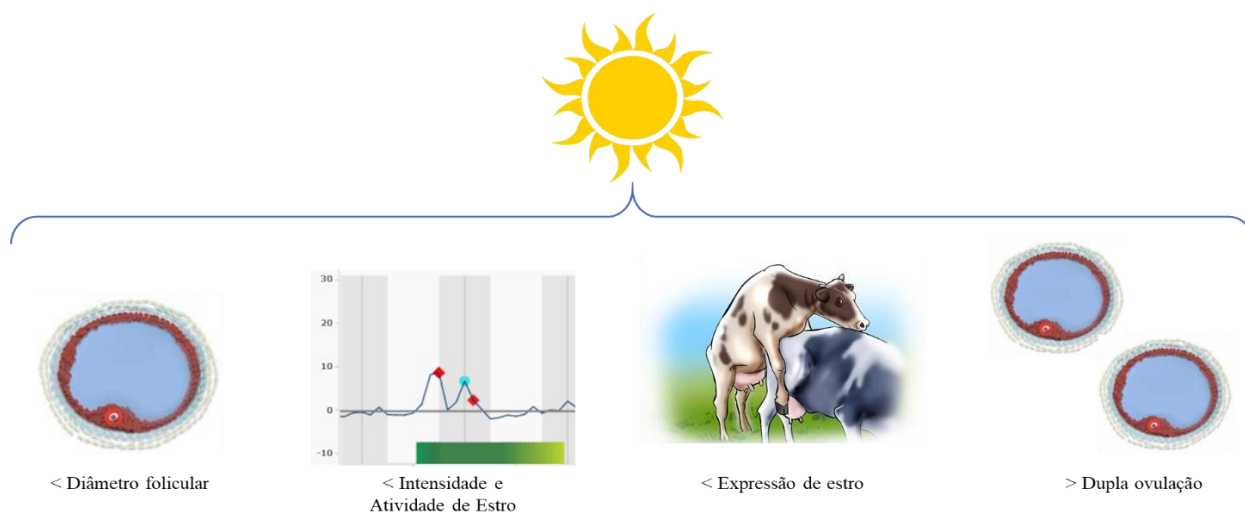
Esse estudo possui duas hipóteses: 1) CMA é eficiente em detectar o estro de vacas holandesas (*Bos taurus*) lactantes (Figura 17); 2) A temperatura média vaginal acima de 39°C

interfere nos parâmetros reprodutivos (duração, intensidade e atividade de estro, ovulação, dupla ovulação e diâmetro do folículo dominante) (Figura 18).

Os objetivos desse estudo são mensurar a eficiência do CMA em detectar estro em animais *Bos indicus* através da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia e avaliar quais parâmetros reprodutivos associados ao estro são influenciados pela temperatura vaginal em vacas holandesas lactantes.



**Figura 17** - Ilustração da hipótese 1 - O colar monitor de atividade (CMA) é eficiente na detecção de estro em vacas Holandesas lactantes (*Bos taurus*).



**Figura 18** - Ilustração da hipótese 2 – Altas temperaturas interferem negativamente no diâmetro do folículo ovulatório, intensidade e atividade de estro, expressão de estro e aumenta a ocorrência de dupla ovulação em vacas Holandesas lactantes (*Bos taurus*).

#### 4.4. MATERIAIS E MÉTODOS

##### 4.4.1. Animais, produção de leite, protocolo hormonal e identificação de estro

O experimento foi realizado com os animais provenientes da Prefeitura do campus da USP de Pirassununga entre os meses de dezembro de 2017 e agosto de 2018. Foram utilizadas 91 vacas lactantes da raça Holandesa mantidas em freestall com cama de areia e alimentadas com mix de concentrado e volumoso formulado para manter os requerimentos da categoria. O DEL médio das vacas envolvidas no estudo foi de  $163 \pm 101$  dias, o número médio de lactações foi de  $2,0 \pm 1,2$  e a produção média de leite, mensurada entre o dia 0 do experimento até o d14 foi de  $23,3 \pm 5,6$  litros.

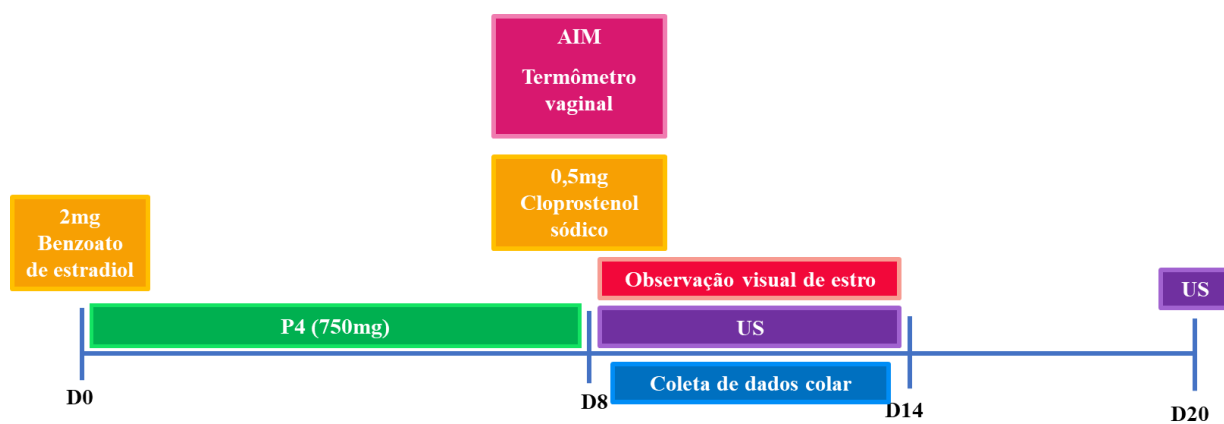
Antes do início do protocolo todos os animais receberam o CMA (figura19) Para sincronizar o estro dos animais, no dia 0 do experimento eles receberam dispositivo de 1g progesterona (Proclicar®, Hertape) associado a 2mg de Benzoato de Estradiol (BE, Sincrodiol®, Ourofino Agronegócio). No dia 8 o dispositivo foi retirado, os animais receberam um termômetro vaginal (Ibutton, Maxim Integrated, California, Estados Unidos) que aferiu a temperatura a cada 10 minutos, 0,5mg i.m, de Cloprostenol Sódico (Sincrocio®, Ouro Fino Saúde Animal) e um adesivo identificador de monta (AIM; Estotect™, EUA) foi afixado na garupa, a frente da inserção da cauda. Nesse experimento não foi aplicado indutores de ovulação (Figura 20).

O estro foi avaliado em todos os animais de três formas, pelo CMA, pelo AIM e por observação visual. O AIM foi checado duas vezes ao dia durante as avaliações ultrassonográficas e as observações visuais foram realizadas por uma hora as 6:00 horas da manhã e as 6:00 horas da tarde (Figura 21). Foi considerado animal em estro pelo AIM se 50% ou mais do adesivo foi ativado e na observação visual o animal foi considerado em estro se ele se deixou ser montado.





**Figura 19** - Vaca Holandesa com o colar monitor de atividade (CMA).



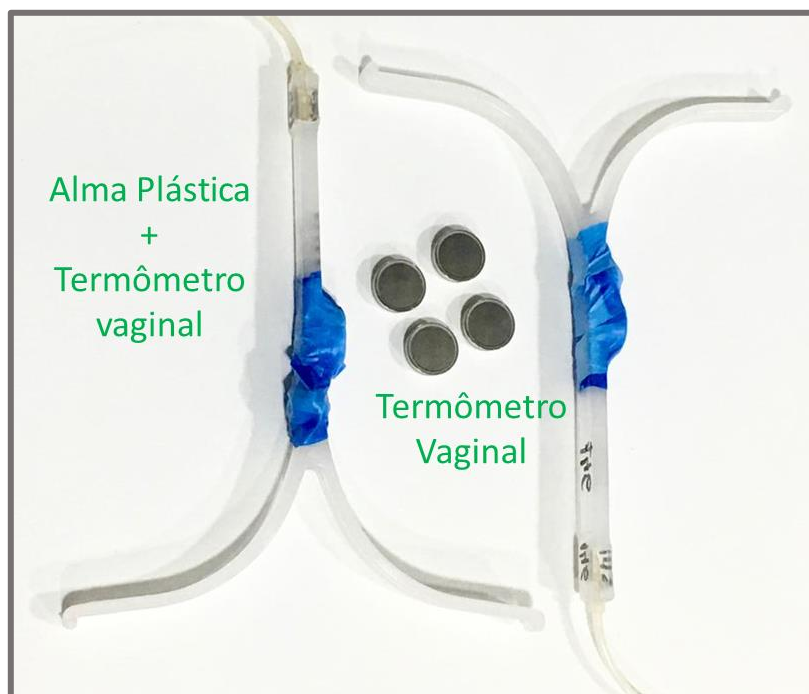
**Figura 20** - Esquema do protocolo hormonal utilizado para sincronização de estro de vacas Holandesas lactantes (*Bos taurus*)



**Figura 21** - Identificação visual de estro.

#### **4.4.2. Termômetro vaginal**

No dia da retirada da P4 todos os animais receberam um termômetro intravaginal (Ibutton, Maxim Integrated, California, Estados Unidos) acoplado em uma “alma” plástica semelhante a usada nos dispositivos de P4 e inserido na vagina (Figura 22). O termômetro permaneceu nos animais até constatada a ovulação ou até o dia 14 do protocolo. Ao ser removido ele foi higienizado e os dados foram extraídos por um dispositivo próprio conectado a uma entrada USB. O software utilizado para a captação dos dados foi o One Wire Viewer (Maxim Integrated, California, Estados Unidos). As informações de temperatura avaliadas nesse estudo compreenderam o dia 0 do experimento até a ovulação ou até o d14, caso o animal não tenha ovulado.



**Figura 22** - Termômetro vaginal e alma plástica já com o termômetro acoplado.

#### **4.4.3. Colar Monitor de Atividade (CMA)**

Trinta dias antes dos animais receberem os colares a antena, o controlador e o processador foram instalados na sala de espera da ordenha do setor de bovinocultura de leite da Prefeitura do campus da USP de Pirassununga. A antena foi disposta de forma a captar os sinais dos colares quando os animais iam para a ordenha, duas vezes ao dia. Conectado a ela foi instalado o controlador que é responsável por captar todas as informações da antena e o processador que é o equipamento que lê os dados e os transforma em informações. O processador foi conectado a um notebook com acesso à internet e todas as informações de estro puderam ser acessadas na plataforma online do CMA (Figura 6).

O colar funciona com base em um acelerômetro que fica disposto em seu interior. Esse acelerômetro é capaz de reconhecer quais os movimentos de cabeça são específicos de estro e quão intensos esses movimentos são. Os dados de atividade e intensidade foram registrados a cada 2

horas e enviados para a antena, controlador, processador e finalmente para a plataforma online. A atividade medida pelo equipamento é baseada no número de movimentos de cabeça relacionados a estro (repouso de queixo, monta, movimentos inquietos de cabeça) o animal apresentou no período de 2 horas e a intensidade é calculada pelo score Z que é o quanto uma medida se afasta da média em termos de desvios padrão.

#### **4.4.4. Ultrassonografia**

O diâmetro do folículo dominante foi mensurado por ultrassonografia (Mindray DP 2220, Mindray Bio-Medical Electronics, China) duas vezes ao dia a partir do dia 8 do protocolo (retirada da P4) até a ovulação ou até dia 14. No d20 novos exames ultrassonográficos foram realizados para determinar a presença de corpo lúteo (CL) e confirmar a ovulação (Figura 23). O diâmetro máximo do folículo dominante foi determinado como sendo o maior diâmetro do maior folículo mensurado durante a dinâmica folicular.



**Figura 23** - Ultrassonografia transretal para realização da dinâmica folicular.

#### **4.4.5. Análises estatísticas**

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Raleigh, NC). Variáveis contínuas foram analisadas por ANOVA (análise de variância) com o PROC MIXED. Os dados binários foram analisados por regressão logística com o PROC GLIMMIX. Para a construção do modelo foi utilizado réplica e estação do ano como variáveis classificatórias.

Para cada um dos resultados avaliados, foram realizadas análises univariáveis para determinar se outras variáveis explicativas deveriam constar no modelo multivariável. As variáveis contínuas foram testadas para efeitos linear e quadrático. Todas as variáveis com  $P \leq 0.10$  na análise univariável foram adicionadas no modelo multivariável. Procedimento REG com “collin” e *variance inflation factor* (VIF) foi usado para testar colinearidade entre as variáveis para cada modelo multivariável. Variáveis com  $VIF \geq 5$  foram consideradas colineares e foram retiradas do

modelo. Ao realizar as análises do modelo multivariado as variáveis que apresentaram valores de  $P > 0,10$  foram retiradas do modelo uma a uma em ordem crescente.

A curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi calculada pelo software MedCalc (MedCalc software, Mariakerke, Bélgica) e foi utilizada para testar quanto a sensibilidade, especificidade e valor de P, o modelo matemático das variável binomial ovulação e também para determinar o ponto de corte para o diâmetro do folículo 24 horas após a retirada da P4. As análises de correlações foram realizadas no Excel® (Microsoft Office 365, Washington, Estados Unidos). Diferenças com  $P \leq 0,05$  foram consideradas significativas enquanto  $0,05 > P < 0,10$  foi considerado tendência.

Os dados de atividade e intensidade de estro foram analisados de três formas: a média das variáveis – que corresponderá a média da atividade e intensidade durante o período de estro; soma das variáveis – que corresponderá a soma da variável durante todo o período de estro indicado pelo aparelho e variável máxima – que corresponderá a variável máxima de atividade e intensidade que o animal apresentou durante o período de estro.

Para verificar se havia diferença estatística entre a taxa de detecção de estro do CMA, AIM e observação visual foi utilizado PROC GENMOD do SAS.

Para calcular a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia foi estabelecida uma matriz de confusão (Figura 2) que consistiu em classificar os eventos de estro identificados pelo CMA em verdadeiros positivo (VP), verdadeiros negativos (VN), falso positivos (FP) e falso negativos (FN). Duas análises foram realizadas, a primeira o AIM foi escolhido como padrão “ouro” para o CMA e para a observação visual e na segunda foi a ovulação a referência para o CMA, AIM e observação visual. As fórmulas para cálculo das características do teste estão representadas abaixo.

- Sensibilidade =  $VP / (VP + FN)$  - É a capacidade que o teste (CMA ou AIM) tem de detectar em estro os animais que realmente estão em estro.
- Especificidade =  $VN / (VN + FP)$  - É a capacidade que o teste tem de detectar os verdadeiros negativos, isto é, de diagnosticar corretamente os indivíduos fora de estro.
- Valor Preditivo Negativo (VPN) =  $VN / (VN + FN)$  - É a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado positivo estar realmente em estro

- Valor Preditivo Positivo (VPP) =  $VP / (VP + FP)$  - É a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado negativo não estar realmente em estro
- Acurácia =  $(VP + VN) / (VP + FP + VN + FN)$  - Identifica a porcentagem de animais que foram corretamente classificados (em estro ou não) pelo teste.

As sensibilidades, especificidades, VPN, VPP e acurácia entre os métodos de detecção de estro (CMA, AIM e Observação visual) foram comparadas pelo teste de Chi-Quadrado e calculadas 2 a 2 através da calculadora do site: [www.socscistatistics.com/tests/chisquare/default2.aspx](http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/default2.aspx).

## 4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.5.1. Animais, número de eventos de estro e avaliações ultrassonográficas

Durante o experimento, 59,3% (54/91) das fêmeas foram detectadas em estro pelo CMA, 65,2% (58/89) pelo AIM e 40,7% (37/91) por observação visual. Não houve diferença estatística nas taxas de detecção de estro entre o CMA e AIM ( $P = 0,96$ ). Entretanto, a taxa de detecção de estro pelo CMA e pelo AIM foi maior que a observada pela observação visual ( $P < 0,01$ ). Esses dados são indicativos de que os dispositivos auxiliares de detecção de estro (CMA e AIM) aumentam a eficiência de identificação os animais em estro e contribuem para aumentar a taxa de serviço em vacas Holandesas em lactação. Outros estudos também evidenciaram aumento da taxa de serviço utilizando dispositivos eletrônicos como ferramenta auxiliar no manejo reprodutivo (VALENZA et al., 2012; FRICKE et al., 2014; ROELOFS; VAN ERP-VAN DER KOOIJ, 2015; MADUREIRA et al., 2019; MACMILLAN et al., 2020).

Dos 59 estros detectados pelo CMA, 38,9% (21/54) tiveram início entre 6:00h e 17:59h, enquanto 61,1% (33/54) deles se iniciaram entre as 18:00h e 5:59h. Dos 58 estros detectados pelo AIM, 12,1% (7/58) foram ativados entre 6:00h e 17:59h, enquanto 87,9% (51/58) foram ativados entre 18:00h e 5:59h (Tabela 6). Esses dados evidenciam que grande parte das vacas Holandesas em lactação criadas em condições tropicais manifestam estro durante o período noturno. Inúmeros estudos discutem a dificuldade de adaptação de vacas taurinas produtoras de leite em condições tropicais (SRIKANDAKUMAR; JOHNSON, 2004; SILVA; MORAIS; GUILHERMINO, 2007).

Devido à dificuldade de detecção do estro, principalmente em períodos noturnos, novas tecnologias de detecção do estro devem ser implementadas nas propriedades para aumentar a taxa de serviço de vacas Holandesas criadas em condições tropicais.

A taxa de ovulação das vacas Holandesas em lactação ao final do protocolo de sincronização foi de 81,3% (74/91). Ao comparar a taxa de ovulação entre os animais que apresentaram estro ou não, foi verificado que o grupo com estro, independentemente do método de identificação (CMA, AIM e Observação visual), apresentou maior taxa de ovulação do que o grupo de animais que não manifestaram estro (Tabela 6). Esses dados corroboram com outros da literatura que verificaram que animais que expressam estro ao final do protocolo de sincronização possuem maior taxa de ovulação do que aqueles que não expressam estro (SÁ FILHO et al., 2010<sup>a</sup>; SÁ FILHO et al., 2009).

**Tabela 6** – Taxa de ovulação de acordo com a detecção ou não de estro nos 3 métodos (CMA, AIM e Observação visual) utilizados para detecção do estro em vacas Holandesas (*Bos taurus*).

	Estro	Sem Estro	Valor P
CMA	94,4% (51/54) <sup>a</sup>	62,1% (23/37) <sup>b</sup>	< 0,01
AIM	91,4 (53/58) <sup>a</sup>	61,3% (19/31) <sup>b</sup>	< 0,01
OBSERVAÇÃO	92,0% (34/37) <sup>a</sup>	74,1% (40/54) <sup>b</sup>	0,04

#### 4.5.2. Avaliação da eficiência do CMA na detecção de estro

Para avaliar a eficiência do dispositivo eletrônico de identificação de estro (CMA) foi calculada a sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. Na primeira análise o AIM foi usado como referência “padrão ouro” e na segunda análise a referência foi a ovulação para o cálculo da eficiência do CMA e do AIM.

Quando o AIM foi usado como referência a sensibilidade do CMA foi de 79,3%, a especificidade de 80,6%, o valor preditivo positivo de 88,5%, o valor preditivo negativo de 67,6% e a acurácia de 79,8%. Para a observação visual, a sensibilidade foi de 56,9%, a especificidade de 90,3%, o valor preditivo positivo de 91,7%, o valor preditivo negativo de 52,8% e a acurácia de 68,5%. Houve diferenças entre as sensibilidades do CMA e da observação visual (P <0,01). O CMA apresentou maior sensibilidade, ou seja, foi mais capaz de detectar em estro os animais que



realmente estão em estro. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre a especificidade ( $P = 0,28$ ), VPP ( $P = 0,16$ ), VPN ( $P = 0,63$ ), porém houve tendência ( $P = 0,09$ ) para maior acurácia no CMA (Tabela 7).

Quando a ovulação foi usada como referência para o CMA, a sensibilidade foi de 68,9%, a especificidade de 82,4%, o valor preditivo positivo de 94,4%, valor preditivo negativo de 37,8% e a acurácia de 71,4%. Para o AIM, a sensibilidade foi de 73,6%, a especificidade de 70,6%, o valor preditivo positivo de 91,4%, valor preditivo negativo de 38,7% e acurácia de 73,0%. Para a observação visual a sensibilidade foi de 45,9%, a especificidade de 82,4%, o valor preditivo positivo de 91,9%, valor preditivo negativo de 25,9% e acurácia de 52,7% (Tabela 8).

Ao comparar o CMA e o AIM não se verificou diferenças em nenhuma das variáveis analisadas quando a ovulação foi utilizada como referência (Tabela 9). Porém, quando foi comparado o CMA com a observação visual verificou-se maior sensibilidade e acurácia para o colar ( $P < 0,01$ ; Tabela 10). Ainda, quando se comparou o AIM com a observação visual observou-se maior sensibilidades e acurácia para o AIM ( $P < 0,01$ ; Tabela 11).

Concluimos, portanto, que as características de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia são semelhantes entre o CMA e o AIM, e que ambos são mais sensíveis e apresentam maiores acurácia do que os observação visual. Esses dados suportam que o CMA e o AIM possuem maior eficiência em detectar o estro dos animais que realmente estão manifestando estro. Verificou-se, ainda, que apresentam maior acerto em diagnosticar estro.

**Tabela 7** - Resultados do teste de Chi-Quadrado para detecção de estro pelo CMA e observação visual, utilizando o AIM como referência em vacas Holandesas (*Bos taurus*).

Detector de estro	CMA	Observação visual	Valor Chi Quadrado	Valor de P
Sensibilidade	79,3%	56,9%	6,71	<0,01
Especificidade	80,6%	90,3%	1,17	0,28
VPP	88,5%	91,7%	1,95	0,16
VPN	67,6%	52,8%	0,24	0,63
Acurácia	79,8%	68,5%	2,93	0,09

**Tabela 8** - Resultados da detecção de estro pelo CMA e AIM utilizando a ovulação como referência em vacas Holandesas (*Bos taurus*).

Detector de estro	CMA	AIM	Observação Visual
Sensibilidade	68,9%	73,6%	45,9%
Especificidade	82,4%	70,6%	82,4%
VPP	94,4%	91,4%	91,9%
VPN	37,8%	38,7%	25,9%
Acurácia	71,4%	73,0%	52,7%

**Tabela 9** - Resultados do teste de Chi-Quadrado para detecção de estro pelo CMA e AIM utilizando a ovulação como referência em vacas Holandesas (*Bos taurus*).

Detector de estro	CMA	AIM	Valor Chi-Quadrado	Valor de P
Sensibilidade	68,9%	73,6%	0,27	0,60
Especificidade	82,4%	70,6%	0,65	0,42
VPP	94,4%	91,4%	0,40	0,53
VPN	37,8%	38,7%	<0,01	0,94
Acurácia	71,4%	73,0%	0,06	0,81

**Tabela 10** - Resultados do teste de Chi-Quadrado para detecção de estro pelo CMA e observação visual, utilizando a ovulação como referência em vacas Holandesas (*Bos taurus*).

Detector de estro	CMA	Observação visual	Valor Chi-Quadrado	Valor de P
Sensibilidade	68,9%	45,9%	7,99	<0,01
Especificidade	82,4%	82,4%	0	1,0
VPP	94,4%	91,9%	0,23	0,63
VPN	37,8%	25,9%	1,46	0,23
Acurácia	71,4%	52,7%	9,75	<0,01

**Tabela 11** - Resultados do teste de Chi-Quadrado para detecção de estro pelo AIM e observação visual, utilizando a ovulação como referência em vacas Holandesas (*Bos taurus*).

Detector de estro	AIM	Observação visual	Valor Chi-Quadrado	Valor de P
Sensibilidade	73,6%	45,9%	10,48	<0,01
Especificidade	70,6%	82,4%	0,65	0,42
VPP	91,4%	91,9%	<0,01	0,93
VPN	38,7%	25,9%	1,52	0,22
Acurácia	73,0%	52,7%	7,92	<0,01

#### 4.5.3. Influência da temperatura vaginal nos parâmetros estrais

O estresse térmico ocorre quando a temperatura corporal central de uma dada espécie excede sua faixa especificada para atividade normal, resultante de uma carga de calor total (produção interna e ambiente) excedendo a capacidade de dissipação de calor. Isso solicita respostas fisiológicas e comportamentais para reduzir a tensão. Respostas comportamentais e fisiológicas são iniciadas para aumentar a perda de calor e reduzir a produção de calor na tentativa de manter a temperatura corporal dentro da faixa de normalidade. As respostas iniciais são consideradas mecanismos homeostáticos e incluem aumento da ingestão de água, taxas de suor e respiração, redução da frequência cardíaca e ingestão de alimentos (Yousef, 1985; Horowitz, 2002).

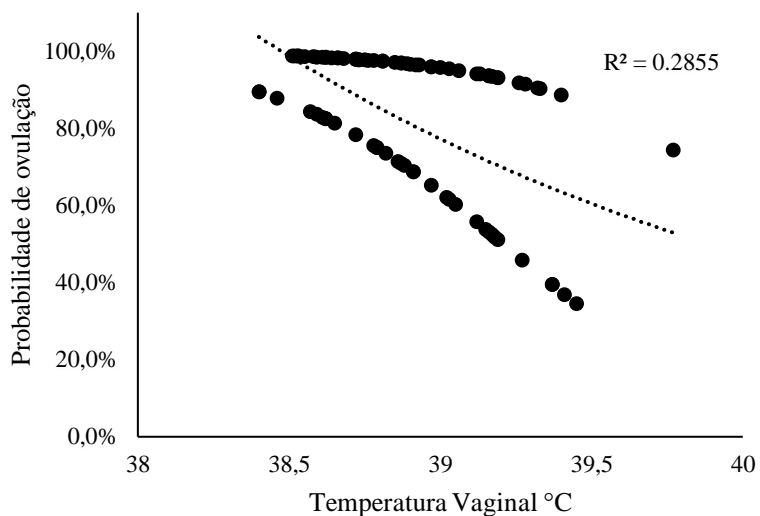
A temperatura retal é usada com frequência para definir parâmetros de adaptação fisiológica ao ambiente, pois seu aumento indica que os mecanismos de liberação de calor tornaram-se insuficientes para manter a homeotermia (JOHNSON, 1965; GATES, 1968) Nesse estudo foi utilizado termômetro eletrônico, que permaneceu na vagina durante todo o experimento, para aferir a temperatura. A temperatura vaginal média das vacas do experimento foi de  $38,9 \pm 0,29$  °C (temperatura aferida de 10 em 10 minutos da retirada dos dispositivos de P4 até a ovulação, sendo que nos animais que não ovularam a temperatura foi aferida até o D14). Ainda, o percentual de tempo que as fêmeas ficaram com temperatura vaginal acima de 39°C foi de  $28,2 \pm 23,0\%$ .

Nesse experimento, foi observado que 4 variáveis reprodutivas foram influenciadas pela temperatura vaginal. Conforme o aumento da temperatura vaginal foi verificada redução na taxa

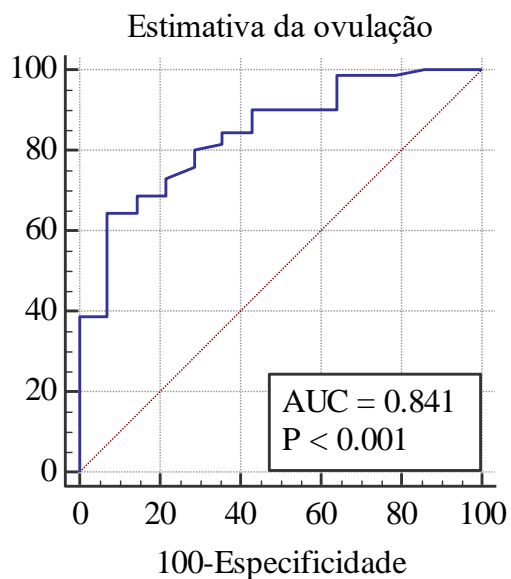
de ovulação ( $P = 0,03$ ), aumento na taxa de dupla ovulação ( $P = 0,02$ ), redução da duração de estro ( $P = 0,04$ ) e redução da identificação de estro pelo AIM ( $P = 0,02$ ). Ainda, conforme o aumento da temperatura vaginal houve tendência ( $P = 0,06$ ) de redução da eficiência de identificação de estro pela observação visual. Entretanto, não foi verificado efeito significativo da temperatura vaginal na identificação de estro pelo CMA ( $P = 0,76$ ). Não foram identificados efeitos significativos da temperatura na MAE ( $P = 0,26$ ), na MIE ( $P = 0,62$ ) e no diâmetro máximo do folículo ovulatório ( $P = 0,43$ ).

A taxa de ovulação foi influenciada pela temperatura vaginal média ( $P = 0,03$ ), pelo percentual do tempo em que o animal ficou com temperatura vaginal acima de  $39^{\circ}\text{C}$  ( $P = 0,05$ ) e pela ocorrência do estro identificados pelo CMA ( $P < 0,01$ ), pelo AIM ( $P < 0,01$ ) e pela observação visual ( $P = 0,04$ ). A temperatura vaginal média foi mais elevada ( $P = 0,01$ ) nos animais que não ovularam ( $39,0 \pm 0,30^{\circ}\text{C}$ ) quando comparada aos animais que ovularam ( $38,8 \pm 0,27^{\circ}\text{C}$ ). O percentual de tempo em que os animais apresentaram temperatura vaginal acima de  $39^{\circ}\text{C}$  foi superior ( $P = 0,05$ ) para os animais que não ovularam ( $38,9 \pm 0,06\%$ ) comparados aos que ovularam ( $26,1 \pm 0,03\%$ ).

O modelo final foi composto pela temperatura vaginal média ( $P = 0,05$ ) e pelo estro determinado pelo CMA ( $P < 0,01$ ). A probabilidade de ovulação em relação a temperatura vaginal média pode ser observada na figura 24. O modelo matemático para ovulação foi testado quanto a sensibilidade e especificidade através análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). O modelo mencionado anteriormente apresentou área sob a curva (AUC) de 0,84 (95% intervalo de confiança (CI) = 0.718-0.939), sensibilidade de 64,3% e especificidade de 92,9% e  $P < 0,01$  (Figura 25).



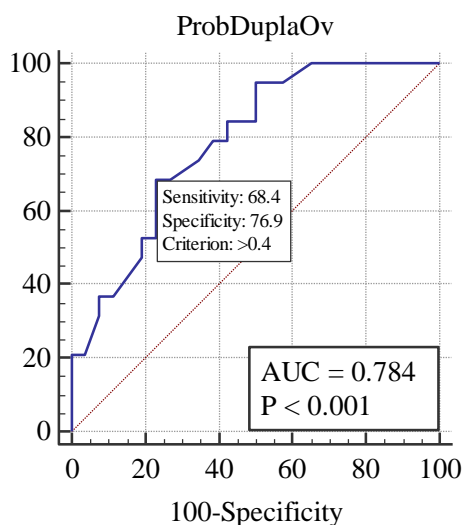
**Figura 24** - Relação entre a probabilidade de ovulação e a temperatura vaginal (mensurada do D8 ao D14) em vacas Holandesas (*Bos taurus*) lactantes que manifestaram (linha superior) ou não (linha inferior) estro. Efeito da temperatura vaginal conforme regressão logística multivariada (N = 84). Equação da probabilidade de Ovulação =  $1 / 1 + \exp 103,57 - 2,6416 \times \text{temperatura vaginal média (}^{\circ}\text{C)} + 2,5547 \times 1$  se animal apresentou estro pelo CMA (P = 0,05).



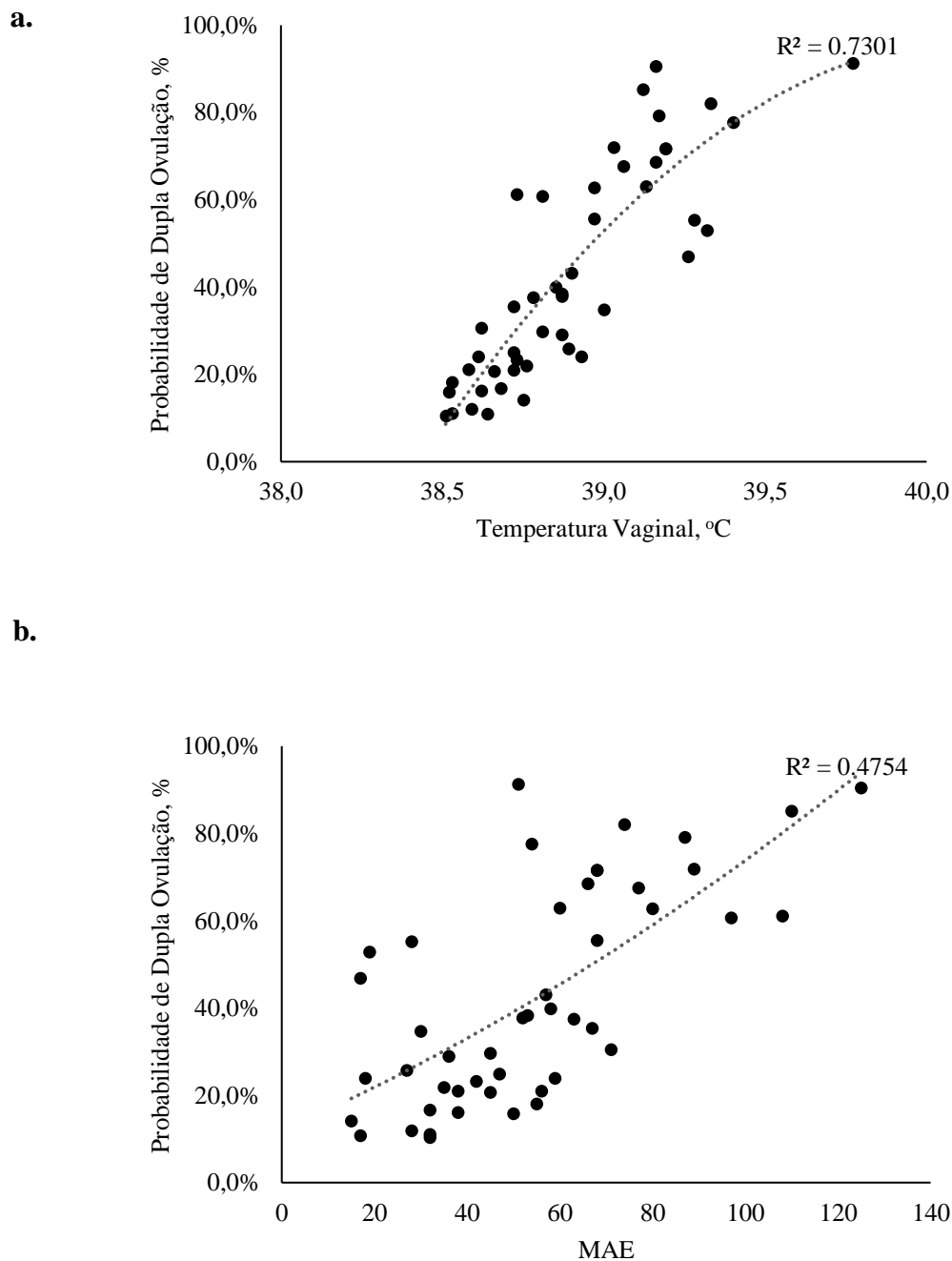
**Figura 25** - Curva ROC para a estimativa da ovulação em vacas Holandesas (*Bos taurus*) lactantes.

Durante o experimento foi verificada taxa de dupla ovulação de 35,1% (26/74). A análise dos dados identificou efeito da temperatura vaginal média ( $P = 0,02$ ), e tendência da MAE ( $P = 0,06$ ) e da variável percentual de tempo com temperatura vaginal acima de  $39^{\circ}\text{C}$  ( $P = 0,07$ ) na taxa de dupla ovulação. A temperatura vaginal média foi superior ( $P = 0,01$ ) nos animais que apresentaram dupla ovulação ( $38,9 \pm 0,27^{\circ}\text{C}$ ) quando comparados com os que ovularam apenas um folículo ( $38,7 \pm 0,28^{\circ}\text{C}$ ). A MAE das vacas com dupla ovulação foi de  $61,9 \pm 29,4$ , superior quando comparada com a MAE das vacas com ovulação simples ( $46,3 \pm 21,2$ ;  $P = 0,01$ ). Houve tendência ( $P = 0,10$ ) do percentual de tempo com temperatura vaginal acima de  $39^{\circ}\text{C}$ , sendo que as fêmeas com dupla ovulação apresentaram maior percentual de tempo que as fêmeas de ovulação simples ( $24,4 \pm 0,23\%$  vs  $17,5 \pm 0,23\%$ ).

O modelo multivariado final foi composto pela temperatura vaginal média ( $P = 0,03$ ) e MAE ( $0,09$ ) e foi testado quanto a sensibilidade e especificidade através análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). O modelo mencionado anteriormente apresentou área sob a curva (AUC) de 0,78 (95% intervalo de confiança (CI) = 0.637 - 0.893), sensibilidade de 68,4% e especificidade de 76,9% e  $P < 0,01$  (Figura 26). A relação entre a probabilidade de dupla ovulação e a temperatura vaginal média e a MAE estão representadas nas figuras (27 a e b).



**Figura 26** - Curva ROC para a estimativa de dupla ovulação em vacas Holandesas (*Bos taurus*) lactantes.



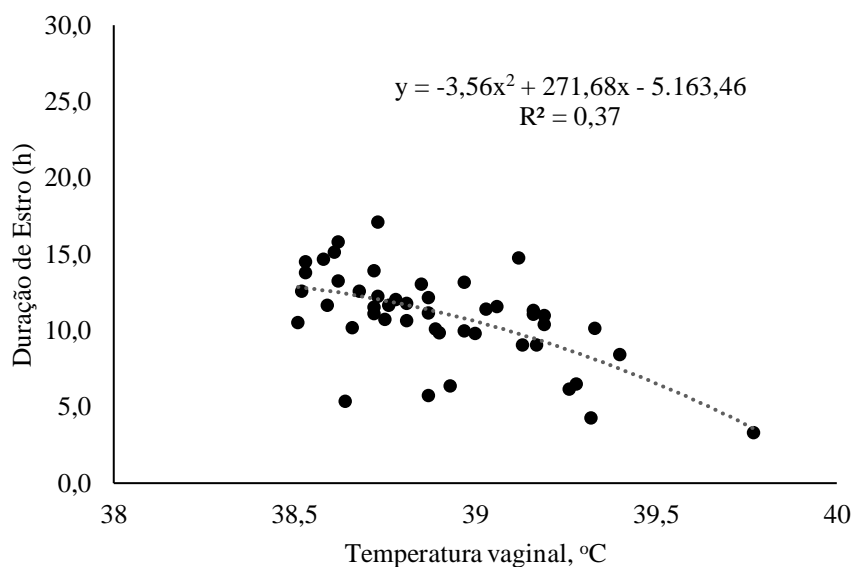
**Figura 27 - a:** Relação entre a probabilidade de dupla ovulação e a temperatura vaginal (mensurada do D8 ao D14) em vacas Holandesas (*Bos taurus*) lactantes. Efeito da temperatura vaginal de acordo regressão logística multivariada. (N=47). Equação da probabilidade de dupla ovulação =  $1 / 1 + \exp -125,89 + 3,1926 \times \text{temperatura vaginal média} + 0,02497 \times \text{MAE}$  (P = 0,03). **b:** Relação entre a probabilidade de dupla ovulação e máxima atividade de estro (MAE) em vacas Holandesas (*Bos taurus*) lactantes. Efeito da MAE de acordo regressão logística multivariada (N=47). Equação da probabilidade de dupla ovulação =  $1 / 1 + \exp -125,89 + 3,1926 \times \text{temperatura vaginal média} + 0,02497 \times \text{MAE}$  (P = 0,09).



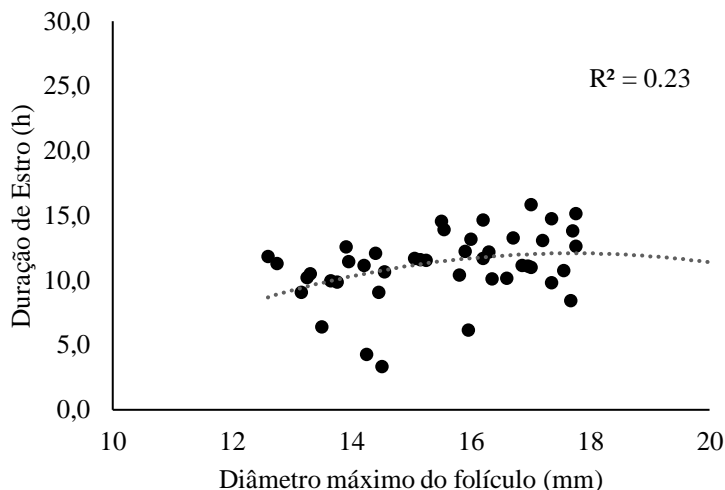
A duração de estro mensurado pelo equipamento (CMA) foi de  $10,7 \pm 6,1$  horas e o intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e o início do estro foi de  $61,7 \pm 21,8$  horas. O intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e a ovulação foi de  $93,1 \pm 23,0$  horas, enquanto o intervalo entre o início do estro e a ovulação foi de  $27,9 \pm 13,7$  horas.

Ao analisar as variáveis que influenciaram a duração do estro foi verificado pelo modelo multivariável que o diâmetro máximo do maior folículo apresentou relação linear ( $P = 0,05$ ) e quadrática ( $P = 0,05$ ). A duração do estro detectada pelo CMA aumentou conforme aumentou o diâmetro máximo do maior folículo após a retirada do dispositivo de P4 (Figura 28b). Verificou-se, também, relação da temperatura vaginal média ( $P < 0,01$ ) com a duração do estro. Com o aumento da temperatura vaginal ocorreu diminuição da duração do estro (Figura 28a). A atividade máxima de estro (MAE) também afetou ( $P = 0,02$ ) a duração do estro. Quanto maior o MAE maior a duração do estro (Figura 28c).

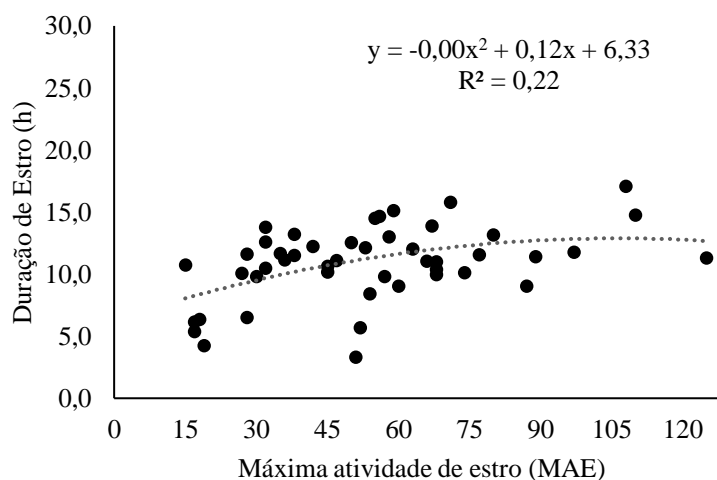
**a.**



b.



c.



**Figura 28 - a:** Relação entre a duração do estro em horas e o diâmetro máximo do folículo (mm) em vacas Holandesas (*Bos taurus*; N = 47). Estimativa duração de estro =  $271,21 + 5,5666 \times \text{diâmetro máximo do folículo} - 0,1543 \times \text{diâmetro máximo do folículo}^2 - 8,0445 \times \text{temperatura vaginal média} + 0,07390 \times \text{MAE}$  (P = 0,05). **b:** Relação entre a duração do estro em horas e temperatura vaginal em °C (mensurada do D8 ao D14) em vacas Holandesas (*Bos taurus*) lactantes. Efeito da temperatura vaginal de acordo regressão logística multivariada. (N=47). Estimativa duração de estro =  $271,21 + 5,5666 \times \text{diâmetro máximo do folículo} - 0,1543 \times \text{diâmetro máximo do folículo}^2 - 8,0445 \times \text{temperatura vaginal média} + 0,07390 \times \text{MAE}$  (P = 0,07). **c:** Relação entre a duração do estro em horas e a atividade máxima de estro (MAE) vacas Holandesas (*Bos taurus*) lactantes (N = 47). Efeito da temperatura vaginal de acordo regressão logística multivariada. (N=47). Estimativa duração de estro =  $271,21 + 5,5666 \times \text{diâmetro máximo do folículo} - 0,1543 \times \text{diâmetro máximo do folículo}^2 - 8,0445 \times \text{temperatura vaginal média} + 0,07390 \times \text{MAE}$  (P < 0,01).

Na literatura há inúmeros trabalhos que demonstram os impactos do estresse térmico no desempenho produtivo e reprodutivo de vacas leiteiras (THATCHER, 1974; FUQUAY, 1981; GWAZDAUSKAS, 1985; HANSEN; ARECHIGA, 1999; WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000; HANSEN et al., 2001; RUTLEDGE, 2001). Esse é um problema que afeta aproximadamente 60% da população mundial de bovinos (WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000) e gera severas perdas econômicas (DARAMOLA; ABIOJA; ONAGBESAN, 2012). Somente nos Estados Unidos, estima-se que os prejuízos causados pelo estresse térmico anualmente cheguem a US\$ 1 bilhão (ST-PIERRE; COBANOV; SCHNITKEY, 2003). Wilson et al. (1998) ao avaliarem os efeitos do estresse térmico induzido nas funções ovarianas de vacas holandesas lactantes verificaram que houve comprometimento do crescimento folicular e dos mecanismos de luteólise, o que resultou em atraso na luteólise e menor taxa de ovulação dos folículos da segunda onda de crescimento folicular (91 vs 18%) nos animais expostos à estresse calórico. Torres-Júnior (2007), ao submeter vacas Gir (*Bos indicus*) à estresse calórico, atestou que o estresse afetou negativamente a dinâmica ovariana, ocasionando falha no mecanismo de dinâmica folicular, levando a longos períodos de aciclicidade ( $P4 < 1\text{ng/mL}$ ), ciclos de curta duração, presença de co-dominância, e diminuição da produção *in vitro* de embriões por um período superior a 105 dias.

A diminuição na taxa de prenhez nos meses mais quentes do ano (CAVESTANY; EL-WISHY; FOOTE, 1985; HANSEN, 2007) pode estar associada a maior sensibilidade dos oócitos e embriões ao estresse térmico nos estágios iniciais de desenvolvimento (ROTH, 2008; AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; GENDELMAN; ROTH, 2012). Tais efeitos negativos são relatados principalmente em vacas produtoras de leite, que são submetidas a manejo nutricional diferenciado (ingestão de elevadas quantidades de ração) e apresentam maior dificuldade para o controle da temperatura corporal. Esses fatores contribuem para que os efeitos do estresse calórico se agravem nessa categoria de animais (BERMAN et al., 1985; UMPHREY et al., 2001).

O mecanismo endócrino responsável pelas alterações da dinâmica do crescimento folicular e do estabelecimento da dominância folicular em animais sob estresse térmico é muito complexo e não totalmente esclarecido (TORRES-JÚNIOR, 2007). Considera-se que o estresse calórico reduz a capacidade de produção de androstenediona das células da teca interna e de estradiol pelas células da granulosa, levando a também a diminuição dos níveis de inibina intrafolicular. A baixa

concentração de inibina, combinada com a baixa secreção de estradiol, favorece a liberação de FSH que se manifesta pelo aumento de co-dominância (seleção de mais de um folículo dominante por onda de crescimento folicular) e pela alta incidência de duplas ovulações. (WOLFENSON et al., 1997; ROTH, 2017; SARTORI et al., 2004; WILTBANK et al., 2006). Quando um animal é submetido a uma condição de estresse, seja esse sazonal (BADINGA et al., 1993) ou induzido (ROTH, 2017), há aumento no número de folículos médios (6 a 9 mm) e grandes (>9mm) caracterizando uma ineficiência no processo de dominância folicular. Esses fenômenos aumentam a quantidade de múltiplas ovulações. Além dos efeitos do estresse calórico na dinâmica do crescimento folicular, em vacas de leite de alta produção um processo semelhante ocorre devido ao alto metabolismo de esteroides sexuais (estradiol e progesterona). Com o aumento da ingestão de matéria seca para produção de leite ocorre aumento do fluxo sanguíneo hepático e aumento da metabolização dos esteroides. Com a redução do estradiol circulante ocorre aumento dos pulsos de FSH, que também podem aumentar a codominância folicular e elevar a quantidade de duplas ovulações (SARTORI et al., 2002; LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004; WILTBANK et al., 2006).

De acordo com a literatura, sugere-se que o estresse térmico reduz a produção estradiol pelas células da granulosa (WOLFENSON et al., 1997; ROTH, 2017), fato esse que pode explicar a associação significativa entre a maior temperatura vaginal e a menor duração de estro encontrada no presente estudo.

Em estudo realizado por Badinga et al. (1993), vacas que foram submetidas à sombra apresentaram folículos dominantes de maior diâmetro (16,4 vs 14,5 mm) quando comparadas com vacas sem acesso à sombra. Da mesma forma, em outro estudo realizado com condições climáticas controladas, vacas em condições termo neutras (19 ° C de temperatura ambiente, 60% de umidade relativa) apresentaram maior diâmetro do folículo dominante que vacas sob estresse pelo calor (WILSON et al., 1998). No presente estudo, entretanto, não foram observadas influências significativas da temperatura vaginal no diâmetro máximo do maior folículo de vacas holandesas lactantes mensurados entre os dias 8 e 14 do protocolo de sincronização.

Schüller; Michaelis e Heuwieser (2017) verificaram que a probabilidade de identificação de estro diminuiu com o aumento da temperatura, corroborando com os resultados do presente estudo. Foi possível aferir que vacas com temperaturas mais elevadas demonstraram menos estro pelo AIM. Porém, a temperatura vaginal não afetou a identificação do estro pelo CMA.

#### 4.5.4 Conclusão

As hipóteses do presente estudo foram parcialmente confirmadas. O colar monitor de atividade (CMA) foi eficiente na detecção de estro em vacas Holandesas lactantes (*Bos taurus*). Quando o AIM foi usado como referência, o CMA apresentou sensibilidade de 79,3%, especificidade de 80,6%, valor preditivo positivo de 88,5%, valor preditivo negativo de 67,6% e acurácia de 79,8%. Quando a ovulação foi usada como referência, o CMA apresentou sensibilidade de 68,9%, especificidade de 82,4%, valor preditivo positivo de 94,4%, valor preditivo negativo de 37,8% e acurácia de 71,4%.

A temperatura vaginal interferiu negativamente 4 variáveis reprodutivas, confirmando parcialmente a hipótese do presente estudo. Conforme houve aumento da temperatura vaginal foi verificada redução na taxa de ovulação ( $P = 0,03$ ), aumento na taxa de dupla ovulação ( $P = 0,02$ ), redução da duração de estro ( $P = 0,04$ ) e redução da identificação de estro pelo AIM ( $P = 0,02$ ). Ainda, conforme o aumento da temperatura vaginal houve tendência ( $P = 0,06$ ) de redução da eficiência de identificação de estro pela observação visual. Entretanto, não foi verificado efeito significativo da temperatura vaginal na identificação de estro pelo CMA ( $P = 0,76$ ). Ainda, não foram identificados efeitos significativos da temperatura na MAE ( $P = 0,26$ ), na MIE ( $P = 0,62$ ) e no diâmetro máximo do folículo ovulatório ( $P = 0,43$ ).

## 5. EXPERIMENTO 3: Efeito da atividade e intensidade do estro (avaliados pelo colar e pedômetro) na eficiência reprodutiva de vacas Girolando em lactação (*Bos taurus x Bos indicus*) submetidas à transferência de embriões em tempo fixo (TETF)

### 5.1. RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a associação da atividade e da intensidade de estro na taxa de prenhez por transferência de embrião em tempo fixo (P/TE) em vacas lactantes da raça Girolando (*Bos taurus x Bos indicus*). A atividade, intensidade e duração do estro foi avaliada pelos dispositivos de monitoramento de atividade (colar e/ou pedômetro) em 404 transferências de embrião. Exames ultrassonográficos foram realizados no dia 0 do protocolo para verificar presença de CL e no dia da transferência de embrião para avaliar a presença de CL, e com 30 e 60 dias para aferir a P/TE e a perda gestacional. A máxima atividade de estro do colar (MAE<sub>C</sub>) foi classificada em alta (Alta-MAE<sub>C</sub>; superior a 64 movimentos) e baixa (Baixa-MAE<sub>C</sub>; ≤ 64 movimentos). A máxima intensidade de estro do colar (MIE<sub>C</sub>) foi classificada em alta (Alta-MIE<sub>C</sub>; ≥ 36 desvios padrões) e baixa (Baixa-MIE<sub>C</sub>; < 36 desvios padrões). Para o pedômetro, utilizou-se classificação de alta atividade (Alta-MAE<sub>p</sub>; ≥ 2.900 passos) e baixa atividade (Baixa-MAE<sub>p</sub>; < 2.900 passos) e alta intensidade (Alta-MIE<sub>p</sub>; ≥ 28 desvios padrões) e baixa (Baixa-MIE<sub>p</sub>; < 29 desvios padrões) intensidade. A P/TE aos 30 dias foi de 33,4% (134/404). Verificou-se efeito de MAE<sub>C</sub> na P/TE (P = 0,01). As vacas com Alta-MAE<sub>C</sub> apresentaram maior P/TE (Alta-MAE<sub>C</sub> = 39,0% vs Baixa-MAE<sub>C</sub> = 22,8%). O MIE<sub>C</sub> (P = 0,25) e o MIE<sub>p</sub> (P = 0,76) não apresentaram efeito significativo na P/TE. Entretanto, verificou-se tendência (P = 0,06) para MAE<sub>p</sub> na P/TE, com aumento da P/TE para receptoras Alta-MAE<sub>p</sub> (Alta-MAE<sub>p</sub> = 39,0% Baixa-MAE<sub>p</sub> = 30,8%). Não foram verificados efeitos de doadora (P = 0,99), touro (P = 0,11), grau de sangue (P=0,92), transferidor (P = 0,15), produção de leite (P = 0,61), duração de estro pelo colar (P = 0,21) e duração de estro pelo pedômetro (P = 0,39) na P/TE. Verificou-se somente efeito do tipo de embrião (frescos ou congelados; P = 0,01), com maior P/TE para os embriões frescos. Comparando as receptoras que ficaram gestantes com as não gestantes foi verificado maior MAE<sub>C</sub> para as gestantes (Alta-MAE<sub>C</sub> = 82,4 ± 31,2 vs Baixa-MAE<sub>C</sub> = 74,2 ± 33,4; P = 0,02). Ainda, as receptoras com Alta-MAE<sub>C</sub> apresentaram maior P/TE que as receptoras Baixa-MAE<sub>C</sub> (39,0% vs 22,8% P <0,01).

Dentre as 134 prenhez identificadas no primeiro diagnóstico de gestação com 30 dias, verificou-se perda gestacional em 14,2% (19/134), quando o diagnóstico foi realizado aos 60 dias de gestação. Na análise multivariada, a perda de gestação foi relacionada positivamente com a produção de leite ( $P = 0,04$ ) e negativamente com a MAEc ( $P = 0,06$ ). A produção de leite dos animais que apresentaram perda gestacional foi significativamente maior do que os animais que mantiveram a gestação ( $39,7 \pm 2,2$  litros vs  $33,7 \pm 0,9$  litros;  $P = 0,01$ ). A MAEc foi menor nos animais que apresentaram perda gestacional do que naqueles que mantiveram a gestação ( $68,1 \pm 6,7$  vs  $84,0 \pm 2,9$ ;  $P = 0,03$ )

A partir de desse experimento pode-se concluir que animais que emprenharam na TETF apresentaram elevada atividade de movimentos aferidas pelo colar (MAEc) quando comparados com animais que não emprenharam. Além disso, foi verificado que as vacas que emprenharam e mantiveram a gestação, sem perda gestacional até 60 dias pós TETF, também apresentaram maior MAEc quando comparadas com aquelas que emprenharam e perderam a gestação. Diante disso, essas informações podem ser utilizadas como estratégias na tomada de decisões para melhorar a eficiência de programas que utilizam a biotecnologia da transferência de embriões.

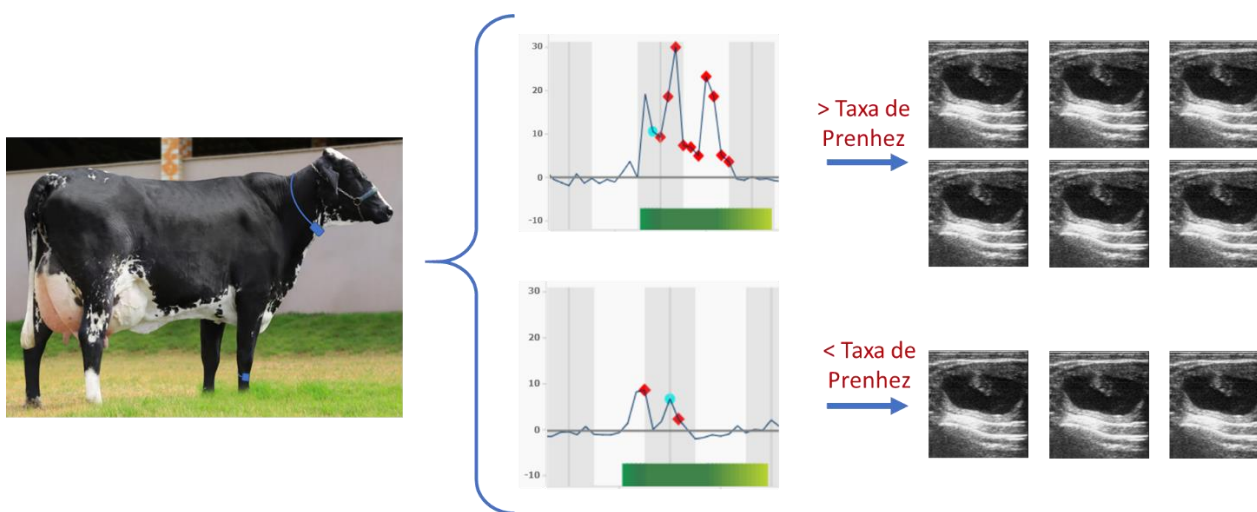
## 5.2. INTRODUÇÃO

São muitos os estudos que relatam o efeito da condição metabólica e ovariana do animal na reprodução. Entretanto, há poucos estudos na literatura sobre os efeitos da atividade e intensidade de estro na fertilidade das vacas submetidas a IATF ou TETF. Informações quantitativas sobre a atividade e intensidade do estro somente são possíveis quando utilizados dados dos monitores de atividade. Além disso, tal tecnologia poderia ser usada para melhorar a acurácia da detecção de estro com o objetivo de aumentar a taxa de serviço, prever os resultados de prenhez e, especialmente, ser usada como ferramenta estratégica para melhorar a tomada de decisões em programas reprodutivos (ex: utilização programada de sêmen ou embrião de melhor qualidade e maior custo, re-sincronização de animais que não estão aptos para serem cobertos).

### 5.3. HIPÓTESE E OBJETIVO

A hipótese do presente estudo é que a probabilidade de prenhez após a transferência de embriões pode ser correlacionada positivamente com a intensidade, atividade e duração de estro em fêmeas Girolando lactantes (Figura 29).

O objetivo desse experimento é avaliar se fatores relacionados ao estro (intensidade, atividade e duração) têm relação com a probabilidade de prenhez e com a perda gestacional.



**Figura 29** - Ilustração da hipótese de que a atividade e a intensidade do estro afetem positivamente o estabelecimento da gestação em vacas Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*) lactantes submetidas a protocolo de TETF.

### 5.4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 5.4.1. Animais, produção de leite, protocolo hormonal e identificação de estro

Esse foi um estudo retrospectivo realizado com informações do estro e da eficiência reprodutiva de vacas da raça Girolando em lactação, provenientes da fazenda Boa Fé localizada em Uberaba, Minas Gerais. Ao todo foram realizadas 675 sincronizações para transferência de embriões em tempo fixo. Os animais foram mantidos em freestall com cama de areia e alimentadas com mix de concentrado e volumoso formulado para os requerimentos nutricionais da categoria



(Figura 30). O DEL médio das vacas envolvidas no estudo foi de  $134 \pm 104$  dias e a produção média de leite foi de  $34,3 \pm 10,5$  litros.

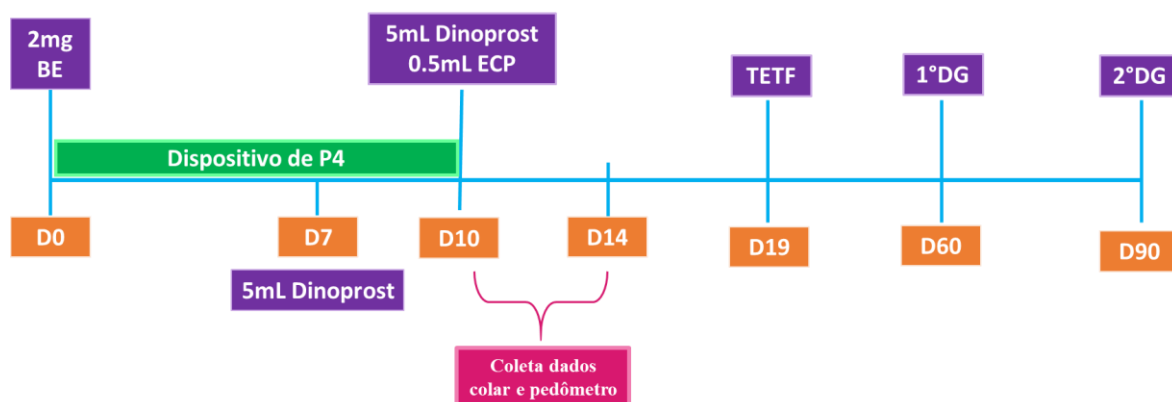
Para sincronizar os animais, no dia 0 do protocolo foi administrado um dispositivo intravaginal de 1,9g progesterona (Cidr®, Zoetis), associado a 2mg de Benzoato de Estradiol (BE, Sincrodiol®, Ourofino Agronegócio). No dia 7, receberam 25mg de Dinoprost (Lutalyse, Zoetis.) e no dia 10 o dispositivo intravaginal de P4 foi removido, juntamente com a administração de 25mg de Dinoprost (Lutalyse, Zoetis.) e 1mg de Cipionato de estradiol (ECP, Zoetis) (Figura 31).

Para a análise dos dados referentes ao efeito da atividade e intensidade do estro (avaliados pelo colar e pedômetro) na eficiência reprodutiva de vacas Girolando em lactação foram utilizados dados estrais de 404 sincronizações. Para utilização das receptoras de embrião nas análises estatísticas foram estabelecidos alguns requisitos: 1) animal possuir pelo menos 1 método de detecção de estro (colar ou pedômetro), 2) animal ter sido verificado em estro por pelo menos um dos métodos e 3) o animal ter recebido a transferência de embrião ao final do protocolo de TETF. As sincronizações que não respeitaram esses critérios foram excluídas das análises estatísticas.

O cálculo da eficiência dos colares para identificação do estro foi realizado levando em consideração a sensibilidade, a especificidade, a acurácia, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo. Para essas análises foram utilizados dados de 611 sincronizações para TETF e os dados do pedômetro foram usados como referência “padrão ouro”. Foram excluídas 65 sincronizações devido às receptoras possuírem apenas um dos dispositivos de monitoramento impossibilitando a realização das análises.



**Figura 30** - Vacas Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*) lactantes mantidas em freestall.



**Figura 31** - Esquema do protocolo hormonal utilizado na TETF de vacas holandesas lactantes (*Bos taurus* x *Bos indicus*).

#### 5.4.2. Dispositivo de monitoramento de atividade (DMA) e eventos de estro

Todos os animais possuíam colar monitor de atividade (CMA) ou pedômetro ou ambos, uma vez que a fazenda faz uso da tecnologia há mais de 3 anos.

O DMA é composto por 4 componentes, uma antena, um controlador um processador e os colares e/ou pedômetros. A antena estava disposta de forma a captar os sinais dos colares e pedômetros 24 horas por dia. Conectado a antena estava instalado um controlador (responsável por captar todas as informações enviadas pela antena) e um processador (equipamento que lê os dados e os transforma em informações) (Figura 32) O processador estava conectado a um notebook com acesso à internet e todas as informações de estro puderam ser acessadas na plataforma online do DMA (Figura 6).

O colar funciona com base em um acelerômetro que fica disposto em seu interior. Esse acelerômetro é capaz de reconhecer quais os movimentos de cabeça são específicos de estro e quão intensos são esses movimentos. Os dados de atividade e intensidade foram registrados a cada 2 horas e enviados para a antena, controlador, processador e finalmente para a plataforma online. A atividade medida pelo equipamento é baseada no número de movimentos de cabeça e pescoço relacionados a estro (repouso de queixo, monta, movimentos inquietos de cabeça) que o animal apresentou no período de 2 horas. A intensidade corresponde a intensidade daquele movimento e é calculada pelo score Z, que é o quanto uma medida se afasta da média em termos de desvios padrão. Das 404 transferências de embriões realizadas durante o experimento, foi possível obter os dados para análise da atividade e a intensidade do colar de 386 eventos estrais.

O pedômetro mede o número de passos que o animal realizou no período de 2 horas (atividade). A intensidade é calculada da mesma forma utilizada na análise dos dados do colar (score Z). Das 404 transferências de embriões realizadas durante o experimento, 354 eventos estrais foram analisados para aferir a atividade e a intensidade do pedômetro.

Em 341 eventos de estro os animais possuíam informações tanto do colar quanto do pedômetro. Desses, 336 eventos foram associados ao estro de animais nos dois dispositivos (colar e pedômetro), 5 eventos foram associados ao estro somente no pedômetro e 15 eventos foram associados ao estro somente no colar.

Os dados de atividade e intensidade de estro foram analisados com base na variável máxima que corresponde ao máximo de atividade e intensidade que o animal apresentou durante o período de estro. A atividade e a intensidade de estro foram classificadas como alta e baixa de acordo com a curva ROC. A máxima atividade de estro do colar (MAE<sub>C</sub>) foi classificada em alta (Alta-MAE<sub>C</sub>; superior a 64 movimentos) e baixa (Baixa-MAE<sub>C</sub>; ≤ 64 movimentos). A máxima intensidade de estro do colar (MIE<sub>C</sub>) foi classificada em alta (Alta-MIE<sub>C</sub>; ≥ 36 desvios padrões) e baixa (Baixa-MIE<sub>C</sub>; < 36 desvios padrões). Para o pedômetro, utilizou-se classificação de alta atividade (Alta-MAE<sub>p</sub>; ≥ 2.900 passos) e baixa atividade (Baixa-MAE<sub>p</sub>; < 2.900 passos) e alta intensidade (Alta-MIE<sub>p</sub>; ≥ 28 desvios padrões) e baixa (Baixa-MIE<sub>p</sub>; < 29 desvios padrões) intensidade.



**Figura 32** - Controlador e processador do dispositivo de monitoramento de atividade (DMA).

### 5.4.3. Ultrassonografia

Exames ultrassonográficos foram realizados no dia 0 do protocolo para verificar presença de folículos grandes ou de CL e no dia da transferência de embrião para avaliar a presença de CL. Todas as avaliações foram conduzidas pelo mesmo técnico usando o ultrassom Mindray DP 2220 (Mindray Bio-Medical Electronics, China).

#### 5.4.4. Transferência de embriões

No dia 19 do protocolo, 404 embriões foram transferidos em animais que apresentaram estro (colar ou pedômetro ou em ambos) e presença de CL no dia da transferência. Dos embriões transferidos, 266 foram frescos e 138 congelados (direct transfer; DT). Do total de embriões transferidos, 93 foram transferidos pelo técnico A, 25 pelo técnico B, 28 pelo técnico C e 258 pelo técnico D. Os embriões transferidos foram classificados em blastocisto eclodido (n=5), blastocisto (n=18), blastocisto em expansão (n=25) e blastocisto expandido (n=356).

#### 5.4.5. Análises estatísticas

As análises das informações aferidas pelo colar e pelo pedômetro foram realizadas separadamente. Ambos os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Raleigh, NC). As variáveis contínuas foram analisadas por ANOVA (análise de variância) com o PROC MIXED. Os dados binários foram analisados por regressão logística com o PROC GLIMMIX. Para a construção do modelo estatístico foi utilizado réplica como variável aleatória e presença de CL no D0, transferidor, empresa de PIVE (produção in vitro de embriões), doadora, touro, e classificação do embrião como variáveis classificatórias. As análises de correlações foram realizadas no Excel® (Microsoft Office 365, Washington, Estados Unidos). Ainda, foi realizada a regressão logística com o PROC GLIMMIX utilizando o LSMEANS, solicitando o ajuste para Tukey das variáveis MAE e MIE. A curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi utilizada para determinar o ponto de corte das variáveis MAE e MIE. Para o colar, a  $MAE \leq 64$  foi considerada baixa atividade (BMAEc) e a  $MAE > 64$  foi considerada alta atividade (AMAEC) e a  $MIE < 36$  foi considerada baixa intensidade (BMIEc) e  $MIE \geq 36$  foi considerada alta intensidade (AMIEc). Para o pedômetro, os pontos de corte foram  $MAE < 2900$  para baixa atividade (BMAEp) e  $MAE \geq 2900$  para alta atividade (AMAEp) e  $MIE < 28$  para baixa intensidade (BMIEp) e  $MIE \geq 28$  para alta intensidade (AMIEp). Diferenças com  $P \leq 0,05$  foram consideradas significativas, enquanto  $0,05 > P < 0,10$  foram consideradas tendências.

Para verificar se havia diferença estatística entre a taxa de detecção de estro do CMA, AIM e observação visual foi utilizado PROC GENMOD do SAS.

Para calcular a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo (VPP), o valor preditivo negativo (VPN) e a acurácia foi estabelecida uma matriz de confusão (Figura 33), que consistiu em classificar os eventos de estro identificados pelo colar em verdadeiros positivos (VP), verdadeiros negativos (VN), falso positivos (FP) e falso negativos (FN), utilizando o pedômetro como padrão “ouro”. As fórmulas para os cálculos das características do teste estão representadas abaixo.

- Sensibilidade =  $VP / (VP + FN)$  - É a capacidade do colar em detectar o estro dos animais que realmente estão em estro.
- Especificidade =  $VN / (VN + FP)$  - É a capacidade do colar em detectar os estros verdadeiros negativos, isto é, de diagnosticar corretamente os indivíduos que não estão em estro.
- Valor Preditivo Negativo (VPN) =  $VN / (VN + FN)$  - É a probabilidade de um indivíduo que apresenta resultado positivo estar realmente em estro
- Valor Preditivo Positivo (VPP) =  $VP / (VP + FP)$  - É a probabilidade de um indivíduo que apresenta resultado negativo não estar realmente em estro
- Acurácia =  $(VP + VN) / (VP + FP + VN + FN)$  - Identifica a porcentagem de animais que foram corretamente classificados (em estro ou não) pelo teste.

		Valores preditos pelo padrão ouro (pedômetro)	
		Positivo	Negativo
Valores preditos pelo colar (CMA)	Positivo	Verdadeiro Positivo (VP)	Falso positivo (FP)
	Negativo	Falso negativo (FN)	Verdadeiro Negativo (VN)

**Figura 33** - Matriz de confusão do experimento com vacas Girolando lactantes.

## 5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.5.1. Número de animais, eventos de estro e eficiência do colar (CMA)

Durante o período do experimento foram realizados 675 protocolos de sincronização para transferência em embrião em tempo fixo (TETF) dos quais 404 manifestaram estro e foram utilizados para a análise de dados desse experimento.

Das 404 sincronizações com estro detectado pelo colar e/ou pedômetro, 369 possuíam pedômetro, 391 possuíam colar e 356 possuíam colar e pedômetro. Dentre os animais que possuíam pedômetro 95,9% apresentaram estro (354/369) por esse dispositivo. Dentro do grupo que possuíam colar, 98,7% (386/391) apresentou estro por esse dispositivo.

A taxa de detecção de estro foi de 76,3% (479/628) para o pedômetro, 71,8% (471/656) para o colar e 74,4% (454/610) para quem possuía os dois dispositivos. Esses dados apontam que não houve diferença entre os dispositivos e não houve efeito aditivo na associação do colar com o pedômetro na eficiência de detecção do estro ( $P = 0,16$ )

Para avaliar a eficiência dos colares na identificação do estro foi calculada a sensibilidade, a especificidade, a acurácia, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo. Para tanto, os dados do pedômetro foram usados como referência “padrão ouro”. Foram excluídos, para essa

análise, 65 eventos de estro (9,6%) pois os animais possuíam somente um dos dispositivos (ou colar ou pedômetro), ao todo foram avaliados 611 eventos de estro (90,4%). Foram classificados 455 estros como verdadeiros positivos, 114 como verdadeiros negativos, 32 como falsos positivos e 10 como falsos negativos. A sensibilidade foi de 97,8%, a especificidade de 78,1%, o valor preditivo positivo de 93,4%, o valor preditivo negativo de 91,9% e a acurácia de 93,1%. Corroborando com os achados do presente estudo, Holman et al. (2011) concluíram que a sensibilidade dos colares (com sensores multidirecionais capazes de detectar comportamentos gerais mais agitados) não foi diferente da sensibilidade dos pedômetros (medindo o número de passos por dia). Esses achados são indicativos que a eficiência de detecção de estro do colar e do pedômetro é semelhante.

### 5.5.2. Descrição dos eventos de estro

Tanto no colar como no pedômetro, os eventos de estro são baseados em duas variáveis: atividade e intensidade. Nas vacas que receberam embrião, a máxima atividade de estro (MAE) durante o período de estro foi de  $76,9 \pm 32,9$  no colar (MAEc) e de  $2.388,3 \pm 698,6$  (MAEp) no pedômetro. Ainda, a máxima intensidade de estro (MIE) foi de  $29,1 \pm 15,5$  no colar (MIEc) e de  $24,4 \pm 16,7$  no pedômetro (MIEp) nas vacas que receberam embrião (Tabela 9). A duração do estro detectada pelo colar foi maior ( $P < 0,01$ ) que a duração do estro detectada pelo pedômetro ( $13,5 \pm 0,3$  horas no colar e de  $12,5 \pm 0,3$  horas no pedômetro; Tabela 12).

**Tabela 12** - Características do estro detectado pelo colar (CMA) e pelo pedômetro em vacas Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*) em lactação.

	Colar (CMA)	Pedômetro	Valore de P
Duração de estro (horas)	$13,5 \pm 0,3$	$12,5 \pm 0,3$	$< 0,01$
Máxima atividade de estro (MAE)	$76,9 \pm 32,9$	$2.388,3 \pm 698,6$	-
Máxima intensidade de estro (MIE)	$29,1 \pm 15,5$	$24,4 \pm 16,7$	-



### 5.5.3. Caracterização dos eventos de estro de acordo com a atividade e intensidade

#### 5.5.3.1. Máxima Atividade de Estro (MAE)

A máxima atividade de estro no colar (MAEc) corresponde a quantidade máxima de movimentos de cabeça e pescoço no período de 2 horas durante o estro. No presente estudo a MAEc foi classificada em alta (Alta-MAEc), quando superou 64 movimentos, e em baixa (Baixa-MAEc), quando o número de movimentos foi  $\leq 64$ . A MAEc para o grupo de Alta-MAEc foi de  $96,0 \pm 1,5$  e para o grupo Baixa-MAEc foi de  $46,1 \pm 1,9$  movimentos de cabeça e pescoço ( $P < 0,01$ ; Tabela 13).

A máxima atividade de estro no pedômetro (MAEp) corresponde a maior quantidade de passos no período de 2 horas durante o estro, foi classificada no presente estudo em alta (Alta-MAEp), quando foi  $\geq 2.900$  passos no período de 2h, e baixa (BMAEp), quando o número de passos foi inferior a 2.900. A média da atividade para o grupo Alta-MAEp foi de  $3.350 \pm 51,0$  passos e para o grupo Baixa-MAEp foi de  $2.100 \pm 28,4$  passos ( $P < 0,01$ ; Tabela 13).

#### 5.5.3.2. Máxima Intensidade de Estro (MIE)

A intensidade de estro corresponde a intensidade dos movimentos de cabeça e pescoço (CMA) ou de passos (pedômetro) e é calculada pelo score Z (quanto uma medida se afasta da média em termos de desvios padrão). A máxima intensidade de estro no colar (MIEc) foi classificada em alta (Alta-MIEc), quando apresentou  $\geq 36$  desvios, e baixa (Baixa-MIEc), quando apresentou  $< 36$  desvios padrões. A intensidade do estro para o grupo Alta-MIEc foi de  $50,7 \pm 1,0$  e para o grupo Baixa-MIEc foi de  $21,7 \pm 0,6$  desvios padrões ( $P < 0,01$ ; Tabela 13).

A máxima intensidade de estro no pedômetro (MIEp) foi classificada em alta (Alta-MIEp), quando a quantidade de desvios padrões foi  $\geq 28$ , e baixa (Baixa-MIEp), quando os desvios foram  $< 28$ . A média de desvios para o grupo Alta-MIEp foi de  $40,6 \pm 1,1$  e para o grupo Baixa-MIEp foi de  $16,9 \pm 0,8$  ( $P < 0,01$ ; Tabela 13).

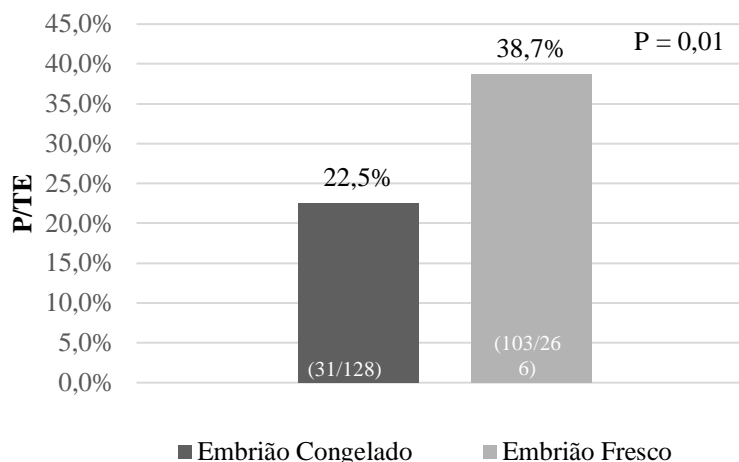
**Tabela 13** - Características do estro de acordo com a alta e baixa atividade e intensidade detectada pelo colar monitor de atividade (CMA) e pelo pedômetro.

	Baixa	Alta	Valor de P
<b>Colar Monitor de Atividade (CMA)</b>			
Máxima Atividade de Estro (MAEc)	96,0 ± 1,5 (n= 241)	46,1 ± 1,9 (n= 145)	P < 0,01
Máxima Intensidade de Estro (MIEc)	50,7 ± 1,0 (n= 100)	21,7 ± 0,6 (n= 286)	P < 0,01
<b>Pedômetro</b>			
Máxima Atividade de Estro (MAEp)	3.350 ± 51,0 (n=82)	2.100 ± 28,4 (n= 272)	P < 0,01
Máxima Intensidade de Estro (MIEp)	40,6 ± 1,1 (n=111)	16,9 ± 0,8 (n=243)	P < 0,01

#### 5.5.4. Fatores que afetam a taxa de prenhez e perda gestacional

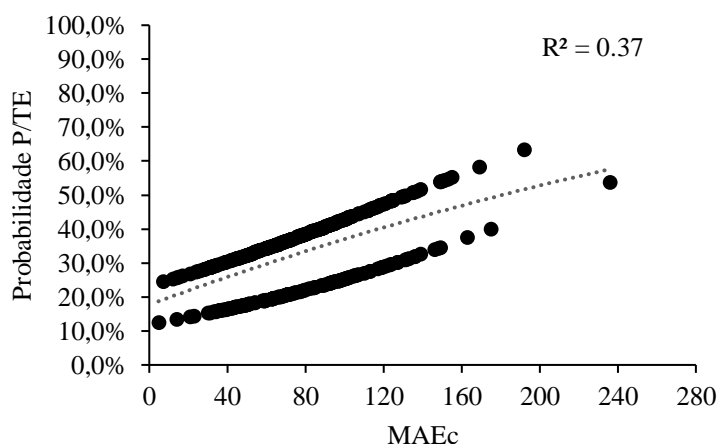
Um dos objetivos desse estudo foi verificar se a atividade e a intensidade de estro mensurada pelo colar e pelo pedômetro têm efeito na taxa de concepção após a transferência de embriões (P/TE) em vacas Girolandas lactantes. A P/TE aos 30 dias de gestação foi de 33,4% (134/404). As variáveis tipo de embrião (frescos ou congelados; P = 0,01) e MAEc (P = 0,01) influenciaram significativamente a P/TE (Figura 34). No entanto, verificou-se apenas tendência (P = 0,06) da MAEp influenciando a P/TE. Ao contrário do esperado, a MIEc (P = 0,25) e a MIEp (P = 0,76) não apresentaram efeito significativo na P/TE. As variáveis doadora (P = 0,99), touro (P = 0,11), grau de sangue (P=0,92), transferidor (P = 0,15), produção de leite (P = 0,61), duração de estro pelo colar (P = 0,21) e duração de estro pelo pedômetro (P = 0,39) não influenciaram a P/TE.

Animais que receberam embriões fresco apresentaram maior P/TE (38,7%;103/266) quando comparados aos que receberam embrião congelado (22,5%; 31/138; P = 0,01; Figura 34).



**Figura 34** - P/TE por tipo de embrião (fresco e congelado) em vacas Girolando (*Bos taurus x Bos indicus*) em lactação (N = 394).

A probabilidade de prenhez de acordo com a MAEc e tipo de embrião está representada na figura 35. Verificou-se que, tanto os embriões transferidos a fresco quanto os embriões transferidos congelados, apresentaram aumento da P/TE com o aumento da MAEc ( $P = 0,01$ ).



**Figura 35** - Relação entre probabilidade de prenhez na TETF de acordo com o tipo de embrião (embrião fresco: linha superior e embrião direct transfer (DT): linha inferior) e a MAEc em vacas Girolando (*Bos taurus x Bos indicus*) em lactação. Efeito do tipo de embrião e MAEc de acordo com a regressão logística multivariada ( $n = 385$ ). Probabilidade de prenhez =  $1 / 1 + \exp(-1,1890 + 0,009033 \times \text{máxima atividade de estro colar} - 0,7934 \text{ se embrião for do tipo DT})$ ; ( $P = 0,01$  para MAEc e  $0,02$  para tipo de embrião).

Comparando a MAEc dos animais que ficaram prenhes ( $82,4 \pm 31,2$ ) com os que não ficaram prenhes ( $74,2 \pm 33,4$ ) foi verificado maior MAEc ( $P = 0,02$ ) nos animais prenhes (Figura 36). Apesar da MAEp ter sido 6% maior nos animais que se tornaram gestantes ( $2.341 \pm 693$  vs  $2.482 \pm 701$ ), houve apenas tendência ( $P = 0,08$ ) para o aumento da P/TE nas receptoras conforme o MAEp (Figura 37).

A comparação da P/TE entre os grupos Alta-MAEc e Baixa-MAEc, Alta-MIEc e Baixa-MIEc, Alta-MAEp e Baixa-MAEp e Alta-MIEp e Baixa-MIEp está apresentada na tabela 14. Animais do grupo Alta-MAEc apresentaram maior P/TE quando comparados aos animais do grupo Baixa-MAEc (39,0% vs 22,8%  $P < 0,01$ ). Esses achados corroboram com Madureira et al. (2019), que verificaram que vacas Holandesas (*Bos taurus*) lactantes do grupo de alta atividade de estro, mensurada pelo colar, emprenharam 37,4%, enquanto os animais com baixa atividade de estro emprenharam 23,9% ( $P > 0,01$ ). Reimers, Smith e Newman (1985) mostraram que existe relação entre sinais de estro e taxa de concepção na primeira inseminação após o parto. Os autores verificaram que animais que aceitaram monta tiveram maior taxa de concepção quando comparados com aqueles que não expressaram esse comportamento. Gwazdauskas, Lineweaver e McGilliard (1983) relataram que a inseminação artificial sem a aceitação de monta resultou em menor prenhez por inseminação (P/IA), aproximadamente 20% menor do que quando a aceitação de monta foi detectada. Sá Filho et al (2011), em trabalho realizado com vacas *Bos indicus*, também verificaram que animais que apresentaram estro tiveram melhores respostas ao protocolo de sincronização da ovulação para IATF. Os autores verificaram que animais que manifestam estro apresentem maiores folículos na IATF, maior taxa de ovulação, maior CL e maiores concentrações de P4 no diestro subsequente à IA e maior taxa de prenhez (61,9% x 41,4%) quando comparados com animais que não manifestaram estro. Embora haja muitos trabalhos relacionados com a presença e ausência de estro com a taxa de prenhez, existem escassos relatos da influência da intensidade e atividade de estro na fertilidade. MacMillan et al. (2020) não verificaram relação significativa entre os parâmetros estrais mensurados pelo colar monitor de atividade (CMA) e a probabilidade de prenhez. Entretanto, Madureira et al. (2015) encontraram resultados semelhantes ao deste estudo. Os autores verificaram que animais com maior atividade de estro apresentaram maior P/AI (36.5 vs. 24.6%) e maiores concentrações circulantes de estradiol do que animais com menor atividade de estro. Moore, Aublet e Butler (2020) verificaram associação positiva da P/IA com a duração do estro mensurada a partir de um dispositivo eletrônico específico (FlashMate),

porém, assim como no presente estudo, não houve associação da P/IA com a duração do estro mensurada pelo colar monitor de atividade.

Não foi verificada diferença significativa na P/TE entre os grupos Alta-MIEc e Baixa-MIEc (39,0% vs 30,8%;  $P = 0,23$ ) e Alta-MIEp e Baixa-MIEp (26,1% vs 35,4%;  $P = 0,11$ ). Entretanto, diferentemente dos efeitos positivos constatados nos grupos MAEc, houve apenas tendência ( $P = 0,06$ ) para aumento de P/TE em animais que apresentaram Alta-MAEp quando comparados com animais que apresentaram Baixa-MAEp (39,0% vs 30,8%).

Dentre as 134 prenhez identificadas no primeiro diagnóstico de gestação com 30 dias, verificou-se perda gestacional em 14,2% (19/134), quando o diagnóstico foi realizado aos 60 dias de gestação. Santos et al. (2004), em levantamento no qual foi analisado vários estudos, estimaram que a incidência de perda de gestação nessa fase varia de 8,3 a 24% em vacas de leite lactantes e de 1,5 a 10,2% em novilhas de leite.

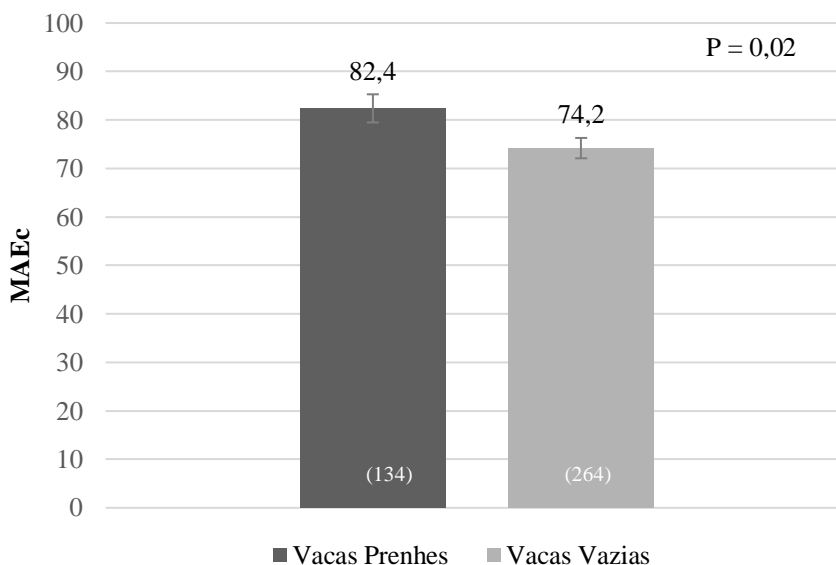
Na análise multivariada, a perda de gestação foi relacionada positivamente com a produção de leite ( $P = 0,04$ ) e negativamente com a MAEc ( $P = 0,06$ ). A produção de leite dos animais que apresentaram perda gestacional foi significativamente maior do que os animais que mantiveram a gestação ( $39,7 \pm 2,2$  litros vs  $33,7 \pm 0,9$  litros;  $P = 0,01$ ; Figura 38), A MAEc foi menor nos animais que apresentaram perda gestacional do que naqueles que mantiveram a gestação ( $68,1 \pm 6,7$  vs  $84,0 \pm 2,9$ ;  $P = 0,03$ ; Figura 39). Esse resultado pode estar associado à produção de estradiol durante o período estral. Estudos evidenciaram maior atividade de estro em animais com maiores concentrações circulantes de estradiol (AUNGIER et al., 2015; MADUREIRA et al., 2015). Ainda, efeitos positivos da exposição ao estradiol durante a fase de estrogênica estão relacionados a efeitos positivos na fase luteínica do ciclo estral e na sobrevivência embrionária (MANN; LAMMING, 2000; SANTOS et al., 2004). Mann e Lamming (2000) demonstraram que as vacas com menores concentrações de estradiol apresentaram subsequente luteólise prematura. A relação entre a probabilidade de perda gestacional e a MAEc está apresentada na Figura 40a. Ainda, a probabilidade de perda gestacional e produção de leite e está representada na Figura 40b.

Em vacas leiteiras em lactação, o alto e contínuo plano de nutrição necessário para atender aos requisitos de alta produção aumenta o fluxo sanguíneo hepático e a taxa de metabolização de P4 e E2 no fígado (SANGSRITAVONG et al., 2002). Esse aumento na metabolização hepática de

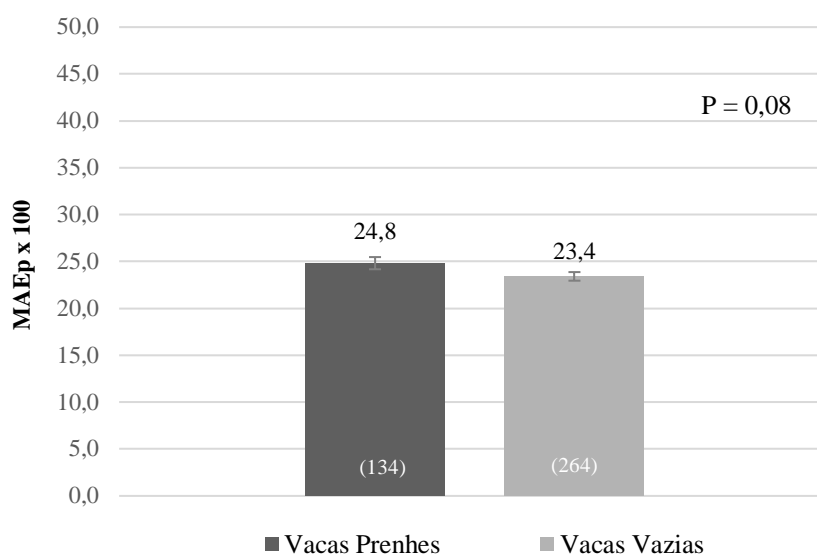
esteroides reduz as concentrações circulantes de estradiol em vacas de alta produção, com possíveis alterações nos processos reprodutivos (WILTBANK et al., 2006; SARTORI et al., 2002). A expressão do estro é induzida pelo aumento do E2 circulante produzido pelo folículo pré-ovulatório (ALLRICH, 1994).

O aumento da produção de leite é comumente relatado por influenciar diversos aspectos de desempenho reprodutivo. A lactação induz alterações metabólicas, tais como o BEN (balanço energético negativo). Tais alterações podem afetar os tecidos ovarianos, o oviduto e o útero e podem contribuir para o declínio da performance reprodutiva (LUCY, 2001; WILTBANK et al., 2006). Os dados do presente estudo confirmam os relatos de Gábor et al. (2006), que verificaram aumento das perdas embrionárias conforme aumento da produção de leite. Porém, contradiz os resultados de López-Gatius et al. (2002), Silke et al. (2002), Chebel et al. (2004) e Jousan, Drost e Hansen (2005), que não verificaram relação entre perda de gestação e a produção de leite.

A duração do estro mensurada pelo colar ( $P = 0,99$ ), a duração de estro mensurada pelo pedômetro ( $P = 0,62$ ), a MAEp ( $P = 0,60$ ), a MIEp ( $P = 0,34$ ) e a MIEc ( $P = 0,80$ ) não tiveram efeito sobre a perda gestacional.



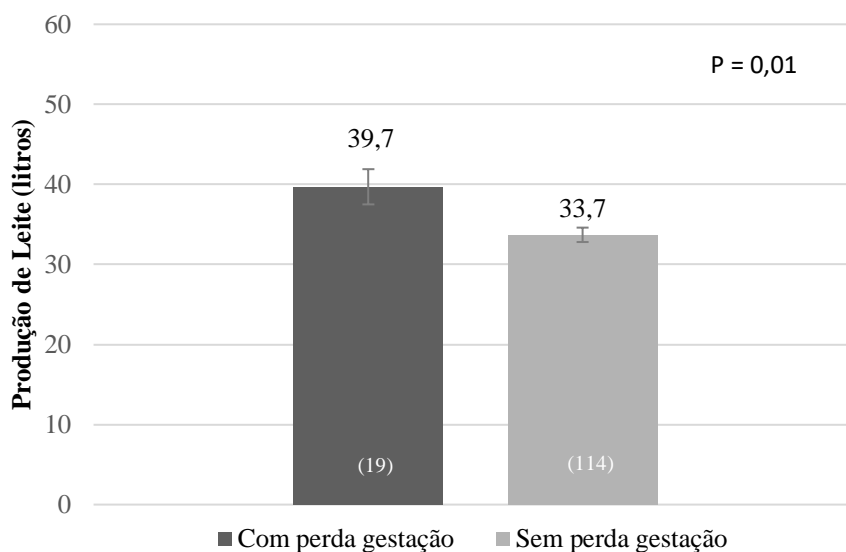
**Figura 36** - MAEc das vacas Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*) lactantes que engravidaram ou que permaneceram vazias após TETF (N = 398).



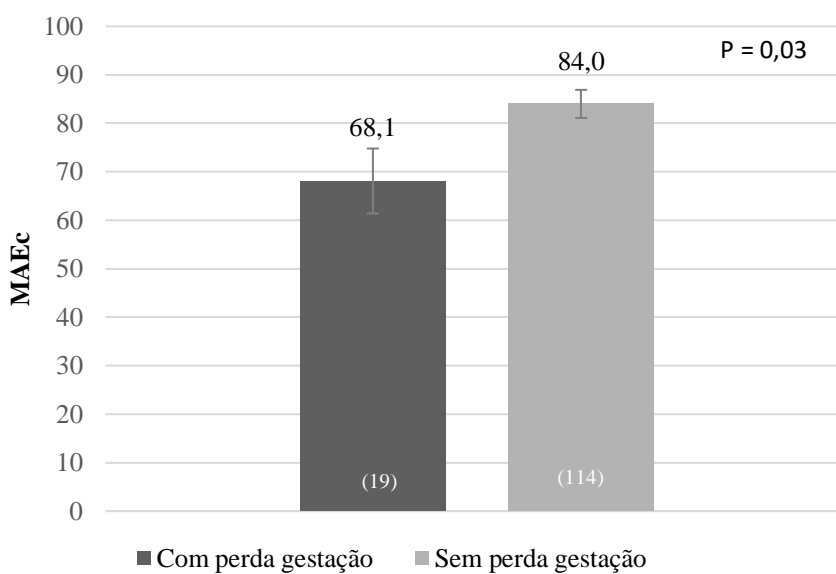
**Figura 37** - MAEp das vacas Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*) lactantes que engravidaram ou que permaneceram vazias após TETF (n = 398).

**Tabela 14** - Taxa de prenhez (P/TE) de acordo com o perfil da manifestação de estro mensurado pelo colar (CMA) e pelo pedômetro em vacas Girolando lactantes submetidas a TETF.

	Taxa de prenhez		
	Grupo de ALTA	Grupo de BAIXA	Valor de P
Máxima Atividade de estro detectada pelo colar (MAEc)	39,0 % (94/241)	22,8% (33/145)	< 0,01
Máxima Intensidade de estro detectada pelo colar (MIEc)	39,0% (39/100)	30,8% (88/286)	0,23
Máxima Atividade de estro detectada pelo pedômetro (MAEp)	41,5% (34/82)	29,8% (81/272)	0,06
Máxima Intensidade de estro detectada pelo pedômetro (MIEp)	26,1% (29/111)	35,4% (86/243)	0,11



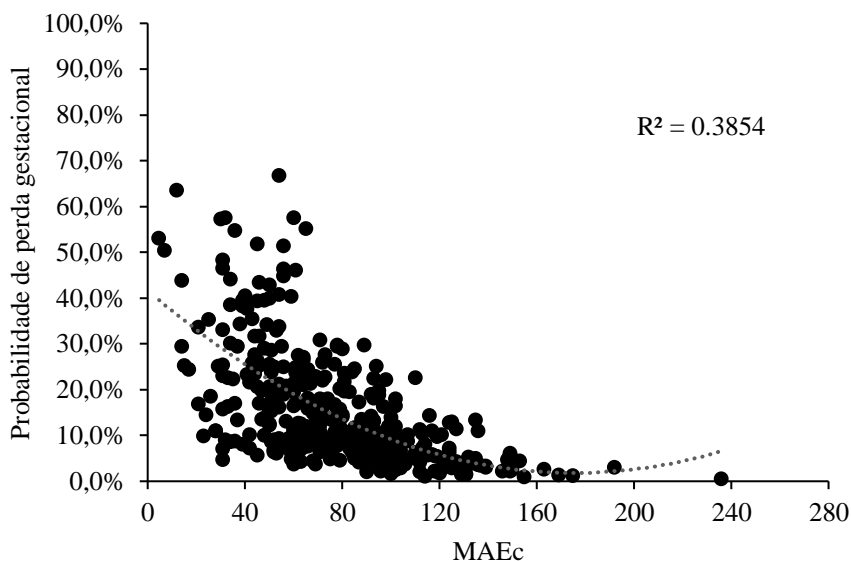
**Figura 38** - Produção de leite das vacas Girolando lactantes (*Bos taurus* x *Bos indicus*) que apresentaram perda gestacional ou não entre 30 e 60 dias após a TETF (n = 133) (P = 0,01).



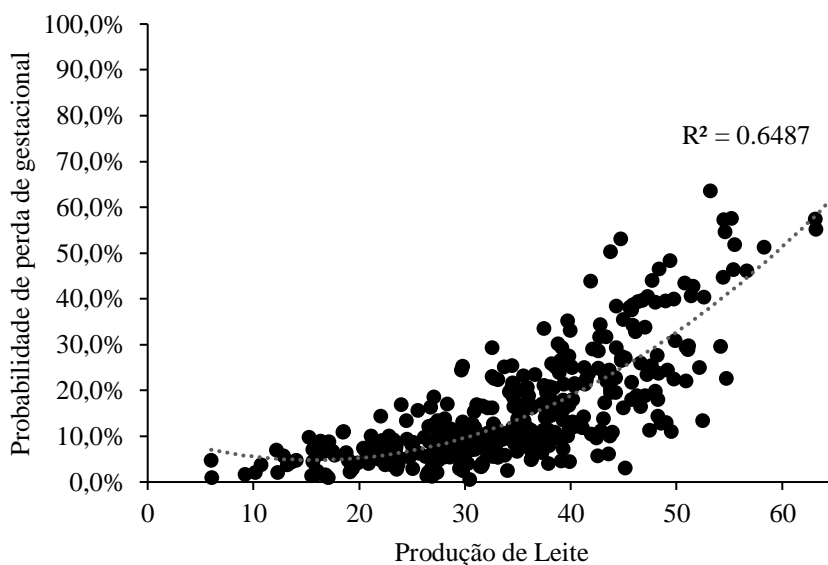
**Figura 39** - MAEc das vacas Girolando lactantes (*Bos taurus* x *Bos indicus*) que apresentaram perda gestacional ou não entre 30 e 60 dias após TETF (n = 133) (P = 0,03).



a.



b.



**Figura 40 - a:** Probabilidade de perda gestacional (entre 30 e 60 dias) de acordo com a máxima atividade de estro avaliada pelo colar (MAEc) em vacas Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*) em lactação que receberam TE. Efeito da MAEc de acordo com a regressão logística multivariada. (N = 382). Probabilidade de perda gestacional =  $1 / 1 + \exp(-2,8079 + 0,06756 \times \text{produção média de leite} - 0,01930 \times \text{máxima atividade de estro do colar})$ ; (P = 0,05). **b:** Probabilidade de perda gestacional (entre 30 e 60 dias) de acordo com a produção de leite em vacas Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*) em lactação que receberam TE. Efeito da produção de leite de acordo com a regressão logística multivariada. (N = 382) Probabilidade de perda gestacional =  $1 / 1 + \exp(-2,8079 + 0,06756 \times \text{produção média de leite} - 0,01930 \times \text{máxima atividade de estro do colar})$ ; (P = 0,05).

### 5.5.5 Conclusão

A hipótese do presente estudo foi parcialmente confirmada. A probabilidade de P/TE foi correlacionada positivamente com a máxima atividade de estro detectada pelo colar monitor de atividade (CMA) em fêmeas Girolando lactantes (Figura 28). Além disso, a MAE do pedômetro (MAEp) apresentou tendência em aumentar a P/TE. Entretanto, a intensidade do colar e do pedômetro e a duração do estro não foram correlacionadas com a probabilidade de P/TE.

Ao comparar a MAEc dos animais que ficaram prenhes com os que não ficaram prenhes, foi verificado maior MAEc ( $P = 0,02$ ) nos animais que ficaram prenhes (Figura 39), porém apenas tendência de aumento da P/TE foi encontrada para a MAEp.

Ao dividir os animais em grupos de alta e baixa MAE, verificou-se que os animais do grupo Alta-MAEc apresentaram maior P/TE quando comparados aos animais do grupo Baixa-MAEc, indicando que animais que se tornam gestantes possuíam maior atividade estral (mensurada pelo colar) do que animais não gestantes ao final do protocolo de TETF.

Outro achado importante foi a relação da perda de gestação (entre 30 e 60 dias) com a MAEc. Verificou-se que receptoras com menor MAEc apresentaram maior perda gestacional (Figura 40a).

A partir de desse experimento pode-se concluir que animais que emprenharam na TETF apresentaram elevada atividade de movimentos aferidas pelo colar (MAEc) quando comparados com animais que não emprenharam. Além disso, foi verificado que receptoras que emprenharam aos 30 dias e mantiveram a gestação até 60 dias também apresentaram maior MAEc do que aquelas que apresentaram perda gestacional. Diante disso, essas informações podem ser utilizadas como estratégias na tomada de decisões com o intuito de melhorar a eficiência reprodutiva dos programas que utilizam a transferência de embriões.

## 6. IMPLICAÇÕES PRÁTICAS:

Baseado nos resultados dos Experimentos 1 e 2, pode-se concluir que o CMA é eficiente para detectar estro em novilhas Gir (*Bos indicus*) e em vacas Holandesas lactantes (*Bos taurus*). Esses dados apontam para uma nova alternativa para eficiente detecção de estro, com otimização da mão de obra rural. Nos programas reprodutivos que empregam biotecnologias da reprodução, a dificuldade de mão de obra para detecção do estro todos os dias no período da manhã e no final da tarde, gera comprometimento na taxa de serviço e, conseqüentemente, reduz a taxa de prenhez do rebanho. As novas tecnologias de automação que estão sendo desenvolvidas colaboram para contornar as dificuldades operacionais e para superar os problemas de baixa eficiência reprodutiva devido às falhas na detecção do estro (CARVALHO et al., 2015). No Experimento 2, verificou-se que não houve efeito significativo da temperatura vaginal na eficiência de identificação de estro detectada pelo CMA ( $P = 0,76$ ), sugerindo que sistema pode ser também utilizado em animais submetidos às altas temperaturas frequentemente presentes nos trópicos.

No Experimento 3, foi verificado que além da detecção de estro, o CMA pode ser usado como ferramenta estratégica para prever resultados de eficiência reprodutiva de receptoras de embrião, uma vez que animais do grupo alta atividade de estro pelo colar (Alta-MAEc) apresentaram maior P/TE quando comparados aos animais do grupo baixa intensidade de estro detectada pelo colar (Baixa-MAEc; 39,0% vs 22,8%  $P < 0,01$ ).

Ressalta-se ainda o ineditismo dos 3 experimentos apresentados nessa dissertação. Na literatura existem escassos estudos que avaliam o uso de monitores de atividades em zebuínos e seus cruzamentos com taurinos. O presente estudo utilizou fêmeas da raça Gir (*Bos indicus*) e Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*) para aferir a eficiência dos sistemas eletrônicos de detecção do estro. Além disso, apesar de existirem estudos científicos com o uso monitores de atividade em taurinos (principalmente da raça Holandesa), geralmente esses estudos foram realizados em países de clima temperado nos quais os efeitos do estresse calórico são menos evidentes. O presente estudo, além de avaliar a eficácia do CMA em zebuínos e seus cruzamentos com taurinos, procurou validar sua utilização em vacas *Bos taurus* em lactação criadas em países tropicais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **J. Dairy Sci.**, v. 85, n.2, p. 390-396, 2002. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(02)74086-1.

ALLEN, J. D. et al. Effect of core body temperature, time of day, and climate conditions on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing mild to moderate heat stress. **J. Dairy Sci.** v.98, n.1, p.118-127, 2015. DOI:10.3168/jds.2013-7704.

ALLRICH, R. D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. **J. Dairy Sci.** v.77, n.9, p.2738–2744, 1994. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(94)77216-7.

ANDERSON, S. D. et. al. Effects of adjustable and stationary fans with misters on core body temperature and lying behavior of lactating dairy cows in a semiarid climate. **J. Dairy Sci.**, v.96, n.7, p.4738–4750, 2013. DOI: 10.3168/jds.2012-6401.

AUNGIER, S. P. et al. The relationship between activity clusters detected by an automatic activity monitor and endocrine changes during the periestrus period in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.98, n.3, p.1666–1684, 2015. DOI:10.3168/jds.2013-7405.

BADINGA, L. et al. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v.39, n.4, p.797-810, 1993. DOI:10.1016/0093-691x(93)90419-6.

BERMAN, A. et al. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate. **J Dairy Sci.**, v.68, n.6, p.1488-1495, 1985. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(85)80987-5.

BEWLEY, J. Precision dairy farming: Advanced analysis solutions for future profitability. In Proceedings of the 1st North American Conference on Precision Dairy Management, Toronto, Canadá. **Progressive Dairy Operators**, Guelph, ON, Canadá, p. 2-5, 2010. Disponível em: <http://precisiondairy.com/proceedings/s1bewley.pdf>. Acesso em 12/12/2019

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci**, v.78, n.3-4, p.307-326, 2003. DOI:10.1016/s0378-4320(03)00097-6.

BRUINSMA, J. (Ed.). World Agriculture: Towards 2015/2030. An FAO Perspective. **Earthscan Publications Ltd**, London: Routledge, 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/3/y4252e/y4252e00.htm>. Acesso em 01/ 07/2020

BURNETT, T. A. et al. Effect of estrous expression on timing and failure of ovulation of Holstein dairy cows using automated activity monitors. **J Dairy Sci.**, v.101, n.12, p.11310-11320, 2018. DOI:10.3168/jds.2018-15151.

CARVALHO, B. C. et al. Uso de tecnologias de precisão na reprodução de bovinos leiteiros. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 79, p. 29-40, 2015. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/139553/1/Cnpg1-2015-CadTecVetZoot-Uso.pdf>. Acesso em 20/11/2019

CAVESTANY, D.; EL-WISHY, A. B.; FOOTE, R.H. Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein cattle. **J Dairy Sci.**, v.68, n.6, p.1471-1478, 1985. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(85)80985-1.

CHANVALLON, A. et al. Comparison of three devices for the automated detection of estrus in dairy cows. **Theriogenology**, v.82, n.5, p.734-741, 2014. DOI:10.1016/j.theriogenology.2014.06.010.

CHEBEL, R. C. et al. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.84, n.3-4, p.239-255, 2004. DOI:10.1016/j.anireprosci.2003.12.012.

COLLIER, R. J. et al. Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. **Journal of Dairy Science** 65, 2213-2227, 1982.

COOK, N. B. et al. The effect of heat stress and lameness on time budgets of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.90, n.4, p.1674-1682, 2007. DOI:10.3168/jds.2006-634.

DARAMOLA, J. O.; ABIOJA, M. O.; ONAGBESAN, O. M. Heat stress impact on livestock production. In: SEJIAN, V. et al. (Ed.). **Environmental Stress and Amelioration in Livestock Production**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. p.53-73. DOI: 10.1007 / 978-3-642-29205-7\_3.

DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Expression and detection of oestrus in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.40, n.5, p.481- 491, 2000. DOI: 10.1051/rnd:2000112.

DOBSON, H. et al. The high-producing dairy cow and its reproductive performance. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 42 (Suppl. 2), p. 17–23, 2007. DOI:10.1111/j.1439-0531.2007.00906.x.

FARRIS, E. J. Activity of Dairy cows during estrus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.125, n.929, p.117-120, 1954.

FORDE, N. et al. Oestrous cycles in Bos taurus cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.124, n.3-4, p.163–169, 2011. DOI:10.1016/j.anireprosci.2010.08.025.

FRICKE, P. M. et al. Expression and detection of estrus in dairy cows: The role of new technologies. **Animal**, v.8 (Suppl. 1), p.134–143, 2014. DOI:10.1017/S1751731114000299.

FUQUAY, J. W. Heat stress as it affects animal production. **J. Anim. Sci.**, v.52, n.1, p.164–174, 1981. DOI:10.2527/jas1981.521164x.

GÁBOR, G. et al. Pregnancy Loss in Dairy Cattle: Relationship of Ultrasound, Blood Pregnancy Specific Protein B, Progesterone and Production Variables. **Reprod Domest Anim.**, v.51, n.4, p.467-473, 2016. DOI: 10.1111/rda. 12703.

GAINES, J. D. Analysis of reproductive efficiency of dairy herds. In: **Proceedings for Annual Meeting**. Kansas City: Society for Theriogenology, p.86-107, 1994.

GALINA, C. S.; ARTHUR, G. H. Review on cattle reproduction in the tropics. Part 4. Oestrus cycles. **Anim Breed Abstr**, v.58, n.8, p.697-707, 1990.

GATES, D. M. Physical environment. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Adaptation of domestic animals**. 1 Ed. Philadelphia, PA. USA: Lea and Febiger, 1968.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. In vivo vs. in vitro models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. **Anim Reprod Sci.**, v.134, n.3-4, p.125-134, 2012. DOI:10.1016/j.anireprosci.2012.07.009.

GIMENES, L.U. et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.7, p.852–858, 2008. DOI:10.1016/j.theriogenology.2008.01.001.

GONÇALVES, P.; FIGUEIREDO, J.; FREITAS, V. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2 Ed. São Paulo (SP): ROCA, 2008. 628p.

GRÖHN, Y. T.; RAJALA-SCHULTZ, P. J. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. **Anim Reprod Sci.**, v.60–61, p.605–614, 2000. DOI:10.1016/s0378-4320(00)00085-3.

GRUNERT, E.; BIRGE, H. E.; VALE, G. W. **Patologia clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: Ginecologia**. 1 Ed. São Paulo: Varela, 2005. 552p.

GWAZDAUSKAS, F. C.; LINEWEAVER, J. A.; MCGILLIARD, M. L. Environmental and Management Factors Affecting Estrous Activity in Dairy Cattle. **J Dairy Sci.**, v.66, n.7, p.1510–1514, 1983. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(83)81966-3.

GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of climate on reproduction in cattle. **J Dairy Sci.**, v.68, n.6, p.1568-1578, 1985. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(85)80995-4

HANLON, D. W. et al. The effect of estradiol benzoate administration on estrous response and synchronized pregnancy rate in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone. **Theriogenology**, v.45, n.4, p.775-785, 1996. DOI: 10.1016/0093-691X(96)00007-6.

HANSEN, P. J.; ARECHIGA, C. F. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. **J. Anim. Sci.**, v.77 (Suppl. 2), p.36–50, 1999. DOI: 10.2527/1997.77suppl\_236x.

HANSEN, P.J. et al. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.91-103, 2001. DOI:10.1016/s0093-691x(00)00448-9.

HANSEN, P.J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. **Theriogenology**, v.68 (Suppl 1), p.242-249, 2007. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.04.008.

HER, E. et al. Thermal, Productive and Reproductive Responses of High Yielding cows exposed to Short-term colling in summer. **J Dairy Sci.**, v.71, n.4, p.1085-1092, 1988. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(88)79656-3.

HOLMAN, A. et al. Comparison of oestrus detection methods in dairy cattle. **Vet Rec.**, v.169, n.2, p.47, 2011. DOI:10.1136/vr.d2344.

IGONO, M. O. et al. Spray cooling effects on milk production, milk and rectal temperatures of cows during a moderate summer season. **J Dairy Sci.**, v.68, n.4, p.979–985, 1985. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(85)80918-8.

JOHNSON, H. D. Response of Animals to Heat. In: WAGGONER, P. E. et al. **Agricultural Meteorology**. Meteorological Monographs. Boston, MA: American Meteorological Society, 1965, v.6, p.109-122. DOI: 10.1007/978-1-940033-58-7\_6.

JOUSAN, F. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Factors associated with early and mid-to-late fetal loss in lactating and nonlactating Holstein cattle in a hot climate. **J Anim Sci.**, v.83, n.5, p.1017-1022, 2005. DOI:10.2527/2005.8351017x.

KADZERE, C. T. et al. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, 77, 59–91, 2002.

KIDDY, C. A. Variation in physical activity as an indication of estrus in dairy cows. **J Dairy Sci.**, v. 60, n.2, p.235-243, 1977. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(77)83859-9.

LAMB, G. C. et al. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 $\alpha$  for ovulation control in postpartum suckled beef cows. **J Anim Sci.**, v.79, n.9, p.2253–2259, 2001. DOI:10.2527/2001.7992253x.

LAMMOGLIA, M. A. et al. Induced and Synchronized Estrus in Cattle: Dose Titration of Estradiol Benzoate in Peripubertal Heifers and Postpartum Cows after Treatment with an Intravaginal Progesterone-Releasing Insert and Prostaglandin F2 $\alpha$ . **J Anim Sci.**, v.76, n.6, p.1662–1670, 1998. DOI:10.2527/1998.7661662x.



LAMOTHE-ZAVALA, C.; FREDRIKSSON, G.; KINDAHL, H. Reproductive performance of zebu cattle in Mexico. I. Sexual behavior and seasonal influence on estrous cyclicity. **Theriogenology**, Woburn, v.36, n.6, p.887-896, 1991. DOI: 10.1016/0093-691X(91)90315-5.

LEE, D. H. K. Climatic stress indices for domestic animals. **Int J Biometeorol**, v.9, n.1, p.29-35, 1965. DOI:10.1007/BF02187306.

LEONARD, F. C.; O'CONNELL, J. M.; O'FARRELL, K. J. Effect of different housing conditions on behavior and foot lesions in Friesian heifers. **Vet Rec.**, v.134, n.19, p.490-494, 1996. DOI:10.1136/vr.134.19.490.

LÓPEZ-GATIUS, F. et al. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. **Theriogenology**, v.57, n.4, p.1251-1261, 2002. DOI: 10.1016/s0093-691x(01)00715-4.

LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Anim Reprod Sci.**, v.81, n.3-4, p.209-223, 2004. DOI:10.1016/j.anireprosci.2003.10.009.

LOPEZ, H. et al. Effect of dietary phosphorus concentration on estrous behaviour of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, n.2-3, p. 437-445, 2004. DOI: 10.1016/S0093-691X(03)00245-0.

LØVENDAHL, P.; CHAGUNDA, M. G. On the use of physical activity monitoring for estrus detection in dairy cows. **J Dairy Sci.**, v.93, n.1, p.249-259, 2010. DOI:10.3168/jds.2008-1721.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?. **J Dairy Sci.**, v. 84, n.6, p.1277-1293, 2001. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(01)70158-0.

MACMILLAN, K. et al. Performance and optimization of an ear tag automated activity monitor for estrus prediction in dairy heifers. **Theriogenology**, v.155, p.197-204, 2020. DOI: 10.1016 / j.theriogenology.2020.06.018.

MADUREIRA, A. M. L. et al. Factors affecting expression of estrus measured by activity monitors and conception risk of lactating dairy cows. **J Dairy Sci.**, v.98, n.10, p.7003–7014, 2015. DOI:10.3168/jds.2015-9672.

MADUREIRA, A. M. L. **Fatores que afetam a expressão de estro detectado por monitores de atividade e riscos de concepção em vacas leiteiras lactantes.** 2016. 57p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/136177> Acesso em 07/08/2020.

MADUREIRA, A. M. L. et al. Intensity of estrus following an estradiol-progesterone-based ovulation synchronization protocol influences fertility outcomes. **J Dairy Sci.**, v.102, n.4, p.3598–3608, 2019. DOI:10.3168/jds.2018-15129.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. **Reprod Dom Anim.**, v.34, n.3-4, p.269-274, 1999. DOI: 10.1111 / j.1439-0531.1999.tb01250.x.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. **Anim Reprod Sci.**, v.64, n.3-4, p.171-180, 2000. DOI: 10.1016 / s0378-4320 (00) 00205-0.

MEMBRIVE, C. M. B. **Estudo da sincronização das ondas foliculares e das características de estros, por radiotelemetria, em novilhas cruzadas (Bos indicus x Bos taurus) tratadas com acetato de melengestrol e prostaglandina associados a hCG, GnRH ou 17b estradiol + progesterona.** 2000. 156f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MENEGHETTI, M. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, n.2, p.179–189, 2009. DOI:10.1016/j.theriogenology.2009.02.010.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (Bos taurus indicus), Angus (Bos taurus taurus) e Nelore x Angus (Bos taurus indicus x Bos taurus taurus).** 2003. 98f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MONTEIRO JUNIOR, P. L. J. **Exogenous hormonal manipulation to increase reproductive efficiency in dairy cows.** 2014. 99p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MOORE, S. G.; AUBLET, V.; BUTLER, S. T. Monitoring estrus activity in pasture-based dairy cows. **Theriogenology**, In Press, Journal Pre-proof, Available online 11 November 2020. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.11.002.

MUSSARD, M.L. et al. Influence of premature induction of a luteinizing hormone surge with gonadotropin-releasing hormone on ovulation, luteal function, and fertility in cattle. **J Anim Sci.**, v.85, n.4, p.937-943, 2007. DOI:10.2527/jas.2006-592

ORIHUELA, A. Some factors affecting the behavioural manifestation of oestrus in cattle: A review. **Appl Anim Behav Sci.**, v.70, n.1, p.1-16, 2000. DOI:10.1016/s0168-1591(00)00139-8.

PELISSIER, C. L. Identification of reproductive problems and their economic consequences. In: **Proceedings of the National Invitational Dairy Cattle Reprod. Workshop.** Louisville, KY (ed. Eastwood). Extension Committee on Policy (ECOP), Science and Education Administration, US Department of Agriculture, Washington, DC. p.9-18, 1982.

PENNINGTON, J. A. et al. Sexual Activity of Holstein Cows: Seasonal Effects. **J Dairy Sci.**, v.68, n.11, p.3023–3030, 1985. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(85)81197-8.

PEREIRA, C. C. J. **Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal.** Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005. 195p.

PEREIRA, M. H. C., WILTBANK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. **J. Dairy Sci.**, v.99, n.3, p.2237–2247, 2016. DOI: 10.3168 / jds.2015-9903.

PERRY, G. A. et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v.102, n.14, p.5268–5273, 2005. DOI:10.1073/pnas.0501700102.

PFEIFER, L. F. M. et al. Effect of the ovulatory follicle diameter and progesterone concentration on the pregnancy rate of fixed-time inseminated lactating beef cows. **R Bras Zootec.**, v.41, n.4, p.1004–1008, 2012. DOI: 10.1590 / S1516-35982012000400024.

PFAUS JG, EVERITT BJ. The psychopharmacology of sexual behaviour. In: Bloom FE, Kupfer D, editors. **Psychopharmacology**, 65. New York: Raven Press, 1995:743–58.

PINHEIRO, O. L. et al. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, n.3, p.667–681, 1998. DOI:10.1016/s0093-691x(98)00017-x.

PITALUGA, P. C. S. F. et al. Manipulation of the proestrous by exogenous gonadotropin and estradiol during a timed artificial insemination protocol in suckled *Bos indicus* beef cows. **Livestock Science**, v.154, n.1–3, p.229–234, 2013. DOI: 10.1071 / RDv25n1Ab17.

POLSON, J. **Method and apparatus for animal heat detection and recording**. US Pat. 3844273. 29 out. 1974. Disponível em <http://www.google.com/patents/US3844273>. Acesso em 20/08/2020.

REIMERS, T. J.; SMITH, R. D.; NEWMAN, S. K. Management factors affecting reproductive performance of dairy cows in the northeastern United States. **J Dairy Sci.**, v. 68, n.4, p.963-972, 1985. DOI: [10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80916-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80916-4). Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(85\)80916-4/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(85)80916-4/pdf) Acesso em 18/06/2020.

DE RENSIS, F. D.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow – a review. **Theriogenology**, v.60, n.6, p.1139–1151, 2003. DOI:10.1016/s0093-691x(03)00126-2.

RHOADS, M. L. et al. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. **J Dairy Sci.**, v.92, n.5, p.1986-1997, 2009. DOI:10.3168/jds.2008-1641.

ROCHE, J. F. Control and regulation of folliculogenesis – a symposium in perspective. **Reviews of Reproduction**, v.1, n.1, p.19-27, 1996. DOI:10.1530/ror.0.0010019.

ROELOFS, J. B. et al. Pedometer readings for estrous detection and as predictor for time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology**, v.64, n.8, p.1690-1703, 2005. DOI:10.1016/j.theriogenology.2005.04.004.

ROELOFS, J. B.; VAN ERP-VAN DER KOOIJ, E. Estrus detection tools and their applicability in cattle: recent and perspectival situation. **Anim. Reprod**, v.12, n.3, p.498–504, 2015. Disponível em:

[http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n3/pag498-504%20\(AR755\).pdf](http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n3/pag498-504%20(AR755).pdf) Acesso em 15/05/2020

RONCHI, B. et al. Influence of heat stress and feed restriction on plasma progesterone, estradiol-17 $\beta$ , LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers. **Livestock Production Science** 68, 231–241, 2001.

ROTH, Z. Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. **Reprod Domest Anim.**, v.43 (Suppl 2), p.238-244, 2008. DOI:10.1111/j.1439-0531.2008.01168.x.

ROTH, Z. Effect of heat stress on reproduction in dairy cows: insights into the cellular and molecular responses of the oocyte. **Annu Rev Anim Biosci.**, v.5, p.151-170, 2017. DOI:10.1146/annurev-animal-022516-022849.

ROY, K. S. and PRAKASH, B. S. Seasonal variation and circadian rhythmicity of the prolactin profile during the summer months in repeat-breeding Murrah buffalo heifers. **Reproduction Fertility and Development** 19, 569–575, 2007.

RUTLEDGE, J. J. Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.105-111, 2001. DOI: 10.1016/S0093-691X(00)00449-0.

RUTTEN, C. J. et al. Invited review: Sensors to support health management on dairy farms. **J Dairy Sci.**, v.96, n.4, p.1928-1952, 2013. DOI:10.3168/jds.2012-6107.

SÁ FILHO, O. J. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows. II. Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, n.2, p.210–218, 2009. DOI:10.1016/j.theriogenology.2009.02.008.

SÁ FILHO, M. F. et al. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or

progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Anim Reprod Sci.**, v.120, n.1–4, p.23–30, 2010a. DOI:10.1016/j.anireprosci.2010.03.007.

SÁ FILHO, M. F. et al. Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. **Theriogenology**, v.74, n.9, p.1636–1642, 2010b. DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.06.036

SÁ FILHO, M. F. et al. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v.76, n.3, p.455–463, 2011. DOI:10.1016/j.theriogenology.2011.02.022.

SÁ FILHO, M. F. et al. Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. **J Anim Sci.**, v.90, n.6, p.1816–1823, 2012. DOI:10.2527/jas.2011-4523.

SAINT-DIZIER, M.; CHASTANT-MAILLARD, S.. Towards an automated detection of oestrus in dairy cattle. **Reprod Domest Anim.**, v.47, n.6, p.1056-1061, 2012. DOI:10.1111/j.1439-0531.2011.01971.x.

SALES, J. N. S. et al. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v.76, n.3, p.427– 435, 2011. DOI:10.1016/j.theriogenology.2011.02.019.

SALES, J. N. S. et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v.78, n.3, p.510–516, 2012. DOI:10.1016/j.theriogenology.2012.02.031.

SANGSRITAVONG, S. et al. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v.85, n.11, p.2831–2842, 2002. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(02)74370-1.

SANTOS, J. E. P. et al. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Anim Reprod Sci.**, v.82–83, p.513-535, 2004. DOI:10.1016/j.anireprosci.2004.04.015.

SARTORI, R. et al. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J Dairy Sci.**, v.85, n.11, p.2803–2812, 2002. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(02)74367-1.

SARTORI, R. et al. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **J Dairy Sci.**, v.87, n.4, p.905-920, 2004. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(04)73235-X.

SCHÜLLER, L. K.; MICHAELIS, I.; HEUWIESER, W. Impact of heat stress on estrus expression and follicle size in estrus under field conditions in dairy cows. **Theriogenology**, v.102, p.48–53, 2017. DOI:10.1016/j.theriogenology.2017.07.004.

SELYE, H. A. Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v.138, p.32, 1936. DOI: 10.1038/138032a0.

SENGER, P. L. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. **J Dairy Sci.**, v.77, n.9, p.2745–2753, 1994. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(94)77217-9.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2 ed. Pullman, WA: Current Conceptions Inc, 2005. 373p.

SILANIKOVE, N 2000b. A base fisiológica da adaptação em cabras a ambientes hostis. **Small Ruminant Research** 35, 181–193.

SILKE, V. et al. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. **Anim Reprod Sci.**, v.71, n.1-2, p.1–12, 2002. DOI:10.1016/s0378-4320(02)00016-7.

SILVA, R. G.; MORAIS, D. A. E. F.; GUILHERMINO, M. M. Evaluation of thermal stress indexes for dairy cows in tropical regions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, supplement, p.1192–1198, 2007. DOI: 10.1590 / S1516-35982007000500028.

SRIKANDAKUMAR, A.; JOHNSON, E. H. Effect of heat stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and Australian milking Zebu cows. **Trop Anim Health Prod**, v.36, n.7, p.685–692, 2004. DOI:10.1023/b:trop.0000042868.76914.a9.

ST-PIERRE, N.R.; COBANOV, B.; SCHNITKEY, G. Economic losses from heat stress by US livestock industries. **J Dairy Sci**, v.86, p.52-77, 2003. DOI: 10.3168 / jds.S0022-0302 (03) 74040-5.

THATCHER, W. W. Effects of season, climate, and temperature on reproduction and lactation. **J Dairy Sci.**, v.57, n.3, p.360–368, 1974. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(74)84894-0.

TORRES-JÚNIOR, J. R. S. **Produção in vitro de embriões Bos indicus sob estresse calórico.** 2007, 135f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. DOI:10.11606/T.10.2007.tde-27062007-141426.

TUCKER, C. B.; ROGERS, A. R; SHUTZ, K. E. Effect of solar radiation on dairy cattle behaviour, use of shade and body temperature in a pasture-based system. **Appl Anim Behav Sci.**, v.109, n.2-4, p.141–154, 2008. DOI: 10.1016 / j.applanim.2007.03.015.

UMPHREY, J. E. et al. Interrelationships in lactating Holsteins of rectal and skin temperatures, milk yield and composition, dry matter intake, body weight, and feed efficiency in summer in Alabama. **J Dairy Sci.**, v.84, n.12, p.2680-2685, 2001. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01) 74722-4.

VALENZA, A. et al. Assessment of an accelerometer system for detection of estrus and treatment with gonadotropin-releasing hormone at the time of insemination in lactating dairy cows. **J Dairy Sci.**, v. 95, n.12, p.7115–7127, 2012. DOI:10.3168/jds.2012-5639.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and conception rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.52, n.6, p.1067- 1078, 1999. DOI: 10.1016/S0093-691X(99)00195-8.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v.56, n.2, p.307–314, 2001. DOI:10.1016/s0093-691x(01)00565-9.



VOH, A.A. et al. Peripheral plasma levels of progesterone in nigerian Zebu cows following synchronization of oestrus with prostaglandin F<sub>2</sub>alpha analogue (dinoprost tromethamine). **Br Vet J.**, v.143, n.3, p.254-263, 1987. DOI: 10.1016/0007-1935(87)90088-1.

WALKER, W. L.; NEBEL, R. L.; MCGILLIARD, M. L. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v.79, n.9, p.1555–1561, 1996. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(96)76517-7.

WALSH, S. W.; WILLIAMS, E. J.; EVANS, A. C. O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.123, n.3-4, p. 127–138, 2011. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2010.12.001.

WILTBank, M. et al. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.17–29, 2006. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.10.003.

WILSON, S. J. et al. Effects of Controlled Heat Stress on Ovarian Function of Dairy Cattle. 1. Lactating Cows. **J Dairy Sci.**, v.81, n.8, p.2124–2131, 1998. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(98)75788-1.

WOLFENSON, D. et al. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. **Anim Reprod Sci.**, v.47, n.1-2, p.9–19, 1997. DOI:10.1016/s0378-4320(96)01638-7.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: Basic and applied aspects. **Anim Reprod Sci.**, v.60–61, p.535–547, 2000. DOI: 10.1016/S0378-4320(00)00102-0.

XU, Z. et al. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol Reprod**, v.53, n.4, p.951-957, 1995. DOI:10.1095/biolreprod53.4.951.

ZAHNER, M. et al. The influence of climatic conditions on physiological and behavioral parameters in dairy cows kept in open stables. **Anim. Sci.** v.78, p.139–147, 2004. DOI: 10.1017 / S1357729800053923.