

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA– PPGZOO**

SILVIA VILLA

**EFICIÊNCIA NA IDENTIFICAÇÃO DE ESTRO POR SISTEMA DE
MONITORAMENTO DE ATIVIDADE AUTOMATIZADO E DIAGNÓSTICO
PRECOCE DE PREENHEZ POR CARACTERÍSTICAS DO LEITE**

CHAPECÓ

2023

SILVIA VILLA

**EFICIÊNCIA NA IDENTIFICAÇÃO DE ESTRO POR SISTEMA DE
MONITORAMENTO DE ATIVIDADE AUTOMATIZADO E DIAGNÓSTICO
PRECOCE DE PREENHEZ POR CARACTERÍSTICAS DO LEITE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.
Orientador: Prof. Dr. Rogério Ferreira
Coorientador: Bernardo Garziera Gasperin

CHAPECÓ
2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Villa, Silvia

Eficiência na identificação de estro por sistema de monitoramento de atividade automatizado e diagnóstico precoce de prenhez por características do leite / Silvia Villa. -- 2023.

56 p.

Orientador: Rogério Ferreira

Coorientador: Bernardo Garziera Gasperin

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2023.

1. Eficiência reprodutiva. 2. Estro. 3. Prenhez. 4. Reprodução. I. Ferreira, Rogério. II. Gasperin, Bernardo Garziera. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

SILVIA VILLA

**EFICIÊNCIA NA IDENTIFICAÇÃO DE ESTRO POR SISTEMA DE
MONITORAMENTO DE ATIVIDADE AUTOMATIZADO E DIAGNÓSTICO
PRECOCE DE PREENHEZ POR CARACTERÍSTICAS DO LEITE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.
Orientador: Prof. Dr. Rogério Ferreira
Coorientador: Bernardo Garziera Gasperin

BANCA EXAMINADORA

Membros:

Rogério Ferreira, Dr.

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Monique Tomazele Rovani, Dra.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Daniele Missio, Dra.

Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Chapecó, 27 de julho de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus por ter me guiado nessa jornada, permitindo que eu superasse todos os obstáculos com saúde, força e alegria. Gostaria de expressar minha gratidão aos meus pais, Rogério e Catiane, por todo o apoio ao longo dessa caminhada. Eles acreditaram nos meus sonhos mais uma vez e me proporcionaram a oportunidade de realizá-los. Agradeço por toda a ajuda no projeto, por não pouparem esforços ao me acompanhar em cada etapa. Não tenho palavras para expressar o quanto sou grata. Muito obrigada!

Sou grata a toda a minha família, especialmente aos meus tios Valdecir e Eliane, e aos meus primos Michel, André, Micheli, Cheila e ao pequeno Bernardo, que sempre me ajudaram e apoiaram. Agradeço especialmente por terem aberto as portas, juntamente com meus pais, para que eu pudesse usar a propriedade na realização da minha pesquisa de mestrado. Muito obrigada!

Expresso minha imensa gratidão aos meus orientadores, Rogério Ferreira e Bernardo Gasperin, pela constante disponibilidade e incentivo. Por terem sido compreensíveis e dispostos a ouvir minhas ideias, preocupações e dúvidas, fornecendo um apoio inestimável que me encorajou a superar desafios. Muito obrigada!

Agradeço à empresa Bionexus Allagro, em especial ao Emiliano Veiga, por ser parceiro durante a pesquisa e por compartilhar ensinamentos valiosos.

A todos que estiveram ao meu lado de alguma forma neste momento, meus mais sinceros agradecimentos!

Agradeço à CAPES, CNPq e FAPESC pelo suporte financeiro para condução do estudo. Agradeço à UDESC pela concessão da bolsa de estudos.

“Crê em ti mesmo, age e verás os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar.” (Chico Xavier, [s.d.])

RESUMO

Aprimorar a detecção do estro, como o uso de AAM, e desenvolver um método de diagnóstico de gestação que possa ser incorporado às práticas de ordenha trariam avanços de significativa importância no campo da reprodução bovina. O estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do sistema de monitoramento de atividade automatizado na identificação do estro e desenvolver um método baseado em bioimpedância elétrica do leite para o diagnóstico de prenhez das vacas. Os animais utilizados no estudo para avaliar a eficiência dos AAM foram 23 vacas em lactação (9 multíparas e 14 primíparas). O AAM foi capaz de detectar 78,3% (18/23) dos eventos de cio, enquanto 21,7% (5/23) foram identificados apenas pela observação visual. Ao analisar o diâmetro do folículo pré-ovulatório nos animais alertados pelo AAM em cio e nos animais não alertados pelo AAM, observou-se que os diâmetros não apresentavam diferenças, com médias de $15,0 \pm 0,24$ mm e $14,9 \pm 0,46$ mm, respectivamente. Essa semelhança no diâmetro foi mantida na segunda avaliação ultrassonográfica realizada 12 horas após o início do cio, com diâmetros de $18,9 \pm 0,4$ mm nos folículos dos animais alertados pelo AAM e $19 \pm 0,75$ mm nos folículos sem alerta. Esses resultados indicam que, mesmo quando os animais não apresentam atividade suficiente para que o AAM identifique o estro, eles possuem folículos pré-ovulatórios capazes de ovular. Em um segundo estudo, investigamos o potencial de realizar o diagnóstico precoce de prenhez em bovinos em diferentes estágios gestacionais com base nas características do leite. Foram analisadas amostras de leite de 53 vacas. No dia 20 pós-IA, o modelo final incluiu três variáveis, alcançando uma taxa de acerto na predição de animais prenhes de 55,5%, enquanto a predição de animais não prenhes teve uma taxa de acerto de 88%. No dia 25 pós-IA, o modelo final incluiu nove variáveis, atingindo 78% de acerto na identificação de vacas prenhes e 83% para vacas não prenhes. No dia 30 pós-IA, sete variáveis foram utilizadas, e a taxa de acerto na predição de vacas prenhes foi de 83%, enquanto a predição de vacas não prenhes foi de 95%. Os achados deste estudo apresentam, pela primeira vez, uma nova alternativa para o diagnóstico precoce de prenhez em vacas com base nas características do leite. A combinação das abordagens de detecção de estro, unindo as vantagens dos AAM e da observação visual, juntamente com os avanços nos métodos de diagnóstico de gestação está impulsionando significativamente o campo da reprodução bovina. Por meio de um contínuo processo de pesquisa e

desenvolvimento, existe um potencial promissor para aprimorar ainda mais essas técnicas. Isso abriria caminho para uma detecção eficiente do período de estro, além de melhorar o método diagnósticos de prenhez e assim ter um gerenciamento da reprodução prático e efetivo.

Palavras-chave: Eficiência reprodutiva; Estro; Prenhez; Reprodução.

ABSTRACT

Improving estrus detection, such as using AAM, and developing a pregnancy diagnostic method that can be integrated into milking practices would bring significant advancements in the field of bovine reproduction. The study aimed to evaluate the effectiveness of an automated activity monitoring system in identifying estrus and to develop a method based on milk's electrical bioimpedance for diagnosing cow pregnancy. The animals used in the study to assess AAM efficiency were 23 lactating cows (9 multiparous and 14 primiparous). The AAM was able to detect 78.3% (18/23) of estrus events, while 21.7% (5/23) were only identified through visual observation. When analyzing the pre-ovulatory follicle diameter in AAM-alerted cows in estrus and non-alerted cows, no differences in diameter were observed, with means of 15.0 ± 0.24 mm and 14.9 ± 0.46 mm, respectively. This diameter similarity was maintained in the second ultrasound evaluation conducted 12 hours after estrus onset, with follicle diameters of 18.9 ± 0.4 mm in AAM-alerted animals and 19 ± 0.75 mm in non-alerted ones. These results indicate that even when animals don't exhibit sufficient activity for AAM to detect estrus, they possess pre-ovulatory follicles capable of ovulation.

In a second study, we investigated the potential for early pregnancy diagnosis in cattle at various gestational stages based on milk characteristics. Milk samples from 53 cows were analyzed. On day 20 post-AI, the final model included three variables, achieving an accuracy rate of 55.5% in predicting pregnant animals, while the prediction accuracy for non-pregnant animals was 88%. On day 25 post-AI, the final model included nine variables, reaching an accuracy of 78% in identifying pregnant cows and 83% for non-pregnant cows. On day 30 post-AI, seven variables were used, and the accuracy rate for predicting pregnant cows was 83%, while the prediction accuracy for non-pregnant cows was 95%. The findings of this study represent, for the first time, a new alternative for early pregnancy diagnosis in cows based on milk characteristics. The combination of estrus detection approaches, harnessing the advantages of AAM and visual observation, along with advances in pregnancy diagnostic methods, is significantly advancing the field of bovine reproduction. Through continuous research and development efforts, there is promising potential to further enhance these techniques. This would pave the way for efficient estrus detection, improved pregnancy diagnostics, and practical and effective reproductive management.

Keywords: Reproductive efficiency; Estrus; Pregnancy; Reproduction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Efficiency of detecting animals with suspected estrus (Suspect) and animals confirmed in estrus (Estrus) by the automated CowScout® monitoring system in relation to visual estrus observation (A) and the time interval between the first standing estrus detection and the suspect and confirmed estrus alerts (B)..... 26
- Figura 2 - Follicular diameter (A) after the first visual estrus detection (Follicle 0h) and 12 hours later (Follicle 12h) and follicular growth during this period (B) in animals identified in estrus (with alert) or not (without alert) by the automated CowScout® monitoring system. NS indicates that there was no statistical difference between the means. 27
- Figura 3 - Características do leite 20 dias após a inseminação artificial de vacas diagnosticadas como prenhes ou não 35
- Figura 4 - Características do leite 25 dias após a inseminação artificial de vacas diagnosticadas como prenhes ou não 36
- Figura 5 - Características do leite 30 dias após a inseminação artificial de vacas diagnosticadas como prenhes ou não. 38
- Figura 6 - Probabilidade de prenhez dos modelos preditivos de gestação por características do leite aos 20 (D20), 25 (D25) e 30 (D30) dias após a inseminação artificial de vacas diagnosticadas como prenhes ou não .. 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Parâmetros utilizados, sensibilidade (sens), especificidade, acurácia e área sobre a curva (AUC) de modelos preditivos de prenhez utilizando amostras de leite aos 20, 25 e 30 dias pós-IA.	39
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAM	Monitores de atividade automatizados (AAM)
AUC	Curva característica de operação do receptor
EBE	Espectroscopia de bioimpedância elétrica
ELISA	Ensaio de imun absorção enzimática
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier
IA	Inseminação artificial
IFN-t	Interferon tau
PAG	Proteína associada a gestação
PAG	Glicoproteína associada à prenhez
RIA	Radioimunoensaio
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	MONITORES DE ATIVIDADE AUTOMAZIDOS (AAM)	18
2.2	GESTAÇÃO E DIGNÓSTICO DE PREENHEZ	19
3	ARTIGO 1: EFFICIENCY OF ESTRUS DETECTION BY AUTOMATED ACTIVITY MONITORING SYSTEM IN DAIRY COWS	23
3.1	ABSTRACT	23
3.2	INTRODUCTION	24
3.3	MATERIALS AND METHODS	24
3.4	RESULTS	25
3.5	DISCUSSION	27
3.6	AUTHOR CONTRIBUTIONS	28
3.7	ACKNOWLEDGMENTS	29
3.8	CONFLICT OF INTEREST STATEMENT	29
3.9	DATA AVAILABILITY STATEMENT	29
4	ARTIGO 2	30
4.1	RESUMO	30
4.2	INTRODUÇÃO	31
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.3.1	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4.4	RESULTADOS	34
4.5	DISCUSSÃO	40
4.6	CONCLUSÃO	42
4.7	MATERIAL COMPLEMENTAR	43
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXO A – COMPROVANTE DO CEUA	56

1 INTRODUÇÃO

Um sistema reprodutivo eficiente é a chave para o sucesso da produção de leite. O desempenho reprodutivo influencia diretamente na lucratividade e eficiência no sistema de produção nas fazendas leiteiras (OVERTON; CABRERA, 2017). Os estros não detectados resultam em grandes perdas econômicas devido a intervalos prolongados de partos e redução da produção de leite (REITH et al., 2014). A combinação entre desempenho reprodutivo e lucratividade é resultado dos efeitos interativos na duração da lactação e nível de produção de leite, produção e disponibilidade de novilhas de reposição, oportunidades de descarte e taxa de ganho genético (OVERTON; CABRERA, 2017).

Alcançar um bom desempenho reprodutivo é o objetivo primordial das fazendas, sendo a detecção do estro o primeiro passo para esse processo. Alta taxa de detecção de estro é essencial para manter o desempenho reprodutivo em rebanhos leiteiros utilizando inseminação artificial (DOLECHECK et al., 2015). Uma boa eficiência reprodutiva é a criação e manutenção de um número suficiente de gestações de maneira eficiente e oportuna na fase da lactação que otimize os objetivos da fazenda, sendo a lucratividade um objetivo frequente” (OVERTON; CABRERA, 2017).

O monitoramento do comportamento estral através da observação visual é trabalhoso sendo a sua precisão afetada nos últimos anos pela diminuição do tempo em estro dos animais e aumento no tamanho dos rebanhos (SCHWEINZER et al., 2020). É recomendado na detecção de estro que os animais sejam observados pelo menos 20 a 30 minutos até três vezes ao dia, por pessoas qualificadas e familiarizadas com sinais do estro (BARKEMA et al., 2015). A redução na taxa de detecção pode estar relacionada à diminuição do período de estro em bovinos da raça holandesa, que diminuiu de 18 para menos de 8 horas ao longo das últimas cinco décadas (REAMES et al., 2011).

Vacas de alta produção apresentam redução na expressão do estro (RIVERA et al., 2010). A diminuição da expressão de estro não apenas tornou a detecção de vacas para IA mais difícil, mas também afetou a fertilidade da vaca (CERRI et al., 2021). Vários podem ser os fatores que influenciam na intensidade e duração da expressão de estro (MADUREIRA et al., 2015), dentre eles,

paridade, produção de leite e fatores ambientais (PALMER et al., 2010). Em um estudo realizado por Madureira et al. (2015), vacas multíparas expressaram menos intensidade de estro e com menor duração em relação às vacas primíparas. O aumento no número de lactações pode reduzir em até 21,4% a atividade de caminhada no estro (LÓPEZ-GATIUS et al., 2005). A redução na expressão e duração do estro está correlacionada ao aumento da falha de ovulação em estros fisiológicos (BURNETT et al., 2018).

Monitores de atividade automatizados (AAM) são alternativas à disposição do produtor que acrescentam ou substituem a detecção de estro visual (DOLECHECK et al., 2015). No mercado atualmente estão disponíveis dois tipos de AAM: 1) pedômetros, utilizados na perna do animal e 2) colares, que são utilizados no pescoço (SAINT-DIZIER E CHASTANT-MAILLARD, 2012). Pedômetros mensuram o número de passos dados e colares mensuram um movimento tridimensional, estimando a atividade geral do animal (FRICKE et al., 2014). Pesquisas destacam as taxas de detecção de estro superiores a 87% (AUNGIER et al., 2012), mas podem ter valor preditivo positivo próximo a 90% dependendo do sistema de detecção utilizado (MADUREIRA et al., 2015).

A detecção precisa e oportuna da prenhez em vacas leiteiras é um componente essencial do manejo reprodutivo. Mais de 90% dos diagnósticos de prenhez são realizados através dos métodos como palpação, ultrassom (REESE et al., 2018). O diagnóstico precoce de prenhez é importante nos programas de gestão reprodutiva, possibilitando diminuir o intervalo entre partos e maximizar a produção leiteira (CHAVES al., 2020).

O diagnóstico de gestação é essencial para o bom funcionamento dos programas reprodutivos. É de suma importância contar com ferramentas eficientes e precoces para o diagnóstico de gestação (TOLEDO-ALVARADO, 2018). Realizar o diagnóstico de gestação precoce permite reduzir o intervalo entre inseminações, identificar perdas gestacionais e melhorar a eficiência do manejo e da produção de leite (FRICK et al., 2014). Atualmente, os testes de diagnóstico de gestação realizados rotineiramente são por meio de palpação retal, ultrassonografia e análise de PAGs no leite ou sangue entre 26 e 40 dias após a inseminação (REESE et al., 2018).

Do ponto de vista econômico, a sensibilidade do diagnóstico precoce de prenhez (identificação correta de vaca prenhe) é mais relevante do que a sua especificidade (identificação correta de vaca não prenhe), com base em um estudo econômico (GIORDANO, 2013). Diagnósticos realizados de forma errônea podem acarretar, principalmente em casos de falsos negativos, perdas iatrogênicas de gestação, quando esses animais são submetidos a protocolos de sincronização de estro (FRICK et al., 2016).

De acordo com Fosgate et al. (2017), a implementação de métodos de diagnóstico indireto de gestação em sistemas automatizados integrados à sala de ordenha teria benefícios consideráveis, facilitando o manejo e reduzindo a dependência de mão de obra. No entanto, os métodos existentes, como espectroscopia de infravermelho, testes de progesterona e glicoproteínas associadas à prenhez, que utilizam o leite para o diagnóstico de gestação, não são amplamente adotados devido à falta de praticidade e viabilidade econômica em fazendas leiteiras comerciais (FRICK et al., 2016). Dessa forma, é imprescindível a busca pelo desenvolvimento de um método que possa ser facilmente incorporado à rotina de ordenha, caracterizado por custos reduzidos, resultados altamente confiáveis e que minimize a necessidade de manipulação dos animais e da mão de obra envolvida.

Potencializar as diversas abordagens de detecção de estro, como, AAM e a observação visual, em conjunto com um método de diagnóstico de gestação, como a EBE que pode ser integrado às rotinas de ordenha, representaria avanços de grande relevância na área da reprodução bovina. Pesquisas voltadas para o aprimoramento dessas técnicas seriam fatores essenciais para otimizar o desempenho reprodutivo dos rebanhos, permitindo uma identificação eficaz do estro e a adoção de métodos de diagnóstico diretos, fáceis e ágeis a partir das linhas de ordenha.

O objetivo do estudo foi estudar a eficiência na identificação de estro por sistema de monitoramento de atividade automatizado e desenvolver um método de diagnóstico de prenhez precoce por características do leite.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MONITORES DE ATIVIDADE AUTOMAZIDOS (AAM)

Novas tecnologias têm surgido para ajudar a melhorar a eficiência da detecção do estro, as quais permitem o monitoramento contínuo do comportamento animal, que pode ser usado para melhorar o manejo reprodutivo e saúde do rebanho (POLSKY et al., 2017). Visando a melhoria na detecção do estro e na determinação do momento ideal para a realização da inseminação artificial, diversas ferramentas foram desenvolvidas (ROELOFS et al., 2010). Métodos alternativos podem ser usados para essa melhoria, como protocolos de sincronização, pintura de cauda ou tecnologias baseadas em sensores, como pedômetros, medidores de atividade e acelerômetros (NOWICKI et al., 2017).

AAM são alternativas que acrescentam ou substituem a detecção de estro visual (DOLECHECK et al., 2015). Os AAM utilizam aumentos comportamentais na atividade física e agitação para detectar o estro (ROELOFS et al., 2010), sendo sugeridos para prever o momento da ovulação (ROELOFS et al., 2006; STEVENSON et al., 2014). Os AAM demonstraram melhorar a detecção de estro e as taxas de concepção em comparação com a detecção visual (PERALTA et al., 2005). As pesquisas apontam que as taxas de detecção de estro podem ultrapassar 87% (AUNGIER et al., 2012). No entanto, o valor preditivo positivo pode chegar a aproximadamente 90%, dependendo do sistema de detecção empregado (MADUREIRA et al., 2015).

Duas categorias de dispositivos estão disponíveis atualmente: (1) pedômetros fixados em uma das pernas, que registram o número de passos dados pela vaca por unidade de tempo; (2) medidores de atividade fixados ao redor do pescoço, que identificam aumento da atividade física usando a tecnologia de acelerômetro tridimensional (caminhar, montar, levantar e deitar) expresso como um grupo de atividades (AUGUIER et al., 2015). Os dispositivos controlam a atividade física da vaca, para assim calcular o momento mais apropriado para a IA (FRICKE et al., 2014).

Os dados sobre a atividade são registrados continuamente e transmitidos em intervalos de tempo regulares (cada 5 minutos ou a cada 2 horas) e são encaminhados automaticamente para um banco de dados em um computador

central (HOCKEY et al., 2010). O software fornecido com cada dispositivo compara a atividade de cada animal com a de um período de referência anterior (de vários dias dependendo do algoritmo) e, em alguns casos, com a atividade média do rebanho (AUGUIER et al., 2015). Por exemplo, o CowScout (GEA Farm Technologies) aciona um alerta para uma vaca em estro quando a atividade registrada em três períodos consecutivos de 2 horas aumenta em pelo menos dois desvios padrão em relação à média dos 10 dias anteriores (HOCKEY et al., 2010). Tecnologias que utilizam o acelerômetro proporcionam que o comportamento demonstrado pelo animal seja medido de forma remota, em tempo real, por longos períodos, visando fornecer detalhadas informações sobre o comportamento exibido pelo animal (BEWLEY et al., 2017).

2.2 GESTAÇÃO E DIGNÓSTICO DE PREENHEZ

O êxito reprodutivo em uma exploração leiteira está condicionado tanto à concepção da vaca quanto à manutenção da gestação até o momento do parto. O estabelecimento da gestação em bovinos começa pela fecundação dos gametas femininos e masculinos, após ocorrem os processos de clivagem e divisões mitóticas dando origem ao embrião. O estágio de mórula entra no útero no 4º a 6º dia após a fertilização e forma um blastocisto, que contém uma massa celular interna, blastocele ou cavidade central circundada por uma única camada de trofoblasto (SENGER, 2012). Após o 8º dia, ocorre a perda da zona pelúcida e, início do alongamento do blastocisto. As células germinativas desenvolvem-se a partir 14º dia caracterizando o início da fase embrionária. Dessa, originam-se três cordões de células denominadas de ectoderma, mesoderma e endoderma, que darão origem aos órgãos e tecidos (GONÇALVES et al., 2021).

O reconhecimento materno da gestação ocorre por meio da ação de proteínas que são produzidas pelas células trofoblásticas do blastocisto, chamada de Interferon tau (INF-t) (GONÇALVES et al., 2021). O IFN-t possui efeitos anti-luteolíticos, ligando-se ao endométrio para inibir a síntese do receptor de ocitocinas e estrógenos pelas células endometriais (SENGER, 2012).

A confirmação da gestação é primordial para o bom funcionamento dos programas reprodutivos, para isso é importante ferramentas de diagnóstico de

prenhez eficientes e precoces. Assim, novas tecnologias para identificar vacas leiteiras prenhes logo após a IA podem desempenhar um papel fundamental nas estratégias de manejo para melhorar a eficiência reprodutiva e a lucratividade nas fazendas leiteiras (RICCI et al., 2015). Ribeiro et al. (2016) destacam que o controle de prenhez tem como objetivo detectar animais não gestantes com precisão, em vez de detectar animais gestantes, pois a rápida identificação de vacas não prenhes contribuirá para minimizar o tempo de uma nova inseminação.

As ferramentas atuais e comuns para diagnóstico de gestação compreendem abordagens diretas, como a palpação transretal e a ultrassonografia, por outro lado, os métodos indiretos fazem uso de marcadores químicos, como as concentrações de progesterona no leite ou no plasma, bem como medições de proteínas associadas à prenhez e à glicoproteína associada à prenhez (PAG). (FRICKE et al., 2016). O teste de prenhez ideal deve ser altamente sensível, altamente específico, barato e simples de conduzir na fazenda (FRICKE et al., 2016).

Os métodos mais comumente utilizados para diagnóstico de prenhez em bovinos leiteiros é através da palpação transretal e ultrassonografia. A palpação transretal tem baixa precisão para determinar o estado gestacional antes dos 30 a 35 dias após a IA (YOUNGQUIST, 2007). Em contrapartida, a avaliação ultrassonográfica é considerada padrão-ouro para o diagnóstico de gestação por possibilitar a visualização do tamanho e dos batimentos cardíacos do embrião (FRICK et al, 2016). Os autores Frick et al. (2016) apontam a ultrassonografia transretal como método de diagnóstico de gestação rápido e preciso, sendo realizado a partir de 28 dias após a IA possibilitando inclusive a avaliação ovariana, porém exige um investimento inicial considerável. A detecção do estado de gestação com base apenas no não retorno ao cio não é confiável, a menos que o monitoramento e o registro da detecção do cio sejam de alto padrão (TIPLADY et al., 2022). Os testes de diagnósticos direto exigem que sejam realizados manejos adicionais com animais, demandando maior mão de obra e transtornos na rotina do animal.

A P4 é um biomarcador utilizado para diagnosticar prenhez em bovinos entre 18 a 24 dias após os animais serem submetidos à IA (DALMASO DE MELO

et al., 2020). A progesterona do sangue ou leite pode ser quantificada em laboratório usando os métodos de radioimunoensaio (RIA) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (FRICK et al., 2016). O teste de P4 não é viável para diagnóstico de prenhez em vacas, pois sua sensibilidade é de apenas 75% (NEBEL, 1988). Os autores Frick et al. (2016), destaca que a determinação de P4 usando métodos RIA ou ELISA não é prática e econômica para uso em fazendas leiteiras comerciais.

Outro teste que foi desenvolvido e comercializado para determinar o estado de prenhez em bovinos são os ensaios para detectar glicoproteína associada à gravidez (PAG) (GREEN et al., 2000). As concentrações de PAG na circulação da vaca começam a partir dos 15 dias após a concepção, sendo a maior sensibilidade e especificidade ao uso da PAG para o diagnóstico de prenhez observada entre 26 e 32 dias IA (SASSER et al., 1986). Os autores Ricci et al. (2015), relatou que as concentrações plasmáticas de PAG apresentam alta sensibilidade, entre 94 e 100%, porém apresentou baixa especificidade (83%) quando comparada com ultrassom entre 28 e 32 dias após IA.

Em pesquisas mais recentes para desenvolver teste para diagnósticos de gestação precoce e que diminuam os manejos com os animais, a espectroscopia infravermelha transformada por Fourier (FTIR) ganhou espaço. O espectrômetro FTIR já é empregado em avaliações de rotina da composição do leite como, gordura, lactose e proteínas, entre outros (ICAR, 2017). Os autores Lainé et al. (2017) observaram em seus estudos que a gestação tem efeito direto sobre a composição do leite de vacas da raça holandesa usando o espectro FTIR, a absorção de 212 ondas foi afetada pela prenhez, especialmente na região espectral infravermelha do número de onda 1.577 a 968 cm^{-1} . Um estudo realizado com leite cru, teve por meio de validação cruzada aleatória de 10 vezes, com uma AUC de 60%, embora em uma ampla extensão de estágios de prenhez (TOLEDO-ALVARADO et al., 2018). Os pesquisadores Delhez et al. (2020) obtiveram uma AUC de 78% através de uma validação cruzada independente, para diagnóstico após 150 dias de gestação.

ESPECTROSCOPIA DE BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA

A espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE), é um método que pode ser utilizado para avaliações na composição do leite. A espectroscopia avalia

materiais biológicos com base em suas características elétricas (GRIMNES; MARTINSEN, 2014). Esse método é usado para determinação da composição do leite (LOPES et al., 2018) e para detecção de adulterantes e contaminantes (DURANTE et al., 2016; FARAHI et al., 2015).

A técnica de EBE, consiste em uma série de correntes com diferentes variações de frequência de onda fluindo através de um material biológico, em que algum componente do material biológico em avaliação produz uma excitação diferente em cada faixa de frequência utilizada (MACHADO; RAMALHO, 2018). Ainda, segundo Grimnes e Martinsen (2014), para frequências abaixo de 100 kHz, a corrente principal circula no espaço extracelular, enquanto para frequências mais altas, a corrente passa pela membrana celular e pelo espaço intracelular, permitindo a separação em diferentes espectros o conteúdo intra e extracelular.

Para estimular o tecido biológico e medir essas propriedades elétricas, é necessário construir uma série de eletrodos que são dispostos e conectados a um circuito eletrônico responsável por injetar corrente elétrica e medir a tensão e atuar como um canal de medição (MORO; PORTO, 2015). Os valores de impedância dos tecidos biológicos são geralmente representados por um número complexo Z , expresso em ohm (Ω), constituído por uma parte real, $Re\{Z\}$, e uma parte imaginária $Im\{Z\}$ (GRIMNES E MARTINSEN, 2014). A parte real está ligada à resistência do circuito, representando a oposição à corrente devido ao aquecimento dos componentes, enquanto a parte imaginária relaciona-se à reatância, representando a oposição à corrente causada por efeitos reativos como o armazenamento de energia magnética em indutores ou de energia elétrica em capacitores, juntas, essas partes descrevem a relação entre tensão e corrente em circuitos de corrente alternada (ALEXANDER, 2013).

A análise de EBE é usada para avaliar a gordura, proteína, lactose, bem como a contagem de células corporais, contagem bacteriana total, sólidos totais, sólidos não gordurosos, com resultados que demonstraram potencial para estimar a composição do leite, mas necessitando aumentar a precisão da técnica (SCHUMACHER et al., 2019). A técnica de impedância já é amplamente utilizada na medicina por não ser invasiva, relativamente barata e capaz de detectar e monitorar diversos parâmetros e processos biológicos (SANCHEZ et al., 2011).

3 ARTIGO 1: EFFICIENCY OF ESTRUS DETECTION BY AUTOMATED ACTIVITY MONITORING SYSTEM IN DAIRY COWS

Os resultados a seguir estão apresentados na forma de short communication técnica, com as seções de acordo com as orientações da Revista *Reproduction in Domestic Animals*. A formatação do texto mantém as normas de trabalhos acadêmicos da UDESC. As referências citadas estão dispostas ao final da dissertação conforme orientações da Biblioteca Universitária da UDESC.

3.1 ABSTRACT

The detection of estrus is an essential component for the success of reproductive programs. The use of automated activity monitors (AAM) for estrus detection is becoming more common in the dairy industry, but its accuracy in detection is not yet fully elucidated. In the present study we evaluated an AAM for estrus detection alongside visual estrus identification in 23 animals. The AAM was able to detect 78.3% (18/23) of these estrus events, while 21.7% (5/23) were detected only through visual identification. The pre-ovulatory follicle diameter in animals that the AAM alerted as being in estrus and those that did not receive an alert at the time of the first ultrasound shortly after identification showed no differences, with diameters of 15.0 ± 0.24 mm and 14.9 ± 0.46 mm, respectively. There were no differences in diameter in the second ultrasound assessment 12 hours after the onset of estrus, with diameters of 18.9 ± 0.4 mm in follicles of animals that received an estrus alert and 19 ± 0.75 mm for follicles without an estrus alert. These results suggest that even if animals do not reach the necessary activity level for AAM to identify estrus, they still have pre-ovulatory follicles capable of ovulating. Therefore, it is indicated to use both AAM and visual estrus observation to maximize the utilization of estrus events.

Keywords: Standing estrus, Activity, Follicular growth.

3.2 INTRODUCTION

Achieving good reproductive performance is the primary goal of farms, with estrus detection being the first step in this process. Maintaining a high estrus detection rate is essential to ensure efficient reproductive performance in dairy herds that adopt artificial insemination (Dolecheck et al., 2015), especially in those that do not use timed artificial insemination (TAI). Monitoring estrous behavior through visual observation is labor-intensive, and its accuracy has been affected in recent years by the reduced estrus duration of animals and the increase in herd size (Schweinzer et al., 2020). Several factors can affect the intensity and duration of estrus expression (Madureira et al., 2015), including parity, milk production, and environmental factors (Palmer et al., 2010).

New technologies have emerged to improve estrus detection efficiency, allowing for continuous monitoring of animal behavior and enhancing reproductive management and herd health (Polsky et al., 2017). Automated activity monitors (AAM) are available alternatives for producers that complement or replace visual estrus detection (Dolecheck et al., 2015). AAM use behavioral variations in physical activity and agitation to detect estrus (Roelofs et al., 2006). The objectives of the present study were to evaluate the estrus detection efficiency of an AAM and determine the size and growth of the dominant follicle in cows identified by the AAM system, whether in estrus or not.

3.3 MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in a commercial farm in Rio Grande do Sul State, Brazil (27°45'35.3"S 52°57'53.8"W). All procedures involving animals were approved by the Animal Research Ethics Committee of the State University of Santa Catarina (CEUA-UDESC; Protocol N° 8157300522). The animals used in the study were 23 lactating cows (9 multiparous, 14 primiparous) with an average production of 42 kg/l/day, at 140 days in milk, fed with a diet based on corn silage, cottonseed, wheat straw, and concentrate, in a compost barn system. The animals were equipped with an automated activity monitoring collar, the CowScout Leg Sensor system (GEA Farm Technologies, Bönen, Germany). CowScout® monitors cow activity in periods of two consecutive hours. If the activity recorded during three of these two-hour periods increases by at least two

standard deviations from the average activity of the previous 10 days, the system triggers an alert indicating that the cow is likely in estrus. If the animal has only one deviation, it enters as a suspicion of estrus alert, and if the activity continues to increase, reaching the required two deviations, then estrus is confirmed.

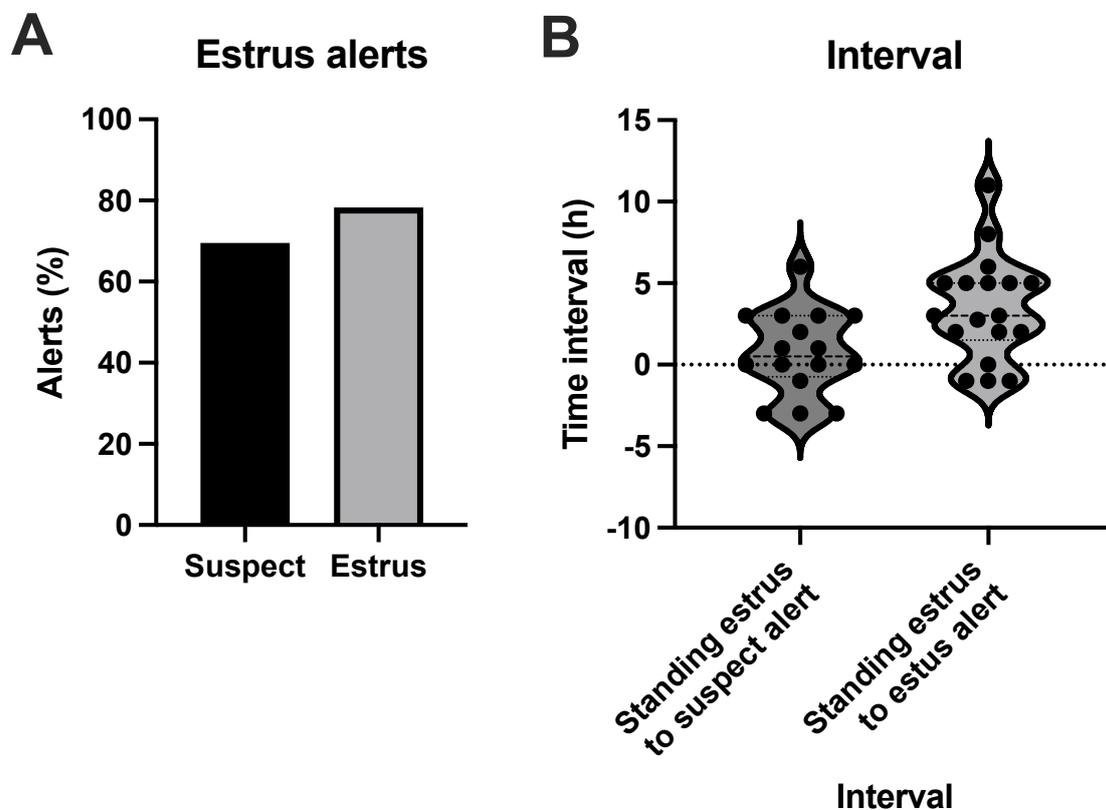
Estrus identification was performed by the CowScout® collar, as well as by visually identifying the characteristic signs of estrus (agitation, walking, standing estrus) between 6 a.m. and 11 a.m. and between 2 p.m. and 6 p.m. Follicular development assessment was performed on all cows identified in estrus by the CowScout® collar and by the characteristic signs of estrus. Cows identified in estrus were subjected to two transrectal ultrasonography evaluations (Mindray ultrasound machine, model DP10Vet equipped with a 7.5 MHz transrectal linear transducer), with the first evaluation performed immediately after estrus identification and the second ultrasound evaluation 12 hours after the first.

The comparison between means was performed by ANOVA, following assumptions for parametric analysis. Normality and homoscedasticity were assessed by the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Data are represented as a percentage or mean and standard error of the mean. Analyses were conducted using JMP Pro software (JMP Statistical Discovery LLC).

3.4 RESULTS

A total of 23 animals were detected in estrus, with 78.3% (18/23) identified by the AAM along with visual identification and 21.7% (5/23) detected only by visual identification (Figure 1A). In 75% of events, the AAM issued a suspicion of estrus alert before estrus confirmation. On average, the alert for estrus suspicion occurred at 0.75 ± 0.64 hours (range between -3 and 6 hours) in relation to visual estrus detection. The confirmation of estrus by AMM occurred at 3.43 ± 0.76 hours (range between -1 and 11 hours) in relation to visual estrus detection (Figure 1B).

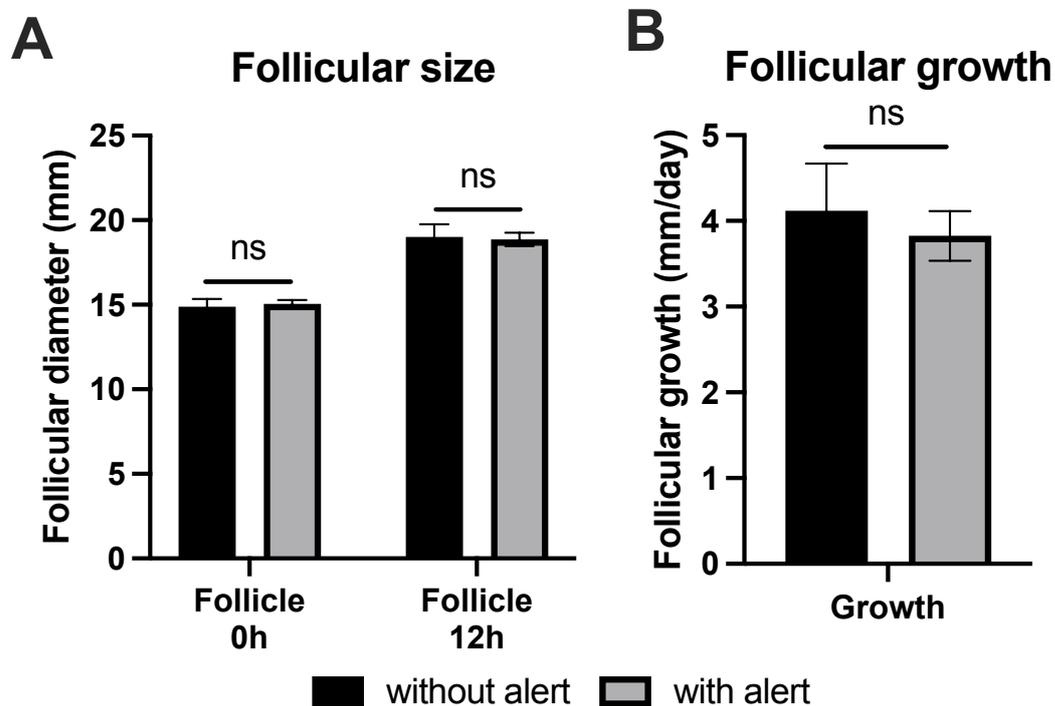
Figura 1 - Efficiency of detecting animals with suspected estrus (Suspect) and animals confirmed in estrus (Estrus) by the automated CowScout® monitoring system in relation to visual estrus observation (A) and the time interval between the first standing estrus detection and the suspect and confirmed estrus alerts (B).



Fonte: Villa et al., 2023.

The diameters of pre-ovulatory follicles in animals that received the AAM alert for estrus and those that did not have the alert at the time of the first ultrasound immediately after identification were 15.0 ± 0.24 mm and 14.9 ± 0.46 mm, respectively. In the second ultrasound assessment, 12 hours after the first, the diameters were 18.9 ± 0.4 mm for follicles in animals with an estrus alert and 19 ± 0.75 mm for follicles without an estrus alert (Figure 2). The growth of follicles in animals identified in estrus by the AAM and those without an alert was similar. The estrus with an alert, the follicle growth was 3.83 ± 0.29 mm, and for those without an alert, it was 4.12 ± 0.55 mm, within a 12-hour interval between measurements.

Figura 2 - Follicular diameter (A) after the first visual estrus detection (Follicle 0h) and 12 hours later (Follicle 12h) and follicular growth during this period (B) in animals identified in estrus (with alert) or not (without alert) by the automated CowScout® monitoring system. NS indicates that there was no statistical difference between the means.



Fonte: Villa et al., 2023.

3.5 DISCUSSION

In the present study we have shown that AAM reported 78.8% of detected estrus. Estrus events were considered true after confirmation of the presence of a pre-ovulatory follicle larger than 10 mm in diameter and the absence of a corpus luteum through ultrasonographic examination. In studies conducted by Madureira et al. (2015) and Silper et al. (2015), AAM were able to identify approximately 85% of estrus events, while Aungier et al. (2015) reported an accuracy of 72% and 32% of false positives.

The AAM issued a suspicion of estrus alert in approximately 75% of events. Alerts are issued every two hours when the software updates, allowing animals to be visually identified in estrus with signs of estrus before the AAM issues a suspicion or confirmation of estrus alert. According to Leroy (2018), it is

recommended that AAMs provide data at shorter intervals or even in real-time to avoid discrepancies related to the timing of insemination.

In the present study, the diameter of the largest follicle and the follicular growth pattern did not differ between cows identified or not in estrus by AAM system. Madureira et al. (2022) conducted an assessment in 117 cows using ovarian ultrasound to determine ovulation at 24 hours, 48 hours, and 7 days after the estrus alert through an AAM system, respecting a voluntary waiting period of 60 days. The results revealed a mean pre-ovulatory follicle diameter of 19.5 ± 3.7 mm, corroborating the findings of the present study.

Dairy cows with larger pre-ovulatory follicles have been associated with higher plasma estrogen concentrations and more evident characteristics of estrus behaviors (Madureira et al., 2021). In contrast, in our study, animals that were not identified in estrus by the AAM had pre-ovulatory follicles with no difference from those identified in estrus by the AAM, although estradiol concentrations were not quantified.

Accurate estrus detection is crucial for satisfactory reproductive performance on dairy farms. In the present study, we have shown the AAM identified most estrus events, accounting for 78.7% of the total, while identification exclusively by visual observation was responsible for identifying the remaining 21.3%. Moreover, even if animals do not reach the necessary activity level for AAM to identify estrus, they still have pre-ovulatory follicles capable of ovulating. Therefore, it is indicated to use both AAM and visual estrus observation to maximize the utilization of estrus events. The ongoing development of these tools is essential to meet the specific needs of each production system and overcome challenges such as reduced estrus expression time and increased herd size. The combination of AAM with visual observation offers a promising approach to improve estrus detection efficiency, allowing for better reproductive planning and control.

3.6 AUTHOR CONTRIBUTIONS

Silvia Villa: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft; Monique Tomazele Rovani:

Conceptualization, Investigation, Resources, Writing – Review; Eduardo Schmitt: Investigation, Resources, Writing – Review; Bernardo Gasperin: Conceptualization, Investigation, Resources, Writing – Review; Rogério Ferreira: Conceptualization, Methodology, Formal analysis; Investigation, Resources; Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Project administration, Funding acquisition.

3.7 ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; Finance Code 001) and Foundation of the Santa Catarina State (FAPESC; 2023TR000636). SV was supported by a scholarship from Santa Catarina State University (PROMOP/UDESC).

3.8 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no conflict of interest.

3.9 DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção precisa do estro é de extrema importância para o desempenho reprodutivo satisfatório nas fazendas leiteiras. A combinação de abordagens, como o uso AAM em conjunto com a observação visual, apresenta resultados promissores para melhorar a eficiência na identificação do estro. A utilização dos AAM mostrou-se eficaz na detecção da maioria dos eventos de estro, enquanto a observação visual complementou a identificação dos eventos não detectados pelos sistemas automatizados.

No contexto do manejo reprodutivo do rebanho, desenvolver um método de diagnóstico de prenhez que possa ser realizado durante cada período de ordenha para todas as vacas em lactação seria altamente benéfico. Isso permitiria o monitoramento contínuo e diário do status de prenhez de cada vaca, facilitando a implementação de estratégias de manejo reprodutivo adequadas. A utilização do método de diagnóstico de prenhez desenvolvido no presente estudo se mostra promissora, oferecendo uma alternativa viável aos métodos tradicionais. O método desenvolvido é de baixo custo e inovador, que pode ser aprimorado para aumentar sua precisão e eficiência. A combinação de ambos os métodos de detecção do estro aproveitando as vantagens dos sistemas automatizados e da observação visual, juntamente com o desenvolvimento de métodos de diagnóstico de prenhez, representa avanços significativos na área da reprodução bovina. Com mais pesquisas e desenvolvimentos, é possível aprimorar ainda mais esses métodos, permitindo uma detecção eficiente e confiável do estro e uma gestão reprodutiva mais eficiente em diferentes condições de manejo e alimentação.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, C. K.; SADIKU, M. N. O. **Fundamentos de circuitos elétricos**. 5º Ed., Porto Alegre: AMGH, 2013.

AUNGIER, S. et al. Effects of management and health on the use of activity monitoring for estrus detection in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2452-66, 2012.

AUNGIER, S. et al. The relationship between activity clusters detected by an automatic activity monitor and endocrine changes during the peri-estrous period in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1666-1684, 2015.

BARKEMA, H. W. et al. Revision guest: changes in the dairy industry affecting the health and well-being of livestock milkman. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 7426-45, 2015.

BARSOUKOV, E.; MACDONALD, J. R. (Ed.). **Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications**. John Wiley & Sons, 2018.

BERTEMES-FILHO, P.; VEIGA, E. A. The Santa Catarina Mark 1 Bioimpedance System: Preliminary Results. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 3, n. 4, p. 2399-2403, 2013.

BEWLEY, J. M. et al. Implementation Opportunities and Challenges of precision dairy monitoring technology. **Journal of Dairy Science**, 2017.

BURNETT, T. A. et al. Effect of estrous expression on timing and failure of ovulation of Holstein dairy cows using automated activity monitors. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1310- 1320, 2018.

CERRI, R, et al. Symposium review: Linking activity-sensor data and physiology to improve dairy cow fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 104, p. 1220-1231, 2021.

- CHAVES, C. M. S. et al. Evaluation of a cattle rapid test for early pregnancy diagnosis in sheep. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, p. 1345-1349, 2020.
- COLAZO, M. G. et al. 2015. Diameter of the ovulatory follicle at timed artificial insemination as a predictor of pregnancy status in lactating dairy cows subjected to GnRH-based protocols. **Theriogenology**, v. 84, p.377–383. 2015.
- DALMASO DE MELO, G. et al. Applied use of interferon-tau stimulated genes expression in polymorphonuclear cells to detect pregnancy compared to other early predictors in beef cattle. **Theriogenology**, v. 152, p.94- 105, 2020.
- DELHEZ, P. et al. Pryce Diagnosing the pregnancy status of dairy cows: How useful is mid-infrared spectroscopy of milk? **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 3264-3274, 2020.
- DENIS-ROBICHAUD, J. et al. Survey of reproduction management on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 9339- 9351, 2016.
- DOLECHECK, K.A. et al. Behavioral and physiological changes around estrus events identified through multiple automated monitoring technologies. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 8723-8731, 2015.
- DUBUC, J., et al. Accuracy of color flow Doppler ultrasonography of the corpus luteum in the diagnosis of non-pregnancy in dairy cows on the 21st day after insemination. **Journal of Dairy Science**, v.103, n.2, p. 2019-2023, 2020.
- DURANTE, G. et al. Electrical Impedance Sensor for Real-Time Detection of Bovine Milk Adulteration. **IEEE Sensors Journal**, v. 16, n. 4, p. 861-865, 2016.
- FARAH, A. et al. Interaction study of paraquat and silver electrode using electrochemical impedance spectroscopy: Application in milk and tomato samples. **Food Control**, v. 47, p. 679-685, 2015.
- FOSGATE, G. T. et al. Bayesian model of latent classes to estimate the accuracy of pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography and laboratory

detection of pregnancy-associated glycoproteins in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 145, p. 100-109, 2017.

FRICK, P.M. et al. Methods for and Implementation of Pregnancy Diagnosis in Dairy Cows. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.32, n.1, p.165-180. 2016.

FRICKE, P. M. et al. Reproductive performance of lactating dairy cows managed for first service using timed artificial insemination with or without detection of estrus using an activity-monitoring system. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 2771-2781, 2014.

GIORDANO, J. O. et al. Economics of resynchronization strategies, including chemical tests to identify non-pregnant cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96. n. 2, p. 949-961, 2013.

GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R.; GASPERIN, B.G. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal e à Humana**, 3ª Ed., Rio de Janeiro: Roca. 2021.

GREEN, J. A. et al. Bovine and ovine glycoproteins associated with pregnancy exhibit patterns of spatial expression and temporally distinct during pregnancy. **Biology Reproduction**, v. 62, p. 1624-1631, 2000.

GRIMNES, S.; MARTINSEN, O. G. **Basics Bioimpedance and Bioelectricity**. 3. ed. Amsterdã: Elsevier, 2014.

HOCKEI, C. D. et al. Evaluating a 2-Hour Activity Meter System neck mounted to detect cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 107-117, 2010.

ICAR (International Committee on Animal Registration). International Recording Practices Agreement- Guidelines for Recording. Rome, Italy, 2016.

KAREN, A. et al. Comparison of a commercial bovine pregnancy-associated glycoprotein ELISA test and a pregnancy-associated glycoprotein radiomimmunoassay test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 15, p. 31-37, 2015.

LAINÉ, et al. Evaluation of the effect of pregnancy stage on milk composition of dairy cows using mid-infrared spectra. **Journal of Dairy Science**, v. 100, v. 4, p. 2863-2876, 2017.

LEROY, C. N. S. et al. Intensity and accuracy of estrous detection and optimal insemination timing with automated activity monitors for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n.2, p. 1638-1647. 2018.

LOPES, A. M. et al. Milk characterization using electrical impedance spectroscopy and fractional models. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 3, p. 901-912, 2018.

LÓPEZ-GATIUS, F. et al. Walking activity at estrus and subsequent fertility in dairy cows. **Theriogenology**, n. 63, p. 1419–1429, 2005.

MACHADO, A. L.; RAMALHO, J. A. Milk Characterization Using Electrical Impedance Spectroscopy and Fractional Models. **Food Analytical Methods**, p. 901-912. 2018.

MADUREIRA, A. M. L. et al. Anogenital distance is associated with postpartum estrus activity, estrus expression intensity, ovulation, and progesterone concentrations in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 105, p. 8523-8534, 2022.

MADUREIRA, A. M. L. et al. Plasma concentrations of progesterone in the preceding estrous cycle are associated with the intensity of estrus and fertility of Holstein cows. **PLoS ONE**, v. 16, n. 8, p. e0248453, 2021.

MADUREIRA, A. M. L., et al. Factors affecting expression of estrus measured by activity monitors and conception risk of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, n. 98 7003-7014, 2015.

MADUREIRA, A. M. L. et al. Intensity of estrus following an estradiol-progesterone-based ovulation synchronization protocol influences fertility outcomes. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 598-608, 2019.

MARTINS, C. M. M. R. et al. Evaluation of electrical bioimpedance spectroscopy in estimate the milk composition, SCC, and milk ethanol stability—Preliminary results. In: AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION - ADSA 2017 ANNUAL MEETING 2017, Pittsburgh. **Anais...** Pittsburgh. Disponível em:<<https://m.adsa.org/2017/abs/t/70941>>. Acesso em: 17 nov. 2019.

MORO, L. C.; PORTO, R. W. Single frequency electrical impedance tomography system with offline reconstruction algorithm. In: IEEE 6th Latin American Symposium on Circuits & Systems (LASCAS), 2015, Montevideu. p. 1-4, 2015.

NEBEL R. L. On-Farm Milk Progesterone Tests. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n.6, p. 1682-1690, 1988.

NOWICKI, A. et al. OvSynch protocol and its modifications in breeding management of dairy herds - an update. **Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 329-360, 2017.

OVERTON, M. W.; CABRERA, V. E. Monitoring and quantifying the value of change in reproductive performance. **American Dairy Science Association**, v. 549, p. 564, 2017.

PALMER, M. A. et al. Estrus detection and estrus characteristics in housed and pastured Holstein- Friesian cows. **Theriogenology**, v. 74, p. 255-264, 2010.

PERALTA, O. A. et al. Comparison of three estrus detection systems during summer in a large commercial dairy herd. **Animals Reproduction Science**, v. 87, p. 59-72, 2005.

POLSKY, L. B. et al. Association between ambient temperature and humidity, vaginal temperature, and automatic activity monitoring on induced estrus in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 590-601, 2017.

REAMES, P. S. et al. Differential regulation of estrous behavior and luteinizing hormone secretion by estradiol-17 β in ovariectomized dairy cows. **Theriogenology**, v. 75, p. 233–240, 2011.

REESE, S. T. et al. The diagnosis of pregnancy in cattle using the concentration of glycoproteins in the circulation on the 24th day of gestation.

Theriogenology, v. 106, p. 178-185, 2018.

REITH, S. et al. Influence of estrus on dry matter intake, water intake and BW of dairy cows. **Animal**, v. 8, p. 48-53, 2014.

RIBEIRO, E. S. et al. Biology of the pre-implantation conceptus in the onset of elongation in dairy cows. **Biology Reproduction**, v. 94, p. 1-18, 2016.

RICCI, A. et al. Factors associated with levels of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in plasma and breast milk Holstein cows during early pregnancy and its effect on accuracy of pregnancy diagnosis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 2502-2514, 2015.

RIVERA, F. et al. Effect of bovine somatotropin (500 mg) administered at ten day intervals on ovulatory responses, expression of estrus, and fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 1500-1510, 2010.

ROELOFS, J. B. et al. Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 66, p. 2173-2181, 2006.

ROELOFS, J. F. et al. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. **Theriogenology**, v. 74, p. 327-344, 2010.

SAINT-DIZIER, M.; CHASTANT-MAILLARD, S. Towards an automated detection of o estrus in dairy cattle. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 47, n. 6, p.1056-1061, 2012.

SANCHEZ, B. et al. Optimal multisine excitation design for broadband electrical impedance spectroscopy. **Measurement Science and Technology**, v. 22, n. 11, 2011.

SASSER, R. G. et al. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a new pregnancy-specific protein in cow serum and a profile of serum concentrations during pregnancy. **Biology Reproduction**, v. 35, p. 936-942, 1986.

SCHUMACHER, L. L. et al. Use of electrical bioimpedance analysis to evaluate the quality of bovine raw milk. **South African Journal of Animal Science**, v. 49, p. 725- 734, 2019.

SCHWEINZER, V. et al. Comparison of behavioral patterns of dairy cows with natural estrus and induced ovulation detected by an ear-tag based accelerometer. **Theriogenology**, v. 157, p. 33-41, 2020.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 3^a Ed., Redmond: Current Conceptions Inc. 2012.

SILPER, B. F. et al. Automated and visual measurements of estrous behavior and their sources of variation in Holstein heifers I: Walking activity and behavior frequency. **Theriogenology**, v. 84, p. 312- 320, 2015.

SILPER, B. F. et al. Daily lying behavior of lactating Holstein cows during an estrus synchronization protocol and its associations with fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 8484-8495, 2017.

SIQUEIRA, L.G.B. et al. Color Doppler for early detection of non-pregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6461-6472, 2013.

STEVENSON, J. S. et al. Ovulation time and conception risk after automated activity monitoring in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 4296-4308, 2014.

TIPLADY, K. M. et al. Pregnancy status predicted using milk mid-infrared spectra from dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 4, p. 3615-3632, 2022.

TOLEDO-ALVARADO, H. et al. Diagnosis of pregnancy status by infrared spectra and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 2496-2505, 2018.

VALENZA, A, et al. Assessment of an accelerometer system for detection of estrus and treatment with gonadotropin-releasing hormone at the time of

inseminate in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 7115-7127, 2012.

VEIGA, E. A.; BERTEMES-FILHO, P. Bioelectrical impedance analysis of bovine milk fat. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 407, n. 1, p. 012009, 2012.

VILLARROEL, A. et al. 2010. A survey of reasons why veterinarians enter rural veterinary practice in the United States. **American Veterinary Medical Association**, v. 236, p. 849- 857, 2010.

YANG, L.; BASHIR, R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 2, p. 135-150, 2008.

YOUNGQUIST, S. **Current Therapy in Large Animal, Theriogenology**. 2. ed. Missouri: Saunder, p. 294 - 303. 2007.

ANEXO A – COMPROVANTE DO CEUA



Universidade do Estado de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização comportamental e endócrina do período periovulatório em estros identificados por sistema de monitoramento de atividade automatizado em vacas e utilização de indutores de ovulação como alternativa para melhorar a eficiência nesses sistemas.", protocolada sob o CEUA nº 6294210622 (ID 001590), sob a responsabilidade de **Rogério Ferreira e equipe; Silvia Villa** - 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 Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 01/07/2022.

We certify that the proposal "Behavioral and endocrine characterization of the periovulatory period in estrus identified by automated activity monitoring system in cows and the use of ovulation inducers as an alternative to improve efficiency in these systems.", utilizing 170 Bovines (170 females), protocol number CEUA 6294210622 (ID 001590), under the responsibility of **Rogério Ferreira and team; Silvia Villa** - 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 University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 07/01/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 07/2022 a 10/2022 Área: Zootecnia

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Bovinos

sexo: Fêmeas

idade: 2 a 6 anos

N: 170

Linhagem: Holandesa

Peso: 650 a 900 kg

Lages, 13 de junho de 2023

José Cristani
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

