

PAULO FRANCISCO MACIEL PÓVOAS SOUTO

**APLICAÇÕES DA INTENSIDADE DO ESTRO DE NOVILHAS
HOLANDESAS DETERMINADA POR MONITORAMENTO
AUTOMATIZADO**

RECIFE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

PAULO FRANCISCO MACIEL PÓVOAS SOUTO

APLICAÇÕES DA INTENSIDADE DO ESTRO DE NOVILHAS
HOLANDESAS DETERMINADA POR MONITORAMENTO
AUTOMATIZADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Veterinária do Departamento de Medicina
Veterinária da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Marcos Antônio Lemos de Oliveira

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

S726a Souto, Paulo Francisco Maciel Póvoas.
Aplicações da intensidade do Estro de Novilhas Holandesas
determinada por monitoramento automatizado / Paulo Francisco
Maciel Póvoas Souto. – Recife, 2018.
70 f. : il.

Orientador(a): Marcos Antonio Lemos de Oliveira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências.

1. Estro comportamental 2. Ovulação 3. Pedômetros
4. Progesterona I. Oliveira, Marcos Antonio Lemos de, orient.
II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

APLICAÇÕES DA INTENSIDADE DO ESTRO DE NOVILHAS
HOLANDESAS DETERMINADA POR MONITORAMENTO
AUTOMATIZADO

Tese de Doutorado elaborada por

PAULO FRANCISCO MACIEL PÓVOAS SOUTO

Aprovada em 28/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. MARCOS ANTÔNIO LEMOS DE OLIVEIRA
Orientador – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. CLÁUDIO COUTINHO BARTOLOMEU
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dr. FERNANDO TENÓRIO FILHO
Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA

Dr. JORGE MOTTA DA ROCHA
Departamento de Produção Animal - UFRN

Prof. MANOEL LOPES DA SILVA FILHO
Departamento de Medicina Veterinária da UFPI

Aos meus pais, **José Ari Póvoas Souto e Edenilde Maria Maciel Póvoas**, meus irmãos, **Thaís Jeruzza Maciel Póvoas Souto e José Ari Póvoas Souto Filho**, pelo apoio incondicional a mim oferecido e por sempre exigirem que eu tentasse o máximo;

À minha esposa, **Tássia Ferreira Pires**, pelo amor, paciência, compreensão e companheirismo durante todos essa jornada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Esta tese é o resultado do trabalho em conjunto e da colaboração de muitos amigos. Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram a concluir mais esta etapa em minha vida. A toda minha família sempre apoiando e fazendo o possível para que eu concluísse essa etapa.

Aos professores e orientadores Dr. **Paulo Fernandes de Lima**, Dr. **Marcos Antônio Lemos de Oliveira**, Dr. **Manoel Lopes da Silva Filho** e em especial ao Dr. **Cláudio Coutinho Bartolomeu** pelo exemplo de dedicação e comprometimento profissional, pela confiança em mim depositada, pelo respeito, pelos conselhos que com certeza me tornaram um profissional e uma pessoa melhor ao longo da graduação, mestrado e doutorado.

Aos Drs. **Fernando Tenório Filho**, **Jorge Motta da Rocha** e **Marcelo Tigre Moura**, por aceitarem o convite para participar da minha defesa e auxiliarem na conclusão desta tese.

Ao supervisor e amigo Prof. **Ronaldo Aoki Cerri**, que me deu a oportunidade de desenvolver o experimento e principalmente pela amizade que nasceu e se solidificou nesse período. Também a todo o Reprolab da University of British Columbia, Canadá.

A todos aqueles que, de alguma forma me ajudaram ao longo do meu percurso pessoal e profissional.

A todos o meu Muito Obrigado!

“Alegações extraordinárias exigem provas extraordinárias.”

Carl Sagan

RESUMO

A detecção do estro na bovinocultura leiteira é desafiadora, em parte devido à má expressão do estro comportamental. Os monitores automatizados de atividade permitem a quantificação da expressão do estro com base na inquietação e suas diferentes intensidades. Os principais objetivos da tese foram avaliar a influência da intensidade da expressão do estro sobre a duração dos eventos e características do estro; na dinâmica ovariana e nas concentrações de progesterona em novilhas holandesas. Um total de 62 estros de 41 novilhas foram avaliados. As novilhas foram monitoradas continuamente por um monitor automatizado de atividade. Quantidade de passos e aumento relativo da atividade (HI) foram coletados de hora em hora durante um evento de estro. Dois grupos foram formados considerando o aumento relativo no momento do pico do estro; alta intensidade (HIGH; >300 HI) e baixa intensidade (LOW; <300 HI). No primeiro estudo, o comportamento de deitar e a duração dos eventos foram gravados a cada hora e analisados. A ovulação foi checada usando monitoramento ultrassonográfico. As novilhas classificadas como HIGH tiveram maior duração no Peak-End ($11,3 \pm 0,9$ vs $6,4 \pm 0,9$; $P = 0,01$) e no estro ($21,3 \pm 1,0$ vs $14,1 \pm 0,1$; $P = 0,01$) do que as novilhas LOW. Intensidade do estro mostrada no pico foi positivamente correlacionada a duração ($r=0,48$, $P = 0,01$). O tempo mais longo por deitada no primeiro dia após o estro foi diferente quando comparado a Alta intensidade e Baixa intensidade ($59,3 \pm 4,4$ vs $71,1 \pm 4,2$, respectivamente; $P < 0,05$). Intensidade do estro não impactou no tempo à ovulação, entretanto impactou a duração do estro. No segundo estudo, foram coletadas amostras de sangue e determinados as concentrações de progesterona e diâmetros dos folículos pré-ovulatórios e de CL. Novilhas classificadas como alta intensidade tiveram maiores níveis de P4 no L3 ($0,84 \pm 0,07$ vs $0,64 \pm 0,04$; $P = 0,02$) do que novilhas do grupo de Baixa intensidade. Correlações fracas foram observadas entre a intensidade do estro e a concentração de progesterona no dia do PGF e L3 ($r=0,11$, $r=0,20$; $P < 0,05$, respectivamente). Também, os níveis de P4 foram fracamente correlacionados a duração do estro nos dias da PGF e do estro ($r=0,19$, $r=0,08$; $P < 0,05$, respectivamente). A intensidade da atividade do estro não foi relacionada aos parâmetros ovarianos e concentrações de P4. Entretanto, a intensidade impactou os níveis de progesterona no terceiro dia após o estro. Os resultados sugerem um potencial na aplicação da classificação da intensidade da expressão do estro a partir de monitores de atividade como parte da tomada de decisão para aumentar a performance reprodutiva de novilhas holandesas.

Palavras-chave: estro comportamental, ovulação, pedômetros, progesterona

ABSTRACT

Detection of estrus in dairy cattle is challenging, in part due to poor expression of behavioral estrus. The automated activity monitors allow the quantification of estrus expression based on the restlessness and its different intensities. The main objectives of this thesis were to evaluate the influence of estrus expression intensity on the duration of estrus events and characteristics; on ovarian dynamics and progesterone concentrations in Holstein heifers. A total of 62 estrus events from 41 heifers were evaluated. Heifers were monitored continuously by an automated activity monitor. Counting steps, and relative increase of activity (HI) were collected each hour during an estrus event. Two groups were formed considering the relative increase on estrus peak; High intensity (HIGH; >300 HI) and Low intensity (LOW; <300 HI). In first study, lying behavior and duration of events were recorded hourly and analyzed. Ovulation was checked using ultrasonography monitoring. Heifers classified as HIGH had greater duration at Peak-End (11.3 ± 0.9 vs 6.4 ± 0.9 ; $P = 0.01$) and estrus time (21.3 ± 1 vs. 14.1 ± 0.1 ; $P = 0.01$) than heifers LOW. Estrus intensity showed on peak was positively correlated to duration ($r=0.48$, $P = 0.01$). The longest rest per bout at the day after of estrus was different when comparing high intensity and low intensity (59.3 ± 4.4 vs 71.1 ± 4.2 , respectively; $P<0.05$). Intensity of estrus did not impact at ovulation timing. However, impacted estrus duration. Measurements such as lying behavior provided important insights on how rest time measurements could be used for further improve estrus detection and timing. In second study, blood samples were harvested and determined the concentrations of progesterone, and preovulatory follicles and CL diameters. Heifers classified as high intensity had greater P4 levels at L3 (0.84 ± 0.07 vs 0.64 ± 0.04 ; $P = 0.02$) than heifers with low intensity. Weak correlations were observed between estrus intensity to progesterone concentration at PGF day and L3 day ($r=0.11$, $r=0.20$; $P<0.05$, respectively). Also, P4 levels was weakly correlated to estrus duration at PGF day and HT day ($r=0.19$, $r=0.08$; $P<0.05$, respectively). Intensity of estrus activity did not change ovarian parameters and P4 concentration. However, impacted progesterone levels at third day after estrus. The results suggest a potential in the application of the classification of estrus expression intensity from activity automatized monitors as part of decision making to increase reproductive performance of Holstein heifers.

Keywords: estrus behavior, ovulation, pedometers, progesterone

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Ciclo Estral e Fisiologia Reprodutiva da Vaca	12
2.2 Comportamento Estral	17
2.3 Detecção Automática do Estro e Monitores de Atividade.....	21
2.4 Perspectivas	27
3. REFERÊNCIAS	29
4. ARTIGOS CIENTÍFICOS	41
4.1 Impact of Activity Intensity Detected by Automated Monitoring System in Holstein Heifers I: Ovulation time and Lying Behavior	41
4.2 Impact of Activity Intensity Detected by Automated Monitoring System in Holstein Heifers II: Ovarian Responses and Progesterone Concentration	56
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70

1. INTRODUÇÃO

Para que a bovinocultura de leite permaneça viável, é essencial o desempenho reprodutivo eficiente. O estro é um dos principais estágios do ciclo de vida reprodutiva que tem impacto dramático no desempenho. Atualmente, as taxas de detecção de estro são tão baixas quanto a 35% (Leblanc, 2005; Ambrose & Colazo, 2007). Com a maioria da bovinocultura leiteira nos Estados Unidos e Canadá usando inseminação artificial (IA) para reposição de vacas, é muito importante que o estro seja detectado com precisão e eficiência. A falta de detecção de estro para a realização da IA aumenta o intervalo desde o parto até a concepção. Isso prolonga os dias em aberto e reduz os lucros para os produtores (LeRoy et al., 2016).

O estro comportamental é tradicionalmente detectado pela aceitação de monta de outras vacas. Este comportamento foi relatado por ocorrer com pouca frequência e durante um intervalo de tempo curto, especialmente em vacas leiteiras de alta produção (Lopez et al., 2004). Assim, o estro provavelmente será desperdiçado quando a observação for realizada duas vezes ou três vezes por dia. Isso foi parcialmente superado com o uso de protocolos de sincronização hormonal para inseminação (IATF) porque esta prática dispensa a detecção de estro. No entanto, uma maior fertilidade foi relatada quando as vacas expressaram estro na IATF (Cerri et al., 2004; Souza et al., 2007; Pereira et al., 2014). Isso levanta questões sobre a importância do comportamento como um marcador fenotípico para a fertilidade e as associações subjacentes entre o comportamento e a fisiologia reprodutiva.

Pesquisas que avaliam as alterações na atividade no momento do estro têm ocorrido há mais de 70 anos (Trimberger, 1943). Ao longo desse tempo, descobriu-se que existem muitos fatores que afetam a intensidade da atividade no estro. Existem fatores ambientais e fisiológicos que afetam o nível de atividade que uma vaca irá expressar em torno do estro (Eradus et al., 1992). Isso dificulta o desenvolvimento de monitores de atividade capazes de detectar quase todas as vacas que estão no estro, além de produzir alguns falsos positivos.

As vacas e novilhas que são detectadas em estro devem ser inseminadas em um momento ótimo que permita que o oócito encontre uma quantidade suficiente de espermatozoides férteis no oviduto imediatamente após a ovulação (Saacke, 2008). Embora o tempo ideal para inseminação tenha sido determinado em relação ao tempo à ovulação, poucos estudos determinaram o melhor momento em que uma vaca ultrapassa um limiar de atividade que é medido e processado por um sistema de monitoramento de atividade comercial.

Agora é mais fácil detectar o estro e medir sua expressão usando monitores automatizados de atividade (MAA), que monitoram o comportamento de forma contínua e fornecem medidas de estro que poderiam ser usadas na ciência de reprodução básica e aplicada. Além disso, pesquisas recentes sugeriram potencial de seleção genética orientada para a fertilidade com base nas medidas dos MAA, pois observou-se que o intervalo entre o parto e o primeiro evento de alta atividade apresenta componente genético correlacionado com características e primeira inseminação pós-parto (Ismael et al., 2015).

Durante o estro, as vacas experimentam várias mudanças fisiológicas, que são expressas através de mudanças de atividade (Kiddy, 1977; Noakes et al., 2001). Os pedômetros são pequenos dispositivos mecânicos que são anexados à perna ou ao pescoço de uma vaca e gravam a atividade com base no movimento. Usando pedômetros para monitorar mudanças de atividade, o estro pode ser previsto automaticamente em vacas e novilhas leiteiras para melhorar o desempenho reprodutivo.

Esta tese começa com uma revisão da literatura, discutindo os mecanismos fisiológicos que controlam as atividades relacionadas a expressão e detecção do estro. A revisão da literatura também descreve o uso de pedômetros e como eles poderiam ser usados para melhorar o desempenho reprodutivo. Os sensores que monitoram o comportamento dos animais, incluindo os MAA, estão em crescente disponibilidade e diversificação (Rutten et al., 2013), embora a ideia de automatizar as medidas da atividade das vacas não seja nova (Kiddy, 1977). Esta revisão da literatura é seguida por um resumo das lacunas em que a pesquisa contribuiria para melhorar o desempenho reprodutivo da vaca leiteira a partir do comportamento estral e da abordagem de detecção. Os capítulos 1 e 2 descrevem os dois estudos concluídos para esta tese. Por fim, nas considerações finais é apresentado um resumo das descobertas dos dois estudos e sugestões para pesquisas futuras para melhorar o conhecimento em torno do estro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ciclo Estral e Fisiologia Reprodutiva da Vaca

Os bovinos são caracterizados por terem ciclos estrais ao longo do ano. O primeiro ciclo estral em uma novilha ocorre em aproximadamente 9-11 meses de idade (Chelikani et al., 2003). Os ciclos estrais variam em duração e, em média passam 21 ± 3 dias em vacas e 20 ± 3 dias em novilhas (Ginther et al., 1989).

Ciclos estrais são divididos em proestro e estro (fase folicular) e metaestro e diestro (fase luteal). Estas fases são determinadas de acordo com estruturas ovarianas e dominância do estradiol ou progesterona (principais hormônios ovarianos). Os ciclos começam e terminam na ovulação, geralmente definidos com dia 1 do ciclo. A luteólise marca a transição entre o diestro e o proestro, levando a fase lútea ao fim e fornecendo o crescimento folicular, desenvolvimento do folículo final e ovulação (Forde et al., 2011)

Estro comportamental é o momento do ciclo estral onde uma vaca é receptiva a monta. Além disso, estro é um estado pré-ovulatório; é o único estágio, no ciclo estral, que é visível ao olho nu. O sinal mais primário e confiável do estro é a aceitação da monta, que é definido por uma vaca imóvel enquanto está sendo montada por um touro ou outra fêmea do rebanho (Baker & Seidel, 1985). Estro é também caracterizado pelo aumento da atividade, inquietação, apoio de queixo, ato de cheirar e lambe a vulva, montar e aumento da descarga de muco vaginal (Kiddy, 1977; Esslemont et al., 1980). A duração do estro em vacas em lactação é em média 7-8 horas (Dransfield et al., 1998; Lovendahl & Chagunda, 2010) e cerca de 9 horas em novilhas holandesas (Lovendahl & Chagunda, 2010).

Em bovinos, a indução do comportamento estral e a ovulação é dependente do estradiol $17-\beta$ e condicional a baixas concentrações de progesterona (Allrich, 1994). Estudos com vacas intactas e ovariectomizadas relataram que a injeção de varias doses de estradiol induziu a expressão de comportamento similar (Allrich, 1994). Isso levou a postulação que o estradiol promove um comportamento estral de forma “tudo ou nada”: o comportamento estral seria induzido uma vez que o estradiol atingisse uma determinada concentração e a expressão comportamental não seria afetada por aumentos adicionais dos níveis de estradiol. Mais recentemente, Reames et al. (2011) observaram um aumento linear na duração da aceitação de monta (da primeira a última aceitação) com aumento da suplementação de estradiol, embora a

suplementação de estradiol não pode ser comparada diretamente entre os experimentos. Reames et al. (2011) testou 4 doses de estradiol relatou diferenças entre vacas na concentração de estradiol necessária para indução do comportamento estral. Comportamentos individuais, taxa metabólica, e expressão de receptores são alguns dos fatores potenciais que poderiam interferir com a resposta da expressão do estro.

Além da inibição do comportamento estral (Allrich, 1994), a progesterona na inseminação artificial acima da concentração basal ($> 0,4$ ng/ml) foi associada a baixa fertilidade (Wiltbank et al., 2014). Consequentemente, Kimmins e Maclaren (2001) concluíram que há auto regulação parácrina entre esteroides sexuais e seus receptores no endométrio. O papel da progesterona no primer do cérebro bovino para estradiol (regulando a expressão dos receptores de estradiol) é evidenciado pela ausência ou baixa expressão do estro associado à primeira ovulação pós-parto ou ao estro puberal, que não são precedidos por uma fase lútea. A maior expressão do estro no momento da IA como parte de protocolos de sincronização com suplementação de progesterona fornece evidências adicionais (Rhodes et al., 2002)

Embora a regulação da expressão do estro provavelmente envolva fatores adicionais, o estradiol é pelo menos necessário como gatilho (Roelofs et al., 2010). É importante considerar que, se uma maior concentração de estradiol não beneficiar a expressão do comportamento do estro, ela ainda pode melhorar os aspectos da função do trato reprodutivo, como o transporte espermático e a secreção de proteínas uterinas para nutrição embrionária. (Allrich, 1994). Associações positivas entre expressão do estro e taxa de concepção (Garcia et al., 2011; Gilmore et al., 2011; Madureira et al., 2015) sugere que ambos os processos compartilham reguladores comuns, como o estradiol. As investigações sobre a regulação neuroendócrina da expressão do estro podem aumentar a compreensão de como o comportamento estral e os mecanismos fisiológicos se relacionam com a fertilidade.

A ovulação ocorre após o término do estro comportamental e os processos que conduzem à ovulação também são controlados pelo estradiol (Bloch et al., 2006; Forde et al., 2011). Quando a concentração de progesterona diminui após a luteólise, o feedback negativo sobre a LH é removido e a amplitude e frequência dos pulsos de LH aumentam. O aumento do LH é dependente de GnRH e é induzido pela crescente concentração de estradiol resultante da atividade esteroidogênica folicular. O aumento do LH induz a maturação folicular final e a ovulação (Forde et al., 2011).

Os intervalos entre os eventos que ocorrem entre a luteólise e a ovulação são regulados oportunamente. A variação nesses intervalos, especialmente em relação ao tempo de início do estro, pode contribuir para as baixas taxas de concepção observadas nas vacas Holandesas

(Saumande & Humblot, 2005; Valenza et al., 2012). Assumindo um intervalo de 28 horas desde o início do estro até a ovulação e 25 horas do aumento da LH para a ovulação (Bloch et al., 2006), o pico de estradiol, o aumento de GnRH e o aumento de LH ocorrem em um período de apenas 3 horas. Ao final do comportamento do estro, a ovulação é o único evento que resta para completar o ciclo estral.

Um maior pico de estradiol durante o estro, obtido com a indução da luteólise no início do ciclo (d6 a d9 vs. d14 a d15), resultou em um intervalo mais curto de 10 horas, da luteólise ao início da aceitação (Stevenson et al., 1998). Este intervalo mais curto está de acordo com as observações de que uma maior concentração de estradiol resulta em pico e ovulação de LH mais próximo do início do estro (Saumande e Humblot, 2005; Bloch et al., 2006). Isso poderia favorecer a fertilidade por causa da ovulação de um oócito de alta qualidade (não prematuramente ativado) e uma melhor sincronia entre IA e ovulação.

Consequentemente, Bloch et al. (2006) relataram que intervalos muito longos entre o estro e a ovulação (35 a 50 horas) coincidiram com o pico de estradiol mais baixo, menor progesterona no ciclo anterior e menor amplitude do aumento de LH. As indicações de que os centros hipotalâmicos para o aumento de GnRH são mais sensíveis ao estradiol do que os centros comportamentais foram relatados. Além disso, sugeriu que não é provável que exista uma associação entre uma concentração mínima de estradiol necessária para o aumento da LH e a intensidade do estro comportamental (Reames et al., 2011).

Além de induzir a ovulação, o pico de LH pára a atividade da aromatase e termina a síntese de estradiol (Forde et al., 2011). Consequentemente, foi relatada uma redução da concentração de estradiol a 50 % da concentração máxima em 5 horas pós-LH (Chenault et al., 1975). Após 14 horas pós-LH, o estradiol já está no nível basal (2 pg / mL; Chenault et al., 1975), ou tem menos 2 pg/ml acima do nível basal (Aungier et al., 2015). Relativamente ao estro comportamental, a concentração máxima de estradiol foi detectada no momento da expressão máxima de acordo com um sistema de pontuação de van Eerdenburg et al. (1996). Verificou-se que o estradiol reduz a 60 % da concentração máxima 6 horas após a expressão comportamental máxima (Lyimo et al., 2000). A síntese de estradiol termina aproximadamente 3 a 9 horas após o início do estro. Pode ser extrapolado que as últimas horas do estro comportamental ocorrem sob as concentrações mais baixas de estradiol, de modo que o comportamento naquele momento resulta da estimulação por outras fontes ou por via neuroendócrina induzida pelo estradiol. Uma vez que as vacas de alta produção possuem maior depuração metabólica do estradiol (Sangsrivong et al., 2002), a redução do estradiol circulante

após o aumento da LH é provavelmente mais rápida nessas vacas e pode resultar em uma expressão de estro mais curta e menos intensa (Lopez et al., 2004).

Concentrações baixas de estradiol ou progesterona podem afetar negativamente mecanismos fisiológicos e desempenho reprodutivo (Sartori et al., 2004). Em um estudo abrangente sobre a função ovariana e a concentração de esteroides em novilhas (10 a 16 meses de idade) e vacas em lactação (56 ± 4 dias no leite), Sartori et al. (2004) observaram que as vacas tinham folículos ovulatórios de maior diâmetro (16,8 vs. 14,9 mm) e maior volume de tecido lúteo (11,120 vs. 7,303 mm³). Embora as estruturas fossem maiores, as vacas em lactação apresentavam estradiol sérico máximo (7,9 vs. 11,3 pg/mL) e concentração de progesterona (5,6 vs 14,9 ng/mL) do que novilhas.

Baixa progesterona e estradiol têm sido associadas ao aumento da taxa metabólica e à depuração dos hormônios esteróides que ocorrem em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo intestinal e hepática pós-alimentação (Parr et al., 1993; Sangsritavong et al., 2002; Vasconcelos et al., 2003). Devido ao metabolismo e à ingestão alimentar, as vacas em lactação têm maior fluxo sanguíneo hepático (1.183 L/h) do que vacas secas (757 L/h) (Sangsritavong et al., 2002). A taxa de depuração metabólica do estradiol permanece elevada durante 4.5 horas após a alimentação em vacas em lactação, resultando em redução do estradiol circulante para metade da concentração de pré-alimentação pelo menos durante esse período de 4,5 horas (Sangsritavong et al., 2002). Vasconcelos et al. (2003) relataram redução da progesterona circulante em aproximadamente 0,5 a 1,5 ng/mL durante as 8-9 horas após a alimentação, se as vacas fossem alimentadas com 50 ou 100 % de suas necessidades diárias.

A dinâmica das ondas foliculares e, portanto, o número de ondas em um ciclo, está sob controle de progesterona e estradiol (Sartori et al., 2004). A baixa concentração de progesterona retarda o turnover do folículo e prolonga a dominância folicular (Cerri et al., 2009) devido à redução da inibição dos pulsos de LH pela progesterona. Um perfil de alta concentração de progesterona durante a fase de crescimento do folículo pré-ovulatório, inversamente, pode inibir ainda mais a frequência de pulso de LH, evitar a ativação prematura de oócitos e prevenir a ovulação retardada ou a falha na ovulação, melhorando assim os resultados reprodutivos. Os folículos que cresceram sob altas concentrações de progesterona também apresentaram maior concentração de IGF-I no fluido folicular (Cerri et al., 2011), o que contribui para o desenvolvimento folicular e a síntese de estradiol. Embriões de folículos que cresceram sob a concentração de progesterona superior a 1,4 ng/mL apresentaram melhor qualidade (Rivera et al., 2011). As perdas iniciais de prenhez podem ser originárias de oócitos comprometidos (embriões de baixa qualidade) ou de um ambiente uterino inadequado (Santos et al., 2004), bem

como de inseminações prematuras (Dalton et al., 2001). A redução da fase lútea da concentração de progesterona resulta em expressão prematura de receptores de estradiol e aumento da concentração de metabolismo de PGF após o desafio da ocitocina, levando a uma luteólise prematura (Cerri et al., 2011).

O controle dos mecanismos luteolíticos também é prejudicado pelo estradiol reduzido durante o período pré-ovulatório. Baixas concentrações de estradiol não inibem completamente os receptores de ocitocina, resultando em luteólise prematura (Mann & Lamming, 2000). Este mecanismo foi proposto para explicar os ciclos curtos após a primeira ovulação pós-parto e suporta o efeito do baixo pico de estradiol em taxas de concepção e luteólise antes do reconhecimento materno da gravidez (d 16 após AI), levando a perdas precoce da prenhez (Santos et al., 2004).

O estradiol também influencia o comprimento do intervalo da luteólise para a ovulação, alterando o tempo de picos de GnRH e LH (Mann & Lamming, 2000). Isso implica um período mais longo de crescimento folicular sob baixas concentrações de progesterona. Além da IA, esse atraso resulta na ovulação de um folículo maior e mais antigo que provavelmente contém um oócito de má qualidade. Uma redução de 1,5 dias no comprimento de dominância folicular melhorou a qualidade do embrião, embora a taxa de fertilização não tenha sido afetada (Cerri et al., 2009).

No momento da emergência de nova onda folicular, a menor concentração de estradiol resulta em menor feedback negativo sobre FSH, o que, ao permanecer em alta concentração, permite o surgimento de mais de um folículo codominante. Este modelo foi proposto para explicar a maior incidência de ovulações duplas e partos gêmeares em associação com alta produção de leite (Wiltbank et al., 2000). As taxas de ovulação dupla de 64% foram relatadas em vacas em lactação no verão, enquanto as novilhas apresentaram taxa de 1,3% e vacas em lactação e secas de 17% em condições de inverno (Sartori et al., 2002).

A baixa concentração de esteroides circulantes também pode prejudicar a expressão do estro. O primeiro estro pós-parto e o estro puberal são exemplos de eventos não precedidos por períodos de alta progesterona onde o estro pode ser silencioso e seguido por uma curta fase lútea. O primeiro estro pós-parto, caracterizado por manifestação comportamental menos intensa, é menor e tem menor aumento da atividade física (Aungier et al., 2012). Foi relatado que a alta produção de leite afetou duração do estro e taxa de ovulações múltiplas, mediada pelo metabolismo elevado dos esteroides e baixa concentração plasmática de estradiol (Wiltbank et al., 2006). Lopez et al. (2004) observaram maiores folículos ($18,6 \pm 0,3$ vs. $17,4 \pm 0,2$ mm) e menor estradiol circulante ($6,8 \pm 0,5$ vs. $8,6 \pm 0,5$ pg/mL) em vacas produzindo médias de 46,8

e 32,3 kg/dia, respectivamente. Além disso, as vacas de maior rendimento apresentaram estro curto ($7,0 \pm 1,1$ vs. $11,9 \pm 1,4$ horas).

Em geral, é provável que uma maior incidência de anormalidades reprodutivas (por exemplo, falha na ovulação, ovulações múltiplas, cistos de ovário) e a baixa expressão do estro provenham de estradiol circulante mais baixo no período pré-ovulatório (Sartori et al., 2004).

2.2. Comportamento Estral

As vacas apresentam uma exibição comportamental característica quando no estro, onde ficar parada quando montada por outra fêmea é o sinal principal (Roelofs et al., 2010). O comportamento de monta nas fêmeas foi explicado como uma estratégia para a comunicação da receptividade sexual aos machos, ou como resultado de uma seleção instintiva por pastores para vacas que exibem esse comportamento quando no estro. Esta hipótese se origina em informações históricas de que o gado bovino *Bos taurus* foi separado dos machos durante séculos; os comportamentos estrais foram usados para determinar quando os touros deveriam ser trazidos para um rebanho (Baker & Seidel, 1984; Albright & Arave, 1997).

As mudanças comportamentais que as vacas experimentam durante o estro são reguladas pelo sistema endócrino e processadas através do cérebro. A concentração aumentada de estrógeno (E2) é processada no cérebro. Os neurônios (no hipotálamo) produzem neurotransmissores específicos do comportamento, que são transferidos para o mesencéfalo. A velocidade do impulso aumenta e direciona os sinais para a medula (Senger, 2003). Na medula, o sinal é integrado e os nervos sinapse com os neurônios motores, que correm nos traçados nervosos da medula espinhal, produzindo comportamentos de estro tais como montar e aceitar a monta (Senger, 2003).

A observação da aceitação de monta pode não ser suficiente para a detecção de estro satisfatória na maioria das fazendas leiteiras. Usando o esquema tradicional de 30 min de observação visual duas vezes / dia, é provável que as montas sejam perdidas, com apenas 37 % dos eventos de estro detectados (Van Vliet & Van Eerdenburg, 1996). Com 30 minutos de observação quatro vezes / dia, Dolecheck et al. (2015) observaram estro em 18 de 32 vacas submetidas a um protocolo de sincronização, enquanto 29 tiveram uma ovulação confirmada pelo perfil de progesterona no sangue. Consequentemente, Roelofs et al. (2005) relataram aceitação de monta em 20 % dos eventos de estro se uma única vaca estivesse em estro em um determinado momento; isso aumentou para 79 % quando mais de duas vacas estavam em estro simultaneamente. Embora uma taxa de detecção de 79 % seja considerada satisfatória, foi

obtida com um esquema de observação visual exigente (rodadas de 30 minutos em intervalos de 3 horas).

A ocorrência da aceitação de monta depende, evidentemente, da disposição de outras vacas a montar. De acordo com a tendência de frequência reduzida de aceitação, há indicação de redução semelhante na exibição do comportamento de monta ao longo do tempo. As montas são realizadas principalmente por vacas em proestro e estro (Helmer e Britt, 1985). Hurnik et al. (1975) relataram uma média de 34 montas por estro e mediana de 16 montas, mostrando uma distribuição positivamente distorcida onde a maioria das vacas apresentou baixa frequência de montas e poucos realizaram muitas montas.

A monta pode ser classificada como orientada (montas traseiras), desorientada (monta frontal e lateral), tentativa (a vaca do receptor não ficou parada), ou monta bem-sucedida (comportamento de aceite pelo receptor). Os relatórios anteriores (Britt et al., 1986, van Eerdenburg et al., 1996) sugeriram que as montas desorientadas são bons comportamentos discriminativos para a detecção de estro, uma vez que ocorrem apenas durante ou dentro de 12 horas do estro. Outra ferramenta útil seria a relação entre montas aceitas e rejeitadas, o que poderia informar se uma vaca recebeu tentativas de monta e não era receptiva, ou se não havia tentativas de monta. Pode-se sugerir que a manifestação comportamental do estro mudou, provavelmente em resposta aos recursos que fornecemos ou restringimos das vacas. É claro que as vacas leiteiras modernas na configuração padrão da fazenda leiteira não podem ser montadas com frequência suficiente para a observação visual do estro para produzir taxas adequadas de IA. Alternativas que podem ser consideradas são 1) provisão de um ambiente que estimule a expressão comportamental, 2) melhoria de métodos para detectar o estro, e 3) desenvolvimento de métodos para a detecção de comportamentos alternativos. As duas últimas alternativas foram abordadas de forma mais ampla, respectivamente, com o uso de giz de cauda ou detectores de monta eletrônica, e com o desenvolvimento dos monitores automatizados de atividade.

Semelhante à monta e à aceitação de monta, os comportamentos estrais secundários são classificados como ativos (iniciados por uma vaca-ação) ou passivos (recebidos por uma vaca-reação). Durante o estro, os sinais secundários ativos são observados em maior frequência do que os sinais secundários passivos (Sveberg et al., 2011). O monitoramento dos comportamentos estrais secundários, como a monta ativa, apoio de queixo, o ato de cheirar a vulva e a agitação, podem melhorar a eficiência da detecção de estro (van Vliet & van Eerdenburg, 1996). Embora os comportamentos secundários não sejam específicos do estro, eles são pouco frequentes e ocorrem aleatoriamente quando as vacas não estão no estro (Sveberg et al., 2011). O início de uma variedade de comportamentos secundários foi relatado

como aumentando durante as 6 horas anteriores do estro, enquanto o aumento da receptividade aos comportamentos secundários foi simultâneo ao início da aceitação de monta (Sveberg et al., 2011). Uma expressão comportamental sequencial foi proposta: em um primeiro momento, ocorreria o cheirar a vulva e o apoio de queixo, seguido da monta e, finalmente, aceitando a monta (Roelofs et al., 2005). Sveberg et al. (2011), inversamente, apontou os comportamentos secundários que ocorrem de forma ativa antes do início do estro e de forma receptiva durante o a aceitação da monta (estado geral receptivo).

A observação do comportamento estral pelos produtores não deve limitar-se a observação da aceitação de monta (Roelofs et al., 2010). Os comportamentos secundários não são específicos, mas são relevantes devido à sua alta frequência de expressão. van Eerdenburg et al. (1996) criou um método de detecção de estro com base em uma soma de pontuação atribuída aos sinais primários e secundários de estro. Eles identificaram um limiar que permite 100% de especificidade para a detecção de estro, apesar de os escores serem baixo e facilmente alcançado se julgar sua escala. No entanto, seus resultados evidenciam que o estro métodos de detecção baseados na expressão frequente de comportamentos secundários podem ser empregados.

Dada a natureza ação e reação da maioria dos comportamentos estrais, espera-se que as vacas no estro formem grupos sexualmente ativos. O aumento da frequência de monta foi descrito na presença de cinco novilhas (Helmer & Britt, 1985) ou duas vacas (Sveberg et al., 2011) simultaneamente em estro. Sveberg et al. (2013) definiu que as vacas em tais grupos devem "... participar de um mínimo de 1 comportamento estral por 5 minutos enquanto se mantêm dentro de 3 metros quadrados (2 comprimentos da vaca) do (s) parceiro (s) por um período mínimo de 5 minutos". A formação de grupos sexualmente ativos certamente facilita a identificação de vacas potencialmente em estro, mas não fornece confirmação. O aumento da exibição comportamental resultante da participação em grupos sexualmente ativos provavelmente contribui para a inquietação característica do estro.

A inquietação, comumente citada como uma das principais alterações comportamentais durante o estro (van Eerdenburg et al., 1996; Roelofs et al., 2010), foi interpretada como uma busca por parceiros de acasalamento ou como uma ferramenta para definir a receptividade sexual (Kerbrat & Disenhaus, 2004). Embora este comportamento seja subjetivo quando avaliado visualmente (van Eerdenburg et al., 1996), constitui a base para a detecção automatizada de estro. A exibição de comportamentos secundários provavelmente contribui para aumentar atividade física, que é o parâmetro mais comum medido pelos MAA. A inquietação também pode afetar o comportamento de descanso. Um número aumentado de

deitadas em bovinos alojados (Walton & King, 1986; Kerbrat & Disenhaus, 2004) e uma diminuição do tempo total de deitadas diária durante o estro foram sugeridas como alternativas para a detecção automatizada de estro (Kerbrat & Disenhaus, 2004, Dolecheck et al., 2015). O tempo de espera e a frequência diminuíram aproximadamente 60 % durante um intervalo de aproximadamente 6 h em torno do primeiro evento de estro visível (Dolecheck et al., 2015). A investigação do comportamento de deitar durante os períodos de estro até esta data foi realizada principalmente com um pequeno número de observações ou com vacas de baixo rendimento (Kerbrat & Disenhaus, 2004, Dolecheck et al., 2015).

Existem vários fatores, que afetam o comportamento das vacas e a expressão do estro; estes podem ser originários de um grupo de vacas, um problema de gestão, uma questão ambiental ou uma condição fisiológica. Um fator importante, que controla a intensidade do comportamento do estro, é o tamanho do grupo sexualmente ativo. Quando 1, 2 e 3 animais estavam em estro Hurnik et al. (1975) descobriram que o número médio de montagens iniciadas aumentou (11, 36 e 53 montas, respectivamente). Fatores de gestão e habitação, como ruídos altos, tetos baixos e tipo de piso (Hurnik et al., 1975; Britt, et al., 1986) podem afetar a frequência, a duração e a expressão da atividade de monta e de aceitação.

O maior fator limitante em um programa de reprodução bem-sucedido é a falha de detecção de estro (Stevenson, 2001), porque as taxas de detecção de estro variam e são afetadas por vários fatores. Em média, as taxas de detecção de estro são tão baixas quanto 35 % (LeBlanc, 2005; Ambrose & Colazo, 2007). A detecção imprecisa de estro e inseminação fora do momento ideal reduzem as taxas de concepção e aumenta os intervalos de partos, aumentando os custos (Firk et al., 2002). Ao melhorar a eficiência da detecção de estro de 50 a 60 %, diminuindo os dias para o primeiro serviço de 80 para 60 d, e aumentando as taxas de concepção de 35% para 50 % (Hady et al., 1994). Isso demonstra que melhorar a eficiência da detecção de estro poderia beneficiar o desempenho reprodutivo em vacas e melhorar os lucros para os produtores.

Existem vários métodos para detectar o estro. Observação visual, gravação de vídeo, giz ou tinta na cauda, sistemas de monitoramento de atividades, como pedômetros e dispositivos sensíveis à pressão mecânicos e eletrônicos que são ativados com base em eventos de montas reais. Senger (1994) sugeriu que as taxas de detecção mais elevadas provêm de observação contínua através de métodos eletrônicos, químicos ou visuais. As observações visuais são demoradas e exigem pessoal treinado, no entanto, pode resultar em uma detecção precisa se for feito com frequência e com atenção. Usando observações visuais (2x / dia) com tinta na cauda em um rebanho em condições extensivas, Xu et al. (1998) encontraram taxas de eficiência e

precisão de 98,4 % e 97,6 %. Embora as observações visuais sejam efetivas, com as fazendas leiteiras consistentemente crescendo em tamanho, os produtores têm menos tempo para monitorar as vacas individuais; portanto, um sistema de monitoramento automático (por exemplo, pedômetro ou detector de montagem) surge como alternativa valiosa.

2.3. Detecção Automática do Estro e Monitores de Atividade

As baixas taxas de concepção com a utilização da IA podem ser ligadas a má expressão do estro ou a detecção ineficiente. Considerando que o problema era a detecção e não a expressão, Senger (1994) propôs três alternativas de automação: pedômetros, detectores de monta sensíveis a pressão e monitores do muco vaginal. Os pedômetros e outros sensores que medem a atividade física tornaram-se a tecnologia mais promissora. Uma pesquisa em grandes laticínios na América do Norte (613 ± 46 vacas) informou que, além da observação visual, o método mais utilizado para a detecção de estro foi o giz na cauda, seguido de detectores de monta ativados por pressão e pedômetros (Caraviello et al., 2006). A técnica do cauda-giz consiste em aplicar giz na cabeça da vaca, com o objetivo de detectar o estro pela remoção do giz, como consequência da aceitação da monta. Este método tem requisitos de mão-de-obra intermediários e de baixo custo e foi aplicado com sucesso considerável (Firk et al., 2002), mas seu princípio de detecção depende da atividade de monta. Os monitores de atividades automatizados estão em desenvolvimento por algumas décadas e são apresentados como uma ferramenta promissora devido a maior detecção de estro por meio de vigilância contínua de comportamentos que não dependem diretamente da aceitação a monta, bem como por sua aplicação simultânea em outras áreas (por exemplo, saúde e bem-estar) e benefícios potenciais adicionais para o gerenciamento e desempenho reprodutivo, que serão apresentados nesta seção.

A tecnologia para a detecção automatizada de estro tem vindo a desenvolver-se rapidamente, aumentando a disponibilidade de sensores mais precisos, duradouros e com maior capacidade de armazenamento e transmissão de dados. Consequentemente, as descrições comportamentais que foram previamente realizadas por observação visual (Hurnik et al., 1975; Pennington et al., 1985) estão agora sendo estudadas com auxílio de sensores automatizados, como detectores de monta (At-Taras & Spahr, 2001; Rivera et al., 2010) e monitores de atividade física (Løvendahl & Chagunda, 2010; Aungier et al., 2012; Valenza et al., 2012).

Os pedômetros são pequenos dispositivos eletrônicos que registram atividade física contando passos. Eles estão localizados dentro de capas de invólucro rígidas à prova de água,

que geralmente são presos na perna traseira de uma vaca com uma alça de nylon. Para que dados de atividade sejam transmitidos para o software, uma antena escaneia o pedômetro para baixar os dados armazenados. Esta atividade de varredura identifica o pedômetro individual e transmite a identificação do pedômetro e o registro de atividades através de um controlador em um computador (Calderón, 2002). Esta informação é armazenada e calculada no software de gerenciamento de rebanhos. O software calcula médias para a atividade de pisar e deitar de cada vaca; se a atividade da vaca se desviar da atividade média, o sistema alerta o operador.

O sistema AfiMilk Pedometer Plus TM (S.A.E. Afikim, Kibbutz Afikim, Israel) (pedômetro Afimilk), não só registra a atividade de pisar (como todos os outros pedômetros), mas também registra a atividade de deitar através de um sensor recém-desenvolvido (Behavior Tag®, Arazi et al., 2010). Os pedômetros de Afimilk monitoram a atividade contando passos (o número de movimentos importantes das pernas), vezes que o animal deita (número de eventos de deitar) e tempo de deitar. Os pedômetros da Afimilk registram a atividade usando um dispositivo analógico mecânico. Quando ocorrem movimentos importantes nas pernas, uma parte mecânica em movimento atinge uma parte mecânica estacionária e um passo é contado. A força do movimento para contar um "passo" foi validada para o gado.

O pedômetro Afimilk detecta atividade de deitar com base no ângulo da perna da vaca. Se o ângulo estiver acima de um limite predeterminado e 3 minutos decorridos, o pedômetro começa a contar isso como tempo deitada (em min). O período de espera de 3 minutos é filtrar os eventos mentirosos simulados (movimentos agressivos das pernas) e garantir que a vaca esteja em posição reclinada. Uma vez que a vaca está parada, o ângulo do pedômetro muda e o contador de tempo deitada termina. O período entre dois eventos em pé (isto é, em pé, deitado, em pé) é contado como um ato de deitar.

Os pedômetros são usados para monitorar mudanças na atividade e para prever diferentes estágios de produção ou doença na vida de uma vaca. O estro é um estágio que os pedômetros comumente preveem em instalações tipo free-stall. Com o uso de pedômetros, a eficiência de detecção de estro pode variar entre 51 e 87 % (Roelofs et al., 2005). Os pedômetros podem ser usados para monitorar as mudanças de atividade com base na atividade ou não de montar (Nebel et al., 2000).

O estro medido com pedômetros é definido pelos limiares de atividade, que afetam a precisão das taxas de detecção (Roelofs et al., 2005). Com um alto limiar ou aumentos (3 ou 4 vezes vs 2 vezes), a precisão da detecção de estro pode ser alta, no entanto, as taxas de eficiência de detecção podem ser baixas. Com os limiares baixos, a eficiência da taxa de detecção será

alta, no entanto, pode ocorrer um aumento nos falsos positivos (menor precisão) (Roelofs et al., 2005; Lovendahl & Chagunda, 2010).

Um dos primeiros estudos usando pedômetros para detecção de estro, Kiddy (1977) observou que a contagem de passos durante o estro foi 4 vezes maior que durante os períodos basais. Outros relataram contagens máximas de passos 8 h após o pico de expressão comportamental e concentração de estradiol, e concluiu que a atividade era uma medida ineficiente devido ao tempo em relação a outros eventos (Lyimo et al., 2000). Hoje em dia, os sensores podem gerar alertas em tempo real no início da alta atividade e indicar o tempo ideal de inseminação com base no tempo de início do estro em vez do tempo de atividade máxima. Os critérios de detecção mais importantes devem ser aqueles que podem prever o tempo de ovulação com maior precisão. O desenvolvimento de sensores até o início dos anos 2000 já definiu a atividade como a medida mais confiável para a detecção automática de estro, embora as taxas de erro ainda limitassem sua aplicação (Firk et al., 2002).

Estudos usando monitores de atividade encontraram uma variedade de mudanças relativas a atividade no estro, variando de 2 a 4 vezes mais que os dias de fase lútea (Kiddy; 1977; Lewis & Newman, 1984; Schofield et al., 1991; Løvendahl & Chagunda, 2010; Madureira et al., 2015). A duração média do evento de atividade capturado pelos monitores de atividades (ou seja, o tempo acima do limite do estro) foi relatado entre 8 e 17 horas (Schofield et al., 1991; Løvendahl & Chagunda, 2010; Valenza et al., 2012; Bombardelli et al., 2015; Madureira et al., 2015). Com diferentes graus e durações do aumento da atividade no estro, é desafiador desenvolver um limiar que pode explicar vacas que não têm um grande aumento no estro sem ter falsos positivos das vacas que têm uma grande variação diária na atividade. Schofield et al. (1991) desenvolveram um algoritmo que detectou todos os eventos de estro e não produziu falsos positivos em uma configuração de pesquisa, no entanto, era um pequeno tamanho de amostra em um ambiente controlado. Existem muitos fatores na fazenda que limitam a aplicação desses resultados, como vacas com problemas metabólicos e mudanças na rotina diária, como mudanças de temperatura (Koelsch et al., 1994).

Intensidade (magnitude da mudança comportamental) e duração do estro são características mensuráveis da expressão do estro. Enquanto a aceitação de monta é de aproximadamente 5,5-9,5 horas (At-Taras & Spahr, 2001; Lopez et al., 2004; Rivera et al., 2010; Sveberg et al., 2011), duração da alta atividade física (ou seja, o limite acima do tempo) aproxima-se de 10-16 horas (Løvendahl & Chagunda, 2010; Aungier et al., 2012; Valenza et al., 2012). Uma maior duração do aumento da atividade física provavelmente está associada a uma maior exibição de monta ou a outros comportamentos secundários antes da aceitação,

embora essas medidas não tenham sido obtidas em um único experimento para fins comparativos.

A quantificação do aumento da atividade, ou seja, a intensidade do estro, geralmente é relatada em relação um período basal e processada como desvios padrão, variação percentual, mudança de dobra ou índices proprietários. As pesquisas têm relatado intensidade de estro na ordem de 2 a 4 vezes o aumento [$334 \pm 156 \%$, Madureira et al. (2015); $377 \pm 156 \%$, López-Gatius et al. (2005); 2,8 vezes; Løvendahl e Chagunda, (2010)]. Estes resultados são comparáveis ao aumento pioneiro de 4 vezes obtido por Kiddy (1977). Os dados descritivos da intensidade de estro são frequentemente omitidos em troca da taxa de detecção e precisão do sensor. A intensidade e a duração dos alertas dos monitores podem ser aplicadas na identificação de falsos positivos, predição de fertilidade e seleção genética e, portanto, devem ser cuidadosamente investigadas. O desenvolvimento de trabalhos sobre características de estro para vacas de níveis de produção variados e sistemas de habitação é essencial para o desenvolvimento de MAA mais preciso e expansão de suas aplicações secundárias.

Outros comportamentos, como ruminção, alimentação e padrões de deitar também podem ser registrados automaticamente. As mudanças nos tempos de alimentação, que estão de acordo com o aumento da atividade física e as características de agitação no estro, foram associadas à diminuição da ruminção e ao tempo de alimentação em D-1 e D0 em relação à inseminação (Pahl et al., 2015).

Houve pouca pesquisa sobre o uso de comportamento de deitar e levantar para detecção de estro. Rutten et al. (2013) analisou 48 documentos, mas apenas dois relataram padrões comportamento de deitar e levantar (Brehme et al., 2008; de Mol et al., 2009). A primeira avaliou seis vacas e um estro; o segundo estudou 10 vacas e 40 eventos de estro. Os sensores que medem o tempo deitada podem ser aplicados à detecção de estro, mas há uma escassez de informações sobre como os tempos de deitar e de repouso mudam durante o estro em gado leiteiro estabulado. Dado o aumento da atividade de caminhada durante o estro, é lógico esperar um aumento no tempo de permanência em pé. Recentemente, Dolecheck et al. (2015) relataram uma redução no tempo deitada e sobre a frequência durante o estro em vacas em lactação e sugeriram que essas medidas poderiam ser usadas para detecção automatizada de estro.

A combinação de medidas múltiplas dentro de um único sistema de detecção pode reduzir a taxa de erro e aumentar a precisão dos MAA (Firk et al., 2002; Dolecheck et al., 2015). Outro benefício prático dos MAA, além do aumento da taxa de detecção, é a predição do intervalo para a ovulação. Os dados sobre o momento do início do estro e o conhecimento do tempo de ovulação em relação ao início do estro podem ser usados para determinar o momento

mais adequado para a IA (Stevenson et al., 2014), potencialmente aumentando as taxas de fertilização e concepção.

Para maximizar a probabilidade de fertilização e concepção, o sêmen deve ser depositado no momento apropriado em relação à ovulação. Walker et al. (1996) demonstraram que o tempo desde o início do aumento da atividade até a ovulação foi de $27,6 \pm 5,4$ horas. Estudos sucessivos descobriram que, em média, a ovulação ocorre entre 26 e 33 horas após a atividade ultrapassar o limiar de vários sistemas de monitoramento de atividade (Roelofs et al., 2005; Hockey et al., 2010a; Yoshioka et al., 2010; Stevenson et al., 2014; Bombardelli et al., 2015). Embora não seja significativamente diferente, Stevenson et al. (2014) observaram que as primíparas tendem a ovular antes das vacas múltíparas: $25,4 \pm 0,5$ h e $27,0 \pm 0,8$ h, respectivamente. Os espermatozoides precisam de 6 a 10 horas para capacitação e transporte no trato feminino (Wilmot & Hunter 1984; Hawk 1987; Saacke et al., 2000). Ao inseminar vacas entre 36 horas antes e 12 horas após a ovulação e avaliar o tempo de ovulação usando ultrassonografia, Roelofs et al. (2006) descobriram que as inseminações que ocorreram 12 a 24 horas antes da ovulação resultaram no maior número de embriões de boa qualidade. Hockey et al. (2010b) também usaram ultrassonografia às 0, 12, 24 e 36 horas após a IA e descobriram que as inseminações que ocorreram 0 a 16 horas antes da ovulação apresentaram a maior taxa de concepção.

O tempo relativo para a inseminação para o primeiro sinal observado de estro tem sido um tema de pesquisa há mais de 70 anos. Uma das primeiras diretrizes foi a regra da “manhã-tarde” que sugeriu que, se uma vaca fosse observada aceitando monta pela manhã, a inseminação deveria ocorrer naquela tarde e, se observada no estro pela tarde, a IA deveria ocorrer na manhã seguinte (Trimberger, 1943). Esta regra ainda está em uso. Desde então, houve estudos que descobriram que a realização de IA, uma vez por dia, poderia atingir risco de concepção semelhante para IA duas vezes por dia (Foote, 1978; Nebel et al., 1994).

Foote (1978) teve registros de 44.707 vacas e novilhas, incluindo os períodos manhã-tarde da primeira observação do estro e o tempo em que a inseminação foi realizada por um inseminador profissional. Uma grande proporção (73 %) das vacas e novilhas foram vistas pela primeira vez no estro pela manhã e não houve diferença no retorno ao estro entre as inseminadas antes das 12:00h entre 12:00h e 18:00h ou após 18:00h. Para as vacas que foram observadas pela primeira vez no estro à tarde, não houve diferença no retorno ao estro antes de 12:00h ou entre 12:00h e 14:00h no dia seguinte. No entanto, a pequena amostra de inseminação que ocorreu após 14:00h no dia seguinte ao estro à tarde teve uma diminuição da taxa de não retorno. Embora as vacas não tenham sido observadas no início real do estro e o tempo real de

observação não foi registrado, Foote (1978) concluiu que, com base nessas descobertas, uma inseminação no meio da manhã deveria proporcionar uma probabilidade quase máxima de prenhez.

Nebel et al. (1994) também descobriram que a inseminação diária entre 8:00h e 11:00h apresentava a maior taxa de não retorno e não era diferente da tradicional regra “manhã-tarde”. Neste estudo, 7240 inseminações de primeiros serviços de 166 rebanhos foram realizadas por técnicos profissionais usando a regra ou inseminando uma vez por dia. Para minimizar o efeito do rebanho e da estação, os técnicos foram alocados aleatoriamente para um dos dois programas de inseminação por 3 meses e depois mudaram para os 3 meses seguintes. Os sinais de estro observados e o tempo de observação e inseminação foram registrados. Não observaram nenhuma perda nas taxas de concepção, usando um programa de inseminação uma vez por dia apresenta o benefício de exigir apenas uma visita de fazenda de um técnico contratado e é um uso eficiente do trabalho para fazendas que inseminam as próprias vacas.

Existem poucos estudos sobre o momento da inseminação em relação aos limiares de atividade para maximizar a probabilidade de prenhez. Maatje et al. (1997) descobriram que a maior probabilidade de prenhez foi alcançada 6 a 17 horas após o início do aumento da atividade do pedômetro, com o ótimo estimado em 11,8 h. Este estudo usou os pedômetros de Boumatic Heat-seeker-TX (Dairy Equipment Co., Madison, WI) e todas as 171 inseminações incluídas no teste foram associadas a sinais de estro durante as três observações de 30 minutos por dia pela gerente do rebanho. Uma vaca foi marcada pelo sistema se a vaca tivesse uma atividade média por seis períodos de 2 horas que era o dobro da atividade média de linha de base dos 2 dias anteriores para os mesmos seis períodos. A hora exata em que o alarme começou foi gravada com o tempo de inseminação. Stevenson et al. (2014) concluiu que as vacas primíparas devem ser inseminadas 13 a 16 horas após passar o limiar de atividade e as vacas múltíparas devem ser inseminadas entre 0 e 12 horas.

Existem numerosos estudos comparando monitores de atividade com métodos alternativos de detecção de estro. Michaelis et al. (2014) comparou o uso de monitores de atividade com a detecção visual de estro ou a detecção por pelo menos um dos métodos. Houve 1004 períodos potenciais de estro, determinados retrospectivamente por ultrassom, P4 sérico ≤ 1 ng / ml na inseminação ou taxa de concepção de 348 vacas monitoradas por monitores de atividade da Heatime (SCR Engineering Ltd., Netanya). Para a detecção visual, as vacas foram observadas durante 30 minutos duas vezes ao dia. Não houve diferença na taxa de detecção de estro entre o MAA e detecção visual nos primeiros 21 dias do período de reprodução, mas a detecção por pelo menos um sistema foi maior do que sozinho. No geral, o MAA teve uma

eficiência ligeiramente maior (o número de eventos de estro detectados corretamente dividido pelo número total de possíveis períodos de estro) do que a detecção visual: 35,6 % e 34,3 %, respectivamente. Esse valor é muito inferior ao anunciado pelo fabricante. A precisão (número de estro corretamente detectados com $P4 < 1 \text{ ng / ml}$ / número de sinais de estro verdadeiro e falso) * 100) do MAA foi de 83,8% em comparação com 75,1% para detecção visual. O estudo mostrou que, em comparação com a detecção visual, os monitores de atividade tiveram bom desempenho e as vacas detectadas pelo MAA apresentaram 1,4 vezes mais probabilidades de serem diagnosticadas como prenhas, mas devem ser feitas melhorias na eficiência de detecção de estro.

Os protocolos de IATF foram adotados na indústria de laticínios (Fricke et al., 2014). No entanto, com preocupações a respeito do uso de hormônios, métodos de detecção de estro alternativos, como o MAA, precisam ser mais pesquisados. Um estudo comparando o desempenho reprodutivo de vacas manejadas usando um monitor em comparação com o uso de vários programas de IATF foi realizado em 3 fazendas comerciais com a Heatime (SCR Engineers Ltd., Netanya, Israel) (Neves et al., 2012). Este estudo descobriu que, no nível da vaca, não havia diferença no tempo para a prenhez e tempo para o primeiro ou segundo serviço para os dois programas de gestão.

Outro estudo que comparou o uso de um monitor (AfiAct Pedometer Plus, Afimilk, Kibbutz Afikim, Israel) com a adição do uso dos protocolos Presynch, Ovsynch e Resynch não encontrou diferença no desempenho reprodutivo (Dolecheck et al., 2016). Este estudo também ocorreu em três fazendas comerciais e todas as vacas que estavam no grupo de tratamento MAA não receberam hormônios, a menos que não tivessem alerta em 39 ± 7 dias após o período voluntário de espera (25 % das vacas), após o que receberam uma injeção de ambos PGF ou GnRH, mas sem IATF. Esses estudos demonstram que os monitores automatizados de atividade podem ser uma alternativa competitiva ao uso de protocolos de IATF.

2.4. Perspectivas

A expressão comportamental do estro tem sido estudada por muitas décadas, pois é essencial para determinar quando e quais vacas e novilhas serão inseminadas. A taxa em que as vacas são inseminadas (ou seja, taxa de serviço) é aparentemente persistentemente baixa. Helmer & Britt (1985) declararam que "a detecção do estro continua a ser um problema nas fazendas leiteiras". Denis-Robichaud et al. (2016) relataram uma taxa de inseminação de 44% nos rebanhos leiteiros canadenses. Atualmente, MAA permite uma taxa de detecção aumentada

e fornece medidas de estro além de uma resposta de detecção dicotômica. Embora haja uma quantidade considerável de pesquisas que investigam a eficiência desses sensores, pouco se sabe sobre as características do estro e o potencial de transformar esses dados em informações valiosas para o gerenciamento reprodutivo. Com foco no uso de dados gerados pelos monitores, foram identificadas duas áreas principais que precisam ser investigadas.

O primeiro refere-se ao conhecimento sobre características de estro em categorias do rebanho e para uma mesma vaca e identificação de fatores que afetam essas características. O MAA atual é eficiente na detecção de estro, mas há potencial adicional para entender como as medidas de estro são influenciadas por fatores relacionados à vaca e ao meio ambiente. Juntamente com a identificação de novas medidas, o aprimoramento das tecnologias pode levar a uma maior sensibilidade.

Uma segunda lacuna diz respeito à aplicação da expressão quantificada do estro como medida fenotípica da fertilidade. Esta é uma área de pesquisa complexa, dada a multiplicidade de fatores que influenciam o comportamento e a fertilidade. Uma abordagem inicial para esta questão seria investigar a associação entre as características do estro (por exemplo, duração e intensidade do estro) e as taxas de prenhez. O conhecimento sobre a variabilidade da expressão do estro poderia contribuir para esta área de pesquisa, que também se beneficiaria de informações sobre o acordo entre as características do estro fornecidas por diferentes sistemas ou com base em critérios diferentes.

Esta pesquisa teve como objetivo apoiar a interpretação e aplicação de dados de MAA estudando padrões de expressão de estro entre ciclos estrais de um mesmo indivíduo e medindo o acordo entre diferentes características de estro e os monitores. Os objetivos secundários foram investigar o potencial desses sistemas e apontar para futuras características possíveis. Ao estudar as associações entre as características do estro e a fertilidade, antecipamos avaliar a importância da expressão do estro como um marcador fenotípico de fertilidade e o potencial dos monitores em fornecer informações em tempo real sobre desempenho reprodutivo individual e a nível de rebanho.

3. REFERÊNCIAS

ALBRIGHT, J.L., ARAVE, C.W. **Reproductive behavior**. Pages 82–89 in *The Behaviour of Cattle*. CAB International, New York, NY. 1997

ALLRICH, R.D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 77:2738–2744. 1994

AMBROSE, D.J., COLAZO, M.G. Reproductive status of dairy herds in Alberta: a closer look. Proc. 2007 Western Can. Dairy Sem. **Adv. Dairy Technol.** 19: 227-244. 2007

AT-TARAS, E.E., SPAHR, S.L. Detection and characterization of estrus in dairy cattle with an electronic heatmount detector and an electronic activity tag. **J. Dairy Sci.** 84:792– 798. 2001

AUNGIER, S.P.M., ROCHE, J.F., SHEEHY, M., CROWE, M. A. Effects of management and health on the use of activity monitoring for estrus detection in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 95:2452–2466. 2012

AUNGIER, S.P.M., ROCHE, J.F., DUFFY, P., SCULLY, S., CROWE, M.A. The relationship between activity clusters detected by an automatic activity monitor and endocrine changes during the peri-estrous period in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 98:1666–1684. 2015

BAKER, A.E.M.; SEIDEL, G.E. Why do cows mount other cows? **Appl. Anim. Behav. Sci.** 13: 237-241. 1985

BLOCH, A., FOLMAN, Y., KAIM, M., ROTH, Z., BRAW-TAL, R., WOLFENSON, D. Endocrine alterations associated with extended time interval between estrus and ovulation in highyield dairy cows. **J. Dairy Sci.** 89:4694–4702. 2006

BOMBARDELLI, G.D., SOARES, H.F., CHEBEL, R.C. Time of insemination relative to reaching activity threshold is associated with pregnancy risk when using sex-sorted semen for lactating Jersey cows. **Theriogenology** 85: 533-539. 2015

BREHME, U., STOLLBERG, U., HOLZ, R., SCHLEUSENER, T. ALT pedometer - New sensoraided measurement system for improvement in oestrus detection. **Comput. Electron. Agric.** 62:73–80. 2008

BRITT, J.H., SCOTT, R.G., ARMSTRONG, J.D., WHITACRE, M.D. Determinants of estrous behavior in lactating Holstein cows. **J. Dairy Sci.** 69: 2195-2202. 1986

CALDERÓN, L. **Reproductive efficiency of a dairy herd after introduction of a pedometry-based estrous detection system.** M.Sc. Thesis, University of Puerto Rico, Mayaguez Campus, Puerto Rico. Pp 37. 2002

CARAVIELLO, D.Z., WEIGEL, K.A., FRICKE, P.M., WILTBANK, M.C., FLORENT, M.J., COOK, N.B., NORDLUND, K.V., ZWALD, N.R., RAWSON, C.L. Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. **J. Dairy Sci.** 89:4723–4735. 2006

CHELIKANI, P.K., AMBROSE, J.D., KENNELLY, J.J. Effect of dietary energy and protein density on body composition, attainment of puberty, and ovarian follicular dynamics in dairy heifers. **Theriogenology.** 60: 707-725. 2003

CHENAULT, J. R., THATCHER, W.W., KALRA, P.S., ABRAMS, R.M., WILCOX, C.J. Transitory changes in plasma progestins, estradiol, and luteinizing hormone approaching ovulation in the bovine. **J. Dairy Sci.** 58:709–717. 1975

CERRI, R.L.A., SANTOS, J.E.P., JUCHEM, S.O., GALVÃO, K.N., CHEBEL, R.C. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. **J. Dairy Sci.** 87:3704–3715. 2004

CERRI, R.L.A., RUTIGLIANO, H.M., CHEBEL, R.C., SANTOS, J.E.P. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. **Reproduction** 137:813–823. 2009

CERRI, R.L.A., CHEBEL, R.C., RIVERA, F., NARCISO, C.D., OLIVEIRA, R.A., AMSTALDEN, M., BAEZ-SANDOVAL, G.M., OLIVEIRA, L.J., THATCHER, W.W.,

DALTON, J.C., NADIR, S., BAME, J.H., NOFTSINGER, M., NEBEL, R.L., SAACKE, R. G. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in non-lactating dairy cattle. **J. Dairy. Sci.** 84:2413-2418. 2001

DENIS-ROBICHAUD, J., CERRI, R.L.A., JONES-BITTON, A., LEBLANC, S.J. Survey of reproduction management on Canadian dairy farms. **J. Dairy Sci.** 99:9339–9351. 2016

DOLECHECK, K.A., SILVIA, W.J., HEERSCHE JR., G., WOOD, C.L., MCQUERRY, K.J., BEWLEY, J.M. A comparison of timed artificial insemination and automated activity monitoring with hormone intervention in 3 commercial dairy herds. **J. Dairy Sci.** 99: 1506-1514. 2016

DOLECHECK, K.A., SILVIA, W.J., HEERSCHE, G., CHANG, Y.M., RAY, D.L., STONE, A.E., WADSWORTH, B.A., BEWLEY, J.M. Behavioral and physiological changes around estrus events identified using multiple automated monitoring technologies. **J. Dairy Sci.** 98:8723–8731. 2015

DRANSFIELD, M.B.G., NEBEL, R.L., PEARSON, R.E., WARNICK, L.D. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **J. Dairy Sci.** 81: 1874-1882. 1998

ERADUS, W.J., ROSSING, W., HOGWERF, P.H., BENDERS, E. Signal processing of activity data for oestrus detection in dairy cattle. In: Ipema, Lippus, Metz, Rossing, (Eds.), Proceedings of the International Symposium on Prospects for Automatic Milking. Pudoc Scientific, Wageningen, **The Netherlands**, pp. 360–369, EAAP Publication No. 65. 1992

van EERDENBURG, F.J.C.M., LOEFFLER, H.S.H., van VLIET, J.H. Detection of oestrus in dairy cows: A new approach to an old problem. **Vet. Q.** 18:52–54. 1994

ESSLEMONT, R.J., GLENCROSS, R.G., BRYANT, M.J., POPE, G.S. Quantitative study of pre-ovulatory behavior in cattle (British Friesian Heifers). **Appl. Anim. Ethol.** 6: 1-17. 1980

FIRK, R., STAMER, E., JUNGE, W., KRIETER, J. Automation of oestrus detection in dairy cows: a review. **Livest. Prod. Sci.** 75: 219-232. 2002

FOOTE, R.H. Time of artificial insemination and fertility in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 62: 355–358. 1978

FORDE, N., BELTMAN, M.E., LONERGAN, P., DISKIN, M., ROCHE, J.F., CROWE, M.A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 124:163–169. 2011

FRICKE, P.M., GIORDANO, J.O., VALENZA, A. LOPES, G., AMUNDSON, M.C., CARVALHO, P.D. 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. **J. Dairy Sci.** 97: 2771–2781. 2014

GARCIA, E., HULTGREN, J., FÄLLMAN, P., GEUST, J., ALGERS, B., STILWELL, G., GUNNARSSON, S., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Oestrous intensity is positively associated with reproductive outcome in high-producing dairy cows. **Livest. Sci.** 139:191–195. 2011

GILMORE, H.S., YOUNG, F.J., PATTERSON, D.C., WYLIE, A.R.G., LAW, R.A., KILPATRICK, D.J., ELLIOTT, C.T., MAYNE, C.S. An evaluation of the effect of altering nutrition and nutritional strategies in early lactation on reproductive performance and estrous behavior of high-yielding Holstein-Friesian dairy cows. **J. Dairy Sci.** 94:3510–3526. 2011

GINTHER, O.J., KNOPF, L., KASTELIC J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fertil.** 87: 223–230. 1989

HADY, P.J., LLOYD, J.W., KANEENE, J.B. SKIDMORE, A.L. Partial budget model for reproductive programs of dairy farm businesses. **J. Dairy Sci.** 77: 482–491. 1994

HAWK, H.W. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. **J. Dairy Sci.** 70: 1487–1503. 1987

HELMER, S.D., BRITT., J.H. Mounting behavior as affected by stage of estrous cycle in Holstein heifers. **J. Dairy Sci.** 68:1290–1296. 1985

HOCKEY, C.D., MORTON, J.M., NORMAN, S.T., MCGOWAN, M.R. Improved prediction of ovulation time may increase pregnancy rates to artificial insemination in lactating dairy cows. **Reprod. Domest. Anim.** 45: e239–e248. 2010a

HOCKEY, C.D., MORTON, J.M., NORMAN, S.T., MCGOWAN, M.R. Evaluation of a neck mounted 2-hourly activity meter system for detecting cows about to ovulate in two paddock-based Australian dairy herds. **Reprod. Domest. Anim.** 45: e107–e117. 2010b

HURNIK, J.F., KING, G.J., ROBERTSON, H.A. Estrus behavior and estrus detection in postpartum dairy cows. **Can. J. Anim. Sci.** 55: 473-474. 1975

ISMAEL, A., STRANDBERG, E., KARGO, M., FOGH, A., LØVENDAHL, P. Estrus traits derived from activity measurements are heritable and closely related to the time from calving to first insemination. **J. Dairy Sci.** 98:3470–3477. 2015

KIDDY, C.A. Variation in physical activity as an indication of estrus in Dairy Cows. **J. Dairy Sci.** 60: 235-243. 1977

KERBRAT, S., DISENHAUS, C. A proposition for an updated behavioural characterization of the oestrus period in dairy cows. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 87:223–238. 2004

KIMMINS, S., MACLAREN, L.A. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. **Placenta**, 22:742–748. 2001

KOELSCH, R.K., ANESHANSLEY, D.J., BUTLER, W.R. Analysis of activity measurement for accurate oestrus detection in dairy cattle. **J. Agric. Eng. Res.** 58: 107-114. 1994

LEBLANC, S. Using DHI records on-farm to evaluate reproductive performance. Proc. 2005 **Western Can. Dairy Sem. Adv. Dairy Technol.** 17: 319-330. 2005

LEROY, C.S. **Estrus detection intensity and accuracy, and optimal timing of insemination with automated activity monitors for dairy cows.** M.Sc. Thesis, The University of Guelph, Canada, 2016.

LEWIS, G.S., NEWMAN, S.K. Changes throughout estrus cycles of variables that might indicate estrus in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 67: 146-152. 1982

LOPEZ, H., SATTER, L.D., WILTBANK, M.C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.** 81:209–223. 2004

LÓPEZ-GATIUS, F., LÓPEZ-BÉJAR, M., FENECH, M., HUNTER, R.H.F. Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: Risk factors and effects. **Theriogenology** 63:1298–1307. 2005

LØVENDAHL, P., CHAGUNDA, G.G. On the use of physical activity monitoring for estrus detection in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 93: 249–259. 2010

LYIMO, Z.C., NIELEN, M., OUWELTJES, W., KRUIP, T.A.M., VAN EERDENBURG, F.J. C.M. Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrus behavior in dairy cattle. **Theriogenology** 53:1783–1795. 2000

MAATJE, K., DE MOL, R.M., ROSSING, W. Cow status monitoring (health and oestrus) using detection sensors. **Comput. Electron. Agric.** 16: 245-254. 1997

MADUREIRA A.M.L., SILPER, B.F., BURNETT, T.A., POLSKY, L., CRUPPE, L.H., VEIRA, D.M., VASCONCELOS, J.L.M., CERRI, R.L.A. Factors affecting expression of estrus measured by activity monitors and conception risk of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 98: 7003-7014. 2015

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.** 64:171–180. 2000

MICHAELIS, I., BURFEIND, O., HEUWIESER, W. Evaluation of estrous detection in dairy cattle comparing an automated activity monitoring system to visual observation. **Reprod. Dom. Anim** 49: 621-628. 2014

de MOL, R.M., BLEUMER, E. J.B., HOGWERF, P.H., IPEMA, A.H. Recording of dairy cow behaviour with wireless accelerometers. In: C. Lokhorst and P. W. G. Groot Koerkamp, editors. **Precision Livestock Farming '09**. Vol. 2009. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. p. 349–356. 2009

NEBEL, R.L., WALKER, W.L., MCGILLIARD, M.L., ALLEN, C.H., HECKMAN, G.S. Timing of insemination of dairy cows: fixed time once daily versus morning and afternoon. **J. Dairy Sci.** 77: 3185–3191. 1994

NEBEL, R.L., DRANSFIELD, M.G., JOBST, S.M. BAME, J.H. Automated electronic systems for the detection of oestrus and timing of AI in cattle. **Anim. Repro Sci.** 60-61: 713-723. 2000

NEVES, R.C., LESLIE, K.E., WALTON, J.S., LEBLANC, S.J. Reproductive performance with an automated activity monitoring system versus a synchronized breeding program. **J. Dairy Sci.** 95: 5683 – 5693. 2012

NOAKES, T. L., PARKINSON, G.C.W. Pregnancy and Parturition. Pages 57-202 in Arthur's **Veterinary Reproduction and Obstetrics**. Elsevier Limited. London, United Kingdom. 2001

PAHL, C., HARTUNG, E., HAEUSSERMANN, A. Feeding characteristics and rumination time of dairy cows around estrus. **J. Dairy Sci.** 98:148–154. 2015

PARR, R.A., DAVIS, I.F., MILES, M.A., SQUIRES, T.J. Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. **Res. Vet. Sci.** 55:311–316. 1993

PENNINGTON, J.A., ALBRIGHT, J. L., DIEKMAN, M. A., CALLAHAN, C. J. Sexual activity of Holstein cows: Seasonal effects. **J. Dairy Sci.** 68:3023–3030. 1985

PEREIRA, M.H.C., RODRIGUES, A.D.P., CARVALHO, R.J., WILTBANK, M.C., VASCONCELOS, J.L.M. Increasing length of an estradiol and progesterone timed artificial insemination protocol decreases pregnancy losses in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 97:1454–1464. 2014

REAMES, P.S., HATLER, T.B., HAYES, S.H., RAY, D.L., SILVIA, W.J. Differential regulation of estrous behavior and luteinizing hormone secretion by estradiol-17 β in ovariectomized dairy cows. **Theriogenology** 75:233–240. 2011

RHODES, F.M., MCDUGALL, S., BURKE, C.R., VERKERK, G.A., MACMILLAN, K.L. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. **J. Dairy Sci.** 86:1876–1894. 2002

RIVERA, F., NARCISO, C., OLIVEIRA, R., CERRI, R.L.A., CORREA-CALDERÓN, A., CHEBEL, R.C., SANTOS, J.E.P. Effect of bovine somatotropin (500 mg) administered at ten-day intervals on ovulatory responses, expression of estrus, and fertility in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 93:1500–1510. 2010

RIVERA, F.A., MENDONÇA, L.G.D., LOPES, G., SANTOS, J.E.P., PEREZ, R.V., AMSTALDEN, M., CORREA-CALDERÓN, A., CHEBEL, R.C. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. **Reproduction** 141:333–342. 2011

ROELOFS, J.B., VAN EERDENBURG, F.J.C.M., SOEDE, N.M., KEMP, B. Pedometer readings for estrous detection and as predictor for time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology** 64: 1690 – 1703. 2005

ROELOFS J., SOED, N.M., VOSKAMP-HARKEMA, W., KEMP, K. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertilization rates and embryo characteristics in spontaneous dairy cattle. **Theriogenology** 66: 2173– 2181. 2006

ROELOFS, J., LÓPEZ-GATIUS, F., HUNTER, R.H.F., VAN EERDENBURG, F.J.C.M., HANZEN, C. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. **Theriogenology** 74:327–344. 2010

ROELOFS, J.B., VAN EERDENBURG, F.J.C.M., SOEDE, N.M., KEMP, B. Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology** 63:1366–1377. 2005

RUTTEN, C.J., VELTHUIS, A.G.J., STEENEVELD, W., HOGEVEEN, H. Invited review: Sensors to support health management on dairy farms. **J. Dairy Sci.** 96:1928–1952. 2013

SAACKE, R.G., DALTON, J.C., NADIR, S., NEBEL, R.L., BAME, J.H. Relationship of seminal traits and insemination time of fertilization rate and embryo quality. **Anim. Reprod. Sci.** 60-61: 663-677. 2000

SAACKE, R.G. Insemination factors related to timed AI in cattle. **Theriogenology** 70: 479–84. 2008

SANGSRITAVONG, S., COMBS, D.K., SARTORI, R., ARMENTANO, L.E., WILTBANK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 85:2831–2842. 2002

SANTOS, J.E.P. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. **J. Dairy Sci.** 94:3352–3365. 2011

SANTOS, J.E.P., THATCHER, W.W., CHEBEL, R.C., CERRI, R.L.A., GALVÃO, K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Anim. Reprod. Sci.** 82–83:513–535. 2004

SARTORI, R., HAUGHIAN, J.M., SHAVER, R.D., ROSA, G.J. M., WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **J. Dairy Sci.** 87:905–920. 2004

SARTORI, R., ROSA, G.J.M., WILTBANK, M.C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J. Dairy Sci.** 85:2813–2822. 2002

SAUMANDE, J., HUMBLLOT, P. The variability in the interval between estrus and ovulation in cattle and its determinants. **Anim. Reprod. Sci.** 85:171–182. 2005

SCHOFIELD, S.A., PHILLIPS, C.J.C., OWENS, A.R. Variation in milk production, activity rate and electrical impedance of cervical mucus over the oestrus period of dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.** 24:231–248. 1991

SENGER, P.L. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. **J. Dairy Sci.** 77: 2745-2753. 1994

SENGER. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. Pages 80-325. Cadmus Professional Communications, Pullman, WA, United States of America. 2003

SOUZA, A.H., GÜMEN, A., SILVA, E.P.B., CUNHA, A.P., GUENTHER, J.N., PETO, C.M., CARAVIELLO, D.Z., WILTBANK, M.C. Supplementation with estradiol-17 β before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the ovsynch protocol in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 90:4623–4634. 2007

STEVENSON, J.S., HILL, S.L., NEBEL, R.L., DEJARNETTE, J.M. Ovulation timing and conception risk after automated activity monitoring in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 97: 4296-4308. 2014

STEVENSON, J.S. Reproductive management of dairy cows in high milk producing herds. **J. Dairy sci.** 84: 128-143. 2001

STEVENSON, J.S., LAMB, G.C., KOBAYASHI, Y., HOFFMAN, D.P. Luteolysis during two stages of the estrous cycle: Subsequent endocrine profiles associated with radiotelemetrically detected estrus in heifers. **J. Dairy Sci.** 81:2897–2903. 1998

SVEBERG, G., REFSDAL, A.O., ERHARD, H.W., KOMMISRUUD, E., ALDRIN, M., TVETE, I.F., BUCKLEY, F., WALDMANN, A., ROPSTAD, E. Sexually active groups in cattle-A novel estrus sign. **J. Dairy Sci.** 96:4375–4386. 2013

SVEBERG, G., REFSDAL, A.O., ERHARD, H.W., KOMMISRUUD, E., ALDRIN, M., TVETE, I.F., BUCKLEY, F., WALDMANN, A., ROPSTAD, E. Behavior of lactating Holstein-Friesian cows during spontaneous cycles of estrus. **J. Dairy Sci.** 94:1289–1301. 2011

TRIMBERGER, G.W., DAVIS, H.P. Conception rate in cattle by artificial insemination at various stages of estrus. **Nebr. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.** 129:1. 1943

VALENZA, A., GIORDANO, J.O., LOPES JR., G., VINCENTI, L., AMUNDSON, M.C., FRICKE, P.M. Assessment of an accelerometer system for detection of estrus and for treatment with GnRH at the time of insemination in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 95: 7115–7127. 2012

VASCONCELOS, J.L.M., SANGSRITAVONG, S., TSAI, S.J., WILTBANK, M.C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. **Theriogenology.** 60:795–807. 2003

van VLIET, J.H., van EERDENBURG, F.C.M. Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 50:57–69. 1996

WALKER, W.L., NEBEL, R.L., MCGILLIARD, M.L. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 79: 1555 – 1561. 1996

WALTON, J.S., KING, G.J. Indicators of estrus in Holstein cows housed in tie stalls. **J. Dairy Sci.** 69:2966–2973. 1986

WILTBANK, M., LOPEZ, H., SARTORI, R., SANGSRITAVONG, S., GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology** 65:17–29. 2006

WILTBANK, M.C., SOUZA, A.H., CARVALHO, P.D., CUNHA, A.P., GIORDANO, J.O., FRICKE, P.M., BAEZ, G.M., DISKIN, M.G. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. **Animal** 8(Suppl 1):70–81. 2014

WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., SANGSRITAVONG, S., SARTORI, R., GINTHER, O. J. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 83:2998–3007. 2000

WILMUT, I., HUNTER, R.H.F. Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in oestrus. **Reproduction Nutrition Development** 24: 461–468. 1984

XU, Z.Z., MCKNIGHT, D.J., VISHWANATH, R., PITT, C.J., BURTON, L.J. Estrus detection using radiotelemetry or visual observation and tail painting for dairy cows on pasture. **J. Dairy Sci.** 81: 2890-2896. 1998

YOSHIOKA, H., ITO, M., TANIMOTO, Y. Effectiveness of real-time radiotelemetric pedometer for estrus detection and insemination in Japanese Black cows. **J. Reprod. Dev.** 56: 351–355. 2010

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1

Impact of Activity Intensity Detected by Automated Monitoring System in Holstein Heifers I: Ovulation time and Lying Behavior

Paulo Francisco Maciel Povoas Souto^I; Cláudio Coutinho Bartolomeu^I; Marcos Antonio Lemos de Oliveira^I; Ronaldo Aoki Cerri^{II}

ABSTRACT

The main objective of the project was to evaluate the impact activity intensity during estrus detected by automated monitoring system at timings and estrus behavior in Holstein heifers. A total of 62 estrus events from 41 heifers were evaluated. Heifers were monitored continuously by an automated activity monitor: a leg-mounted accelerometer. Counting steps, and relative increase of activity (HI) were collected each hour during an estrus event. Two groups were formed considering the relative increase; High intensity (> 300 HI) and Low intensity (< 300 HI). Lying behavior was recorded hourly and summarized as rest time, rest per bout, and restlessness. Ovulation was determined using ultrasonographic monitoring. Heifers classified as high intensity had greater duration at peak-end (11.3 ± 0.9 vs. 6.4 ± 0.9 ; $P = 0.01$) and estrus time (21.3 ± 1 vs. 14.1 ± 0.1 ; $P = 0.01$) than heifers with low intensity. Estrus intensity showed on peak was positively correlated to duration ($r=0.48$, $P = 0.01$). The longest rest per bout at the day after of estrus was different when comparing high intensity and low intensity (59.3 ± 4.4 vs. 71.1 ± 4.2 , respectively; $P < 0.05$). Intensity of estrus activity did not impact at ovulation timing. However, impacted estrus duration. Measurements such as lying behavior provided important insights on how rest time measurements could be used for further improve estrus detection and timing. The application of intensity classification as part of decision-making tools represents an opportunity for improving the use of sensors and the reproductive performance of Holstein heifers.

Keywords: AAM, lying time, ovulation, pedometers

^IDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil. ^{II}Dairy Education and Research Centre, University of British Columbia (UBC), Agassiz, BC, Canada

INTRODUCTION

The accurate and efficient detection of estrus is a key component to successful reproductive management. Nevertheless, failure to detect estrus in dairy cattle is one of the largest limiting factors in reproductive performance (Nebel and Jobst, 1998). Poor estrus detection may be associated with increased herd sizes as producers have less time for individual monitoring of cows. During the past 20 years, timed AI protocols have improved service and pregnancy rates with satisfactory results (Santos et al., 2004).

Recent interest in reproductive programs with minimal pharmacological intervention presents a new opportunity for the use of automated estrus detection tools, thus the need for further research on behavior, detailed measurements from automatic monitors of activity, and variability between and within cows (Silper et al., 2015a).

Automated and visually measured estrous behavior, their relationship, and inherent variation are essential for improvement of currently available automated technologies. For example, definition of estrus time onset based on increased walking activity is one of the areas that needs refinement for improved accuracy and determination of AI timing (Aungier et al., 2012).

Measurements of baseline activity, time of the day of estrus onset, and sources of variation among and within animals have not been substantially reported in the literature and are key components to determine relative and absolute increase in activity and duration of estrus. Such measurements of estrus intensity have been described as possible indicators of fertility (López-Gatius et al., 2005; Madureira et al., 2013) and perhaps markers for phenotypic selection for this trait.

Although pedometers regularly facilitate estrus detection by recording changes in stepping or walking activity, there are other measures of activity (lying and standing behavior) (Pollock and Hurnick, 1979; Walton and King, 1986) that changes during estrus and could be automatically measured. The AfiMilk Pedometer Plus™ system (Afirmilk pedometer), used in this study, is unique in that in addition to the number of steps, they have an additional sensor (Behaviour tag®), which records lying bouts (number of lying events) and lying time (duration of a lying event), which is beneficial in a free-stall barn to monitor changes in activity besides increased walking.

Restlessness is commonly cited as one of the main behavioral changes at estrus (van Eerdenburg et al., 1996; Roelofs et al., 2010). Increased walking activity, which is the most common behavioural change measured by estrus detection devices, and the behavior of

following other cows are indicators of restlessness (Diskin and Sreenan, 2000). An increased number of changes in position (Walton and King, 1986; Kerbrat and Disenhaus, 2004) and a decrease in the total daily lying time during estrus have been suggested as alternatives that could be automatically measured (Kerbrat and Disenhaus, 2004). Restlessness, however, is subjective when visually evaluated (van Eerdenburg et al., 1996).

There has been little research on the application of lying (LY) and standing (ST) behavior towards improvements of estrus detection rate and accuracy (Rutten et al., 2013). If changes in LY and ST measurements from baseline to estrus are consistent and of sufficient magnitude, they could represent potential additions to estrus detection systems. Sensors using a combination of measurements would not only have improved sensitivity and specificity for estrus detection, particularly for events of low intensity, but also would have greater accuracy for AI timing.

The objective was to evaluate the impact of the intensity of activity during estrus detected by automated activity monitoring (AAM) system at ovulation time and estrus behavior of Holstein heifers. We hypothesized that a higher intensity of estrus activity promotes lesser variation on ovulation.

MATERIAL AND METHODS

This experiment was conducted between June 2016 and December 2016 at the University of British Columbia's Dairy Education and Research Centre in Agassiz, Canada (49°13'59" N, 121°46'01"W). The local Institutional Animal Care Committee following the requirements of the Canadian Animal Care Council (2009) approved all experimental procedures.

Holstein heifers (n=41) housed from 10 months of age in a sand-bedded free stall barn with rubber flooring on the feed bunk alley. Heifers were housed in groups of 12 animals. Pens were 6.7 x 12 m and had 13 stalls each. Heifers were fed total mixed ration formulated for a 1.0 kg/day weight gain. Feed was offered once per day and pushed up three times per day. Water was available ad libitum.

All heifers had their estrous cycle presynchronized with an injection of 100 µg of GnRH (gonadorelin acetate; Fertiline; Vetoquinol NA Inc., Lavaltrie, QC, Canada) and a third used controlled internal drug-release (CIDR; Pfizer Animal Health, New York, NY) containing 1.38 g of progesterone (GN day). Seven days later, cows received an injection of 500 µg of PGF2α

(cloprostenol; Estrumate; Schering-Plough Animal Health, Point-Claire, QC, Canada) concurrent with removal of the CIDR (PG day).

Heifers were monitored continuously by one automated activity monitors (AAM): a leg-mounted accelerometer (AF; AfiAct II Pedometer Plus, Afimilk, Kibbutz Afikim, Israel). The **AF** was attached to the left-rear limb above the distal expansion of the metatarsal bone. The AF was fitted 10 days before the experiment.

Activity data from **AF** was recorded in real time each hour by a wired connection antenna to the data logger, which in turn was connected to a computer where it is a herd management software. Each heifer had each hour, the following data collected: counting steps (activity; **ACTSY**); and the relative increase of activity measured in percentage (heat indicator; **HI**). The HI was calculated using the raw ACTSY value and baseline values of the previous 10 d. An estrus alert was generated when the most recent cow's ACTSY exceeded her 10-d backward moving, as determined using proprietary algorithm. The onset and end time of high activity, peak of activity, and activity duration were obtained based on the threshold of proprietary algorithm, for example: the beginning values above of basal activity were considered the onset, the highest was considered as the peak, and the end of the high activity was considered as the final of the values above the threshold.

Estrus episodes were identified based on increased steps per hour, four times per day (00:00, 06:00, 12:00, 18:00 h), a list of heifers determined by the AAM that showed heat was generated by monitor.

The following criteria was used throughout the trial for definition of estrus intensity: if a heifer showed a HI above 300 on AF, this heifer was considered of high intensity (**HIGH**). If a heifer showed HI below 300 on monitor, this heifer was considered of low intensity (**LOW**).

Lying behavior was recorded on a 24 h basis by AF and summarized as total lying time (**REST TIME**; min/day); longest lying bout duration (**REST PER BOUT**; min/bout), and **RESTLESSNESS**, an Afimilk proprietary calculation measured in arbitrary units.

Ovulation was defined as the disappearance of a previously identified largest follicle (> 10 mm diameter). The ovulation check was initiated 12 hours after heat and based on the 3-h interval of ultrasonography monitoring, the ovulation time was defined as the number of hours from onset of high activity detected by AAM to half way between last observation of largest follicle and time of subsequent observation. Seven days after estrus detection (L7), the ovulation was reconfirmed based on the presence or absence of a CL in the same ovary had the largest follicle seven days earlier.

The statistical analyses were done using SAS 9.4. The outcomes of interest were duration, rest time (RT), rest per bout, restlessness and intensity of the estrus measured by activity monitoring systems using ANOVA test (continuous). Correlations were determined for the relations between intensity and duration of estrus measured by system. A difference in outcomes between the 2 groups helped understanding if estrus had an impact at ovulation time on farm using automated activity monitoring systems.

RESULTS

A total of 62 estrus events from 41 heifers were evaluated. Duration of events measured by sensors were classified for identification separately (Figure 1). These events are presented in Table 1.

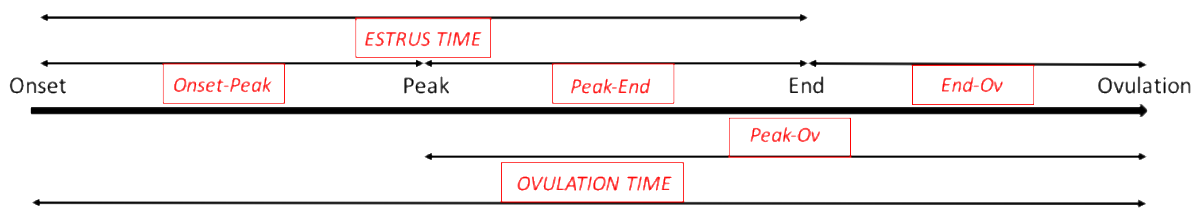


Figure 1. Definition of events measured by sensors

Heifers classified as high intensity had greater duration at peak-end and estrus time than heifers with low intensity ($P < 0.05$). However, onset-peak was similar between-events duration ($P > 0.05$; Table 1).

Ovulation time and time between estrus peak and ovulation did not vary between heifers ($P > 0.05$). However, duration of End-Ov was significantly longer in heifers from LOW group than heifers from HIGH ($p < 0.05$).

Table 1. Timings of estrus events of Holstein heifers

Event (h)	AFI Duration		p
	Groups		
	HIGH	LOW	
Onset-Peak	9.78 ± 0.67	7.67 ± 0.84	0.06
Peak-End	11.30 ± 0.99	6.48 ± 0.97	0.01
Estrus Time	21.30 ± 1.01	14.10 ± 0.15	0.01
Ovulation Time	32.20 ± 0.97	31.70 ± 1.75	0.78
Peak-Ov	22.60 ± 1.18	24.00 ± 1.91	0.5
End-Ov	11.90 ± 1.06	17.60 ± 1.97	0.01

The distribution of estrus duration comparing two intensity groups is presented in Figure 2. There were more heifers from Low group with estrus time shorter than 12 hours (41 % vs 6 %; $P < 0.05$).

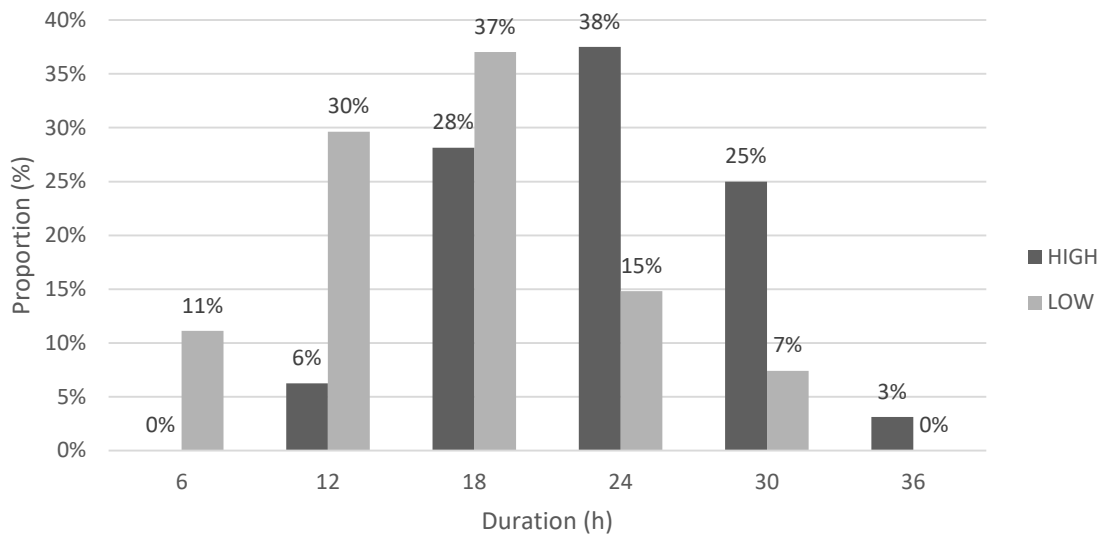


Figure 2. Distribution of estrus time between groups according to duration of activity detected by AFI

Estrus Intensity showed on peak were positively correlated to durations ($r = 0.48$, $P < 0.05$; Figure 3).

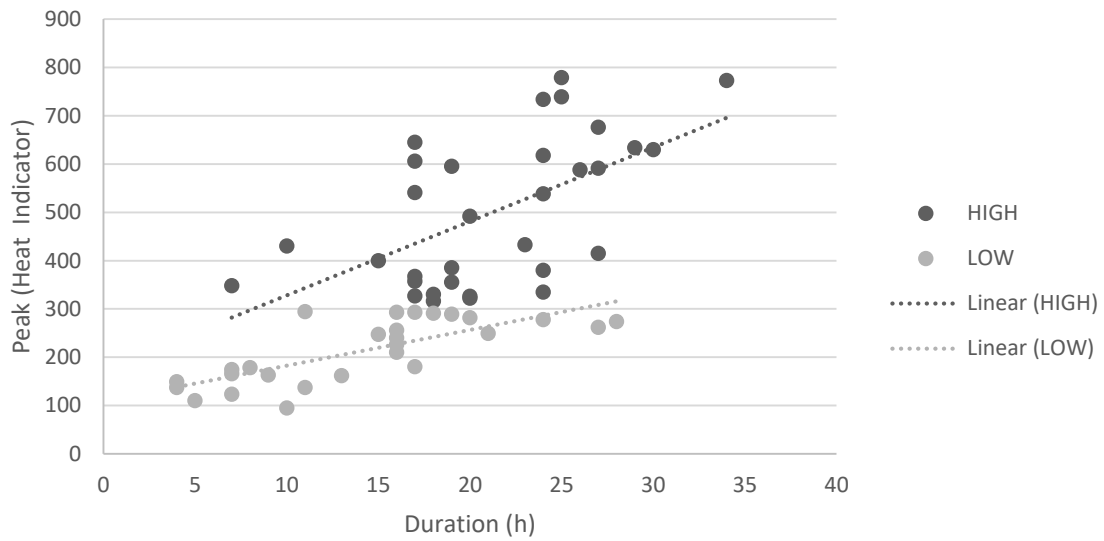


Figure 3. Correlations between peak of activity and duration of activity at duration of estrus measured by AFL. $r=0.48$ ($P<0.05$)

Lying behavior are presented in Table 2. Variables as rest time, and restlessness at day before, after and on heat did not differ between heifers ($P > 0.05$). However, the longest rest per bout at day after heat from Low group was longer than High group (59.3 ± 4.4 vs 71.1 ± 4.2 , respectively; $p < 0.05$).

Table 2. Lying Behaviour of Holstein heifers at estrus event

Event	Lying Behaviour					
	Day Before (-1)		Heat Day (0)		Day After (+1)	
	High	Low	High	Low	High	Low
Rest Time (min/day)	734.8 ± 27.0^a	772.6 ± 21^a	402 ± 23.7^a	446.4 ± 28.5^a	756.9 ± 33.9^a	777.3 ± 29.1^a
Rest Per Bout (min/bout)	83.5 ± 4.9^a	83.8 ± 3.7^a	56.7 ± 4.6^a	56.7 ± 4.5^a	59.3 ± 4.4^a	71.1 ± 4.2^b
Restlessness (unit)	3.5 ± 0.7^a	2.8 ± 0.2^a	14.8 ± 1.8^a	11.6 ± 1.3^a	4.8 ± 0.9^a	3.7 ± 0.6^a

Different lowercase letters indicate differences between groups ($P < 0.05$)

DISCUSSION

The study on nulliparous heifers should provide a reliable reference for further studies on the effects of age, lactation and management on expression of estrus and perhaps indicate the potential of each heifer for different intensity of estrus expression.

The current study was able to demonstrate that measurements as relative increase of walking activity, hour of estrus onset and behaviours frequently displayed during estrus, could improve estrus intensity calculations and detection by automated activity monitors or by a combination of different methods.

It has been reported that cows with lower basal activity had estrus of lower activity, but of greater proportional activity increase (Phillips and Schofield, 1989). To the best of our knowledge, there is no recent study clearly suggesting an association of baseline levels and absolute and relative increase in estrus intensity. The category of baseline activity did not influence the measurements obtained here for intensity (relative increase in walking activity) and duration of estrus. However, this study observed relationship between intensity and duration of estrus, this effect suggests an important factor to be considered for automation of estrus detection.

It is possible that the moment of high walking activity onset largely influences the degree of estrus expression. One of the challenges with automated estrus detection systems is use of a single threshold for the whole herd. A low threshold will favour sensitivity, but it will also increase the false positive rate. Inclusion of time effect of estrus onset on activity level as a component of automated estrus detection algorithms might be an opportunity for use of variable thresholds according to daytime.

It was observed that heifers would have more estrus events of high intensity in comparison of low intensity, different than observed by Madureira et al., (2013) with lactating cows in the same herd had an average estrus intensity of 258 ± 20.2 at peak time using same monitor. Intensity of estrus can be influenced negatively by lactation and lameness, among other factors (Galina and Orihuela, 2007; Roelofs et al., 2010). Estrus peak activity has been reported to have a negative linear relationship with milk production by some (López-Gatius et al., 2005; Valenza et al., 2012). Factors influencing estrus expression are mainly absent in heifers, resulting in generally better reproductive performance for this cattle category.

It is speculated that the number of mounts per estrus has decreased over the last decades. It has been reported that only 45 % of cows show standing behaviour during estrus (Roelofs et al., 2004). Lopez et al. (2004) observed 6 mounts/estrus in lactating cows and Rivera et al.

(2010), 4 mounts/estrus. A low number of mounts/estrus and a low percentage of cows showing standing behaviour suggest that the use of secondary estrus signs or of changes in walking activity might be important to achieve desirable estrus detection levels. Walking activity is likely a more accurate tool for determining start and end of estrus than visual observation of mounting and standing behaviour.

The mean relative increase in walking activity was 356 %, a value similar to that observed by Løvendahl and Chagunda (2010) also in Holstein heifers. These authors reported estrus duration of 9.2 h, whereas in our study the mean duration was of 18.8 h. It is clear from this study that individual estrus events vary significantly (4 to 26 h duration; 30 to 1190 % relative increase of walking activity) in animals of a similar age and not influenced by hoof problems, health issues, or milk production. Aungier et al. (2012), using Heatime, reported mean estrus duration of 8.4 h and 10.8 h for the first and subsequent post-partum ovulations, respectively. If visual observation or mount detectors are used as the method for detection of estrus, duration is determined as the period of acceptance of mount, lasting 5.6 to 7.6 h for lactating cows (At-Taras and Spahr, 2001; Lopez et al., 2004; Rivera et al., 2010) and 9.2 h for heifers (Silper et al., 2015a).

The current study, ovulation timing was similar between groups. These data were longest than Valenza et al. (2012) reported mean interval of 28.7 h from high activity onset to ovulation and 16.4 h from peak weighted activity to ovulation. It is important to note that Valenza et al. (2012) observed a large variation on the interval between estrus onset and ovulation, which makes the determination of optimal AI timing less predictable. Given the differences in reproductive performance between heifers and lactating cows, it can be hypothesized that the interval from estrus onset to ovulation would be less variable in heifers than in lactating cows.

Duration and intensity are important components of estrus expression that directly influence AI submission rate (Silper et al., 2015a). AFI measurements of intensity and duration were positively correlated ($r = 0.48$; $P < 0.05$), suggesting that estrus is usually either well expressed or poorly displayed in both AFI measurements. In contrast, Silper et al., 2015b reported intensity and duration measured with IceTag data were not correlated ($r = 0.13$; $P = 0.26$).

The results do not confirm our hypothesis of altered lying patterns during estrus. However, measurements such as the longest lying per bout on d +1 in the low intensity group have potential to help improve estrus detection and timing accuracy in automated systems.

Decision of time to AI depends on the methodology used to determine estrus onset, but

still there is large variation in AI to ovulation interval when it is done based on onset of high activity (Kerbrat and Disenhaus, 2004). Since the longest lying per bout occurred the day after peak activity, it could potentially signal that estrus has ended.

Duration of rest time did not show large variation, particularly on the day of estrus, indicating the need for proper calculation of the sample size (animals and events). It was observed at currently study, and it was expected that ST time would increase on day of estrus, but the weight of the longest ST bout at day after on this measurement was surprising. The association between the longest ST bout start time and time of estrus onset determined by walking activity suggests that start time of the longest ST bout at day after could be an important addition to automated estrus detection systems for improved accuracy.

Although restlessness is widely recognized as one of the main signs of estrus (Roelofs et al., 2010), its lying behaviour component has not been extensively employed in the measurement of estrus behaviour. Factors influencing the relative decrease in lying time or bout frequency were similar to those affecting intensity of spontaneous estrus (Madureira et al., 2015) and behavioural display of standing to be mounted (Lopez et al., 2004).

Changes in daily lying time of lactating cows during periods of estrus were similar to those observed for dairy heifers (Silper et al., 2015a). Lying behaviour of lactating cows analyzed in min/h and bouts/h (Dolecheck et al., 2015) indicated a larger difference between baseline and estrus than that reported here. Although different AAM often quantify the same measurement, we assume that there are differences in the outcome due to equipment precision, algorithms and data processing, among other possible sources of variation.

The results presented here provide supporting evidence for the association between the degree of behavioural change (intensity) of estrus expression and realized fertility, which has been recently reported for AI performed after detection of spontaneous estrus (Madureira et al., 2015). The association between estrus expression and fertility suggests underlying physiological mechanisms where hormones such as estradiol and progesterone would coordinate estrus expression and also influence fertility-related parameters such as ovulation, oocyte quality, uterine environment, and CL function.

The development of new technologies enables obtainment of diverse measurements from a single sensor and potentially greater accuracy of detection. As an example, Jónsson et al. (2011) reported increased probability of estrus detection and reduced error rate when combining walking activity and lying behaviour. It remains to be address the applicability of monitoring lying behaviour for real-time estrus detection and determination of AI-timing.

Once the time of high activity onset is known, interval to ovulation can be estimated and AI time determined (Stevenson et al., 2014). There is, however, a need for more research with diverse estrus detection systems. A second aspect of measurement of estrus intensity concerns its association with fertility. In this experiment, lying behaviour was not similar to that reported by Silper et al., 2015a, which observed lying behavior to be similarly associated with fertility as previously observed with walking activity measurements. Evaluation of daily circulating estradiol and progesterone concentrations and of endometrial gene expression might contribute to the understanding of physiological mechanisms linking magnitude of estrus expression and fertility.

CONCLUSIONS

Intensity of estrus activity did not impact at duration between estrus onset measured by monitor to ovulation. However, impacted estrus duration. Heifers with lower intensity of estrus activity showed shorter estrus time and higher variation at estrus.

Measurements such as the rest time, restlessness, and longest lying time per bout provided important insights on how rest time measurements could be used for further estrus detection and timing improve.

REFERENCES

- AT-TARAS, E.E., SPAHR, S.L. Detection and characterization of estrus in dairy cattle with an electronic heatmount detector and an electronic activity tag. **J. Dairy Sci.** 84:792–798. 2001
- AUNGIER, S.P.M., ROCHE, J.F., SHEEHY, M., CROWE, M.A. Effects of management and health on the use of activity monitoring for estrus detection in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 95:2452–2466. 2012
- CERRI, R.L.A., CHEBEL, R.C., RIVERA, F., NARCISO, C.D., OLIVEIRA, R.A., AMSTALDEN, M., BAEZ-SANDOVAL, G.M., OLIVEIRA, L.J., THATCHER, W.W., SANTOS, J.E.P. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. **J. Dairy Sci.** 94:3352–3365. 2011

DAVOODI, S., COOKE, R.F., FERNANDES, A.C.C., CAPPELLOZZA, B.I., VASCONCELOS, J.L.M., CERRI, R.L.A. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on Day 19 of gestation in beef cows. **Theriogenology** 85:645–655. 2016

DISKIN, M.G., SREENAN, J.M. 2000. Expression and detection of oestrus in cattle. **Repro. Nutr. Dev.** 40:481–491

DOLECHECK, K.A., SILVIA, W.J., HEERSCHE, G., CHANG, Y.M., RAY, D.L., STONE, A.E., WADSWORTH, B.A., BEWLEY, J.M. Behavioral and physiological changes around estrus events identified using multiple automated monitoring technologies. **J. Dairy Sci.** 98:8723–8731. 2015

HOLMAN, A., THOMPSON, J., ROUTLY, J.E., CAMERON, J., JONES, D.N., GROVE-WHITE, D., SMITH, R.F., DOBSON, H. Comparison of oestrus detection methods in dairy cattle. **Vet. Rec.** 169:47–53. 2011

GALINA, C.S., ORIHUELA, A. The detection of estrus in cattle raised under tropical conditions: What we know and what we need to know. **Horm. Behav.** 52:32–38. 2007

JÓNSSON, R., BLANKE, M., POULSEN, N.K., CAPONETTI, F., HØJSGAARD, S. Oestrus detection in dairy cows from activity and lying data using on-line individual models. **Comput Electron. Agric.** 76:6–15. 2011

KERBRAT, S., DISENHAUS, C. A proposition for an updated behavioural characterization of the oestrus period in dairy cows. **Appl. Anim. Behav. Sci.** 87:223–238. 2004

KIDDY, C.A. Variation in physical activity as an indication of estrus in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 60:235–243. 1977

LOPEZ, H., SATTER, L.D., WILTBANK, M.C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.** 81:209–223. 2004

LÓPEZ-GATIUS, F., SANTOLARIA, P., MUNDET, I., YÁNIZ, J.L. Walking activity at estrus and subsequent fertility in dairy cows. **Theriogenology** 63:1419–1429. 2005

LØVENDAHL, P., CHAGUNDA, M.G.G. On the use of physical activity monitoring for estrus detection in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 93:249–259. 2010

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.** 64:171–180. 2000

MADUREIRA, A.M.L., BURNETT, T.A., SILPER, B.F., DINN, N., CERRI, R.L.A. Factors affecting expression of estrus of lactating dairy cows using activity monitors. **J. Dairy Sci.** 96(Suppl. 1):600–601. 2013

MADUREIRA, A.M.L., SILPER, B.F., BURNETT, T.A., POLSKY, L., CRUPPE, L.H., VEIRA, D.M., VASCONCELOS, J.L.M., CERRI, R.L.A. Factors affecting expression of estrus measured by activity monitors and conception risk of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 98:7003–7014. 2015

NEBEL, R.L., JOBST, S.M. Evaluation of systematic breeding programs for lactating dairy cows: A Review. **J. Dairy Sci.** 81: 1169-1174. 1998

PHILLIPS, C.J.C., SCHOFIELD, S.A. The effect of supplementary light on the production and behaviour of dairy cows. **Anim. Prod.** 48:293–303. 1989

POLLOCK, W.E., HURNICK, L.F. Effect of two confinement systems on estrus detection and diestrus behaviour in dairy cows. **Can. J. Anim. Sci.** 59: 799-803. 1979

RIVERA, F., NARCISO, C., OLIVEIRA, R., CERRI, R.L.A., CORREA-CALDERÓN, A., CHEBEL, R.C., SANTOS, J.E.P. Effect of bovine somatotropin (500 mg) administered at ten-day intervals on ovulatory responses, expression of estrus, and fertility in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 93:1500–1510. 2010

ROELOFS, J.B., BOUWMAN, E.G., DIELEMAN, S.J., VAN EERDENBURG, F.J.C.M., KAAL-LANSBERGEN, L.M.T.E., SOEDE, N.M., KEMP, B. Influence of repeated rectal ultrasound examinations on hormone profiles and behaviour around oestrus and ovulation in dairy cattle. **Theriogenology** 62:1337–1352. 2004

ROELOFS, J.B., VAN EERDENBURG, F.J.C.M., SOEDE, N.M., KEMP, B. Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. **Theriogenology** 63:1366–1377. 2005

ROELOFS, J., LÓPEZ-GATIUS, F., HUNTER, R.H.F., VAN EERDENBURG, F.J.C.M., HANZEN, C. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. **Theriogenology** 74:327–344. 2010

RUTTEN, C.J., VELTHUIS, A.G.J., STEENEVELD, W., HOGEVEEN, H. Invited review: Sensors to support health management on dairy farms. **J. Dairy Sci.** 96:1928–1952. 2013

SANTOS, J.E.P., THATCHER, W.W., CHEBEL, R.C., CERRI, R.L.A., GALVÃO, K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Anim. Reprod. Sci.** 82–83:513–535. 2004

SCHOFIELD, S.A., PHILLIPS, C.J.C., OWENS, A.R. Variation in the milk production, activity rate and electrical impedance of cervical mucus over the oestrous period of dairy cows. **Anim. Reprod. Sci.** 24:231–248. 1991

SILPER, B.F., ROBLES, I., MADUREIRA, A.M.L., BURNETT, T.A., REIS, M.M., DE PASSILLÉ, A.M., RUSHEN, J., CERRI, R.L.A. Automated and visual measurements of estrous behavior and their sources of variation in Holstein heifers. I: Walking activity and behavior frequency. **Theriogenology** 84:312–320. 2015a

SILPER, B.F., POLSKY, L., LUU, J., BURNETT, T.A., RUSHEN, J., DE PASSILLÉ, A.M., CERRI, R.L.A. Automated and visual measurements of estrous behavior and their sources of variation in Holstein heifers. II: Standing and lying patterns. **Theriogenology** 84:333–341. 2015b

STEVENSON, J.S., HILL, S.L., NEBEL, R.L., DEJARNETTE, J.M. Ovulation timing and conception risk after automated activity monitoring in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 97:4296–4308. 2014

SVEBERG, G., REFSDAL, A.O., ERHARD, H.W., KOMMISRUUD, E., ALDRIN, M., TVETE, I.F., BUCKLEY, F., WALDMANN, A., ROPSTAD, E. Behavior of lactating Holstein-Friesian cows during spontaneous cycles of estrus. **J. Dairy Sci.** 94:1289–1301. 2011

VALENZA, A., GIORDANO, J.O., LOPES, G., VINCENTI, L., AMUNDSON, M.C., FRICKE, P.M. 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.** 95:7115–7127. 2012

VAN EERDENBURG, F.J.C.M., LOEFFLER, H.S.H., VAN VLIET, J.H. Detection of oestrus in dairy cows: A new approach to an old problem. **Vet. Q.** 18:52–54. 1996

WALKER, S.L., SMITH, R.F., ROUTLY, J.E., JONES, D.N., MORRIS, M.J., DOBSON, H. Lameness, activity time-budgets, and estrus expression in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 91:4552–4559. 2008

WALTON, J.S., KING, G.J. Indicators of estrus in Holstein cows housed in tie stalls. **J. Dairy Sci.** 69: 2966-2973. 1986

4.2

Impact of Activity Intensity Detected by Automated Monitoring System in Holstein Heifers II: Ovarian Responses and Progesterone Concentration

Paulo Francisco Maciel Povoas Souto^I Claudio Coutinho Bartolomeu^I Marcos Antonio Lemos de Oliveira^I Ronaldo Aoki Cerri^{II}

ABSTRACT

The main objective of project was to evaluate the impact activity intensity during estrus detected by automated monitoring system on ovarian parameters and progesterone level profile of Holstein heifers. A total of 62 estrus events from 41 heifers were evaluated. Heifers were monitored continuously by an automated activity monitor: a leg-mounted accelerometer. Counting steps, and relative increase of activity (HI) were collected each hour during an estrus event. Two groups were formed considering the relative increase; High intensity (>300 HI) and Low intensity (<300 HI). Heifers had their ovaries examined by ultrasound. Blood samples (7 mL) were harvested and progesterone concentration was determined. Heifers classified as high intensity had greater P4 levels at L3 (0.84 ± 0.07 vs 0.64 ± 0.04 ; $P = 0.02$) than heifers with low intensity. Weak correlations were observed between estrus intensity to progesterone concentration at PGF day and L3 day ($r=0.11$, $r=0.20$; $P<0.05$, respectively). Also, P4 levels was weakly correlated to estrus duration at PGF day and HT day ($r=0.19$, $r=0.08$; $P<0.05$, respectively). Intensity of estrus activity did not change ovarian parameters and P4 concentration. However, impacted progesterone levels at third day after estrus. To control the P4 levels during estrus provided important insights on the regulation of hormones from estrus intensity could be used for further improve fertility.

Keywords: AAM, CL, follicles, P4, pedometers

^IDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil. ^{II}Dairy Education and Research Centre, University of British Columbia (UBC), Agassiz, BC, Canada

INTRODUCTION

The gold standard for estrus detection is a cow that is displaying standing to be mounted, has a dominant follicle that subsequently ovulates, has no *corpus luteum* (CL) and therefore has low levels of P4 in serum and milk. If a cow has high P4 while displaying signs of estrus, a CL is present, and it can be considered as a falsely-identified estrus (Aungier et al., 2012). However, a cow with low levels of P4 cannot be assumed to be in estrus because it is possible that the cow is anovular.

Automated systems for estrus detection identify preovulatory follicular phases with variable rates of success depending on pre-determined thresholds. There are relatively few studies of detailed automated estrus activity measurements that include sufficient number of observations to provide statistical power above 0.80 (Aungier et al., 2012).

Furthermore, walking activity and behavioral measurements of estrus are subject to variation originating from lactation, social interactions, housing, age, genetics, and physiological aspects (Galina & Orihuela, 2007). Studies of estrous behaviour and walking activity of heifers provide assessment of individual and environmental sources of variation while controlling for some of the lactation linked factors.

Expression of estrus (compared to absence of it) at the moment of timed AI has been associated with greater pregnancy per artificial insemination (P/AI; Cerri et al., 2004: Heatsynch protocol; Souza et al., 2007: Ovsynch protocol with injection of 1 mg estradiol 17- β 8 h before the last GnRH). Among cows that expressed estrus, those with higher degree of intensity measured by automated activity monitor were associated with greater P/AI compared to poorly expressed events (Madureira et al., 2015). Pregnancy per AI was also greater among cows with confirmed ovulation after TAI (Pereira et al., 2014). Estrus expression and fertility likely share endocrine regulators. Possible mechanisms could involve progesterone exposure and the regulation of endometrial estradiol receptors (Spencer & Bazer, 2004), LH concentration and follicular growth (Cerri et al., 2011), in addition to plasma estradiol concentration.

Estradiol and progesterone-based protocols are more likely to induce expression of estrus when compared to GnRH-based protocols (Pereira et al., 2013), providing an opportunity to study the associations between intensity of estrus and fertility under controlled conditions. Automated activity monitors allow grading of behavioural estrus, measurements that can be further used as real-time predictors of fertility and reproductive states.

The objective was to evaluate the impact of the intensity of activity during estrus detected by automated activity monitor (AAM) on ovarian responses and progesterone concentration of Holstein heifers. We hypothesized that a higher intensity of estrus activity would show larger follicular diameter and lesser progesterone concentration at estrus day and then would impact the estrus and ovulation timing.

MATERIAL AND METHODS

This experiment was conducted between June 2016 and December 2016 at the University of British Columbia's Dairy Education and Research Centre in Agassiz, Canada (49°13'59" N, 121°46'01"W). The local Institutional Animal Care Committee following the requirements of the Canadian Animal Care Council (2009) approved all experimental procedures.

Holstein heifers (n = 41) housed from 10 months of age in a sand-bedded free stall barn with rubber flooring on the feed bunk alley. Heifers were housed in groups of 12 animals. Pens were 6.7 x 12 m and had 13 stalls each. Heifers were fed total mixed ration formulated for a 1.0 kg/day weight gain. Feed was offered once per day and pushed up three times per day. Water was available ad libitum.

All heifers had their estrous cycle presynchronized with an injection of 100 µg GnRH (gonadorelin acetate; Fertiline; Vetoquinol NA Inc., Lavaltrie, QC, Canada) and a used controlled internal drug-release (CIDR; Pfizer Animal Health, New York, NY) containing 1.38 g of progesterone (**GN**). Seven days later, cows received an injection of 500 µg PGF2α (cloprostenol; Estrumate; Schering-Plough Animal Health, Point-Claire, QC, Canada) concurrent with removal of the CIDR (**PG**).

Heifers were monitored continuously by one automated activity monitors (AAM): a leg-mounted accelerometer (**AF**; AfiAct II Pedometer Plus, Afimilk, Kibbutz Afikim, Israel). The **AF** was attached to the left-rear limb above the distal expansion of the metatarsal bone. The **AF** was fitted 10 days before the trial.

Activity data from **AF** was recorded in real time each hour by a wired connection antenna to the data logger, which in turn was connected to a computer where it is a herd management software. Each heifer had each hour, the following data collected: counting steps (activity; **ACTSY**); and the relative increase of activity measured in percentage (heat indicator; **HI**). The **HI** was calculated using the raw **ACTSY** value and baseline values of the previous 10

d. An estrus alert was generated when the most recent cow's ACTSY exceeded her 10-d backward moving, as determined using proprietary algorithm. The onset and end time of high activity, and high activity duration were obtained based on the threshold of proprietary algorithm, for example: the beginning values above of basal activity were considered the onset, the highest was considered as the peak, and the end of the high activity was considered as the final of the values above the threshold.

Estrus episodes were identified based on increased steps per hour and confirmed as true estrus by ovarian ultrasonography. Four times per day (00:00 h, 06:00 h, 12:00 h, 18:00 h), a list of heifers determined by the AAM that showed heat was generated by monitor.

The following criteria was used throughout the trial for definition of estrus intensity: if a heifer showed a HI above 300 on AF, this heifer was considered of high intensity (**HIGH**). If a heifer showed HI below 300 on monitor, this heifer was considered of low intensity (**LOW**).

Heifers had their ovaries examined by ultrasound (Ibex Pro; E. I. Medical Imaging, Loveland, CO, USA, equipped with a 7.5-Mhz linear rectal transducer) in the following moments: GN day; PG day; immediately in the episode of high activity detected by the AAM; and seven days after the estrus episode (L7). The presence and diameter of the largest follicles and corpus luteum, if present, were measured and recorded.

Ovulation was defined as the disappearance of a previously identified largest follicle (> 10 mm diameter). The ovulation check was initiated 12 hours after heat and based on the 3-h interval of ultrasonographic monitoring, the ovulation time was defined as the number of hours from onset of high activity detected by AAM to half way between last observation of largest follicle and time of subsequent observation. Seven days after estrus detection (L7), the ovulation was reconfirmed based on the presence or absence of a CL in the same ovary had the largest follicle seven days earlier.

Blood samples (7 mL) were harvested from the median coccygeal vein or artery utilizing Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Rutherford, NJ). Blood samples were collected at GN and PG days; immediately following an estrus alert from the AAM; on ovulation time. After ovulation, heifers had the blood collected every 48 hours until 14 days after estrus episode. Samples were centrifuged (1,565 g for 15 min); plasma was harvested and stored frozen at -80 °C. Progesterone concentration was determined using a chemiluminescent enzyme immunoassay (Ovucheck Plasma; AES Laboratoire; Bruze; France). Intra and inter-assay CV were, respectively, 6.1 and 7.8 %. The minimum detectable concentration was 0.191 ng/mL. The experimental design is shown in Figure 1.

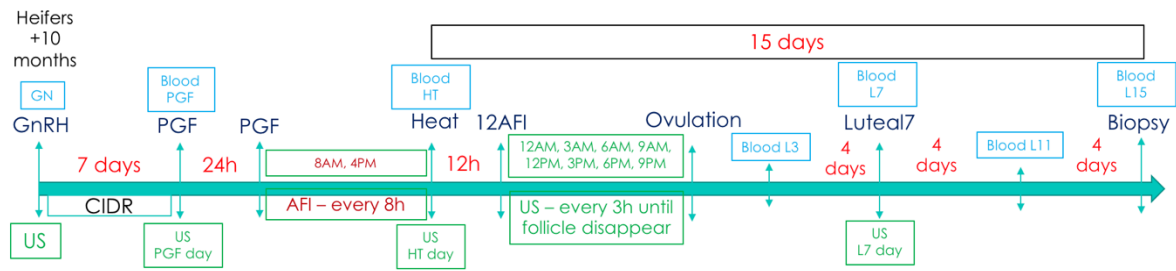


Figure 1. Experimental design

The statistical analyses were done using SAS 9.4. Descriptive statistics were calculated for the response variables (follicle and CL diameters, and progesterone concentrations). Correlations were also performed between follicle, CL diameters and P4 concentration, heat intensity, estrus time and ovulation timing using ANOVA test.

RESULTS

A total of 62 estrus events from 41 heifers were evaluated. Ovarian parameters were not influenced by estrus intensity. Diameter of follicles (PGF day and HT day) and corpus luteum (L7 day) did not differ between intensity groups ($p > 0.05$; Table 1).

Table 1. Mean \pm SE for pre-ovulatory follicle and corpus luteum according intensity groups measured by monitor of Holstein heifers.

Parameter (mm)	Ovarian Parameters		
	Groups		
	HIGH	LOW	p
Largest Follicle – PGF day	16.06 \pm 0.81	16.36 \pm 1.12	0,82
Largest Follicle – HT day	17.90 \pm 0.43	17.36 \pm 0.66	0,49
Largest CL – L7 day	26.15 \pm 0.82	25.66 \pm 0.89	0,69

Progesterone concentration in different moments did not differ between estrus intensity groups. However, heifers that expressed high intensity had greater P4 levels at L3 than heifers with lower P4 concentration ($p < 0.05$; Table 2).

Table 2. Mean \pm SE for progesterone concentration according intensity groups measured by monitor of Holstein heifers.

P4 Concentration (ng/ml)	Progesterone		
	Groups		
	HIGH	LOW	p
PGF day	4.82 \pm 0.74	6.73 \pm 0.80	0,08
HT day	0.41 \pm 0.02	0.48 \pm 0.05	0,29
L3 day	0.84 \pm 0.07	0.64 \pm 0.04	0.02
L7 day	3.34 \pm 0.31	2.85 \pm 0.24	0.22
L11 day	7.22 \pm 0.55	6.36 \pm 0.52	0.27
L15 day	7.54 \pm 0.53	7.96 \pm 0.59	0,59

Correlations of intensity on peak, progesterone concentration, estrus duration and ovulation time to largest follicles and CL, and P4 levels in different moments is illustrated in Table 3.

Table 3. Statistical correlations data for Heat intensity on peak, progesterone concentration, estrus duration and ovulation time to ovarian structure diameters and progesterone concentrations in different intervals.

Parameter	Correlations							
	Variables							
	HI		P4		Estrus duration		Ovulation Time	
r	p	r	p	r	p	r	p	
Largest Follicle - PGF day	0.00	0.70	0.03	0.21	0.00	0.58	0.00	0.71
Largest Follicle – HT day	0.01	0.27	0.05	0.10	0.00	0.71	0.00	0.55
Largest CL – L7 day	0.02	0.22	0.13	0.01	0.03	0.17	0.02	0.21
P4 – PGF day	0.11	0.01	-	-	0.19	0.01	0.01	0.44
P4 – HT day	0.05	0.11	-	-	0.08	0.04	0.00	0.99
P4 – L3 day	0.20	0.01	-	-	0.03	0.19	0.00	0.87
P4 – L7 day	0.00	0.70	-	-	0.00	0.81	0.01	0.47
P4 – L11 day	0.01	0.44	-	-	0.01	0.50	0.00	0.93
P4 – L15 day	0.00	0.78	-	-	0.00	0.67	0.00	0.88

Corpus luteum diameter measured at L7 day was weakly correlated to progesterone levels at same day ($r = 0.13$, $P < 0.05$; Figure 2).

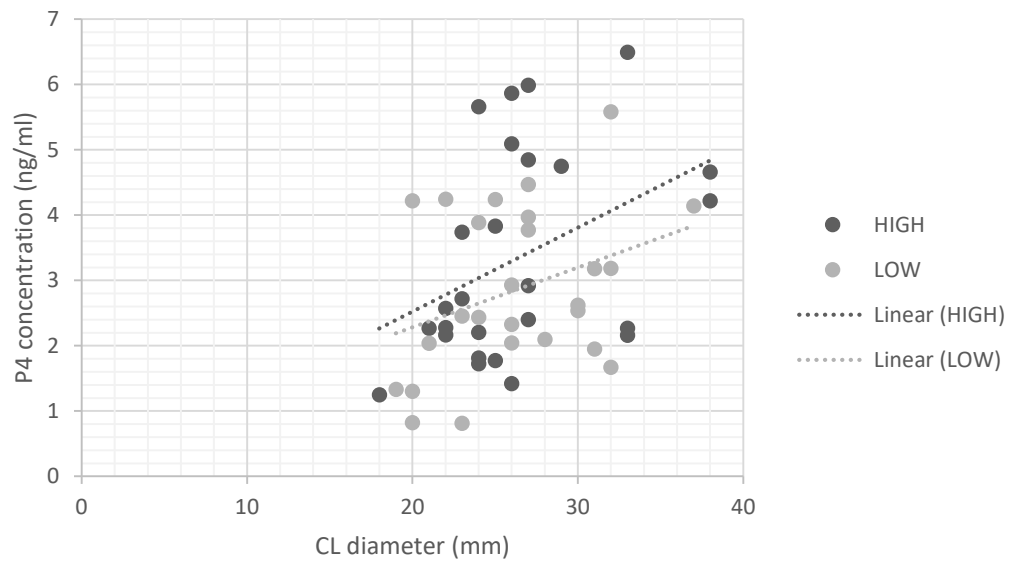
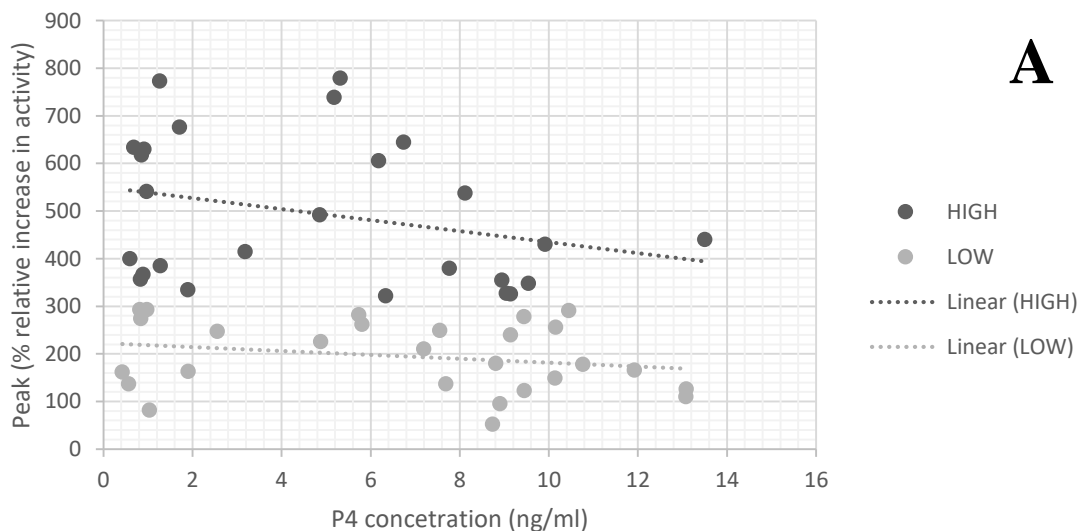


Figure 2. Correlations between P4 concentration and corpus luteum at L7 day ($r = 0.13$, $p = 0.01$)

Activity intensity was weakly correlated ($r = 0.11$) to progesterone concentration at PGF day ($p = 0.01$; Figure 3A) and also weakly correlated ($r = 0.20$) to P4 levels at three days after heat ($p = 0.01$; Figure 3B).



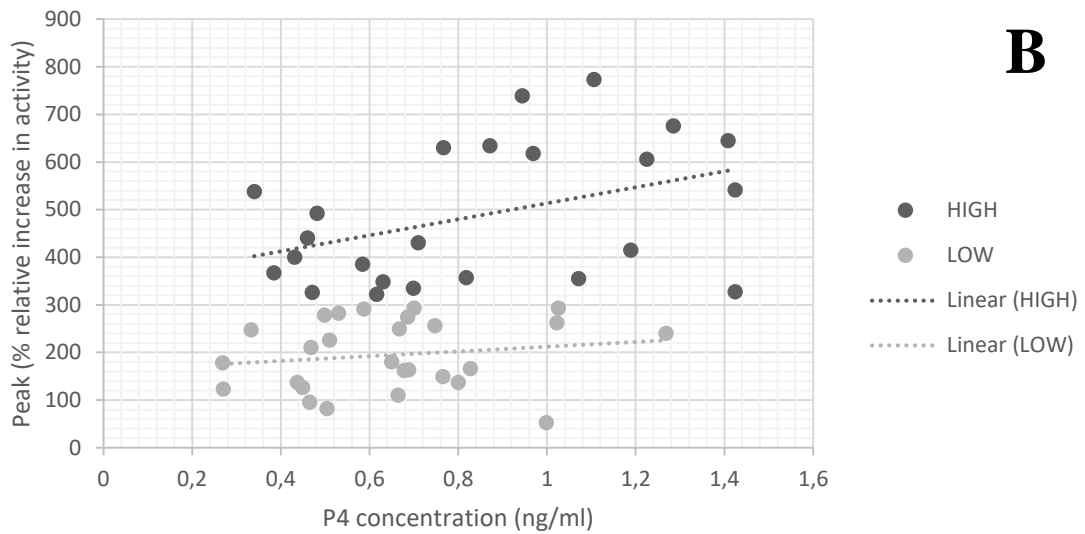
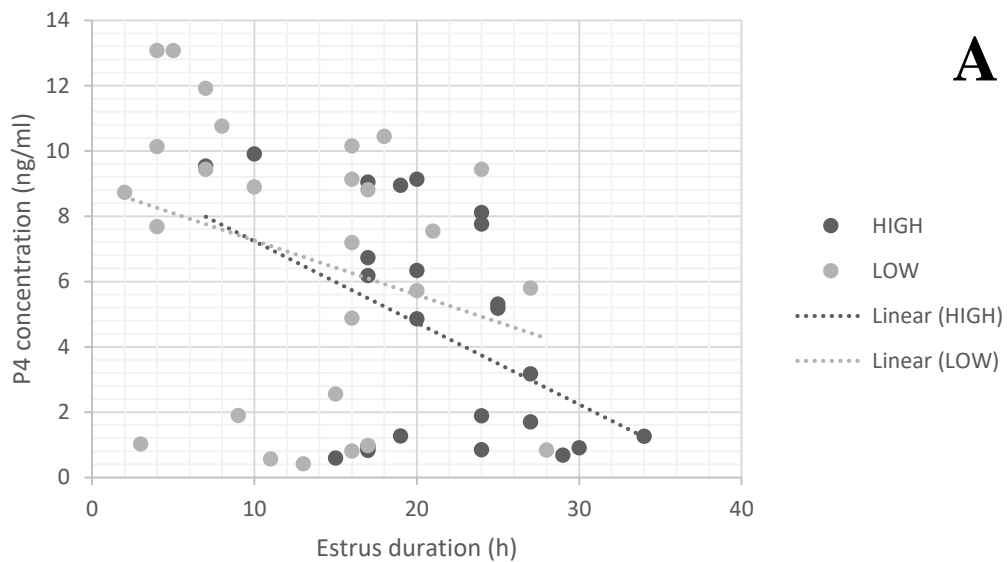


Figure 3. Correlations between percent relative increase on peak of activity and A) P4 concentration at PGF day ($r = 0.11$, $p = 0.01$) and B) P4 concentration at L3 day ($r = 0.20$, $p = 0.01$)

Correlations between progesterone concentration to estrus duration were weakly observed at PGF day and HT day ($r = 0.19$, $r = 0.08$, respectively; $p < 0.05$, Figure 4).



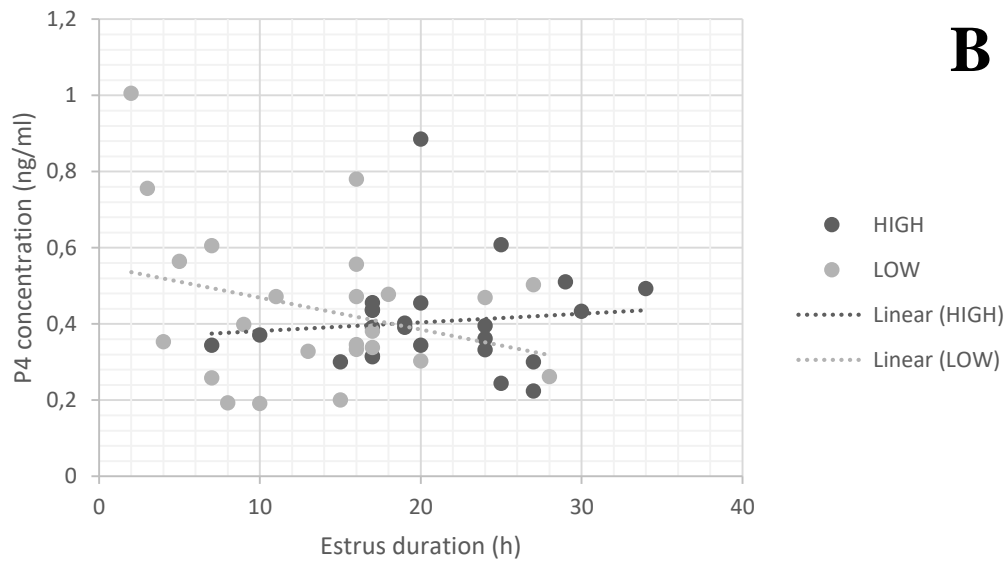


Figure 4. Correlations between A) P4 concentration at PGF day and estrus duration ($r = 0.19$, $p = 0.01$) and B) P4 concentration at HT day (heat day) and estrus duration ($r=0.08$, $p = 0.04$)

DISCUSSION

The physiological mechanisms linking estrus expression and fertility are not yet fully understood. Lower concentration of progesterone during the luteal phase preceding estrus has been associated with precocious endometrial expression of estradiol receptor- α , leading to increased PGF secretion and short estrous cycles (Cerri et al., 2011). In addition, a lower preovulatory estradiol concentration has been associated with precocious luteolysis (Mann & Lamming, 2000). Conversely, endometrial and CL gene expression in Nelore cows at d 19 of gestation was more favourable to pregnancy maintenance in cows that expressed behavioural estrus at the moment of TAI (Davoodi et al., 2016).

Estrous behaviour is induced mainly by the effect of estradiol from the preovulatory follicle on the brain (Forde et al., 2011). Correlations between preovulatory follicle diameter, plasma estradiol concentration, and degree of estrus expression could have been expected.

Mean diameter of the preovulatory follicle was 17.63 ± 0.5 mm. These were similar to results by Sartori et al. (2004), who reported greater plasma estradiol concentration in heifers than in lactating dairy cows, even though cows had larger preovulatory follicles. Accordingly, Wiltbank et al. (2006) highlighted a role of elevated metabolic rate on reduction of circulating

estradiol in dairy cows, resulting in heifers having longer estrus and greater pregnancy rate than lactating cows.

No influence of intensity was observed on follicular diameters. A study with cows classified as high activity had similar pre-ovulatory follicle diameter, but greater concentrations of estradiol in plasma than cows classified as low (Cerri et al., 2004). The expression of estrus behavior is triggered by high concentrations of estradiol-17 β produced by the pre-ovulatory follicle (Allrich, 1994; Forde et al., 2011).

Surprisingly, no influence was observed between preovulatory follicle diameter and duration of estrus and ovulation between intensity. Cummins et al. (2012) found that cows classified with a greater genetic merit for fertility had pronounced effects on corpus luteum development, progesterone concentration, preovulatory follicle diameter, and behavioral estrus. More detailed studies should be conducted to approach possible management, physiological or perhaps genetic explanations for the observed endocrine and behavioral variation and at times paradoxical correlations.

Estradiol concentrations were not timely measured in this experiment. Some studies describe that pre-ovulatory estradiol and previous luteal phase progesterone concentrations are involved in regulation of estrus expression (Reames et al., 2011). Estradiol concentration at onset of estrus has been observed to be approximately 1 pg/mL greater in cows expressing high intensity estrus (Madureira et al., 2015), but correlations between estradiol concentration and estrus activity levels are weak (Aungier et al., 2015, Madureira et al., 2015). It is interesting to note that duration of standing to be mounted has been reported to be associated with estradiol concentration (Reames et al., 2011; Aungier et al., 2015).

In this study was observed greater progesterone levels after AI in High intensity group than Low intensity. The ovulation of pre-ovulatory follicles with similar diameter would be suggest change in concentrations of progesterone after AI. Madureira et al. (2015) suggests that concentrations of progesterone 10 d after AI was greater in cows displaying high intensity estrus at AI. The faster increase in progesterone early in the cycle could result in increased early embryonic development (Mann & Lamming, 2001; Bisinotto et al., 2010) possibly due to changes in the endometrium receptor profile (Lonergan, 2011) and therefore could be a reason for increased pregnancy rates found in animals with high activity.

Progesterone levels at proestrus day and heat moment were weakly correlated to estrus duration. Estrus walking activity is probably more dependent on the individual and thus not dependent on availability of other heifers for behavioural interactions. Other factors such as plasma estradiol concentration, expression of estradiol receptors in the brain, and level of

progesterone from the previous cycle likely also influence the behavioural expression of estrus (Roelofs et al., 2010).

The results presented here provide supporting evidence for the association between the degree of behavioural change (intensity) of estrus expression and progesterone levels in determined moments. As Madureira et al., (2015), the association between estrus expression and fertility suggests underlying physiological mechanisms where hormones such as estradiol and progesterone would coordinate estrus expression and also influence fertility-related parameters such as ovulation, oocyte quality, uterine environment, and CL function.

Evaluation of daily circulating estradiol and progesterone concentrations and of endometrial gene expression might contribute to the understanding of physiological mechanisms linking magnitude of estrus expression and fertility.

CONCLUSIONS

The current study demonstrated the intensity of estrus activity did not impact ovarian parameter as follicular and CL diameters and the majority of progesterone concentration. However, impacted the P4 levels at the third day after estrus. Heifers with lower intensity of estrus activity showed lower levels than high intensity.

The relationships between estrus intensity and P4 levels were observed at proestrus and three days after heat. Also, correlations between plasma progesterone concentration to estrus duration were observed at proestrus and heat day. These correlations could help the best moment to manipulate exogenous hormones from different estrus intensity measured by monitors.

REFERENCES

ALLRICH, R.D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 77:2738–2744. 1994

AUNGIER, S.P.M., ROCHE, J.F., SHEEHY, M., CROWE, M.A. Effects of management and health on the use of activity monitoring for estrus detection in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 95: 2452–2466. 2012

AUNGIER, S.P.M., ROCHE, J.F., DUFFY, P., SCULLY, S., CROWE, M.A. The relationship between activity clusters detected by an automatic activity monitor and endocrine changes during the periestrous period in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 98:1666–1684. 2015

BISINOTTO, R.S., RIBEIRO, E.S., MARTINS, L.T., MARSOLA, R.S., GRECO, L.F., FAVORETO, M.G., RISCO, C.A., THATCHER, W.W., SANTOS, J.E. Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. **J. Dairy Sci.** 93:5798–5808. 2010

CERRI, R.L.A., SANTOS, J.E.P., JUCHEM, S.O., GALVÃO, K.N., CHEBEL, R.C. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in high-producing dairy cows. **J. Dairy Sci.** 87:3704–3715. 2004

CERRI, R.L.A., CHEBEL, R.C., RIVERA, F., NARCISO, C. D. OLIVEIRA, R. A., AMSTALDEN, M. BAEZ-SANDOVAL, G. M., OLIVEIRA, L.J., THATCHER, W.W., SANTOS, J.E.P. Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. **J. Dairy Sci.** 94:3352–3365. 2011

CUMMINS, S.B., LONERGAN, P., EVANS, A.C., BUTLER, S.T. Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: II. Ovarian follicular and corpus luteum dynamics, reproductive hormones, and estrus behavior. **J Dairy Sci.** 95:3698-3710. 2012

DAVOODI, S., COOKE, R.F., FERNANDES, A.C.C., CAPPELLOZZA, B.I., VASCONCELOS, J.L.M., CERRI, R.L.A. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on Day 19 of gestation in beef cows. **Theriogenology** 85:645–655. 2016

FORDE, N., BELTMAN, M.E., LONERGAN, P., DISKIN, M., ROCHE, J.F. CROWE, M.A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 124:163–169. 2011

GALINA, C.S., ORIHUELA, A. The detection of estrus in cattle raised under tropical conditions: What we know and what we need to know. **Horm. Behav.** 52:32–38. 2007

LONERGAN P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**. 76(9):1594-601. 2011

MANN, G.E., LAMMING, G.E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**. 121:175–180. 2001

MADUREIRA, A.M.L., SILPER, B.F., BURNETT, T.A., POLSKY, L., CRUPPE, L.H., VEIRA, D.M., VASCONCELOS, J.L.M., CERRI, R.L.A. Factors affecting expression of estrus measured by activity monitors and conception risk of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 98:7003–7014. 2015

PEREIRA, M.H.C., RODRIGUES, A.D.P., CARVALHO, R.J., WILTBANK, M.C., VASCONCELOS, J.L.M. Increasing length of an estradiol and progesterone timed artificial insemination protocol decreases pregnancy losses in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 97:1454–1464. 2014

PEREIRA, M.H.C., RODRIGUES, A.D.P., MARTINS, T., OLIVEIRA, W.V.C., WILTBANK, M.C., VASCONCELOS, J.L.M. Times artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. **J. Dairy Sci.** 96:6904–6914. 2013

REAMES, P. S., HATLER, T.B., HAYES, S.H., RAY, D.L., SILVIA, W.J. Differential regulation of estrous behavior and luteinizing hormone secretion by estradiol-17 β in ovariectomized dairy cows. **Theriogenology** 75:233–240. 2011

ROELOFS, J., LÓPEZ-GATIUS, F., HUNTER, R.H.F., VAN EERDENBURG, F.J.C.M., HANZEN, C. When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. **Theriogenology** 74:327–344. 2010

SARTORI, R., HAUGHIAN, J.M., SHAVER, R.D., ROSA, G.J.M., WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **J. Dairy Sci.** 87:905–920. 2004

SOUZA, A. H., GÜMEN, A., SILVA, E.P.B., CUNHA, A.P., GUENTHER, J.N., PETO, C.M., CARAVIELLO, D.Z., WILTBANK, M.C. Supplementation with estradiol-17 β before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the ovsynch protocol in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 90:4623–4634. 2007

SPENCER, T.E., BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Anim. Reprod. Sci.** 15:1–15. 2004

WILTBANK, M., H. LOPEZ, R. SARTORI, S. SANGSRITAVONG, A. GÜMEN. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology** 65:17–29.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa apresentada nesta tese contribuiu para o conhecimento sobre as medições do uso dos monitores automatizados da expressão do estro, especialmente sobre os padrões de intensidade da atividade em eventos de estro de novilhas, caracterização do comportamento durante o estro (deitar e levantar), concordância entre o monitoramento e associação entre características do estro; dinâmica ovariana; perfil endócrino e conseqüentemente, a fertilidade. A literatura informou que os sistemas de monitoramento de atividade são capazes de aumentar as taxas de concepção à IA. Os resultados dessa tese indicam que há muitas áreas a serem exploradas, dada a grande quantidade de dados gerados diariamente para vacas e novilhas.

Em apoio à maximização do potencial dos monitores automatizados de atividade, listei questões para futuras pesquisas. Estes dizem respeito a como usar os dados dos monitores para melhorar a detecção e a expressão do estro, quais são os mecanismos fisiológicos por trás da associação da intensidade e fertilidade e como podemos aplicar os monitores à tomada de decisão diária de rotina. O uso dos MAA pode ser uma alternativa à sincronização hormonal em alguns rebanhos, bem como uma ferramenta para aumentar as taxas gerais de concepção. Uma ação de acompanhamento é aprender a usar os dados dos MAA para melhorar o gerenciamento do rebanho e a saúde, resultando em maior expressão do estro e melhor desempenho reprodutivo do rebanho leiteiro.