

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA eCG SOBRE A IRRIGAÇÃO SANGUÍNEA DAS
ESTRUTURAS OVARIANAS E TEMPERATURA VULVAR DE
BÚFALAS MURRAH COM OVULAÇÃO SINCRONIZADA**

FELIPE RYDYGIER DE RUEDIGER

Botucatu - SP
Novembro 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA eCG SOBRE A IRRIGAÇÃO SANGUÍNEA DAS
ESTRUTURAS OVARIANAS E TEMPERATURA VULVAR DE
BÚFALAS MURRAH COM OVULAÇÃO SINCRONIZADA**

FELIPE RYDYGIER DE RUEDIGER

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Oba

Botucatu - SP
Novembro 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ruediger, Felipe Rydygier de.

Efeito da eCG sobre a irrigação sanguínea das estruturas ovarianas e temperatura vulvar de búfalas Murrah com ovulação sincronizada / Felipe Rydygier de Ruediger. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Doppler, Ultrassonografia. 2. Termografia médica. 3. Radiação infravermelha. 4. Folículo ovariano. 5. Corpo lúteo. 6. Progesterona.

Palavras-chave: Corpo lúteo; Folículo; Progesterona; Termografia digital por infravermelho; Ultrassonografia Doppler.

Felipe Rydygier de Ruediger

EFEITO DA eCG SOBRE A IRRIGAÇÃO SANGUÍNEA DAS ESTRUTURAS
OVARIANAS E TEMPERATURA VULVAR DE BÚFALAS MURRAH COM
OVULAÇÃO SINCRONIZADA

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eunice Oba

Presidente e orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu /SP

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu /SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu /SP

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur

Membro

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Oeste
Paulista – UNOESTE – Presidente Prudente/SP

Prof. Dr. Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho

Membro

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA - Registro/SP

14 de novembro de 2017

DEDICATÓRIA

In Memoriam, com muito amor ao meu pai Ricardo Rydygier de Ruediger, que nos deixou durante o doutoramento. Meu grande exemplo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar no caminho certo, me dar forças, coragem e sabedoria em todos os momentos.

Agradeço a minha Mãe Telma, mesmo com a distância sinto diariamente todo o calor do seu amor, todas as palavras de incentivo, cada vez que pensa em mim, muito obrigado por ser quem é, por tudo que fez e faz por mim, por sua força para nos mantermos em pé, por todos os seus sonhos abdicados para realizar os meus, faltam palavras.....

À minha irmã Paula, meu terceiro pilar, pelo carinho e compreensão. Mostrando sempre com sua alegria o lado bom da vida.

À Gabi, mais que uma noiva, uma amiga, parceira e cúmplice. Por todo seu amor, carinho e incentivo em todos os momentos. Pela ajuda nos trabalhos, artigos e tese. Sempre com um abraço carinhoso e uma palavra de incentivo.

Ao meu avô Newton, tios e primos os quais carrego em meu coração.

À minha orientadora Profa. Dra. Eunice pelas conversas, vivência, amizade, paciência, amparo, conselhos e claro sua orientação. Muito obrigado Professora, levarei para toda a vida!

Ao Dr. Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho pela amizade e pelo apoio em realizar o experimento, assim como por participar da banca de defesa.

Ao Prof. Dr. Rogério Antônio de Oliveira pela realização das análises estatísticas dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira e a Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza, pela colaboração e participação na banca de defesa.

Ao amigo Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur pela disponibilidade, colaboração na execução deste projeto e participação na banca de defesa.

Aos Professores da pós-graduação em Biotecnologia Animal, pelo conhecimento passado, dedicação e paciência.

Aos amigos que me ajudaram durante o experimento, Paulo, Viviane, Ariane, Doze e Rafael Leciulli.

Aos funcionários da APTA de Registro e do Departamento de Reprodução Animal.

Aos amigos de pós-graduação, pelo apoio, troca de conhecimento, momentos de descontração e por fazerem a estada aqui muito mais agradável. Muito obrigado!

Agradeço todos que fizeram e fazem parte da minha caminhada profissional tendo cada um guardado com uma importância única.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius
μg – Micrograma
BE – Benzoato de estradiol
CL – Corpo lúteo
cm² – Centímetro quadrado
eCG – Gonadotrofina coriônica equina
FD – Folículo dominante
FPO – Folículo pré-ovulatório
FSH – Hormônio folículo estimulante
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina
h – Hora
HHG – Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal
IA – Inseminação artificial
IATF – Inseminação artificial em tempo fixo
Kg – Quilograma
LH- Hormônio luteinizante
m – Metro
MHz – Mega-hertz
mL – Mililitro
mm – Milímetro
mm² – Milímetro quadrado
ng – Nanograma
P4 – Progesterona
pg – Picograma
PGF2α – Prostaglandina F2α
RIA – Radioimunoensaio
TA – Temperatura ambiente
TDPI – Termografia digital por infravermelho

TG – Temperatura de bulbo negro

TR – Temperatura retal

UI – Unidade internacional

UR – Umidade relativa do ar

WBGT – Temperatura de bulbo úmido

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1- Linha do tempo do protocolo hormonal, com e sem eCG, das ultrassonografias e das colheitas de sangue. Implante intravaginal de progesterona (P4), benzoato de estradiol (EB), gonadotrofina coriônica equina (eCG), prostaglandina F 2 α (PGF2 α), hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), ultrassom (US), colheita de sangue (BS).....p.42

Figura 2 – Imagens ultrassonográficas *colour* Doppler do folículo pré-ovulatório, demonstrando a maior irrigação do seu perímetro previamente à ovulação (esq.) e do CL com sua área irrigada máxima (dir.).....p.44

Figura 3 – Médias $\pm$ erro padrão, do diâmetro, perímetro, perímetro irrigado e porcentagem do perímetro irrigado do folículo de búfalas Murrah, entre os grupos eCG (n = 20) e controle (n = 20). * $P < 0,05$ entre os tratamentos.....p.45

Figura 4 – Médias $\pm$ erro padrão, do diâmetro, área, área irrigada e porcentagem da área irrigada do CL de búfalas Murrah, entre os grupos eCG (n = 20) e controle (n = 20). * $P < 0,05$ entre os tratamentos.....p.45

Figura 5 – Médias $\pm$ erro padrão da concentração plasmática de progesterona de búfalas Murrah, entre os grupos eCG (n = 20) e controle (n = 20). * $P < 0,05$ entre os tratamentos.....p.46

Capítulo 2

Figura 1- Linha do tempo do protocolo hormonal, das ultrassonografias, das termografias e das colheitas de sangue. Implante intravaginal de progesterona (P4), benzoato de estradiol (EB), gonadotrofina coriônica equina (eCG), prostaglandina F2 α (PGF2 α), hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), ultrassom (US), termografia digital por infravermelho (TDPI) e colheita de sangue (BS).....p.64

Figura 2 – Termogramas da vulva (A), olho (B) e mufla (C) de búfalas, com as áreas de aferição demarcadas.....p.65

Figura 3 – Variação da temperatura da superfície da vulva (VST) e concentração plasmática de progesterona, durante os dias do experimento em búfalas.....p.68

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Média $\pm$ erro padrão (EP) e nível de significância (*P*) entre os grupos tratados com e sem eCG, para crescimento médio diário dos folículos de búfalas Murrah.....p.44

Tabela 2 – Coeficiente de correlação de Pearson e nível de significância (*P*) observados entre o diâmetro, área, área irrigada e porcentagem da irrigação do CL em relação a concentração plasmática de progesterona em búfalas Murrah.....p.46

Tabela 3 – Coeficiente de correlação de Pearson e nível de significância (*P*) entre os diâmetros do folículo (FOL) e corpo lúteo (CL), área do CL, perímetro do FOL, área irrigada do CL, perímetro irrigado do FOL, porcentagem irrigada da área do CL e do perímetro do FOL e a concentração plasmática de progesterona de búfalas Murrah.....p.47

Capítulo 2

Tabela 1 – Médias $\pm$ erro padrão (EP), das temperaturas da superfície da vulva, mufla, olho e retal (TR) de búfalas Murrah e dos dados climáticos.....p.66

Tabela 2 – Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (*P*) entre a temperatura retal (TR) e as temperaturas da superfície da vulva, mufla e olho, obtidas por termografia digital por infravermelho em búfalas Murrah.....p.67

Tabela 3 – Médias $\pm$ erro padrão (EP) e nível de significância (*P*) das temperaturas da superfície da vulva, mufla e olho, obtidas por termografia digital por infravermelho, comparadas entre as fases folicular e luteínica de búfalas Murrah.....p.67

Tabela 4 – Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância entre os dados climáticos e as temperaturas de vulva, mufla e olho e temperatura retal (TR) de búfalas no período da manhã e da tarde.....p.68

Tabela 5 – Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (*P*) entre as concentrações plasmáticas de progesterona e as temperaturas da superfície da vulva, mufla, olho e retal (TR) em búfalas.....p.69

Tabela 6 – Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (<i>P</i>) entre as concentrações plasmáticas de cortisol e as temperaturas da superfície da vulva, mufla, olho e retal (TR) de búfalas e os dados climáticos.....	p.69
--	------

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1. Características reprodutivas das búfalas	7
2.2. IATF em búfalas.....	9
2.3. Ultrassonografia Doppler e vascularização das estruturas ovarianas....	13
2.4. Termografia por infravermelho	17
3. HIPÓTESES.....	21
4. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivo Geral	22
4.2. Objetivos Específicos.....	22
REFERÊNCIAS.....	23
Capítulo 1	37
Capítulo 2.....	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS	79

RESUMO

Felipe Rydygier de Ruediger. EFEITO DA eCG SOBRE A IRRIGAÇÃO SANGUÍNEA DAS ESTRUTURAS OVARIANAS E TEMPERATURA VULVAR DE BÚFALAS MURRAH COM OVULAÇÃO SINCRONIZADA. Botucatu – SP. 2017. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Estratégias que busquem resultados reprodutivos superiores em búfalos devem ser pesquisadas. Para tanto, a gonadotrofina coriônica equina (eCG) vem sendo estudada apresentando resultados satisfatórios em búfalas, porém os mecanismos envolvidos na ação da eCG não foram totalmente esclarecidos. A termografia digital por infravermelho apresenta importância no estudo das variações de temperaturas da vulva durante o ciclo estral, podendo auxiliar na detecção do estro nesta espécie. O objetivo do presente estudo foi avaliar as variações morfológicas e de vascularização dos folículos e corpo lúteo (CL) e nas concentrações plasmáticas de progesterona (P4) e cortisol durante protocolo hormonal para a sincronização da ovulação com e sem eCG. Também objetivou-se avaliar a influência da fase reprodutiva e do clima sobre a temperatura da superfície da vulva em búfalas Murrah. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos, grupo com eCG (eCG, n=20) e grupo sem eCG (controle, n=20). No primeiro dia do protocolo hormonal (Dia 0), as vacas receberam um dispositivo intravaginal de P4 e administração de benzoato de estradiol. No dia 9, removeu-se o dispositivo de P4, administrou-se PGF2 α em todas as búfalas e eCG nos animais do grupo eCG. No dia 11, foi administrado GnRH. A partir do dia 9, foram realizadas ultrassonografias doppler no período da tarde e termografia digital pela manhã e à tarde, diariamente até o dia 16 e depois nos dias 20, 24, 28 e 32, visando avaliar o desenvolvimento e irrigação folicular e do CL, e as temperaturas superficiais da vulva, mufla e olho. Adicionalmente, foram realizadas mensurações das variáveis climáticas, temperatura retal (TR) e colheita de sangue para obter as concentrações plasmáticas de P4 e cortisol. No experimento 1 o grupo eCG apresentou maior

perímetro irrigado dos folículos nos dias 11 ($P=0,018$) e 12 ($P=0,03$), o CL apresentou maior diâmetro no dia 16 ($P<0,0001$) e maior área irrigada nos dias 14 ($P=0,008$), 15 ($P=0,0051$), 16 ($P=0,0048$), 20 ($P=0,0037$) e 24 ($P=0,022$) e produção de P4 nos dias 15 ($P=0,042$), 16 ($P=0,048$), 20 ($P=0,0054$) e 24 ($P=0,0063$). No experimento 2 as temperaturas da superfície da vulva, mufla e olho correlacionaram-se positivamente, com a TR e com os dados climáticos. As ovulações ocorreram em média aos $13,57 \pm 1,32$ dias, sendo que foram encontradas maiores temperaturas da superfície da vulva, olho e mufla na fase folicular em relação à luteínica. As temperaturas da superfície da vulva foram mais baixas durante os dias 16, 20, 24 e 28 e a concentração plasmática de P4 apresentou padrão inversamente proporcional. As temperaturas da superfície da mufla e do olho não acompanharam o mesmo padrão de variação das temperaturas vulvares, entretanto, correlacionaram-se positivamente com as concentrações plasmáticas de cortisol. Portanto, a utilização de eCG durante protocolo hormonal para sincronização da ovulação à base de P4 favorece a concentração plasmática de P4 pela maior irrigação do folículo que proverá um CL maior e mais irrigado. A termografia digital por infravermelho é eficaz para avaliar a influência do ciclo estral e variações climáticas sobre as temperaturas da vulva e corporal.

Palavras-chave: ultrassonografia Doppler, termografia digital por infravermelho, folículo, corpo lúteo, progesterona.

ABSTRACT

Felipe Rydygier de Ruediger. EFFECT OF eCG ON BLOOD IRRIGATION OF OVARIAN STRUCTURES AND VULVAR TEMPERATURE OF MURRAH BUFFALOES WITH SYNCHRONIZED OVULATION. Botucatu - SP. 2017. Thesis (Ph.D.) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science.

Strategies that seek better reproductive results in buffaloes should be researched. Thus, equine chorionic gonadotrophin (eCG) was studied presenting satisfactory results when used in buffalo during the breeding season and anestrus period, but the mechanisms involved in the reproductive improvement observed with the eCG implementation were not fully understood. The superficial digital thermography may be important in the study of temperature variations of the vulva inherent to the estrous cycle, and may help in the detection of estrus in this species. The objective of the present study was to evaluate the morphological and irrigation alterations in the follicles and corpus luteum (CL) and the changes in plasma concentrations of progesterone (P4) during hormonal protocol for ovulation synchronization with and without eCG. As well the aim of this study was to evaluate the influence of the reproductive phase and the climate on the superficial vulvar temperature in Murrah buffaloes. The animals were randomly divided into two groups, group with eCG (eCG, n = 20) and group without eCG (control, n = 20). On the first day of the hormonal protocol (Day 0), cows received an intravaginal P4 device and estradiol benzoate administration. On day 9, the P4 device was removed, PGF2 α was administered in all buffaloes and eCG in eCG group. On day 11, GnRH was administered. From day 9, Doppler ultrasonography was daily performed in the afternoon and digital thermography in the morning and afternoon, until day 16 and later on days 20, 24, 28 and 32, to evaluate follicular and CL development and irrigation, and superficial temperatures of the vulva, mufla and eye. In addition, the climatic variables, rectal temperature (RT) and blood collection to evaluate P4 and cortisol plasma concentrations were performed. In the experiment 1, the eCG group showed a greater follicular perimeter irrigation on days 11 (p = 0.018) and 12 (p = 0.03), the

CL presented a larger diameter on day 16 ($p < 0.0001$) and higher irrigated area on days 14 ($p = 0.008$), 15 ($p = 0.0051$), 16 ($p = 0.0048$), 20 ($p = 0.0037$) and 24 ($p = 0.022$) and P4 production on days 15 ($p = 0.042$), 16 ($p = 0.048$), 20 ($p = 0.0054$) and 24 ($p = 0.0063$). In experiment 2 the surface temperatures of the vulva, mufla and eye were positively correlated with RT and climatic data. Ovulation occurred on average at 13.57 ± 1.32 days, with higher temperatures of the vulva, eye and mufla in the follicular phase compared to luteinic. Vulval temperatures were lower during days 16, 20, 24 and 28 and P4 plasma concentration was inversely proportional, but mufla and eye temperatures did not follow the same pattern of vulvar temperature variation. Therefore, the use of eCG during P4-based hormonal protocol for ovulation synchronization favors P4 plasma concentration by the greater irrigation of the follicle that will provide a greater and more irrigated CL. Digital infrared thermography is effective to evaluate the influence of the estrous cycle and climatic variations on vulva and body temperatures.

Keywords: Doppler ultrasound, infrared digital thermography, follicle, corpus luteum, progesterone.

1. INTRODUÇÃO

O rebanho bubalino brasileiro é estimado em 1,32 milhões de cabeças (IBGE, 2017), demonstrando um crescimento anual de aproximadamente 3,5% (BERNARDES, 2007), superior ao dos bovinos (MACHADO et al., 2007), com excelente capacidade de adaptação da espécie às condições ambientais do Brasil, apresentando alto desempenho produtivo e reprodutivo (BARUSELLI e CARVALHO, 2002).

No Brasil, os búfalos são criados para a produção de carne (MARIANTE et al., 2003) e de leite (JORGE et al., 2006). A produção nacional de leite de búfala supera 92 milhões de litros por ano, com destaque a região Sudeste do país que apresenta uma desenvolvida cadeia produtiva de leite e derivados (IBGE, 2017).

Considerando as peculiaridades reprodutivas das búfalas, tais quais, baixo comportamento homossexual e sazonalidade, técnicas visando melhorar a fertilidade do rebanho bubalino necessitam ser desenvolvidas.

Em vista disso, para elevar os índices reprodutivos do rebanho bubalino vem sendo empregada a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) que permite a inseminação artificial (IA) sem a observação de cio. A associação da gonadotrofina coriônica equina (eCG) a esses protocolos, apresenta resultados satisfatórios durante o período de anestro sazonal devido a sua capacidade de desestacionalização, sendo importante estratégia por permitir maior produção leiteira na entressafra, que coincide com a época de elevada disponibilidade de pastagem (CARVALHO et al., 2013a, GERDES et al., 2000). Visando elucidar as alterações ovarianas desencadeadas pela utilização da eCG a ultrassonografia doppler dos ovários é uma ferramenta útil, pois permite a avaliação de variações hemodinâmicas envolvidas no desenvolvimento folicular e luteínico (ACOSTA et al., 2002).

Fêmeas bovinas apresentam maior taxa de prenhez em programas de IATF quando são inseminadas após a expressão de cio, desta maneira a termografia digital superficial da vulva pode ser estudada na espécie bubalina buscando auxílio para detecção do estro, uma vez que variações hormonais influenciam na vascularização e no fluxo sanguíneo, alterando a temperatura da

superfície de diferentes regiões do corpo do animal (PUROHIT et al., 1985.; SCOLARI et al., 2011; TALUKDER et al., 2014).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as variações morfológicas e de vascularização nos folículos e corpo lúteo (CL) juntamente com as variações nas concentrações plasmáticas de progesterona (P4) durante protocolo hormonal com e sem eCG, e avaliar a influência da fase reprodutiva e do clima sobre as temperaturas da superfície da vulva, olho e mufla por meio da termografia digital em búfalas Murrah.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características reprodutivas das búfalas

A espécie bubalina apresenta sazonalidade reprodutiva e a sua eficiência reprodutiva é influenciada negativamente pelo aumento no número de horas/luz no dia (BITTMAN e KARSCH, 1984). Esta sazonalidade reprodutiva é menos marcante quanto mais próxima à linha do equador, contudo, na região Sudeste do Brasil a estação reprodutiva favorável (ERF) concentra-se entre os meses de março a julho, apresentando anestro sazonal na estação reprodutiva desfavorável (ERD) de agosto a fevereiro na maioria dos animais (BARUSELLI, 1997).

Nas búfalas de rio o comprimento médio do ciclo estral é de 21 dias (18-24 dias), a duração média do estro é de $13,7 \pm 5,9$ horas e a ovulação ocorre em $31,6 \pm 4,4$ horas após o início do estro (DROST, 2007; PORTO FILHO et al., 2014).

O desenvolvimento folicular em bubalinos pode ocorrer em uma, duas ou três ondas, sendo mais comum a ocorrência de duas ondas por ciclo estral. (TANEJA et al., 1996; BARUSELLI et al., 1997). Em ciclos estrais com duas ondas foliculares a primeira onda folicular inicia-se no primeiro dia após a ovulação (dia 0 = ovulação), já a segunda onda emerge nos dias 10,8 e 9,3 para os animais com 2 e 3 ondas por ciclo, respectivamente, e a terceira onda surge no dia 16,8 do ciclo estral (BARKAWI et al., 2009).

Os diâmetros dos folículos dominantes (FD) e subordinados no momento da divergência folicular são de $7,2 \pm 0,3$ mm e $6,4 \pm 0,3$ mm, respectivamente, obtendo capacidade ovulatória a partir de 8,5 mm de diâmetro (GIMENES et al., 2011). O folículo pré-ovulatório (FPO) possui diâmetro máximo de $15,5 \pm 1,6$ mm em animais com duas ondas foliculares e de $13,4 \pm 1,3$ mm em animais com três ondas foliculares (BARUSELLI et al., 1997).

O pico de estradiol acompanha o desenvolvimento folicular, variando entre 7,2 pg/mL e 10,9 pg/mL, este resultado demonstra que os bubalinos possuem baixas concentrações de estradiol durante o estro, comparados aos bovinos (SANTIAGO et al., 2005; VALE, 2011).

Nas búfalas, a ovulação ocorre somente após o estro (VALE, 1988), onde então inicia-se a luteogênese e a concentração plasmática de P4 se eleva a partir do terceiro dia atingindo seu pico plasmático no 10º dia após a ovulação. Com a aproximação do próximo estro, como resposta uterina a secreção de PGF2 α na ausência de um embrião, ocorre a luteólise e a P4 volta para concentrações basais (FITZ et al., 1982).

O CL maduro apresenta, em novilhas, entre 12 e 15 mm de diâmetro (BRITO et al., 2002), sendo que na maioria dos animais a papila ovulatória não sobressai além da superfície do ovário, o que torna mais difícil identifica-los por palpação retal (DROST, 2007). O CL atinge o seu tamanho máximo entre o 10º e 16º dia do ciclo (VALLE, 2011).

A baixa concentração plasmática de estradiol nas búfalas, comparadas aos bovinos, pode ser o fator responsável pela manifestação do estro com sinais pouco evidentes nesta espécie (VARUGHESE et al., 2014). Sinais de estro como micção frequente, vocalização, inchaço vulvar, descarga de muco também são sinais de estro observados em búfalas do rio, mas a sua expressão é extremamente fraca, dificultando sua detecção (BARILE, 2005).

Além da baixa expressão do estro das búfalas, em regiões com temperaturas elevadas, estas possuem hábitos sexuais noturnos, com predominância de sinais clínicos de estro durante o período de 17:00 às 20:00 horas e 4:00 às 07:00 horas. Isto parece estar relacionado com um efeito inibitório da radiação solar e da temperatura ambiente sobre a expressão do estro (VALE, 1988).

Detecção de estro é um pré-requisito para um manejo reprodutivo eficiente, sendo essencial na aplicação da IA. Para compensar a dificuldade de se detectar os sinais de estro, este pode ser detectado com ajuda de rufiões, ou pode ser utilizada a IATF (DROST et al., 1985; BARUSELLI et al., 2013).

Para aumentar a fertilidade em búfalos o conhecimento adequado sobre o comportamento reprodutivo é necessário (GLATZEL et al., 2000), sendo necessárias novas ferramentas de biotecnologia na reprodução para superar a baixa produtividade. Para o estabelecimento de programas de sincronização de estro e superovulação em rebanhos de búfalos, o conhecimento sobre o

comportamento cíclico do ovário na forma de desenvolvimento folicular e dinâmica é essencial. Ao contrário de bovinos, pouca atenção tem sido focada sobre estes temas em bubalinos (OBA; SOUZA, 2003).

2.2. IATF em búfalas

A IA é a biotecnologia da reprodução mais utilizada nos animais domésticos, sendo importante para a disseminação de material genético paterno de origem superior, sem a necessidade de manutenção de um touro reprodutor no rebanho, reduzindo-se a incidência de doenças reprodutivas (BARUSELLI et al., 2013). Esta biotécnica é utilizada na bubalinocultura visando melhora quantitativa e qualitativa do rebanho, tanto para produção de carne como produção de leite (SINGH e BALHARA, 2016).

As primeiras pesquisas relacionadas à IA, com aplicação de GnRH para indução da ovulação, em búfalas no Brasil foram realizadas em 1993 (OBA et al., 1993), introduzindo a técnica no meio científico, permitindo assim novos estudos e disseminação da mesma com consideráveis avanços desde então.

Apesar das vantagens, a aplicação da IA em búfalas foi relacionada a baixa eficiência reprodutiva dos animais, que possuem maturidade sexual tardia, baixa expressão de estro, grande intervalo entre partos, anestro sazonal durante dias longos (JAINUDEEN e HAFEZ, 1993; SINGH et al., 2000) e duração do estro muito variável, dificultando a predição do momento da ovulação (OHASHI, 1994; BARUSELLI et al., 2001).

Nos últimos anos, a eficiência da IA em búfalos passou de 25% (ZICARELLI, et al., 1997) para 50% (HAIDER, et al., 2015), e os protocolos de maior sucesso envolvem a sincronização da ovulação (NEGLIA et al., 2008; VECCHIO et al., 2013). No entanto, alguns protocolos hormonais apresentam baixas taxas de prenhez durante o período de anestro sazonal (RUSSO et al., 2010).

Para facilitar e aumentar o uso da IA, estudou-se manejos que não requerem a identificação de estro, sendo propostos diferentes protocolos hormonais para IATF (BARILE, 2005). Os tratamentos hormonais desenvolvidos visam controlar as funções luteais e foliculares do ovário, possibilitando a

sincronização do crescimento folicular e da ovulação (BARUSELLI et al., 2007; CARVALHO et al., 2013b; DE RENSIS et al., 2005; MURUGAVEL et al., 2009), sendo utilizados com sucesso tanto durante a estação de monta como em animais em anestro (BARUSELLI et al., 2002; DE RENSIS et al., 2005; BARUSELLI et al., 2007; VECCHIO et al., 2013).

Os principais protocolos de IATF utilizados em búfalas são adaptados de protocolos usados em bovinos, utilizando principalmente GnRH, P4, estradiol, eCG e PGF2 α (KUMAR et al., 2014).

Um dos protocolos mais comumente utilizados para IATF em búfalas leiteiras é o Ovsynch (ROSSI et al., 2014; CAMPANILE et al., 2016). Este protocolo consiste na aplicação de GnRH no primeiro dia (D0), aplicação de PGF2 α no D7, segunda aplicação de GnRH no D9 e IA 16 horas após a segunda aplicação de GnRH (BERBER et al., 2002; BARUSELLI et al., 2003). A primeira aplicação de GnRH promove a ovulação do folículo dominante presente, a aplicação de PGF2 α tem como objetivo a luteólise do CL oriundo da ovulação ocorrida, e a segunda aplicação de GnRH irá promover a ovulação do folículo dominante gerado pelo controle da onda folicular (DE RENSIS et al., 2005).

Os protocolos hormonais de IATF Doublesynch, Heatsynch e Estradoublesynch são oriundos do Ovsynch e buscam minimizar a proporção de animais não responsivos ao protocolo no momento da IA. Estas estratégias na sua maioria apresentam a desvantagem de necessitarem de maior número de manejos para sua execução (MOREIRA et al., 2001; MURUGAVEL et al., 2003; CIRIT et al., 2007).

O Heatsynch, substitui a segunda aplicação de GnRH do protocolo Ovsynch por benzoato de estradiol (BE), apresentando taxas de prenhez semelhantes ao protocolo Ovsynch, mostrando que é possível a substituição da segunda aplicação de GnRH por BE (MOHAN et al., 2009).

O Doublesynch consiste da administração adicional de PGF2 α 48 horas antes do programa Ovsynch (CIRIT et al., 2007), obtendo-se taxas de prenhez de 58,1% durante a estação de monta e 27,3% em animais em anestro (MIRMAHMOUDI e PRAKASH, 2012). No Estradoublesynch, a segunda aplicação de GnRH do protocolo Doublesynch é substituída por BE, e apresenta

maior taxa de prenhez durante a estação de monta em búfalas Murrah. Este fato deve-se, provavelmente, ao menor envolvimento de P4 durante o protocolo, já que este possui uma aplicação de PGF2 α anterior ao início do protocolo Ovsynch, o qual promoverá a luteólise de possíveis CLs. Desta maneira fazendo com que não ocorra o bloqueio do pulso de LH após as induções de ovulação (MIRMAHMOUDI et al., 2014).

O protocolo Ovsynch e suas derivações necessitam da presença de um FD durante a primeira aplicação de GnRH para que a ovulação seja induzida corretamente pela segunda aplicação de GnRH. Desta maneira, bons resultados são apresentados durante a estação de monta, porém, não foram obtidos resultados satisfatórios quando aplicados no período de anestro (VALE, 2011).

Buscando melhores resultados durante o anestro sazonal, iniciaram-se estudos com protocolos de IATF baseados na associação entre P4 e estradiol. A combinação de P4 e estradiol no início do protocolo mantém um *feedback* negativo sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), restringindo a liberação de gonadotrofinas, embora a síntese destes hormônios continue. Quando o implante de P4 é retirado, encerra-se o *feedback* negativo, ocorrendo liberação reflexa das gonadotrofinas resultando na indução de estro dentro de 2 a 5 dias (ADAMS et al., 1992; BARILE et al., 2012). Segundo Rhodes et al. (2002), vacas em anestro pós-parto tratadas com P4 apresentam maior frequência do pulso de LH, maior concentração de estrogênio no líquido folicular e circulante e maior número de receptores de LH nas células da granulosa e da teca.

Diferentes fontes de P4 são efetivas no bloqueio do eixo HHG, uma vez que ao comparar a utilização de dispositivo intravaginal de P4 e implante auricular de norgestomet associados a BE, eCG, PGF2 α e GnRH, não foram encontradas diferenças entre os grupos, obtendo-se, respectivamente, diâmetro do FD no dia 9 ($9,8 \pm 0,5$ vs. $9,8 \pm 0,4$ mm), diâmetro FPO ($13,5 \pm 0,5$ mm vs. $14,0 \pm 0,3$ mm), intervalo entre a remoção dos dispositivos e a ovulação ($71 \pm 2,6$ h vs. $70,9 \pm 2,6$ h), taxa de ovulação (86,4% vs. 93,3%) e taxa de prenhez (46,4% vs. 49,6%). (CARVALHO et al., 2013b)

Indutores de ovulação, são utilizados durante protocolos de IATF para que um maior número de animais ovule em um curto intervalo de tempo (NASEER et al., 2011; SALES et al., 2012), fazendo com que a IA seja mais precisa (HAIDER et al., 2015). Tanto o BE, quanto o GnRH podem ser utilizados como indutores de ovulação já que ao utiliza-los o diâmetro do FPO, a taxa de ovulação e a taxa de prenhez são semelhantes (CARVALHO et al., 2012)

Os protocolos de sincronização a base de P4 são eficientes em búfalas cíclicas, durante a ERF (BARILE et al., 2005). Em um estudo de Moura (2003), onde se avaliou o uso de implantes vaginais de P4 associados a BE, obteve-se 10% de taxa de ovulação em animais em anestro sazonal. Com o objetivo de melhorar o resultado do tratamento, Porto Filho (2004) acrescentou eCG ao protocolo de IATF em vacas em anestro e obteve taxa de ovulação de 70% no grupo tratado com eCG e de 44,4% no grupo não tratado.

A melhora observada com a adição da eCG em protocolos de IATF à base de P4 deve-se ao fato desta possuir capacidade de ligar-se tanto a receptores de FSH como de LH, possuindo atividade folículo estimulante e luteinizante (MURPHY e MARTINUK, 1991). O uso de 400 UI de eCG no momento da retirada do implante de P4 aumenta a taxa de ovulação e a taxa de prenhez em búfalas em anestro (BARUSELLI et al. 2002). Murugavel et al. (2009) relataram uma maior taxa de ovulação em búfalas em anestro utilizando implante vaginal de P4 associado a eCG (81,0%) em comparação sem eCG (47,4%), os autores sugerem que isto ocorre, pois, as vacas em anestro têm liberação pulsátil de LH insuficiente para suportar os estádios finais do desenvolvimento folicular ovariano e da ovulação.

Além da sincronização, os protocolos de IATF em associação com tratamento com gonadotrofinas resultam em aumento das taxas de concepção provavelmente devido ao aumento das concentrações plasmáticas de P4 durante o diestro precoce (BINELLI et al., 2001; SÁ FILHO et al., 2010; SALES et al., 2011). O aumento das concentrações de P4 em búfalas tratadas com eCG pode ser resultado do aumento no diâmetro do CL (CARVALHO et al., 2013a).

O diâmetro do FPO é importante nos protocolos de IATF, uma vez que este está diretamente relacionado ao tamanho do CL em bubalinos e bovinos.

Um CL robusto promove secreção de P4, o que aumenta a probabilidade de manter a prenhez e melhorar a fertilidade em búfalos e bovinos (DADARWAL et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2001). Uma correlação positiva entre o diâmetro do FPO na IATF e a taxa de ovulação ($r = 0,59$, $p < 0,01$) ou entre o diâmetro do FPO na IATF e a taxa de gestação aos 45 dias ($r = 0,49$, $p < 0,01$) foram verificadas em búfalas (MONTEIRO et al., 2016).

Em estudo de Carvalho et al. (2013a), ficou evidenciada a importância do tratamento com eCG nos protocolos de IATF em búfalas durante o anestro sazonal, no qual obteve-se um aumento do diâmetro do FPO ($13,7 \pm 0,4$ mm vs. $12,6 \pm 0,6$ mm, $p = 0,09$) e a taxa de ovulação (66,7 vs. 44,8%, $p = 0,05$); diâmetro do CL ($15,8 \pm 0,92$ mm vs. $12,7 \pm 0,77$ mm, $p = 0,03$), aumento das concentrações de P4 ($0,59 \pm 0,08$ ng/mL vs. $0,27 \pm 0,05$ ng / mL, $p = 0,01$) e aumento da taxa de prenhez (52,7 vs. 39,4%, $p = 0,03$), respectivamente nos grupos com e sem eCG.

Baixas concentrações plasmáticas de P4 podem estar relacionadas a menores taxas de prenhez após a IATF. A importância da P4 inicia-se ao inibir a síntese de PGF2 α entre 15 a 17 dias após a IA (BINELLI et al., 2001), para promover o alongamento do embrião entre 10 e 15 dias após a IA e estabelecer a pré-fixação entre 17 a 24 dias após o cio (CAMPANILE e NEGLIA, 2010). Portanto, estratégias que elevam as concentrações de P4 durante esses períodos são desejadas.

2.3. Ultrassonografia Doppler e vascularização das estruturas ovarianas

O uso de imagens de ultrassom para o exame não invasivo dos órgãos reprodutivos tem contribuído para avanços substanciais nas duas últimas décadas (GINTHER et al., 2004, 2007). O modo-B foi utilizado pela primeira vez em bovinos na década de 1980 (PIERSON e GINTHER, 1984) possuindo um papel integral no manejo reprodutivo de bovinos, possibilitando a caracterização das ondas foliculares e diagnóstico de gestação (SAVIO et al., 1988; PIETERSE et al., 1990). Dessa maneira, a ultrassonografia deu origem ao desenvolvimento de protocolos de sincronização do estro e uma nova compreensão da dinâmica folicular durante o ciclo estral (ROCHE et al., 1998).

O ultrassom Doppler transretal é um recente método diagnóstico em Medicina Veterinária que é útil para o estudo não invasivo da vascularização dos órgãos genitais internos dos animais, permitindo assim novos conhecimentos sobre a fisiologia reprodutiva e ovariana de fêmeas durante o ciclo estral (ACOSTA et al., 2005; MIYAMOTO et al., 2005; GINTHER, 2007; HERZOG e BOLLWEIN, 2007; CARVALHO et al., 2008; GINTHER, 2014). Este equipamento utiliza a frequência causada pelo efeito Doppler para produzir imagens do fluxo sanguíneo. O princípio Doppler baseia-se em ondas, aumentando sua frequência quando estas ecoam a partir de eritrócitos que se aproximam do transdutor e diminuindo quando ecoam a partir de eritrócitos que se afastam. Esta mudança de frequência é aferida e utilizada para determinar a velocidade do fluxo sanguíneo. Em Doppler colorido, o fluxo sanguíneo é exibido em cor, em uma imagem bidimensional da estrutura de um tecido ou órgão. Imagens em Doppler colorido fornecem em tempo real a visualização do fluxo sanguíneo, variando de escoamento de alto fluxo em grandes vasos para fluxo mínimo através dos vasos terminais (GINTHER, 2007).

Durante um exame de ultrassom Doppler é possível realizar uma avaliação qualitativa e quantitativa dos vasos e tecidos específicos. A direção e a velocidade das células vermelhas do sangue podem ser representadas por diferentes cores e intensidades ou como uma velocidade de gráfico espectral. No entanto, para selecionar o modo mais adequado de exame é necessário ter conhecimento sobre os princípios e métodos de avaliação de ultrassonografia Doppler (FERREIRA et al., 2011).

O modo espectral é considerado ineficiente, e atualmente não é utilizado para a avaliação objetiva de folículos e CL por estes possuírem vasos de calibre muito pequenos (GINTHER et al., 2007). Uma alternativa para realizar a técnica *colour* Doppler de forma objetiva é determinar pelo *software* o número de pixels coloridos em uma imagem de CL ou folículo (GINTHER e UTT 2004).

Os folículos pré-antrais são irrigados pela teca interna, a qual contém muitos vasos sanguíneos, que se degeneram após a seleção folicular (MACCHIARELLI et al., 2006). Após o aparecimento do antro folicular, aumenta-se a demanda nutritiva e metabólica dos folículos, havendo maior necessidade

de suprimento sanguíneo, ocorrendo então neovascularização capaz de suprir essas exigências. (ROBINSON et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011). A dominância ocorre pela maior vascularização do folículo durante a sua seleção, devido a qual estes poderão receber uma maior quantidade de nutrientes e hormônios que irão auxiliar em seu desenvolvimento e produção hormonal (MATTIOLI et al., 2001; GRAZUL-BILSKA et al., 2007). A ultrassonografia Doppler demonstra extensa vascularização da parede do FD, não ocorrendo o mesmo em folículos subordinados (ACOSTA et al., 2003; GINTHER, 2007).

A degradação da camada da teca do folículo durante o processo de ovulação é acompanhada pelo aumento da dilatação e permeabilidade vascular, que são necessárias para a ruptura folicular (MURDOCH et al., 1986; ABISOGUN et al., 1988), mostrando que o fluxo sanguíneo aumenta rapidamente no início do pico de LH, e atinge um máximo antes da ovulação (JIANG et al., 2003). Estes dados sugerem que o aumento do fluxo sanguíneo dentro da parede folicular aumenta juntamente com o pico de LH e pode estar estreitamente associado com as alterações estruturais e funcionais da parede folicular durante o processo de ovulação (VARGA et al., 1985; ACOSTA et al., 2003; SIDDIQUI et al., 2010). Estudos em éguas demonstram que a irrigação da parede do FPO está relacionada com a sua maturidade e com a qualidade do oócito (GASTAL et al., 2006; GINTHER et al., 2007; GASTAL; GASTAL, 2011). O crescimento folicular, seleção, dominância, ovulação ou atresia estão intimamente associados com as mudanças no fornecimento de sangue para o folículo. Então, a ultrassonografia Doppler é uma ferramenta que pode ajudar a esclarecer as variações de irrigação e fluxo sanguíneo durante esses processos (MATSUI e MIYAMOTO, 2009; AYRES; MINGOTI, 2012).

Assim como os folículos, o CL é uma estrutura ovariana que também pode ser analisada por ultrassonografia Doppler, sendo esta uma das estruturas mais vascularizadas do organismo, composta por um grande número de células endoteliais vasculares que são responsáveis por até 50% da composição do CL e por células luteais esteroideogênicas grandes e pequenas, que constituem aproximadamente 30% de todas as células do CL (O'SHEA et al., 1989; LEI et al., 1991). O número de vasos e microcapilares aumenta drasticamente a partir do início de fase luteínica (BAUER et al., 2003; HOJO et al., 2009; SHIRASUNA

et al., 2010) indicando angiogênese ativa por vários dias após a ovulação (WILTBANK et al., 1988; GAYTAN et al., 1999).

O fluxo sanguíneo do CL parece estar mais correlacionado com a concentração plasmática de P4 em relação ao tamanho da estrutura (ACOSTA et al., 2003; SCHAMS e BERISHA, 2004; MIYAMOTO et al., 2005), sendo que em éguas e vacas ocorrem fortes correlações entre o fluxo sanguíneo do CL e a concentração plasmática de P4 (BOLLWEIN et al., 2002; GINTHER et al., 2007, HERZOG, 2010).

Em búfalas o fluxo sanguíneo do CL (DISKIN e MORRIS, 2008) também se mostrou mais promissor que o seu diâmetro (FOLMAN et al., 1973) para indicar a produção de P4, revelando uma estreita correlação entre o fluxo sanguíneo do CL e a concentração de P4, sendo este suprimento sanguíneo responsável pelo fornecimento de precursores de esteroides e gonadotrofinas ao CL (JANSON et al., 1981; ACOSTA et al., 2004; AYRES e MINGOTI, 2012).

Em vacas, caso o conceito não esteja presente no útero entre os dias 14 e 17, ocorre a liberação de PGF2 α , iniciando-se a luteólise com queda das concentrações plasmáticas de P4 (BINELLI et al., 2001). Em uma pesquisa de Ginther et al. (2007), onde foram estudadas luteólises espontâneas e induzidas em vacas de leite, foi observado que inicialmente ocorre um aumento significativo do fluxo sanguíneo no início do processo para depois iniciar a redução da irrigação do CL. Shirasuna et al. (2004) observaram uma diminuição da concentração plasmática de P4 um dia antes de ocorrer a redução da vascularização do CL.

Herzog et al., (2011) ao compararem vacas gestantes e vacas vazias, encontraram um fluxo sanguíneo do CL significativamente maior em vacas prenhes em relação a vacas vazias 15 dias ($2,00 \pm 0,34 \text{ cm}^2$ vs $2,50 \pm 0,15 \text{ cm}^2$, respectivamente) e 18 dias após a ovulação ($2,05 \pm 0,39 \text{ cm}^2$ vs $2,40 \pm 0,13 \text{ cm}^2$, respectivamente), assim como a concentração de P4 foi maior em vacas prenhez em relação a vacas vazias, demonstrando a importância da vascularização do CL e produção P4 no diestro precoce para a manutenção da gestação.

Estudos mais recentes mostram que não há somente correlação entre a irrigação do CL com a concentração de P4, mas que também há alta correlação

entre o diâmetro e a irrigação do FPO, com o diâmetro e a irrigação do CL, consequentemente com a concentração plasmática de P4 e a manutenção da gestação (TARSO et al., 2015; TARSO et al., 2016).

A quantificação do fluxo sanguíneo do folículo tem sido realizada em bovinos e equinos, avaliando a porcentagem da circunferência da parede do folículo com sinais de fluxo de sangue, assim como o fluxo sanguíneo luteínico foi quantificado em números de pixel coloridos (SILVA et al., 2006; HERZOG e GINTHER, 2007; BOLLWEIN, 2007; SIDDIQUI et al., 2009). Embora muitos estudos foram realizados com ultrassonografia Doppler na década passada, existe ainda um enorme leque de informações para serem estudadas sobre alterações da vascularização da parede do folículo e do CL em fêmeas bubalinas.

2.4. Termografia por infravermelho

A termografia digital por infravermelho (TDPI) é baseada na lei da radiação, em que todos os corpos com temperatura acima de -273°C emitem radiação infravermelha, variando sua frequência eletromagnética de acordo com a temperatura irradiada. (RICARTE et al., 2014).

No espectro eletromagnético, o infravermelho está localizado entre as ondas de rádio e luz visível e, como todas as radiações eletromagnéticas, é caracterizada por seu comprimento de onda e intensidade. O comprimento de onda da radiação emitida está intimamente relacionado com a temperatura da fonte: quanto maior a temperatura, mais rápida será a vibração dos seus átomos, e, portanto, o comprimento de onda mais curto do que resulta desta vibração. A câmera de infravermelho detecta estas radiações, analisa os seus comprimentos de onda e converte essas informações em uma imagem chamada termograma, onde as regiões mais frias são representadas em azul e as mais quentes em vermelho (SPEAKMAN e WARD, 1998).

A TDPI é uma técnica não invasiva que pode ser utilizada para detectar os gradientes de temperatura simétricos e assimétricos de áreas de superfície. A superfície da pele atua como um sistema de arrefecimento que irradia calor (PUROHIT et al., 1985) permitindo medida exata de gradientes de temperatura,

através de imagem térmica. Alterações do fluxo sanguíneo e a vascularização de tecidos podem alterar a temperatura da superfície da pele. Sob condições fisiológicas, o corpo mantém uma temperatura constante; por conseguinte, as alterações na temperatura são facilmente reconhecidas e detectadas por TDPI e podem proporcionar um meio para a detecção e monitorização de eventos fisiológicos normais e anormais (PUROHIT et al., 1985).

A radiação medida por uma câmara de infravermelhos não depende apenas da temperatura do objeto, mas é também uma função da emissividade. A emissividade é, de um modo geral, a capacidade relativa de um dado material de emitir energia de radiação em comparação com um emissor teoricamente perfeito, que varia de 0 a um. Um emissor é chamado corpo negro perfeito e tem um valor de emissividade um, enquanto que um corpo regular que emite apenas 60% da quantidade teórica de energia infravermelha tem um valor de emissividade de 0,6. O valor de emissividade de um objeto é influenciado pelo material, a condição da superfície, a sua refletividade e a sua opacidade. Uma vez que esta variável pode influenciar significativamente as medições de temperatura, a emissividade do objeto em estudo deve ser sempre levada em conta para obter resultados precisos (WILLIAMSON CORP, 2008).

Atualmente, a TDPI é utilizada experimentalmente para monitorar e elucidar as trocas de calor dos animais com o ambiente, estudar a termorregulação escrotal em ruminantes (KASTELIC et al., 1996; RUEDIGER et al., 2016), mastites em vacas de leite (COLAK et al., 2008) analisar alterações no sistema locomotor de equinos (ALSAAOD e BÜSCHER, 2012) e ruminantes (STEWART et al., 2010). Também tem sido relatado que a TDPI, pode ser utilizada para detectar alterações nas temperaturas vulvares entre estro e diestro em porcas (SCOLARI et al., 2011; SYKES et al., 2012) e em ovelhas (GEORGE et al., 2014).

Como sabe-se as búfalas possuem características fisiológicas que dificultam a visualização do estro (SINGH et al, 2000), dessa maneira foi implementada a IATF buscando melhora nos resultados reprodutivos. A expressão do estro anterior ao momento da IA em vacas submetidas a protocolos de IATF é desejada, uma vez que eleva a taxa de prenhez (SÁ FILHO,

2010). Desta maneira, alguns métodos, como a observação do cio, utilização de rufiões e marcação com bastões de tinta podem ser utilizados para auxiliar na detecção do estro. Contudo, os desenvolvimentos de técnicas para prever com precisão a expressão do estro em condições de campo são de especial valor. Isto permitirá uma IA mais precisa, um aumento na taxa de fecundação, e também uma diminuição do número de IA por animal (ROELOFS et al., 2005; HOCKEY et al., 2010; SIMÕES et al., 2014).

Em marrãs, observou-se variações do fluxo sanguíneo da vulva durante o ciclo estral. Esta variação do fluxo sanguíneo pode gerar alterações da temperatura da superfície dessa região que podem ser estudadas para auxiliar na detecção do estro e do momento da IA (FRANDSON et al., 2003).

Diferentes técnicas foram utilizadas para medir as alterações na temperatura do corpo durante o estro (CLAPPER et al., 1990; MOSHER et al., 1990; REDDEN et al., 1993; KYLE et al., 1998; FISHER et al., 2008). No entanto, estas técnicas necessitavam da imobilização dos animais para medir a temperatura vaginal utilizando implantes invasivos que poderiam causar desconforto e estresse para os animais, alterando a real temperatura do corpo (TALUKDER et al., 2014).

Com base nos resultados de Scolari et al. (2011) especula-se que o aumento na temperatura da superfície da vulva ocorre devido à elevação das concentrações de estrogênio durante o estro. As concentrações elevadas de estrogênio são responsáveis por alterações vasculares, como o aumento do fluxo sanguíneo, que ocorrem nos tecidos vaginais e vulvares, podendo causar um aumento da temperatura da superfície vulvar durante o estro.

No estudo de Talukder et al. (2014), a elevação e redução da temperatura da superfície vulvar notadas em vacas durante a fase lútea (72 horas antes da ovulação) e pré-estro (48 horas antes da ovulação) podem corresponder as altas e baixas concentrações plasmáticas de P4. Embora as temperaturas superficiais da vulva e da mufla aumentem significativamente um dia antes da ovulação, as concentrações de P4 não apresentaram diferenças significativas nestes dias.

A cabeça, o olho e a porção posterior da orelha são relatadas como regiões do corpo promissoras para aferição da temperatura por infravermelho,

sendo mais suscetíveis a captura de dados regulares (HOFFMANN et al., 2013). Consequentemente, diferentes regiões do corpo devem ser avaliadas para determinar o seu potencial em detectar o estro e a ovulação em vacas leiteiras (TALUKDER et al., 2014). O mesmo é demonstrado em búfalas durante estudos termográficos do olho, flanco e orelhas correlacionando-se positivamente com a temperatura retal e com as variações climáticas (BARROS et al., 2016; SEVEGNANI et al., 2016), demonstrando potencial da aplicação da técnica em futuros trabalhos de monitoramento da temperatura da superfície da vulva durante o ciclo estral nesta espécie.

A utilização da TDPI como preditor da ovulação parece promissor. Com a redução do preço das câmeras de infravermelhos digitais e a realização de estudos na área, esta tecnologia poderá ser utilizada como método auxiliar na detecção do estro (SCOLARI et al., 2011; RICARTE et al., 2014).

O comprimento do ciclo estral, juntamente com gradientes de temperatura da vulva precisam ser mapeados ao longo de ciclos contínuos para avaliar a uniformidade. Estas temperaturas devem ser correlacionadas com as concentrações plasmáticas de estrogênio e de P4 para proporcionar uma melhor compreensão do aumento da temperatura vulvar em relação ao início do estro (SYKES et al., 2012).

A temperatura da superfície de um animal pode variar em processos fisiológicos, inflamatórios e oncológicos, devido as variações na perfusão sanguínea dos tecidos, assim como podem sofrer interferência da temperatura ambiente, do fluxo de ar, da umidade relativa do ar, radiação infravermelha e detritos sob a superfície (CRAVELLO e FERRI, 2008; RICARTE et al., 2014). A temperatura ambiente ideal sugerida para a obtenção de imagens térmicas a superfície da pele é cerca de 20°C, mas uma temperatura abaixo de 30°C é aceitável (SYKES et al., 2012).

3. HIPÓTESES

O tratamento com eCG modifica a morfologia e a vascularização folicular e do CL, resultando em um incremento na concentração plasmática de progesterona.

A temperatura da superfície da vulva e das áreas do corpo obtidas por TDPI aumentam no período pré-ovulatório, voltando a concentrações mais baixas após a ovulação. O aumento da temperatura da superfície vulvar pode ocorrer devido a variações nas concentrações hormonais de estradiol e progesterona, podendo ser utilizado para avaliar a expressão do estro no omento da IA em protocolos de IATF.

A variação climática pode afetar a aferição da temperatura da superfície da vulva, olho e mufla realizadas à campo por TDPI.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

4.1.1. Avaliar o efeito da eCG sobre os aspectos morfológicos e vascularização dos folículos e corpos lúteos, assim como sobre a concentração plasmática de progesterona em búfalas Murrah submetidas a protocolo hormonal para sincronização da ovulação.

4.1.2. Caracterizar as variações na temperatura da superfície vulvar e corporal relacionadas à concentração plasmática de progesterona antes e após a ovulação em búfalas Murrah submetidas a protocolo hormonal para sincronização da ovulação e a influência do clima sobre as temperaturas obtidas.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Analisar a morfologia dos folículos e do CL em búfalas Murrah por meio de ultrassonografia durante protocolo hormonal com e sem eCG.

4.2.2. Avaliar a vascularização da parede do folículo até o momento da ovulação e do CL durante a luteogênese e luteólise por ultrassonografia Doppler em búfalas Murrah durante o protocolo hormonal com e sem eCG.

4.2.3. Determinar as variações da temperatura vulvar e corpórea por meio de TDPI, durante o desenvolvimento folicular, ovulação, luteogênese e luteólise em búfalas Murrah submetidas a protocolo hormonal para sincronização da ovulação.

4.2.4. Analisar o efeito do clima sobre as temperaturas obtidas por TDPI.

4.2.5. Avaliar as concentrações hormonais de progesterona e cortisol de búfalas Murrah durante o período experimental.

4.2.6. Correlacionar os dados obtidos por ultrassonografia Doppler, TDPI e concentrações hormonais obtidos durante o experimento.

REFERÊNCIAS¹

ABISOGUN, A. O.; DAPHNA-IKEN, D.; REICH, R.; KRANZFELDER, D.; TSAFRIRI, A. Modulatory role of eicosanoids in vascular changes during the preovulatory period in the rat. **Biology of Reproduction**, v.38, p.756–762, 1988.

ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. **Journal of Reproduction and Development**, v.51, p.273–280, 2005.

ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**, v.125, p.759-767, 2003.

ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p.127–140, 2004.

ACOSTA, T. J.; YOSHIZAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F₂ α injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v.66, p.651–658, 2002.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.96, p.627-640, 1992.

ALI, A.; ABDEL-RAZEK, A. K.; BDEL-GHAFFAR, S. A.; GLATZEL, P. S. Ovarian Follicular Dynamics in Buffalo Cows (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38. p.214–218, 2003.

ALSAAOD, M.; BÜSCHER, W. Detection of hoof lesions using digital infrared thermography in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.95, p.735–742, 2012.

ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B.; BRUNO, J. B.; PINHO LOPES, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. **Zygote**, v.13, p.1-10, 2011.

AYRES, H.; MINGOTI, G.Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, p.174-180, 2012.

BARILE, V. L. Improving reproductive efficiency in female buffaloes. **Livestock Production Science**, v.92, p.183–194, 2005.

BARILE, V. L. Technologies related with the artificial insemination in buffalo. **Journal of Buffalo Science**, v.1, p.139-146, 2012.

¹Referências organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BARILE, V. L.; TERZANO, G.M.; ALLEGRINI, S.; MASCHIO, M.; RAZZANO, M.; NEGLIA, G.; PACELLI, C. Relationship among preovulatory follicle, corpus luteum and progesterone in oestrus synchronized buffaloes. *Ital. Journal of Animal Science*, v.6, p.663-666, 2007.

BARKAWI, A. H.; HAFEZ, Y. M.; IBRAHIM S. A.; ASHOUR, G.; EL-ASHEERI, A. K.; GHANEM, N. Characteristics of ovarian follicular dynamics throughout the estrous cycle of Egyptian buffaloes. *Animal Reproduction Science*, v.110, p.326–334, 2009.

BARROS, D.V.; L. K. X. SILVA, P. R. KAHWAGE, J. B. LOURENÇO JÚNIOR, J. S. SOUSA, A. G. M. SILVA, I. M. FRANCO, MARTORANO, L. G.; GARCIA, A. R. Assessment of surface temperatures of buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) raised under tropical conditions using infrared thermography. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.68, p.422-430, 2016.

BARUSELLI, P.S.; MUCCIOLO, R.G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRA, C. A.; MOLERO FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.47, p.1531–1547, 1997.

BARUSELLI, P. S.; BERNANDES, O.; BARUFI, F. B.; BRAGA, D.; ARAUJO, D.; TONATHI, H. Calving distribution throughout the year in buffalo raised all over Brazil. In: **Proceedings of the 6th World Buffalo Congress; Book of the Congress**, p. 234–40, 2001.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. Reproduction Management and artificial insemination in buffalo. **Proceedings of 1 Buffalo Symposium of Americas**, Belém, PA, v.1, p.119-143, 2002.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; HENRIQUEZ, C. H. P.; AMARAL, R.; NICHI, M. Synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in the buffalo. **Proceedings of 1th Buffalo Symposium of Americas**. Belém, p. 418-420, 2002.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; BERBER, R. C. A. Evaluation of synchronization of ovulation for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.431-442, 2003.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; GIMENES, L. U.; CREPALDI, G. A. Fixed-time artificial insemination in buffalo. **Italian Journal of Animal Science**, v.6, p.107-118, 2007.

BARUSELLI, P. S.; SOARES, J. G.; GIMENES, L. U.; MONTEIRO, B. M.; OLAZARRI, M. J.; CARVALHO, N. A. T. Control of Buffalo Follicular Dynamics for Artificial Insemination, Superovulation and *In Vitro* Embryo Production. **Buffalo Bulletin**, v.32, n.1, p.160-176, 2013.

BAUER, M.; SCHILLING, N.; SPANEL-BOROWSKI, K. Development and regression of non-capillary vessels in the bovine corpus luteum. **Cell Tissue and Research**, v.311, p.199–205, 2003.

BERBER, R. C. A.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Comparison of two ovsynch protocols (GnRH vs. LH) for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.57, p.1421-1430, 2002.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.293-298, 2007.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Anti-luteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1451-1463, 2001.

BITTMAN, E. L.; KARSCH, F. J. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day lengths in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.30, p.585–593, 1984.

BOLLWEIN H.; MAYER, R.; WEBER, F.; STOLLA, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v.57, p. 2043–2051, 2002.

BRITO, L. F.; SATRAPA, R.; MARSON, E. P.; KASTELIC, J. P. Efficacy of PGF(2alpha) to synchronize estrus in water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) is dependent upon plasma progesterone concentration, corpus luteum size and ovarian follicular status before treatment. **Animal Reproduction Science**, v.73, p.23–35, 2002.

CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; SENATORE, E. M.; BELLA, A. Pregnancy rates following AI with sexed semen in Mediterranean Italian buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.76, p.500-506, 2011.

CAMPANILE, G.; NEGLIA, G. Embryonic mortality in buffalo cows Italian. **Journal of Animal Science**, v.6, p.119-129, 2010.

CAMPANILE, G.; NEGLIA, G.; D'OCCHIO M. J. Embryonic and foetal loss in River buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.86, p.207-213, 2016.

CARVALHO, C. F.; CHAMMAS, M. C.; CERRIL, G. G. Princípios físicos do Doppler em ultra-sonografia. **Ciência Rural**, v.38, n.3, 2008.

CARVALHO, N. A T.; SOARES, J. G.; PORTO FILHO, R. M.; GIMENES, L. U.; SOUZA, D. C.; NICHI, M.; SALES, J. S.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season. **Theriogenology**, p. 423–428, 2013a.

CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; REIS, E. L.; VANNUCCI, F. S.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Use of Different Progestagens for Ovulation Synchronization and TAI in Buffaloes during the Non Breeding Season. **Buffalo Bulletin**, v.32, p.527-531, 2013b.

CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; SOUZA, D. C.; MAIO, J. R. G.; SALES, J. N. S.; MARTINS, B. J. Ovulation synchronization with EB or GnRH in buffalo TAI during the non breeding season. **Animal Reproduction**, v.9, p.523, 2012.

CIRIT, Ü.; AK, K.; ILERI, I. K. New strategies to improve the efficiency of the Ovsynch protocol in primiparous dairy cows. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.51, p.47-51, 2007.

CLAPPER, J. A.; OTTOBRE, J. S.; OTTOBRE, A. C.; ZARTMAN, D. L. Estrual rise in body temperature in the bovine I. Temporal relationships with serum patterns of reproductive hormones. **Animal Reproduction Science**, v.23, p.89–98, 1990.

COLAK, A.; POLAT, B.; OKUMUS, Z.; KAYA, M.; YANMAZ, L. E.; HAYIRLI, A. Short communication: early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.4244–4248, 2008.

CRAVELLO, B.; FERRI, A. Relationships between skin properties and environmental parameters. **Skin Research Technology**, v.14, p.180–186, 2008.

DADARWAL, D.; MAPLETOFT, R. J.; ADAMS, G. P.; PFEIFER, L. F. M.; CREELMAN, C.; SINGH, J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v.79, p.859-866, 2013.

DE RENSIS, F.; RONCI, G.; GUARNERI, P.; NGUYEN, B. X.; PRESICCE, G. A.; HUSZENICZA, G. Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.63, p.1824-1831, 2005.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D.G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, Suppl 2, p.260–267, 2008.

DROST, M. Bubaline versus bovine reproduction. **Theriogenology**, v. 68, p. 447–449, 2007.

DROST, M.; CRIPE, W. S.; RICHTER, A. R. Oestrus detection in buffaloes (*Bubalus bubalis*): use of an androgenized female. **Buffalo Bulletin Journal**, v.1, p.159–161, 1985.

FERREIRA, J. C.; FERNANDA SAULES IGNÁCIO, F.C.; MEIRA, C.. Doppler ultrasonography principles and methods of evaluation of the reproductive tract in mares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p.105 – 111, 2011.

FISHER, A. D.; MORTON, R.; DEMPSEY, J. M.; HENSHALL, J. M.; HILL, J. R. Evaluation of a new approach for the estimation of the time of the LH surge in dairy cows using vaginal temperature and electrodeless conductivity measurements. **Theriogenology**, v.70, p.1065–1074, 2008.

FITZ, T. A.; MAYAN, M. H.; SAWYER, H. R.; NISWENDER, G. D. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.27, p.703, 1982.

FOLMAN, Y.; ROSENBERG, M.; HERZ, Z.; DAVIDSON, M. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in post-partum dairy cows maintained on two levels of nutrition. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.34, p.267–278, 1973.

FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. **Anatomy of the female reproductive system**. In: Anatomy and Physiology of Farm Animals, Troy D (Ed.), Lippincott Williams and Wilkins, 2003, pp. 394.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O. Equine preovulatory follicle: blood flow changes, prediction of ovulation and fertility. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v.35, p.239–252, 2011.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction**, v.131, p.699–709, 2006.

GAYTAN, F.; MORALES, C.; GARCIA-PARDO, L.; REYMUNDO, C.; BELLIDO, C.; SANCHEZ-CRIADO, J. E. A quantitative study of changes in the human corpus luteum microvasculature during the menstrual cycle. **Biology of Reproduction**, v.60, p.914–919, 1999.

GEORGE, W. D.; GODFREY, R.W.; KETRING, R. C.; VINSON, M. C.; WILLARD, S. T. Relationship among eye and muzzle temperatures measured using digital infrared thermal imaging and vaginal and rectal temperatures in hair sheep and cattle. **Journal of Animal Science**, v.92, p.4949–4955, 2014.

GERDES, L.; WERNER, J. C.; COLOZZA, M. T.; CARVALHO, D. D. DE; SCHAMMASS, E. A. Avaliação de características agrônômicas e morfológicas das gramíneas forrageiras Marandu, Setária e Tanzânia aos 35 dias de crescimento nas estações do ano 1 evaluation of agronomic and morphologic characteristics of the Grasses Brachiaria brizantha cv. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 947–954, 2000.

GIMENES, L. U., SÁ FILHO, M. F., CARVALHO, N. A. T., VANUCCI, F. S., REICHERT, R. H., SARTORELLI, E. S., BARROS, C. M., BARUSELLI, P. S. Ultrasonographic and endocrine aspects of follicle deviation, and acquisition of ovulatory capacity in buffalo (Bubalus bubalis) heifers. **Animal Reproduction Science**, v.123, p. 175–179, 2011.

GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v.81, p.112–125, 2014.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-Doppler ultrasonography**, Book 4. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing; 2007.

GINTHER, O. J.; SILVA, L. A.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂α, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.76, p.506–513, 2007.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; CHECURA, C. M.; BEG, M. A. Dose response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor-1 on follicular-fluid factors and follicle dominance in mares. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1063-1069, 2004.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, p.516–526, 2004.

GLATZEL, P. S.; ALI, A.; GILLES, M.; FIDELAK, C.: Feststellung der Fruchtbarkeit bei 30 Wasserbüffeln. TU 6, 329–332. Ireland JJ, Coulson PB, Murphree RL, 1979: Follicular development during four stages of the oestrous cycle of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.49, p.1261–1269, 2000.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; NAVANUKRA, W. C.; JOHNSON, M. L.; VONNAHME, K. A.; FORD, S. P.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. **Journal of Animal Science**, v.85, p.1914-1922, 2007.

HAIDER, M.S.; HASSAN, M.; KHAN, A. S.; HUSNAIN, A.; BILAL, M.; PURSLEY, J.R.; AHMAD, N. Effect of timing of insemination after CIDR removal with or without GnRH on pregnancy rates in Nili-Ravi buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 24-29, 2015.

HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Application of doppler ultrasonography in cattle reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.51–58, 2007.

HERZOG, K.; BROCKHAN-LÜDEMANN, M.; KASKE, M.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v.73, p.691–697, 2010.

HERZOG, K.; VOSSA, C.; KASTELIC, J. P.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.75, p.549–554, 2011.

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. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.107–117, 2010.

HOFFMANN, G.; SCHMIDT, M.; AMMON, C.; ROSE-MEIERHÖFER, S.; URFEIND, O.; HEUWIESER, W. Monitoring the body temperature of cows and calves using video recordings from an infrared thermography camera. **Veterinary Research Communications**, v.37, p.91–99, 2013.

HOJO, T.; AL-ZI'ABI, M. O.; SKARZYNSKI, D. J.; ACOSTA, T. J.; OKUDA, K. Changes in the vasculature of bovine corpus luteum during the estrous cycle and prostaglandin F₂α-induced luteolysis. **Journal of Reproduction and Development**, v.55, p.512–517, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Pecuária Municipal: Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 04 abril 2017.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. **Cattle and buffalo**. In: Hafez ESE, editor. *Reproduction in farm animals*. 6th ed., Philadelphia: Lea and Febiger; 1993. p. 315–29.

JANSON, P. O.; DAMBER, J. E.; AXEN, C. Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.63, p.491–497, 1981.

JIANG, J.; MACCHIARELLI, G.; TSANG, B.; SATO, E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. **Reproduction**, v.125, p.211–223, 2003.

JORGE, A. M.; ANDRIGHETTO, C.; MILLIEN, D. C.; CALIXTO, M. G.; VARGAS, A. D. F. Desempenho e eficiência biológica de bubalinos de três grupos genéticos terminados em confinamento e abatidos em diferentes estádios de maturidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 252-257, 2006.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H.; WALLINS, G. L.; ENTZ, T. Environmental factors affecting measurement of bovine scrotal surface temperature with infrared thermography. **Animal Reproduction Science**, v.41, p.153-159, 1996.

KUMAR, P. R.; SINGH, S. K.; KHARCHE, S. D.; GOVINDARAJU, C. S.; BEHERA, B. K.; SHUKLA, S. N.; KUMAR, H.; AGARWAL, S. K. Anestrus in cattle and buffalo: Indian perspective. **Advance in Animal and Veterinary Science**., v.2, n.3, p.124-138, 2014.

KYLE, B. L.; KENNEDY, A. D.; SMALL, J. A. Measurement of vaginal temperature by radiotelemetry for the prediction of estrus in beef cows. **Theriogenology**, v.49, p.1437–1449, 1998.

LEI, Z. M.; CHEGINI, N.; RAO, C. V. Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. **Biology of Reproduction**, v. 44, p.1148–1156, 1991.

MACCHIARELLI, G.; JIANG, J. Y.; NOTTOLA, S. A.; SATO, E. Morphological patterns of angiogenesis in ovarian follicle capillary networks. A scanning electron microscopy study of corrosion cast. **Microscopy Research and Technique**, v.69, p.459-468, 2006.

MALHADO, C. H. M.; RAMOS, A. A.; CARNEIRO, P. L. S.; SOUZA, J. C.; PICCININ, A. Parâmetros e tendências da produção de leite em bubalinos da raça Murrah no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 376-379, 2007.

MARIANTE, A. S.; MCMANUS, C.; MENDONÇA, J. F.; Country report on the state of animal genetic resources. **Embrapa/Genetic Resources and Biotechnology**, p. 121, 2003.

MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de Estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. In: **Simpósio Internacional de Reproducción Animal**, Córdoba, Argentina, p. 392, 2003.

MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. **The Veterinary Journal**, v.181, p.232–240, 2009.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; ZANNONI, A.; CASTELLANI, G.; BERARDINELLI, P.; SCAPOLO, P. A. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1014-1019, 2001.

MIRMAHMOUDI, R.; PRAKASH, B. S. The endocrine changes, timing of ovulation and efficacy of the Doublesynch protocol in the Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Gen Comp Endocr.**, v.177, p.153-159, 2012.

MIRMAHMOUDI, R.; SOURI, M.; PRAKASH, B. S. Comparison of endocrine changes, timing of ovulations, ovarian follicular growth, and efficacy associated with Estradoublesynch and Heatsynch protocols in Murrah buffalo cows (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 82, p.1012–1020, 2014.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M. P.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T. J. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, p.329–339, 2005.

MOHAN, K.; SARKAR, M.; PRAKASH, B. S. Efficiency of Heatsynch protocol in estrus synchronization, ovulation and conception of dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.22, p.774–780, 2009.

MONTEIRO, B. M.; SOUZA, D. C.; VASCONCELLOS, G. S. F. M.; CORRÊA, T. B.; VECCHIO, D.; SÁ FILHO, M. F. Ovarian responses of dairy buffalo cows to timed artificial insemination protocol, using new or used progesterone devices, during the breeding season (autumn–winter). **Animal Science Journal**, v.87, p.13-20, 2016.

MOREIRA, F. C.; ORLANDI, C. A.; RISCO, C. A.; MATTOS, R.; LOPEZ, F.; THATCHER, W. W. Effects of prepresynchronization and bovine somatotrophin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1646–1659, 2001.

MOSHER, M. D.; OTTOBRE, J. S.; HAIBEL, G. K.; ZARTMAN, D. L. Estrual rise in body temperature in the bovine II. The temporal relationship with ovulation. **Animal Reproduction Science**, v.23, p.99–107, 1990.

MOURA, A.J.D.R. **Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CID-R®) associado a estrógeno e prostaglandina F_{2α} em búfalas (*Bubalus bubalis*) tratadas em estações reprodutivas distintas.** 2003. 127f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MURDOCH, W.; PETERSON, T.; VAN KIRK, E.; VINCENT, D.; INSKEEP, E. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. **Biology of Reproduction**, v.35, p.1187–1194, 1986.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotrophin. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 27-44, 1991

MURUGAVEL, K.; ANTOINE, D.; RAJU, M. S.; LÓPEZ-GATIUS, F. The effect of addition of equine chorionic gonadotropin to a progesterone-based estrous synchronization protocol in buffaloes (*Bubalus bubalis*) under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1120–1126, 2009.

MURUGAVEL, K.; YANIZ, J. L.; SANTOLARIA, P.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-GATIUS, F. Luteal activity at the onset of a timed insemination protocol affects reproductive outcome in early postpartum dairy cows, **Theriogenology**, v.60, p.583–593, 2003.

NASEER, Z.; AHMAD, E.; SINGH, J.; AHMAD, N. Fertility following CIDR based synchronization regimens in anoestrous Nili-Ravi buffaloes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.814–817, 2011.

NEGLIA, G.; NATALE, A.; ESPOSITO, G.; SALZILLO, F.; ADINOLFI, L.; CAMPANILE, G. Effect of prostaglandin F2a at the time of AI on progesterone levels and pregnancy rate in synchronized Italian Mediterranean buffaloes. **Theriogenology**, v.69, p.953-960, 2008.

O'SHEA, J. D.; RODGERS, R. J.; D'OCCHIO, M. J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p.483–487, 1989.

OBA, E. **Tópicos atualizados ligados à reprodução na espécie bubalina. In: Sanidade e Produtividade em Búfalos.** Ed. Por Juan Molero Filho e col. Jaboticabal, FUNEP, p.202, 1993.

OBA, E.; SOUZA, M. I. L. Avanços na reprodução de bovinos e bubalinos. Contribuição ao estudo dos bubalinos: período de 1972-2001: palestras. Botucatu, SP: FMVZ/UNESP, p.541-564, 2003.

OHASHI, O. M. Estrous detection in buffalo cow. **Buffalo Journal**, v.10, p.61-64, 1994.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v. 21, p. 495–504, 1984.

PIETERSE, M. C.; SZENCI, O.; WILLEMSE, A. H.; BAJCSY, C. S.; DIELEMAN, S. J.; TAVERNE, M. A. Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test. **Theriogenology**, v.33, p.697–707, 1990.

PORTO FILHO, R. M. **Sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. p. 100, 2004.

PORTO-FILHO, R.M.; GIMENES, L.U.; MONTEIRO, B.M.; CARVALHO, N.A.T.; GHUMAN, S.P.S.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Detection of estrous behavior in buffalo heifers by radiotelemetry following PGF2 administration during the early or late luteal phase. **Animal Reproduction Science**, v. 144, p.90–94, 2014.

PUROHIT, R. C.; HUDSON, R. S.; RIDDELL, M. G.; CARSON, R. L.; WOLFE, D. F.; WALKER, D. F. Thermography of the bovine scrotum. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.2388–2392, 1985.

REDDEN, K. D.; KENNEDY, A. D.; INGALL, S. J. R.; GILSON, T. L. Detection of estrus by radiotelemetric monitoring of vaginal and ear skin temperature and pedometer measurements of activity. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.713–721, 1993.

RHODES, F. M.; BURKE, C. R.; CLARK, B. A.; DAY, M. L.; MACMILLAN, K. L. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.139-150, 2002.

RICARTE, A. R. F.; FAÇANHA, D. A. E.; COSTA, L. L. M. Possibilidades na utilização da termografia infravermelha no diagnóstico reprodutivo de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, Supl. 2, p. 380-384, 2014.

ROBINSON, R. S.; WOAD, K. J.; HAMMOND, A. J.; LAIRD, M.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Angiogenesis and vascular function in the ovary. **Reproduction**, v.138, p.869-881, 2009.

ROCHE, J. F.; MIHM, M.; DISKIN, M.; IRELAND, J. J. A review of regulation of follicle growth in gattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p.16–29, 1998.

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

ROSSI, P.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; DI PALO, R.; GASPARRINI, B.; D'OCCHIO, M. J. Seasonal fluctuations in the response of Italian Mediterranean buffaloes to synchronization of ovulation and timed artificial insemination. **Theriogenology**, v.82, p.132-137, 2014.

ROY, K. S.; PRAKASH, B. S. Plasma progesterone, oestradiol-17 and total oestrogen profiles in relation to oestrous behaviour during induced ovulation in Murrah buffalo heifers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.93, p.486–495, 2009.

RUEDIGER, F. R.; CHACUR, M. G. M.; ALVES, F. C. P. E.; OBA, E.; RAMOS, A. A. Digital infrared thermography of the scrotum, semen quality, serum

testosterone levels in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) and their correlation with climatic factors. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, p. 221-232, 2016.

RUSO, M.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; PACELLI, C.; PRANDI, A.; GASPARRINI, B. Corpus luteum function and pregnancy outcome in buffaloes during the transition period from breeding to non-breeding season. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.988-991, 2010.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; SILVA, R. C. P.; RODRIGUES, C. A.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v.73, p.651-658, 2010.

SALES, J. N.; CARVALHO, J. B.; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O.; MAIO, J. R.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v.78, p.510–516, 2012.

SALES, J. N.; CREPALDI, G. A.; GIROTTI, R. W.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.12-18, 2011.

SANTIAGO, C. A.; VOGEL, J. L.; AAD, P. Y.; ALLEN, D. T.; STEIN, D. R.; MALAYER, J. R.; SPICER, L. J. Pregnancy associated plasma-protein A and insulin like growth factor binding protein mRNA's in granulosa cells of dominant and subordinate follicles of preovulatory cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.28, p.46–63, 2005.

SAVIO, J. D., KEENAN, L., BOLAND, M. P., ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, p. 663-671, 1988.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, New, v.39, p.241-251, 2004.

SCOLARI, S. C.; CLARK, S. G.; KNOX, R. V. Vulvar skin temperature changes significantly during estrus in swine as determined by digital infrared thermography. **Journal of Swine Health and Production**, Iowa, v.19, p.151–155, 2011.

SENATORE, E.; SANTIS G.; BARILE V. L.; STECCO, R.; DE MAURO, G. J.; TERZANO, G. M.; PRESICCE, G. A. Corpus luteum measurement, echotexture and plasma progesterone in adult and pre-puberal mediterranean italian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.57, p.792, 2002.

SEVEGNANI, K. B.; FERNANDES, D. P. B.; SILVA, S. H. M. G. Evaluation of thermoregulatory capacity of dairy buffaloes using infrared thermography. **Engenharia Agrícola**, v.36, n.1, p.1-12, 2016

SHIRASUNA, K.; ASAH, T.; SASAKI, M.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Distribution of arteriolo-venous vessels, capillaries and eNOS expression in the bovine corpus luteum during the estrous cycle: a possible implication of different sensitivity by luteal phase to PGF(2 α) in the increase of luteal blood flow. **Journal of Reproduction and Development**, v.56, p.124–130, 2010.

SHIRASUNA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; WATANABE, S.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; OHTANI, M. A blood flow in the corpus luteum acutely increases together with endothelin-1 mRNA expression at early stage of regression during spontaneous luteolysis in the cow. **Biology of Reproduction**, v.71, p.137, 2004.

SIDDIQUI, M. A. R.; ALMAMUN, M.; GINTHER, O. J. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.113, p.287–292, 2009.

SIDDIQUI, M. A.; FERREIRA, J. C.; GASTAL, E. L.; BEG, M. A.; COOPER, D. A.; GINTHER, O. J. Temporal relationships of the LH surge and ovulation to echotexture and power Doppler signals of blood flow in the wall of the preovulatory follicle in heifers. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.1110-1117, 2010.

SILVA, L. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. **Animal Reproduction Science**, Philadelphia, p. 339–346, 2006.

SIMÕES, V. G.; LYAZRHI, F.; PICARD-HAGEN, N.; GAYRARD, V.; MARTINEAU, G. P.; WARET-SZKUTA, A. Variations in the vulvar temperature of sows during proestrus and estrus as determined by infrared thermography and its relation to ovulation. **Theriogenology**, v.82, p.1080-1085, 2014.

SINGH, I.; BALHARA, A. K. New approaches in buffalo artificial insemination programs with special reference to India. **Theriogenology**, 2016; v.86, p.194–199, 2016.

SINGH, J.; NANDA, A. S.; ADAMS, G. P. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.593–604, 2000.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A.; SILVA, F. F.; ARAÚJO, R.; BÓ, G. A.; WILTBANK, M. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v.72, p.10-21, 2009.

SPEAKMAN, J. R.; WARD, S. Infrared thermography: principles and applications. **Zoology**, v.101, p.224-232, 1998.

STEWART, M.; WEBSTER, J. R.; STAFFORD, K. J.; SCHAEFER, A. L.; VERKERK, G. A. Technical note: Effects of an epinephrine infusion on eye temperature and heart rate variability in bull calves. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5252-5257, 2010.

SYKES, D. J.; COUVILLION, J. S.; CROMIAK, A.; BOWERS, S.; SCHENCK, E.; CRENSHAW, M. The use of digital infrared thermal imaging to detect estrus in gilts. **Theriogenology**, v.78, p.147–152, 2012.

TALUKDER, S.; KERRISK, K. L.; INGENHOFF, L.; THOMSON, P. C.; GARCIA, S. C.; CELIA, P. Infrared technology for estrus detection and as a predictor of time of ovulation in dairy cows in a pasture-based system. **Theriogenology**, v.81, p.925–935, 2014.

TANEJA, M.; ALI, A.; SINGH, G. Ovarian follicular dynamics in water buffalo. **Theriogenology**, v.46, p.121–130, 1996.

TARSO S. G. S.; GASTAL, G. D. A.; BASHIR, S. T.; GASTAL, M. O.; APGAR, G. A.; GASTAL, E. L. Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 448-457, 2015.

TARSO, S. G. S.; APGAR, G.A.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Relationships between follicle and corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in beef cows and heifers: preliminary results. **Animal Reproduction**, v.13, p.81 -92, 2016.

VALE, W. G. Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução. Campinas, Fundação Cargil. 86p., 1988.

VALE, W. G. Reproducción en hembras bufalinas: inseminación artificial y reproducción asistida **Tecnología en Marcha**, vol.24, p.5-18, 2011.

VARGA, B.; HORVATH, E.; FOLLY, G.; STARK, E. Study of the luteinizing hormone-induced increase of ovarian blood flow during the estrous cycle in the rat. **Biology of Reproduction**, v.32, p.480–488. 1985.

VARUGHESE, E. E.; BRAR, P. S.; HONPARKHE, M.; GHUMAN, S. P. S. Correlation of Blood Flow of the Preovulatory Follicle to its Diameter and Endocrine Profile in Dairy Buffalo **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.140–144, 2014.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v.56, p.307–314, 2001.

VECCHIO, D.; ROSSI, P.; NEGLIA, G.; LONGOBARDI, V.; SALZANO, A.; BIFULCO, G. Comparison of two synchronization protocols for timed artificial insemination in acyclic Italian Mediterranean Buffalo cows out of the breeding season. **Proceedings of the 10th World Buffalo Congress**, Phuket Thailand. May 6–8, p. 42, 2013.

WILLIAMSON CORP (2008). Infrared energy, emissivity, reflection & transmission. Disponível em: <http://www.deltat.com/pdf/Infrared%20Energy,%20Emissivity,%20Reflection%20%26%20Transmission.pdf> Acesso em: Março, 30, 2016.

WILTBANK, M. C.; DYSKO, R. C.; GALLAGHER, K. P.; KEYES, P. L. Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.84, p.513-520, 1988.

ZAABEL, S. M.; HEGA, A. O.; MONTASSER, A. E.; EL-SHEIKH, H. Reproductive performance of anestrous buffaloes treated with CIDR. **Animal Reproduction**, v.6, p.460-464, 2009.

ZICARELLI, L. Reproductive seasonality in buffalo. In: **Proceedings, Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes**, Caserta, Italy. October 6–10, p. 29–52, 1997.

Capítulo 1

Efeito da eCG sobre a vascularização folicular e luteínica e produção de progesterona em búfalas Murrah submetidas a sincronização da ovulação

(Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, fator de impacto JCR: 1,838. Disponível em: <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>).

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da gonadotrofina coriônica equina (eCG) sobre a vascularização das estruturas ovarianas e a concentração plasmática de progesterona (P4) em búfalas Murrah durante protocolo hormonal para sincronização da ovulação. Foram utilizadas 20 búfalas, divididas em dois grupos, com eCG (eCG, n=20) e sem eCG (controle, n =20), em delineamento *crossover*. Foi realizada inserção do dispositivo intravaginal de P4 (DIB) e aplicação de benzoato de estradiol no dia 0; remoção do DIB, aplicação de PGF2 α em todos animais e de eCG na metade dos animais no dia 9 (D9) e administração de análogo de GnRH no dia 11. Após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 no D9, foi realizada ultrassonografia Doppler diariamente até o dia 16, e depois nos dias 20, 24, 28 e 32, visando avaliar o desenvolvimento e irrigação folicular e do corpo lúteo (CL). Previamente as ultrassonografias foram colhidas amostras de sangue para análise da concentração plasmática de P4. A ovulação ocorreu no dia $13,42 \pm 1,17$ no grupo eCG e $13,53 \pm 0,19$ no grupo controle ($P = 0,34$), e a taxa de ovulação foi superior no grupo eCG (95%) em relação ao grupo controle (70%). O grupo eCG apresentou maior perímetro irrigado dos folículos nos dias 11 ($P = 0,018$) e 12 ($P = 0,03$), o CL apresentou maior diâmetro no dia 16 ($P < 0,001$) e maior área irrigada nos dias 14 ($P = 0,008$), 15 ($P = 0,005$), 16 ($P = 0,004$), 20 ($P = 0,003$) e 24 ($P = 0,022$) e produção de P4 nos dias 15 ($P = 0,042$), 16 ($P = 0,048$), 20 ($P = 0,005$) e 24 ($P = 0,006$). Foi observada correlação positiva entre o tamanho ($r=0,52$, $p<0,001$) e irrigação ($r=0,75$, $p<0,001$) do CL com a concentração plasmática de P4, assim como entre o diâmetro do folículo e diâmetro do CL (r

= 0,54, $P = 0,004$), diâmetro do folículo e área irrigada do CL ($r = 0,55$, $P = 0,032$), perímetro irrigado do folículo e diâmetro do folículo ($r=0,78$, $p = 0,001$) perímetro irrigado do folículo e área irrigada do CL ($r = 0,64$, $P = 0,004$) e entre a concentração plasmática de P4 e o diâmetro do folículo ($r = 0,35$, $P = 0,029$) e o perímetro irrigado do folículo ($r = 0,59$, $p = 0,004$), sendo que em ambos os casos a irrigação apresentou maior correlação comparada ao tamanho. Conclui-se que a utilização de eCG durante protocolo hormonal em búfalas Murrah, favorece a irrigação folicular e luteínica e ovulação, induzindo incremento nas concentrações plasmáticas de P4, sendo indicada esta prática visando melhores taxas reprodutivas nos rebanhos.

Palavras-chave: Ultrassonografia Doppler, irrigação sanguínea, ovário, IATF

1 Introdução

A inseminação artificial (IA) é a biotecnologia da reprodução mais difundida nos animais domésticos [1], sendo utilizada na bubalinocultura visando acelerar a seleção genética e melhora dos índices zootécnicos dos rebanhos [2]. Porém, algumas características reprodutivas como hábito sexual noturno em regiões quentes, [3], baixa incidência de comportamento homossexual [4], sazonalidade [5] e duração do estro muito variável [6, 7], dificultam sua implementação. Dessa maneira, estratégias que permitam a otimização da técnica, como a utilização de rufiões [4,8] e a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) devem ser utilizadas [3,9].

Diversos protocolos hormonais buscam controlar as funções luteais e foliculares, possibilitando a sincronização do crescimento folicular e da ovulação permitindo assim o emprego da IATF em búfalas [9-14].

O Ovsynch, um dos protocolos mais utilizados em IATF de búfalas [15,16], bem como o Doublesynch [17], Heatsynch [18], Estradoublesynch [19] dependem da presença de um

folículo dominante (FD) no momento da primeira aplicação de GnRH, e de corpo lúteo no momento da administração de PGF2 α , apontando bons resultados durante a estação reprodutiva favorável. Porém, estes protocolos hormonais não apresentam resultados satisfatórios durante a estação reprodutiva desfavorável, devido a deficiência do desenvolvimento folicular neste período, resultando em menor taxa de ovulação [20, 21] e, conseqüentemente de prenhez [22].

Com a finalidade de contornar esses problemas, vêm sendo estudado o efeito da adição da gonadotrofina coriônica equina (eCG) ao protocolo com progesterona (P4) durante a estação reprodutiva favorável e desfavorável, promovendo aumento do diâmetro dos folículos pré-ovulatórios, da taxa de ovulação, do diâmetro dos corpos lúteos resultantes destas ovulações, da concentração plasmática de P4 e da taxa de prenhez [14, 23, 24], viabilizando a desestacionalização das búfalas, reduzindo o intervalo entre partos e aumentando a eficiência reprodutiva e produtiva do rebanho [25], com incremento da produção leiteira durante a entressafra [26 – 29].

Assim, são necessários estudos sobre os efeitos da eCG sobre a irrigação das estruturas ovarianas em búfalas, uma vez que alterações hemodinâmicas estão envolvidas nas remodelações cíclicas do tecido ovariano que ocorrem durante o desenvolvimento folicular, ovulação, luteogênese e luteólise [30 – 32], e são responsáveis pelo suprimento sanguíneo que dará suporte nutricional e precursores indispensáveis para a produção e secreção hormonal [33, 34].

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da eCG sobre a vascularização folicular e luteínica, assim como na concentração de P4 durante protocolo hormonal para a sincronização da ovulação em búfalas Murrah.

2 Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA - 18/2016), sendo realizado de abril a agosto de 2016 no município de Registro/SP aos 23°43' S e aos -47°78' W, com clima subtropical úmido, com inverno seco e verão quente e úmido, apresentando estação chuvosa de outubro a março e seca de abril a setembro.

2.1 Animais

Foram selecionadas 20 búfalas da raça Murrah, pluríparas ($3,6 \pm 3,2$ partos), idade média de $95,15 \pm 48,22$ meses de idade, escore corporal $3,60 \pm 0,37$ (escala de 1 a 5), produção de leite média diária de $6,64 \pm 1,24$ kg e $112,50 \pm 55,50$ dias em lactação.

As búfalas foram mantidas em piquete com pastagem formada por *Brachiaria brizantha* em pastejo rotacionado, com acesso a água, sal mineral bovino *ad libitum* concentrado durante a ordenha.

2.2 Delineamento experimental

O protocolo hormonal utilizado consistiu na inserção de um dispositivo intravaginal liberador de P4 (1,0 g, dispositivo intravaginal, Sincrogest, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil) associado à 2 mg benzoato de estradiol (EB, im, Sincrodiol, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil), em dia aleatório do ciclo estral (D0). Nove dias mais tarde (D9), aplicou-se prostaglandina F2 α (0,150mg, im, d-cloprostenol, Croniben, Biogéneses Bagó, Buenos Aires, Argentina) e 400 UI de eCG (eCG, im, Folligon, MSD Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) nos animais do grupo eCG (n = 20), os animais do grupo controle (n = 20) não receberam eCG, seguida pela aplicação de GnRH (10 μ g de acetato de buserelina, im Sincroforte, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil) no 11° dia (D11). Os protocolos hormonais foram repetidos uma vez, após 30 dias de intervalo, invertendo-se os grupos em delineamento *crossover*. Os exames ultrassonográficos e as

colheitas de sangue foram realizadas diariamente do dia nove (D9) ao dia 16 (D16) e nos dias 20, 24, 28 e 32, conforme a figura 1.

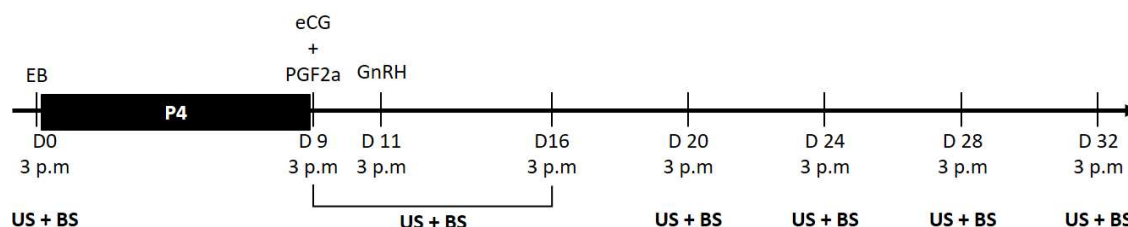


Figura 1- Linha do tempo do protocolo hormonal, com e sem eCG, das ultrassonografias e das colheitas de sangue. Implante intravaginal de progesterona (P4), benzoato de estradiol (EB), gonadotrofina coriônica equina (eCG), prostaglandina F 2 α (PGF2 α), hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), ultrassom (US), colheita de sangue (BS).

2.3 Ultrassonografia

A ultrassonografia transretal foi realizada utilizando-se um transdutor linear de 7,5 MHz (esaote, MyLabTMFIVE, Genova, Itália) sem a necessidade de sedação, visando acompanhar o desenvolvimento folicular, ovulação, luteogênese e luteólise. As estruturas foram examinadas em modo B para avaliação do diâmetro dos folículos dominantes (FD) (média dos diâmetros do eixo longitudinal e transversal), ovulação e diâmetro do CL (média do diâmetro do eixo longitudinal e transversal). A seguir, o ultrassom foi passado para o modo *colour* Doppler, onde então a imagem foi gravada durante um minuto para posterior avaliação da irrigação da parede do folículo e a irrigação do CL. A irrigação foi mensurada de maneira objetiva utilizando o programa ImageJ (versão 1.5, Wayne Rasband National Institute of Health, USA), no qual foram realizadas mensurações do perímetro folicular, perímetro folicular irrigado, porcentagem de irrigação da parede do folículo, área luteínica, área luteínica irrigada e porcentagem da área luteínica irrigada segundo Guinther [35].

2.4 Colheita de sangue

Foram colhidas amostras de sangue, previamente a realização da ultrassonografia por punção da veia caudal, em tubo contendo anticoagulante (EDTA), durante todo o período experimental. Após a colheita, o sangue foi centrifugado a 2500g/15 minutos para obtenção do plasma, o qual foi armazenado à -20°C para posterior análise hormonal.

2.5 Análise hormonal

A dosagem das concentrações plasmáticas de P4 foram realizadas por radioimunoensaio (Perkin Elmer 1470 automatic gamma counter, Massachusetts, USA), utilizando-se kit comercial em fase sólida (RIA Progesteron IM 1188, Bechman Coulter, Califórnia, USA), seguindo instruções do fabricante, com sensibilidade do teste de 0,02 ng/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4,8% e o coeficiente de variação inter-ensaio de 7,5%.

2.6 Análise estatística

Os dados colhidos foram analisados pelo *General Linear Models* (GLM) do pacote estatístico SAS [36]. As médias das variáveis foram submetidas a ANOVA e teste t para comparação entre grupos utilizando nível de significância a 5%.

Para estudar a correlação entre as variáveis de diâmetro, perímetro, perímetro irrigado e % do perímetro irrigado dos folículos, com o diâmetro, área, área irrigada e porcentagem da área irrigada do CL e com as concentrações plasmáticas de P4 durante o período experimental foram determinadas correlações de Pearson. O coeficiente de correlação foi classificado como nulo ($r=0$), baixo ($0 < r \leq 0,30$), moderado ($r= 0,30 < r \leq 0,70$) e forte ($0,70 < r \leq 1$), conforme Levine et al. [37].

3 Resultados

O dia da ovulação não diferiu entre os grupos, sendo $13,42 \pm 1,17$ e $13,53 \pm 0,19$ dias, respectivamente entre os grupos eCG e controle ($P = 0,34$). A taxa de ovulação foi superior no

grupo eCG em relação ao grupo controle, apresentando 95% (19/20) e 70% (14/20), respectivamente ($P = 0,003$). Os dados obtidos para crescimento médio diário dos folículos foram semelhantes entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1 – Média $\pm$ erro padrão (EP) e nível de significância (P) entre os grupos tratados com e sem eCG, para crescimento médio diário dos folículos de búfalas Murrah.

Folículo	eCG Média $\pm$ EP	Controle Média $\pm$ EP	P
Diâmetro (mm/d)	1,12 $\pm$ 0,21	1,35 $\pm$ 0,20	0,26
Perímetro (mm/d)	3,63 $\pm$ 0,3	3,48 $\pm$ 0,32	0,31
Irrigação do perímetro (mm/d)	3,69 $\pm$ 0,34	3,63 $\pm$ 0,34	0,30
% do perímetro irrigado (%/d)	8,93 $\pm$ 0,57	8,86 $\pm$ 0,63	0,43

Na análise dos dados normalizados em relação à ovulação, considerado a ovulação como dia 13, os grupos não diferiram quanto ao diâmetro e perímetro do folículo. Porém, o grupo eCG apresentou maior irrigação do folículo ($P = 0,018$; e $P = 0,03$) e também maior porcentagem do perímetro irrigado do folículo ($P = 0,025$; $P = 0,03$) quando comparado ao grupo controle, nos dias 11 e 12, respectivamente (Figura 2 e 3).



Figura 2 – Imagens ultrassonográficas *colour* Doppler do folículo pré-ovulatório, demonstrando a maior irrigação do seu perímetro previamente à ovulação (esq.) e do CL com sua área irrigada máxima (dir.).

O grupo eCG apresentou maior diâmetro do CL no dia 16 em relação ao grupo controle ($P < 0,001$), assim como apresentou maior área irrigada do CL nos dias 14 ($P = 0,008$), 15 ($P = 0,005$), 16 ($P = 0,008$), 20 ($P = 0,004$), 24 ($P = 0,003$) e 32 ($P = 0,022$) (Figura 4). A concentração plasmática de P4 foi maior no grupo eCG nos dias 15 ($P = 0,042$), 16 ($P = 0,048$), 20 ($P = 0,005$) e 24 ($P = 0,006$) (Figura 5).

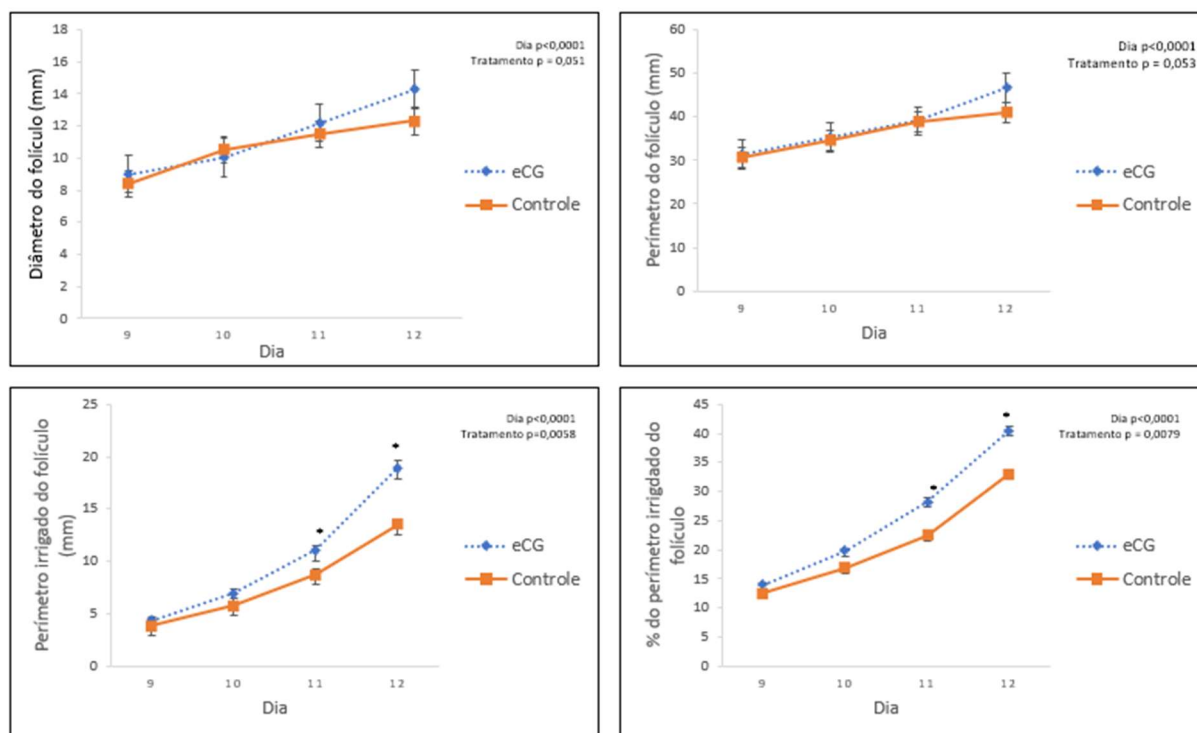


Figura 3 – Médias $\pm$ erro padrão, do diâmetro, perímetro, perímetro irrigado e porcentagem do perímetro irrigado do folículo de búfalas Murrah, entre os grupos eCG ($n = 20$) e controle ($n = 20$). * $P < 0,05$ entre os tratamentos.

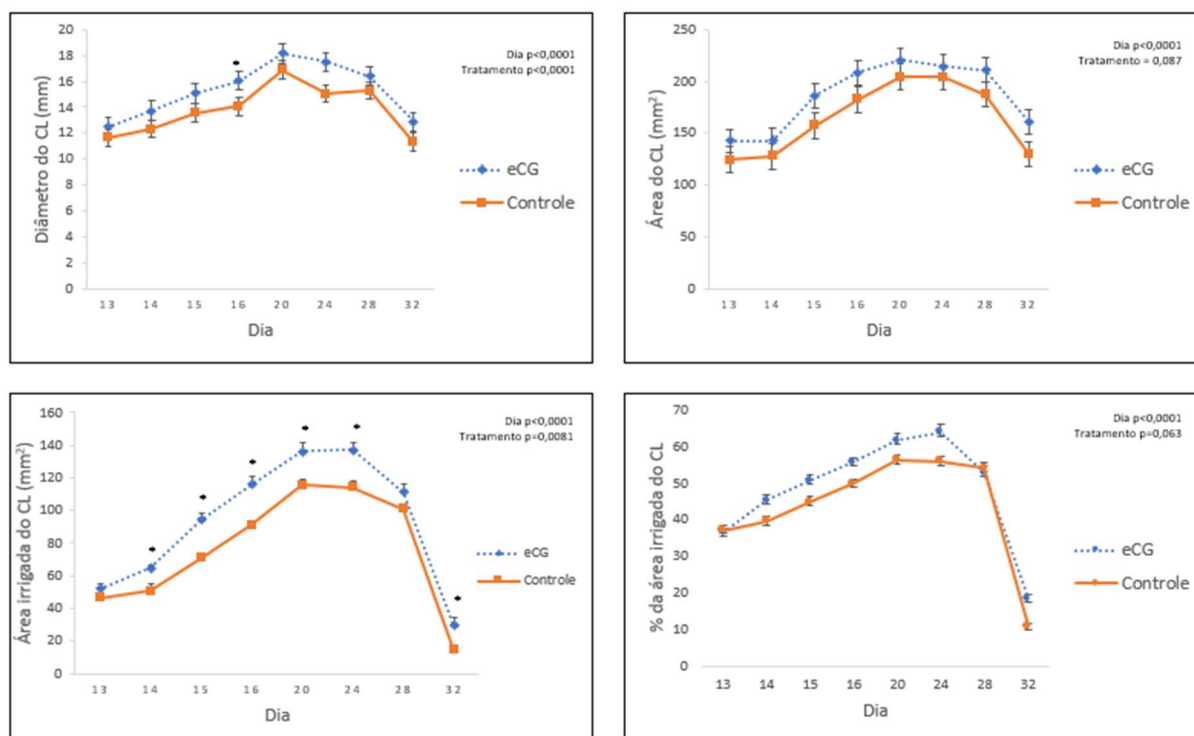


Figura 4 – Médias $\pm$ erro padrão, do diâmetro, área, área irrigada e porcentagem da área irrigada do CL de búfalas Murrah, entre os grupos eCG ($n = 20$) e controle ($n = 20$). * $P < 0,05$ entre os tratamentos.

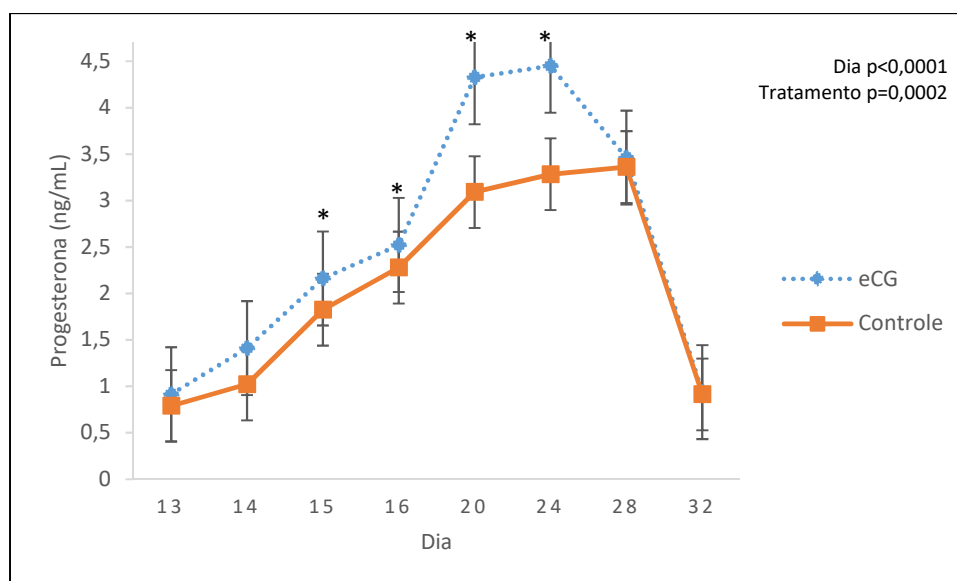


Figura 5 – Médias $\pm$ erro padrão da concentração plasmática de progesterona de búfalas Murrah, entre os grupos eCG ($n = 20$) e controle ($n = 20$). * $P < 0,05$ entre os tratamentos.

Foi observada forte correlação entre a área irrigada do CL e a concentração plasmática de P4 ($r=0,752$, $p<0,0001$), mostrando que foi o o melhor parâmetro correlacionado com a P4 (Tabela 2).

Tabela 2 – Coeficiente de correlação de Pearson e nível de significância (P) observados entre o diâmetro, área, área irrigada e porcentagem da irrigação do CL em relação a concentração plasmática de progesterona em búfalas Murrah.

X	Progesterona	P
Diâmetro	0,521	<0,001
Área	0,608	<0,001
Área irrigada	0,752	<0,001
% irrigação	0,534	<0,001

Correlacionando-se os dados do diâmetro, perímetro, perímetro e porcentagem do perímetro irrigado do folículo pré-ovulatório com o diâmetro, área, área irrigada, porcentagem da área irrigada do CL no dia 24 com a concentração plasmática de P4 também do dia 24, o perímetro irrigado do folículo apresentou correlações forte e moderada com os parêmtros estudados do CL e com a concentração plasmática de P4 (Tabela 3).

Tabela 3 – Coeficiente de correlação de Pearson e nível de significância (*P*) entre os diâmetros do folículo (FOL) e corpo lúteo (CL), área do CL, perímetro do FOL, área irrigada do CL, perímetro irrigado do FOL, porcentagem irrigada da área do CL e do perímetro do FOL e a concentração plasmática de progesterona de búfalas Murrah.

X	Diâmetro FOL	Perímetro FOL	Perímetro irrigado FOL	% irrigação FOL
Diâmetro CL	0,542 (0,004)	0,512 (0,044)	0,780 (0,001)	0,381 (<0,001)
Área CL	0,496 (0,014)	0,492 (0,032)	0,671 (0,004)	0,464 (0,018)
Área Irrigada CL	0,552 (0,032)	0,578 (0,016)	0,643 (0,004)	0,328 (0,023)
% irrigação CL	0,384 (0,020)	0,364 (0,048)	0,346 (0,004)	0,275 (0,043)
Progesterona	0,357 (0,029)	0,392 (0,040)	0,592 (0,004)	0,327 (0,0425)

4 Discussão

Protocolos hormonais são estudados na bubalinocultura buscando resultados reprodutivos superiores [38]. O presente estudo fornece informações relacionadas a ação da eCG sobre a irrigação folicular e luteínica, e como estas são capazes de promover uma elevação na concentração plasmática de P4.

O estudo foi realizado durante a estação reprodutiva favorável, e provavelmente por este motivo não foram observadas diferenças significativas entre os diâmetros dos folículos comparando-se os grupos eCG e controle no dia da ovulação ($p = 0,067$). Se conduzido durante a estação reprodutiva desfavorável, na qual ocorre insuficiente liberação de LH para promover o desenvolvimento folicular e ovulação, provavelmente a ação do eCG seria mais evidente, podendo ser observada diferença significativa entre os grupos, como os de Carvalho et al [24], que notaram aumento do diâmetro dos folículos ($13,7 \pm 0,4$ mm vs. $12,6 \pm 0,6$ mm) entre os grupos tratado com eCG em relação ao não tratado. O tamanho do folículo pré-ovulatório mostra-se importante nos protocolos de IATF, uma vez que está correlacionado à taxa de ovulação ($r = 0,59$, $P < 0,01$) e de gestação ($r = 0,49$, $P < 0,01$) em búfalas [39].

Já, em relação à irrigação dos folículos, analisados no modo *colour Doppler*, o constante incremento de irrigação sanguínea nas paredes foliculares, promovida principalmente pelo VEGF, deve-se a necessidade de neovascularização capaz de suprir as crescentes necessidades nutricionais dos folículos, para que a sua evolução até a ovulação não seja comprometida pela redução da vascularização devido a compostos antiangiogênicos [40, 41], sendo um fator determinante para a ocorrência da dominância [40, 42-44]. Este aspecto foi observado em vacas de leite, também encontraram constante desenvolvimento da irrigação da parede folicular durante seu crescimento, apresentando $55\% \pm 1,7$ de irrigação do perímetro folicular [45].

O maior desenvolvimento folicular e da sua irrigação no grupo eCG ocorrem pelo acréscimo na liberação de FSH e LH promovido pelos protocolos hormonais à base de P4 associados com eCG [14, 22, 29, 46].

O eCG causou superior desenvolvimento folicular e da sua irrigação, o que permitiu melhora na taxa de ovulação (95%) em relação ao grupo controle (70%), provavelmente devido ao influxo de substâncias mediadoras responsáveis pela degradação das camadas de colágeno contidas na túnica albugínea e na teca, acompanhadas do aumento da permeabilidade vascular necessária para a ruptura folicular [30, 47-50]. Os dados obtidos em nosso experimento corroboram com os de Porto Filho [23] que, em búfalas leiteiras, obteve taxa de ovulação de 70% no grupo tratado com eCG e 44,4% em grupo não tratado com eCG.

Além do aumento na irrigação das paredes dos folículos e na taxa de ovulação, também foram observados crescimentos no diâmetro e na área irrigada do CL no grupo eCG, provavelmente por este possuir meia-vida de aproximadamente 48 horas, permitindo sua ligação aos receptores de LH do CL, promovendo maior expressão gênica dos fatores angiogênicos VEGF e FGF2 e multiplicação das células luteais grandes [51]. Resultados semelhantes a esse foram encontrados por Carvalho et al. [24], no qual o diâmetro do CL no

grupo com eCG foi maior em relação ao grupo sem eCG ($15,8 \pm 0,92$ mm vs. $12,7 \pm 0,77$ mm, $P = 0,03$).

O acréscimo no aporte sanguíneo proporcionado ao CL devido à administração de eCG observado neste estudo serve como uma via de transporte de substâncias biológicas ao fornecer nutrientes e substratos para as células luteais grandes, que são indispensáveis para a manutenção da secreção de P4 [24, 33, 52-57]. Desta maneira, foram demonstrados neste estudo incremento na concentração plasmáticas de P4 no grupo eCG comparado ao grupo controle. Marques et al. [52] observaram aumento nas concentrações plasmáticas de P4, nos animais em que a eCG foi administrada ($8,6 \pm 0,4$ ng/mL vs $6,4 \pm 0,5$ ng/mL; $P < 0,05$). Desta maneira, ao correlacionar o diâmetro e a área irrigada do CL com a concentração plasmática de P4 obteve-se correlações média e forte, respectivamente. O fato de haver uma relação subjacente básica entre angiogênese e função do CL em búfalas, assim como em éguas [35], enfatiza que um suprimento de sangue elevado representa uma condição importante para a secreção de P4 [33]. Os resultados obtidos corroboram com Herzog et al. [58], que observaram uma correlação significativa entre o tamanho do CL e a concentração de P4 ($r = 0,69$; $p < 0,001$) e entre o fluxo sanguíneo do CL e a concentração de P4 ($r = 0,71$; $p < 0,001$) em vacas holandesas.

Em estudos sobre o efeito da eCG em protocolos de IATF de búfalas, foram encontradas correlações positivas entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório e o diâmetro do CL, assim como foram evidenciadas correlações entre o diâmetro do folículo pré-ovulatório e a concentração plasmática de P4 oriunda do CL, desta maneira a utilização de eCG durante protocolos de IATF podem produzir folículos de maior diâmetro que ao ovularem produziram um CL maior, capaz de gerar incremento na produção de P4 [24, 39, 59]. Porém, nesses estudos não foram avaliados dados relativos a irrigação folicular e luteínica. Já em nosso estudo, além do diâmetro, a irrigação dos folículos pré-ovulatórios foram correlacionados com o diâmetro e irrigação do CL assim como com concentração plasmática de P4, mostrando a importância de

se obter um folículo pré-ovulatório com boa irrigação e de maior diâmetro, sendo que a irrigação se mostrou melhor parâmetro que o diâmetro do folículo para predição da função do CL e por consequência da concentração plasmática de P4.

Estudos de Tarso et al. [45], com vacas de leite, demonstraram que não há somente correlação entre a irrigação do CL com a concentração de P4, mas que também há alta correlação entre o diâmetro e a irrigação do folículo pré-ovulatório, com o diâmetro e a irrigação do CL, consequentemente com a concentração plasmática de P4 e a manutenção da gestação, assim como também foi observado que as vacas que se tornaram prenhes tiveram diâmetro do folículo pré-ovulatório maior ($14,9 \pm 0,4$ mm vs $13,1 \pm 0,2$ mm; $P < 0,05$, respectivamente) em relação as vacas que continuaram vazias, e que o fluxo sanguíneo folicular em vacas que se tornaram prenhes tende a ser maior comparado as que continuaram vazias ($77 \pm 1\%$ vs $69 \pm 1\%$ $P < 0,01$, respectivamente), evidenciando que há uma relação do tamanho e da irrigação do folículo pré-ovulatório com a taxa de prenhez [60].

Este fenômeno pode ser explicado pelo aumento do fluxo sanguíneo via vasodilatação periférica, por ação do óxido nítrico, para melhor oferta de gonadotrofinas, nutrientes, e substratos hormonais, assim como para a ocorrência da ovulação [57]. Após a ovulação, o fluxo sanguíneo vigoroso permite abundante extravasamento de linfa e sangue para a cavidade formada anteriormente pelo folículo, que juntamente com as células remanescentes do folículo irão formar um CL maior área e irrigado [61] permitindo produção de P4 pelas células luteínicas grandes, que com maior irrigação proverão maior quantidade deste hormônio para manutenção da prenhez [15, 45, 60, 62].

5 Conclusão

A utilização de eCG em protocolo hormonal de IATF em búfalas Murrah favorece o desenvolvimento da vascularização folicular, ovulação e da vascularização luteínica,

proporcionando desta maneira um incremento na concentração plasmática de P4, podendo favorecer a capacidade reprodutiva do rebanho.

Agradecemos a FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro concedido.

Referências

- [1] Baruselli PS, Soares JG, Gimenes LU, Monteiro BM, Olazarri MJ, Carvalho NAT. Control of Buffalo Follicular Dynamics for Artificial Insemination, Superovulation and *In Vitro* Embryo Production. *Buffalo Bulletin* 2013;32:160–76.
- [2] Singh I, Balhara AK. New approaches in buffalo artificial insemination programs with special reference to India. *Theriogenology* 2016;86:194–99.
- [3] Vale WG. Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução. Campinas: Fundação Cargil; 1988.
- [4] Barile VL. Improving reproductive efficiency in female buffaloes. *Livestock Production Science* 2005;92:183–94.
- [5] Bittman EL, Karsch FJ. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day lengths in the ewe. *Biology of Reproduction* 1984;30:585–93.
- [6] Baruselli PS, Bernandes O, Barufi FB, Braga D, Araujo D, Tonathi H. Calving distribution throughout the year in buffalo raised all over Brazil. In: *Proceedings of the 6th World Buffalo Congress* 2001: 234–40.
- [7] Ohashi OM. Estrous detection in buffalo cow. *Buffalo Journal* 1994;10:61–4.
- [8] Drost M, Cripe WS, Richter AR. Oestrus detection in buffaloes (*Bubalus bubalis*): use of

an androgenized female. Buffalo Bulletin Journal 1985;1:159–161.

[9] Neglia G, Natale A, Esposito G, Salzillo F, Adinolfi L, Campanile G, et al. Effect of prostaglandin F2a at the time of AI on progesterone levels and pregnancy rate in synchronized Italian Mediterranean buffaloes. Theriogenology 2008;69:953-960.

[10] Vecchio D, Rossi P, Neglia G, Longobardi V, Salzano A, Bifulco G. Comparison of two synchronization protocols for timed artificial insemination in acyclic Italian Mediterranean Buffalo cows out of the breeding season. Proceedings of the 10th World Buffalo Congress 2013;42

[11] Baruselli PS, Carvalho NAT, Gimenes LU, Crepaldi GA. Fixed-time artificial insemination in buffalo. Ital. J. Anim. Sci 2007;6:107-118.

[12] Carvalho NAT, Soares JG, Reis EL, Vannucci FS, Sales JNS, Baruselli PS. Use of Different Progestagens for Ovulation Synchronization and TAI in Buffaloes during the Non Breeding Season. Buffalo Bulletin 2013;32:527–31.

[13] De Rensis F, Ronci G, Guarneri P, Nguyen BX, Presicce GA, Huszenicza G, et al. Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 2005;63:1824–31.

[14] Murugavel K, Antoine D, Raju MS, López-Gatius F. The effect of addition of equine chorionic gonadotropin to a progesterone-based estrous synchronization protocol in buffaloes (*Bubalus bubalis*) under tropical conditions. Theriogenology 2009;71:1120–26.

[15] Campanile G, Neglia G, D’occhio, MJ. Embryonic and foetal loss in River buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 2016;86:207–13.

- [16] Rossi P, Vecchio D, Neglia G, Di Palo R, Gasparrini B, D'occhio MJ, et al. Seasonal fluctuations in the response of Italian Mediterranean buffaloes to synchronization of ovulation and timed artificial insemination. *Theriogenology* 2014;82:132–37.
- [17] Cirit Ü, Ak K, Ileri IK. New strategies to improve the efficiency of the Ovsynch protocol in primiparous dairy cows. *Bull Vet Inst Pulawy* 2007;51:47–51.
- [18] Mohan K, Sarkar M, Prakash BS. Efficiency of Heatsynch protocol in estrus synchronization, ovulation and conception of dairy buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Asian Austral. J. Anim* 2009;22:774–80.
- [19] Mirmahmoudi R, Sourì M, Prakash BS. Comparison of endocrine changes, timing of ovulations, ovarian follicular growth, and efficiency associated with Estradoublesynch and Heatsynch protocols in Murrah buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 2014;82:1012–20.
- [20] Ali A, Fahmy S. Ovarian dynamics and milk progesterone concentrations in cycling and non-cycling buffalo-cows (*Bubalus bubalis*) during Ovsynch program. *Theriogenology* 2007;68:23–8.
- [21] Warriach HM, Channa AA, Ahmad N. Effect of oestrus synchronization methods on oestrus behaviour, timing of ovulation and pregnancy rate during the breeding and low breeding seasons in Nili-Ravi buffaloes. *Anim Reprod Sci* 2008;107:62–7.
- [22] Baruselli PS, Carvalho NAT. Reproduction Management and artificial insemination in buffalo. *Proceedings of 1 Buffalo Symposium of Americas* 2002;1:119–143.
- [23] Porto Filho RM. Sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) durante estação reprodutiva desfavorável em fêmeas bubalinas. Tese (Doutorado em

Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo. p. 100, 2004.

[24] Carvalho NAT, Soares JG, Porto Filho RM, Gimenes LU, Souza DC, Nichi M, Sales JS, Baruselli PS. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season. *Theriogenology* 2013;79:423–28.

[25] Baruselli PS, Carvalho NAT. Biotechnology of reproduction in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Rev Bras Reprod Anim* 2005;29:4–17.

[26] Bernardes O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2007;31:293–98.

[27] Carvalho NAT Bernardes O, Baruselli PS. Desestacionalização dos partos para a produção de leite de Búfalas a pasto no Centro Sul do Brasil. *Pesquisa & Tecnologia* 2011;8:1–5.

[28] Carvalho NAT, Soares JG, Souza DC, Vannucci FS, Amaral R, Maio JRG, et al. Different circulating progesterone concentrations during synchronization of ovulation protocol did not affect ovarian follicular and pregnancy responses in seasonal anestrous buffalo cows. *Theriogenology* 2014;81:490–95.

[29] Monteiro BM, Souza DC, Vasconcellos GSFM, Ortolan MDDV, Mendanha MF, Soares JG. Reproductive performance of dairy buffaloes submitted to TAI protocols based on P4/E2 plus eCG during breeding and nonbreeding seasons. *Animal Reproduction* 2014;11:344.

[30] Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 2003;125:759-67.

[31] Reynolds L, Grazul-Bilska A, Redmer D. Angiogenesis in the corpus luteum.

Endocrinology 2000;12:1-9.

[32] Matsui M, Miyamoto A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. *The Veterinary Journal* 2009;181:232–40.

[33] Ayres H, Mingoti GZ. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2012;36:174–80.

[34] Schams D, Berisha B. Regulation of corpus luteum function in cattle-an overview. *Reproduction in Domestic Animals* 2004;39:241–51.

[35] Ginther OJ. Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-Doppler ultrasonography, Book 4. Equiservices Publishing; 2007.

[36] SAS Institute. 2009. Statistical Analysis System 2009. Version 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC.

[37] Levine DM, Berenson ML, Stephan, D. Estatística: Teoria e Aplicações. 6th ed. LTC, Rio de Janeiro, RJ; 2012.

[38] Glatzel PS, Ali A, Gilles M, Fidelak C. Follicular development during four stages of the oestrous cycle of beef cattle. *Journal of Animal Science* 2000;49:1261–69.

[39] Monteiro BM, Souza DC, Vasconcellos GSFM, Corrêa TB, Vecchio D, Sá Filho MF. Ovarian responses of dairy buffalo cows to timed artificial insemination protocol, using new or used progesterone devices, during the breeding season (autumn–winter). *Anim Sci J* 2016;87:13-20.

- [40] Araújo VR, Duarte AB, Bruno JB, Pinho Lopes CA, Figueiredo JR. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. *Zygote* 2011;13:1–10.
- [41] Robinson RS, Woad KJ, Hammond AJ, Laird M, Hunter MG, Mann GE. Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction* 2009;138:869–81.
- [42] Grazul-Bilska AT, Navanukra WC, Johnson ML, Vonnahme KA, Ford SP, Reynolds LP, Redmer DA. Vascularity and expression of angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *Journal of Animal Science* 2007;85:1914–22.
- [43] Macchiarelli G, Jiang JY, Nottola SA, Sato E. Morphological patterns of angiogenesis in ovarian follicle capillary networks. A scanning electron microscopy study of corrosion cast. *Microscopy Research and Technique* 2006;69:459–68.
- [44] Mattioli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G, Berardinelli P, Scapolo PA. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biology of Reproduction* 2001;65:1014–19.
- [45] Tarso SGS, Gastal GDA, Bashir ST, Gastal MO, Apgar GA, Gasta EL. Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. *Reproduction, Fertility and Development* 2015;29:448–57.
- [46] Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotrophin. *Endocrine Reviews* 1991;12:27–44.
- [47] Jiang J, Macchiarelli G, Tsang B, Sato E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction* 2003;125:211–23.
- [48] Siddiqui MA, Ferreira JC, Gastal EL, Beg MA, Cooper DA, Ginther OJ. Temporal relationships of the LH surge and ovulation to echotexture and power Doppler signals of blood

flow in the wall of the preovulatory follicle in heifers. *Reproduction, Fertility and Development* 2010;22:1110–17.

[49] Murdoch W, Peterson T, Van Kirk E, Vincent D, Inskeep E. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biology of Reproduction* 1986;35:1187–94.

[50] Abisogun AO, Daphna-Iken D, Reich R, Kranzfelder D, Tsafiriri A. Modulatory role of eicosanoids in vascular changes during the preovulatory period in the rat. *Biology of Reproduction* 1988;38:756–62.

[51] Souza AH, Viechnieski S, Lima FA, Silva FF, Araújo R, Bó GA, Wiltbank MC, Baruselli PS. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 2009;72:10-21.

[52] Marques MO, Reis EL, Campos Filho EP, Baruselli PS. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de Estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. In: *Simpósio Internacional de Reproducción Animal*, Córdoba,: SIRA, 2003:392.

[53] Dadarwal D, Mapletoft RJ, Adams GP, Pfeifer LFM, Creelman C, Singh J. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 2013;79:859–66.

[54] Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 2001;56:307–14.

[55] Janson PO, Damber JE, Axen C. Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility* 1981;63:491–97.

- [56] Barile VL, Terzano GM Allegrini S, Maschio M, Razzano M, Neglia G, Pacelli C. Relationship among preovulatory follicle, corpus luteum and progesterone in oestrus synchronized buffaloes. *Ital J Anim Sci* 2007;6:663–666.
- [57] Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science* 2004;82–83:127–140.
- [58] Herzog K, Brockhan-Ludemann M, Kaske M.; Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bollwein H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 2010;73:691–97.
- [59] Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Marques MO, Reis EL, Silva RCP, Rodrigues CA, Madureira EH, Bó GA, Baruselli PS. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nellore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology* 2010; 73:651–58.
- [60] Tarso SGS, Apgar GA, Gastal MO, Gastal EL. Relationships between follicle and corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in beef cows and heifers: preliminary results. *Anim Reprod* 2016;13:81–92.
- [61] Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC. Regulation of progesterone and prostaglandin F_{2a} production in the CL. *Mol. Cell. Endocrinol* 2002;191:65-68.
- [62] Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli PS. Anti-luteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 2001;56:1451–63.

Capítulo 2

Efeito da fase do ciclo estral e da ambiência sobre as temperaturas da superfície vulvar, ocular e da mufla em búfalas Murrah submetidas a sincronização da ovulação

(Artigo redigido segundo as normas da Animal Reproduction Science, ISSN 0378-4320, fator de impacto JCR: 1,377. Disponível em: <https://www.elsevier.com/journals/animal-reproduction-science/0378-4320/guide-for-authors>).

RESUMO

Objetivou-se avaliar as variações da temperatura do olho, mufla e vulva e concentrações plasmáticas de progesterona (P4) e cortisol durante as fases folicular e luteínica em búfalas Murrah, e se estas temperaturas sofrem influência do clima. Quarenta búfalas Murrah foram submetidas a protocolo hormonal à base de P4 para sincronização da ovulação. Após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 no dia 9, foram realizadas ultrassonografias transretal no período da tarde e termografia digital pela manhã e à tarde, diariamente até o dia 16 e nos dias 20, 24, 28 e 32, visando avaliar o desenvolvimento folicular e do CL e o momento da ovulação, e as temperaturas superficiais da vulva, mufla e olho. Adicionalmente, foram realizadas a aferição das variáveis climáticas, temperatura retal (TR) e colheita de sangue para a avaliação das concentrações plasmáticas P4 e cortisol por radioimunoensaio. As temperaturas superficiais da vulva, mufla e olho correlacionaram-se positivamente, com a TR e com os dados climáticos. As ovulações ocorreram em média aos $13,57 \pm 1,32$ dias, sendo que foram encontradas maiores temperaturas da vulva, olho e mufla no período de estro em relação ao diestro. A temperatura da vulva demonstrou sofrer menor influência dos fatores climáticos durante a manhã, sendo este o melhor período para avaliação da influência da fase do ciclo estral sobre esta temperatura. As temperaturas da vulva foram mais baixas durante os dias 16, 20, 24 e 28 e a concentração plasmática de P4 apresentou padrão inversamente proporcional. As temperaturas da mufla e do olho e a TR não acompanharam o mesmo padrão de variação das temperaturas vulvares, correlacionando-se com os níveis plasmáticos de cortisol. Conclui-se que a termografia digital

por infravermelho é eficaz na mensuração das temperaturas de diferentes regiões do corpo animal, sendo que a temperatura vulvar sofre alterações durante as fases reprodutivas, havendo correlação com a concentração plasmática de P4. Os fatores climáticos influenciam as temperaturas das áreas estudadas, sendo o melhor momento para realizar as termografias o período matutino, predominantemente com temperaturas amenas.

Palavras-chave: termografia digital por infravermelho, estro, progesterona, clima.

1. Introdução

A iseminação artificial em tempo fixo (IATF) vem sendo utilizada na bubalinocultura visando disseminação de material genético superior e de melhores taxas reprodutivas (Baruselli et al., 2013). Métodos auxiliares são estudados em busca de melhor eficiência da IATF na bovinocultura, podendo ser utilizados marcadores em bastão para observar quais fêmeas foram montadas pelas demais através de comportamento homossexual típico da expressão do estro (Sá Filho et al., 2011). Porém, na espécie bubalina o comportamento homossexual não é acentuado, sendo necessário o desenvolvimento de métodos práticos para identificar sua expressão (Singh et al., 2000; Hockey et al., 2010).

Eventos fisiológicos, como o ciclo estral, alteraram o fluxo sanguíneo e a vascularização de tecidos. A superfície da pele atua como um sistema de arrefecimento que irradia calor e as variações de irrigação de determinados tecidos possivelmente altera a temperatura da superfície da pele (Purohit et al., 1985). Diferentes técnicas invasivas têm sido utilizadas para aferir as alterações na temperatura do corpo durante o estro, porém estas podem sofrer influência devido ao estresse causado ao animal (Clapper et al., 1990; Mosher et al., 1990; Kyle et al., 1998; Redden et al., 1993; Fisher et al., 2008). A termografia digital por infravermelho (TDPI) é uma tecnologia não invasiva, de fácil execução e resultados imediatos que permite a medida exata de gradientes de temperatura de uma superfície (Chacur et al., 2016a) e possui potencial para

aplicação na reprodução animal. Porém, poucos estudos foram realizados nesta área (Ricarte et al., 2014).

Apesar da TDPI possuir potencial para uso em pesquisas a campo, a temperatura da superfície do corpo de um animal pode sofrer interferência da temperatura ambiente, do fluxo de ar, da umidade relativa do ar, radiação infravermelha e detritos sob a superfície da pele (Cravello e Ferri, 2008), sendo temperaturas abaixo de 30° C aceitáveis para execução da técnica (Sykes et al., 2012).

Atualmente, a TDPI vem sendo utilizada experimentalmente para monitorar e elucidar as trocas de calor dos animais com o ambiente, estudar a termorregulação escrotal em ruminantes (Kastelic et al., 1996, Ruediger et al., 2016), mastites em vacas de leite (Colak et al., 2008), analisar alterações no sistema locomotor de equinos (Alsaad e Büscher, 2012) e ruminantes (Stewart et al., 2010). Existem relatos da utilização da termografia por infravermelho para detectar alterações nas temperaturas vulvares entre estro e diestro em porcas (Scolari et al., 2011; Sykes et al., 2012), ovelhas (George et al., 2014) e vacas de leite (Talukder et al., 2014).

Recentemente, foi demonstrada a aplicabilidade da TDPI em búfalos, ao verificarem que as temperaturas da superfície do olho, flanco e orelhas, estão sujeitas as variações climáticas e correlacionadas com a temperatura retal, podendo ser utilizadas em estudos de conforto térmico nesses animais (Barros et al., 2016; Sevegnani et al., 2016).

Desta forma, os objetivos deste estudo foram analisar as variações da temperatura da superfície do olho, da mufla e da vulva e variações nas concentrações hormonais de progesterona (P4) durante as fases estrogênica e progesterônica, assim como avaliar a influência da ambiência nas temperaturas obtidas por TDPI em búfalas Murrah submetidas a protocolo hormonal para sincronização da ovulação.

2. Material e Métodos

Após a aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 18/2016) foi realizada a colheita de dados entre os meses de abril a agosto de 2016 na cidade de Registro/Brasil, com clima subtropical úmido, inverno seco e verão quente e úmido, apresentando estação chuvosa de outubro a março e seca de abril a setembro.

2.1 Animais

Foram selecionadas 40 búfalas da raça Murrah, com idade média de $95,15 \pm 48,22$ meses, escore corporal $3,60 \pm 0,37$ (escala de 1 a 5), produção de leite média diária de $6,64 \pm 1,24$ kg e $112,50 \pm 55,50$ dias em lactação.

2.2 Alimentação

Os animais foram mantidos em mesmo lote, com pastagem *Brachiaria brizantha* e submetidas ao mesmo manejo nutricional em pastejo rotacionado, com água e sal mineralizado *ad libitum*, e fornecimento de concentrado antes da ordenha.

2.3 Delineamento experimental

Foi realizada sincronização da ovulação dos animais selecionados, utilizando protocolo hormonal que consiste na inserção de um dispositivo intravaginal de P4 (1,0 g, dispositivo intravaginal, Sincrogest, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil) e 2 mg de benzoato de estradiol (EB, im, Sincrodiol, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil), em dia aleatório do ciclo estral, sendo considerado como dia 0 (D0). Após nove dias (D9), foi administrada prostaglandina F2 alfa (0,150 mg, im, d-cloprostenol, Croniben, Biogéneses Bagó, Buenos Aires, Argentina) e 400 UI de eCG (eCG, im, Folligon, MSD Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil), seguida pela administração de GnRH (10 µg de acetato de buserelina, im Sincroforte, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil) no 11º dia (D11) para indução da ovulação (Figura 1). Foram realizadas diariamente

ultrassonografias e colheita de sangue no período da tarde do D9 ao D16 e no D20, 24, 28 e 32, assim como TDPI da mufla, olho e vulva acompanhada pela aferição dos dados climáticos.

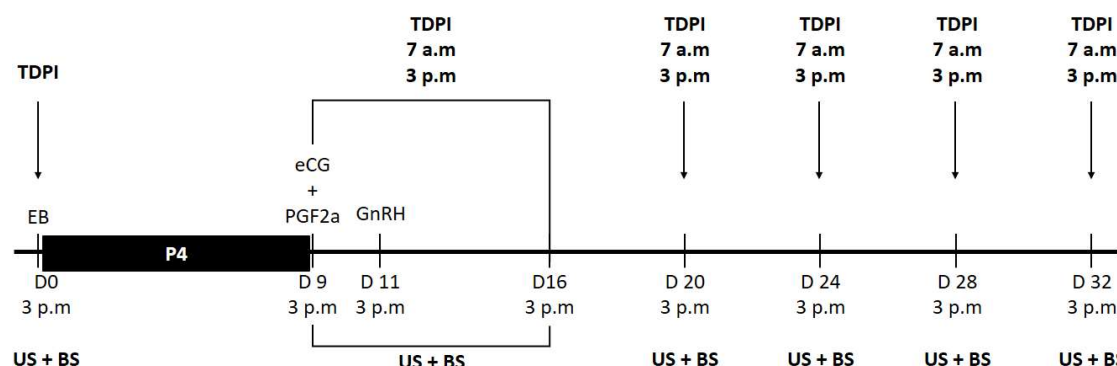


Figura 1- Linha do tempo do protocolo hormonal, das ultrassonografias, das termografias e das colheitas de sangue. Implante intravaginal de progesterona (P4), benzoato de estradiol (EB), gonadotrofina coriônica equina (eCG), prostaglandina F2 α (PGF2 α), hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), ultrassom (US), termografia digital por infravermelho (TDPI) e colheita de sangue (BS).

2.4 Termografia digital por infravermelho

Todos os exames termográficos foram realizados no animal não anestesiado em estação, após 30 minutos em ambiente coberto, contido em tronco de contenção para bubalinos. As termografias (Termovisor E-40, FLIR, Oregon, USA) da vulva, mufla e olho, foram efetuadas duas vezes ao dia, entre 7h e 09h e entre 15h e 18h, durante todas as fases do ciclo estral. As imagens termográficas foram obtidas com câmera termográfica digital a uma distância aproximada de 1 m da vulva, da búfala com o foco do termógrafo direcionado perpendicularmente à vulva, e posteriormente com um ângulo de 45° à mufla e ao olho (Figura 1). Os termogramas foram armazenados e posteriormente, transferidos para o computador para análise (Flir Tools Version 5.11.16357.2007, FLIR, Oregon, USA), no qual foram obtidas as temperaturas máximas, mínimas e médias da superfície da vulva, olho e mufla conforme as demarcações da Figura 2. Após a realização das termografias foi aferida a temperatura retal (TR) com termômetro clínico digital.

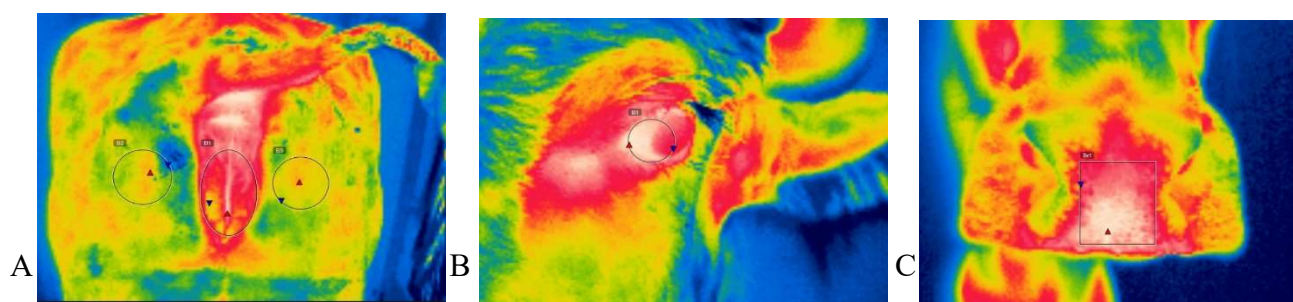


Figura 2 – Termogramas da vulva (A), olho (B) e mufla (C) de búfalas, com as áreas de aferição demarcadas.

2.5 Ambiência

Os dados climáticos no período do experimento foram coletados de hora em hora por meio de termômetro do globo (ITWTG-2000, InstruTemp®, São Paulo, Brasil), avaliando a temperatura do globo preto (TG, que avalia a insulação), temperatura de bulbo seco (TA, que avalia a temperatura ambiente), umidade relativa do ar (UR) e a temperatura de estresse calórico (WBGT), onde:

$$WBGT = 0,7TW + 0,2TG + 0,1TA$$

TW = Temperatura de bulbo úmido. Esta temperatura é calculada automaticamente pelo termômetro de globo a partir da TA e da UR, segundo Stull (2011).

2.6 Ultrassonografia

Para acompanhamento do momento da ovulação foi realizada ultrassonografia transretal modo B, com transdutor linear de 7,5 MHz (esaote, MyLab™FIVE, Genova, Itália) diariamente, entre 15h e 18h.

2.7 Colheita de sangue

Previamente a realização das ultrassonografias, foram colhidas amostras de sangue por punção da veia caudal, em tubo com EDTA, para obtenção do plasma sanguíneo após centrifugação a 2.500g/15 minutos. O plasma foi armazenado à -20°C para posterior realização das análises hormonais.

2.8 Análise hormonal

As concentrações plasmáticas de P4 e cortisol foram determinadas por radioimunoensaio (Perkin Elmer, 1470 automatic gamma counter, Massachusetts, USA) utilizando-se kits comerciais de fase sólida (RIA Progesteron IM 1188 e RIA Cortisol IM 184,1 Bechman Coulter, Califórnia, USA) seguindo as instruções do fabricante. A sensibilidade do teste para P4 foi de 0,02 ng/mL e para o cortisol de 0,04 ng/mL. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram de 4,8% e 5,2% e o coeficiente de variação inter-ensaio de 7,5% e 8,4% para P4 e cortisol, respectivamente.

2.9 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS (SAS, 2009) por meio do procedimento GLM. As médias foram submetidas a ANOVA considerando nível de significância 5%. Foram determinadas correlações de Pearson, classificadas conforme Levine et al., 2012.

3. Resultados

As médias e erro padrão das temperaturas da vulva, mufla, olho, temperatura retal e dados climáticos, obtidos durante o período experimental estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1 – Médias $\pm$ erro padrão (EP), das temperaturas da superfície da vulva, mufla, olho e retal (TR) de búfalas Murrah e dos dados climáticos.

Temperaturas	Média $\pm$ EP
Temperatura da vulva (°C)	32,86 $\pm$ 2,86
Temperatura de mufla (°C)	32,11 $\pm$ 3,28
Temperatura do olho (°C)	35,00 $\pm$ 2,16
WBGT (°C)	19,85 $\pm$ 5,26
TA (°C)	21,99 $\pm$ 6,45
TG (°C)	22,33 $\pm$ 6,75
UR (%)	77,07 $\pm$ 8,05
TR (°C)	37,50 $\pm$ 0,74

Temperatura do globo preto (TG), temperatura de bulbo seco (TA), umidade relativa do ar (UR), temperatura de estresse calórico (WBGT).

A TR e a temperatura da superfície da vulva, mufla e olho correlacionaram-se positivamente, sendo que entre as temperaturas de vulva e mufla e a TR foram observadas correlações médias e fortes entre a temperatura do olho e a TR (Tabela 2).

Tabela 2 – Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (*P*) entre a temperatura retal (TR) e as temperaturas da superfície da vulva, mufla e olho, obtidas por termografia digital por infravermelho em búfalas Murrah.

X	TR	<i>P</i>
Temperatura da Vulva	0,69	<0,001
Temperatura da Mufla	0,69	<0,001
Temperatura do Olho	0,77	<0,001

As ovulações ocorreram em média aos $13,57 \pm 1,32$ dias do protocolo. Comparando-se as médias entre as temperaturas da superfície da vulva, mufla e olho na fase folicular ou na fase luteínica, observa-se uma maior temperatura durante a fase folicular (Tabela 3).

Tabela 3 – Médias $\pm$ erro padrão (EP) e nível de significância (*P*) das temperaturas da superfície da vulva, mufla e olho, obtidas por termografia digital por infravermelho, comparadas entre as fases folicular e luteínica de búfalas Murrah.

Fases	Folicular	Luteínica	
Temperatura	Média $\pm$ EP	Média $\pm$ EP	<i>P</i>
Temperatura da vulva (°C)	$33,67 \pm 2,86$	$31,68 \pm 2,86$	<0,001
Temperatura da Mufla (°C)	$33,25 \pm 3,26$	$30,69 \pm 3,28$	<0,001
Temperatura do Olho (°C)	$35,72 \pm 2,15$	$33,93 \pm 2,15$	0,004

O período matutino apresentou de forma geral temperaturas mais amenas que o período vespertino com WBGT ($17,70 \pm 4,26^\circ\text{C}$ e $20,60 \pm 6,2^\circ\text{C}$, $P = 0,003$), TA ($18,80 \pm 3,48^\circ\text{C}$ e $23,60 \pm 6,7^\circ\text{C}$, $P = 0,005$), TG ($19,10 \pm 4,7^\circ\text{C}$ e $23,90 \pm 6,3^\circ\text{C}$, $P < 0,001$) e UR ($85,70 \pm 12,20\%$ e $70,10 \pm 16,70\%$, $P = 0,001$), respectivamente.

Dessa maneira, correlacionando-se os dados climáticos com as temperaturas da superfície da vulva, mufla e olho, e TR nos períodos da manhã e da tarde, constatou-se que durante o período da tarde as correlações foram fortes para WBGT, TA e TG e moderadas para UR, e no período da manhã as correlações foram moderadas para WBGT, TA e TG e fracas

para UR, indicando que o clima teve maior influência sobre as temperaturas da vulva, olho e mufla obtidas por termografia durante a tarde (Tabela 4).

A partir desta observação, optou-se por utilizar as temperaturas da superfície da vulva do período matutino para avaliação estatística. Nesta avaliação, as temperaturas da superfície da vulva durante os dias 16, 20, 24 e 28 do delineamento experimental foram mais baixas em relação aos dias 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 32, sendo acompanhados de maneira inversamente proporcional pela concentração plasmática de P4 como demonstrado na Figura 3. Já as temperaturas superficiais do olho e da mufla não acompanharam o mesmo padrão de variação das temperaturas vulvares.

Tabela 4 – Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância entre os dados climáticos e as temperaturas de vulva, mufla e olho e temperatura retal (TR) de búfalas no período da manhã e da tarde.

Período	Tarde				Manhã			
X	WBGT	TA	TG	UR	WBGT	TA	TG	UR
Temperatura da Vulva	0,83*	0,82*	0,83*	0,46*	0,50*	0,40*	0,50*	0,91**
Temperatura da Mufla	0,86*	0,84*	0,82*	0,53*	0,52*	0,52*	0,52*	0,10
Temperatura do Olho	0,86*	0,83*	0,83*	0,63*	0,54*	0,57*	0,58*	0,11
TR	0,82*	0,79*	0,81*	0,61*	0,53*	0,57*	0,54*	0,03

* $P < 0,001$ ** $P < 0,05$. Temperatura do globo preto (TG), temperatura de bulbo seco (TA), umidade relativa do ar (UR), temperatura de estresse calórico (WBGT).

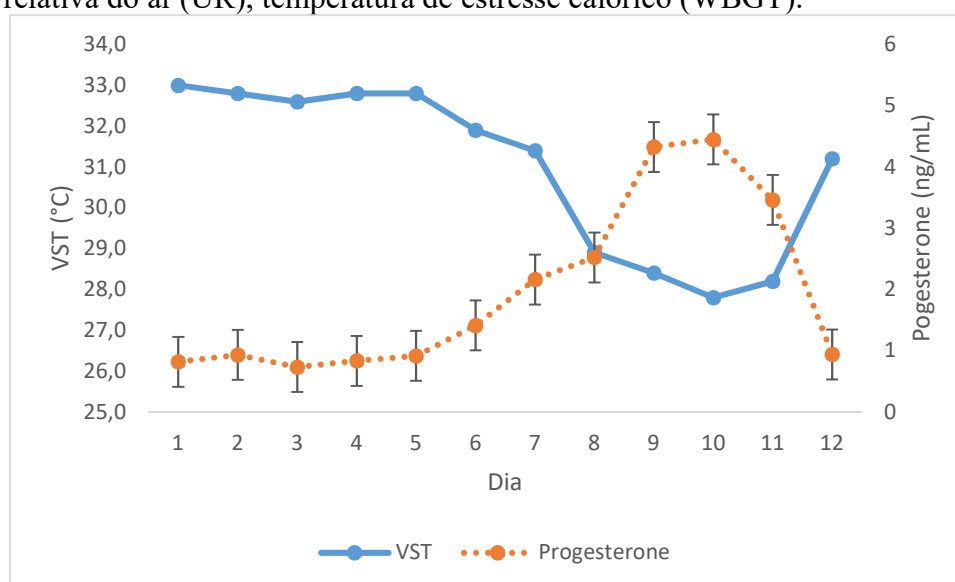


Figura 3 – Variação da temperatura da superfície da vulva (VST) e concentração plasmática de progesterona, durante os dias do experimento em búfalas.

Além disso, foram observadas correlações negativas fortes entre as temperaturas da superfície da vulva e a concentração plasmática de P4 e correlações negativas fracas entre a concentração plasmática de P4 e as temperaturas da superfície da mufla e do olho (Tabela 5).

Tabela 5 – Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (*P*) entre as concentrações plasmáticas de progesterona e as temperaturas da superfície da vulva, mufla, olho e retal (TR) em búfalas.

X	Progesterona	<i>P</i>
Temperatura da Vulva	-0,70	<0,001
Temperatura da Mufla	-0,24	<0,001
Temperatura do Olho	-0,29	<0,001
TR	-0,29	<0,001

A concentração plasmática de cortisol variou entre 2,84 ng/mL e 0,69 ng/mL correlacionando-se de forma moderada a forte entre com as temperaturas da superfície da vulva, mufla e olho. Também houve correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de cortisol e a TR e os dados climáticos, mostrando que quanto mais quente e úmido se apresenta o clima, maiores são as temperaturas superficiais e TR, elevando a concentração plasmática de cortisol (Tabela 6).

Tabela 6 – Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (*P*) entre as concentrações plasmáticas de cortisol e as temperaturas da superfície da vulva, mufla, olho e retal (TR) de búfalas e os dados climáticos.

X	Cortisol	<i>P</i>
Temperatura da Vulva	0,42	0,030
Temperatura da Mufla	0,54	0,010
Temperatura do Olho	0,69	0,014
TR	0,69	0,011
WBGT	0,66	<0,001
TA	0,67	<0,001
TG	0,60	<0,001
UR	0,65	<0,001

Temperatura do globo preto (TG), temperatura de bulbo seco (TA), umidade relativa do ar (UR), temperatura de estresse calórico (WBGT).

4. Discussão

Os dados obtidos no presente estudo para temperatura da superfície da vulva, da mufla e do olho, aferidos por TDPI e a temperatura retal são similares a estudos realizados anteriormente em vacas leiteiras (Talukder et al., 2014; Chacur et al., 2016b) e búfalas de leite (Barros et al., 2016; Sevegnani et al., 2016). Assim, a técnica de TDPI é de potencial aplicabilidade no estudo das modificações fisiológicas da temperatura corporal na espécie bubalina.

Foram observados coeficientes de correlação de moderados a fortes entre a TR e as temperaturas da superfície da vulva, da mufla e do olho. Em recente estudo com búfalas leiteiras (Barros et al., 2016; Sevegnani et al., 2016) e vacas holandesas (Hoffmann et al., 2013) as temperaturas da superfície do olho e das orelhas apresentaram-se altamente correlacionadas com as temperaturas retais. Dessa maneira, as termografias de diferentes regiões do corpo podem ser estudadas refletindo de maneira fidedigna a temperatura retal de maneira rápida, precisa e menos invasiva, uma vez que a pele funciona como um sistema de arrefecimento, irradiando temperatura.

As variações climáticas são capazes de influenciar a manutenção da temperatura da superfície corporal assim como da TR em touros Nelore (Ruediger et al., 2016), vacas de leite (Chacur et al., 2016a), caprinos (Ricarte et al., 2014) e búfalos (Sevegnani et al., 2016). Esta influência foi notada ao correlacionar as variáveis climáticas (WBGT, TA, TG e UR) e as temperaturas da superfície de diferentes regiões corporais com a TR, encontrando-se maiores correlações entre os fatores climáticos e as temperaturas corporais e retal no período da tarde, o qual foi mais quente, em relação ao da manhã. Este fato está relacionado com as temperaturas corporais variarem durante as horas do dia, sendo mais influenciadas quando o clima apresenta temperaturas elevadas (Nabenish et al., 2011; Talukder et al., 2014), sendo a temperatura

ambiente ideal sugerida para a obtenção de imagens térmicas a superfície da pele próximas de 20°C (Sykes et al., 2012).

Para alcançar boas taxas de concepção com a utilização da IATF, pode-se utilizar a detecção do estro de forma auxiliar (Sá Filho et al., 2011). Em busca de novas técnicas para auxiliar no diagnóstico do cio, Osawa et al. (2004) estudaram as variações das temperaturas da vulva em vacas e observaram um aumento na temperatura da superfície vulvar de vacas em estro vs diestro e Sykes et al. (2012) notaram o mesmo fenômeno em porcas. O mesmo ocorreu em nosso experimento, havendo uma maior temperatura não somente da vulva como também da mufla e do olho no período pré-ovulatório em relação ao período de diestro (Tabela 3).

Constatada esta diferença das temperaturas corporais que ocorrem entre o estro e o diestro e considerando a menor influência dos fatores climáticos no período matutino, foram avaliadas as variações das temperaturas da superfície da vulva, da mufla, do olho e da TR dia-a-dia neste período. Desta maneira observou-se uma variação das temperaturas da superfície da vulva, apontando menores temperaturas nos dias 16, 20, 24 e 28, sendo esta inversamente proporcional à variação diária da concentração plasmática de P4 (Figura 3). A variação da temperatura da superfície da vulva que ocorre previamente a ovulação, deve-se provavelmente a alteração do fluxo sanguíneo nesta região devido a elevação da concentração plasmática de estrogênio que ocorre durante a foliculogênese (Scolari et al., 2011) e posterior a ovulação devido a concentração plasmática de P4 eminentes ao desenvolvimento luteínico (Talukder et al., 2014). Sendo assim, encontramos correlações negativas fortes entre a concentração plasmática de P4 e a temperatura da superfície da vulva, corroborando com a hipótese do autor supracitado de que a temperatura da superfície da vulva decresce ao haver um incremento da P4 plasmática, assim como a hipótese proposta por Sykes et al. (2012).

Talukder et al. (2014) utilizando vacas leiteiras e Simões et al. (2014) em marrãs, observaram o mesmo padrão de variação de temperatura da superfície vulvar entre estro e diestro que os encontrados no presente estudo (Figura 3), porém ambos encontraram um pico de temperatura da superfície vulvar 48 horas antes de ocorrer a ovulação, o que não foi observado em nosso trabalho provavelmente devido à utilização de acetato de buserelina no 11º dia do protocolo hormonal para indução da ovulação, que pode ter afetado o sistema fisiológico para ovulação alterando o padrão da temperatura vulvar.

No presente experimento não foi observado o mesmo padrão de variação das temperaturas da superfície da mufla, do olho e TR durante os dias, diferentemente de Talukder et al. (2014) que mostraram uma variação da temperatura da mufla acompanhando a variação da temperatura da superfície da vulva durante o ciclo estral dos animais. Esta discordância pode ter sido observada pelo fato deste estudo ter sido realizado em condições de clima tropical com os animais à campo diferentemente de Talukder et al. (2014) que utilizaram vacas de *free stall*, com temperatura amena e controlada tendo menor influência do clima sobre a temperatura da mufla, possibilitando desta maneira a observação do padrão termográfico ocasionado pela variação hormonal inerente a ovulação.

Apesar de não terem demonstrado eficiência no diagnóstico do estro, as temperaturas da superfície do olho e da mufla apresentaram correlação com a temperatura retal, com os dados climáticos e com as concentrações plasmáticas de cortisol. As alterações nas temperaturas da superfície do olho e da mufla acompanhadas pelas variações climáticas podem ser explicadas devido a dissipação de calor para o ambiente por vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo para os tecidos periféricos do corpo (Titto et al., 1998; Silanikove, 2000; Marai e Haebe, 2010), uma vez que os búfalos são mais suscetíveis as alterações climáticas e ao estresse térmico, por possuírem corpo escuro e menor número de glândulas sudoríparas (Gudev et al., 2007; Marai et al., 2009; Wagenmaker et al., 2009; Marai e Haebe, 2010). Ademais, o estresse térmico pode

ocasionar variações na concentração plasmática de cortisol (Christison e Johnson, 1972; Leining et al., 1980; Nessim, 2004) levando à prejuízos na atividade produtiva e reprodutiva dos rebanhos (Barros et al., 2016; Chacur et al., 2016b; Sevegnani et al., 2016). Assim, as termografias da superfície dessas regiões do corpo podem ser utilizadas no estudo de conforto térmico de búfalas leiteiras.

5. Conclusão

A TDPI é eficaz na mensuração das temperaturas de diferentes regiões do corpo animal, estando essas relacionadas com a temperatura retal. A temperatura vulvar é efetiva na captação das alterações fisiológicas inerentes ao ciclo reprodutivo, podendo ser futuramente utilizada como método auxiliar em programas de IATF de búflas. As temperaturas da mufla e do olho correlacionam-se com a TR e fatores climáticos podendo ser utilizadas como método auxiliar na avaliação do bem-estar animal de fêmeas bubalinas. Visando sua padronização, são recomendados outros estudos sobre utilização da TDPI como técnica complementar no exame reprodutivo de búfalas.

Agradecemos a FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro concedido.

Referências

- Alsaad, M., Büscher, W., 2012. Detection of hoof lesions using digital infrared thermography in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 95, 735–742.
- Barros, D.V., Silva, L.K.X., Kahwage, P.R., Lourenço Júnior, J.B., Sousa, J.S., Silva, A.G.M., Franco, I.M., Martorano, L.G.; Garcia, A. R., 2016. Assessment of surface temperatures of buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) raised under tropical conditions using infrared thermography. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 68, 422–430.

Baruselli, P.S., Soares, J.G., Gimenes, L.U., Monteiro, B.M., Olazarri, M.J., Carvalho, N.A.T., 2013. Control of Buffalo Follicular Dynamics for Artificial Insemination, Superovulation and *In Vitro* Embryo Production. *Buff. Bull.* 32,160-176.

Chacur, M.G.M., Bastos, G.P., Vivian, D.S., Silva, L., Chiari, L.N.F., Araujo, J.S., Souza, C.D., Gabriel Filho, L.R.A., 2016a. Use of infrared thermography to evaluate the influence of the of Climatic Factors in the Reproduction and Lactation of Dairy Cattle. *Acta Sci. Vet.* 44, 1412–1421.

Chacur, M.G.M., Souza, C.D., Bastos, G.P., Gabriel Filho, L.R.A., Cremasco, C.P., Putti, F.F., 2016b. Fatores climáticos e bem-estar em bovinos: enfoque na reprodução e lactação, second ed, in: Silva, A.L.C., Benini, S.M., Dias, L.S. (Org.), Fórum Ambiental - Uma visão multidisciplinar da questão ambiental. Brasil: ANAP, pp. 253–270.

Christison, G.I., Johnson, H.D., 1972. Cortisol turnover in heat stressed cows. *Journal of Animal Science.* 35, 1005–1010.

Clapper, J.A., Ottobre, J.S., Ottobre, A.C., Zartman, D.L., 1990. Estrual rise in body temperature in the bovine I. Temporal relationships with serum patterns of reproductive hormones. *Animal Reproduction Science.* 23, 89– 98.

Colak, A., Polat, B., Okumus, Z., Kaya, M., Yanmaz, L.E., Hayirli, A., 2008. Short communication: early detection of mastitis using infrared thermography in dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 91, 4244–4248.

Cravello, B., Ferri, A., 2008. Relationships between skin properties and environmental parameters. *Skin Research Technology.* 14, 180–186.

Fisher, A.D., Morton, R., Dempsey, J.M., Henshall, J.M., Hill, J.R., 2008. Evaluation of a new approach for the estimation of the time of the LH surge in dairy cows using vaginal temperature and electrodeless conductivity measurements. *Theriogenology.* 70, 1065–1074.

- George, W.D., Godfrey, R.W., Ketring, R.C., Vinson, M.C., Willard, S.T., 2014. Relationship among eye and muzzle temperatures measured using digital infrared thermal imaging and vaginal and rectal temperatures in hair sheep and cattle. *Journal of Animal Science*. 92, 4949–4955.
- Gudev, D., Popova-Ralcheva, S., Moneva, P., Aleksiev, Y., Peeva, T., Ilieva, Y., Penchev, P., 2007. Effect of heatstress on some physiological and biochemical parameters in buffaloes. *Italian Journal of Animal Science*. 6, 1325–1328.
- Hockey, C.D., Morton, J.M., Norman, S.T., McGowan, M.R., 2010. Evaluation of a neck mounted 2-hourly activity meter system for detecting cows about to ovulate in two paddock-based Australian dairy herds. *Reproduction in Domestic Animals*. 45, 107–117.
- Hoffmann, G., Schmidt, M., Ammon, C., Rose-Meierhöfer, S., Urfeind, O., Heuwieser, W., 2013. Monitoring the body temperature of cows and calves using video recordings from an infrared thermography camera. *Veterinary Research Communications*. 37, 91–99.
- Kastelic, J.P., Cook, R.B., Coulter, G.H., Wallins, G.L., Entz, T., 1996. Environmental factors affecting measurement of bovine scrotal surface temperature with infrared thermography. *Animal Reproduction Science*. 41, 153–159.
- Kyle, B.L., Kennedy, A.D., Small, J.A., 1998. Measurement of vaginal temperature by radiotelemetry for the prediction of estrus in beef cows. *Theriogenology*. 49, 1437–1449.
- Leining, K.B., Tucker, A.H., Kesner, J.S., 1980. Growth Hormone, Glucocorticoid and Thyroxine Response to Duration, Intensity and Wavelength of Light in Prepubertal Bulls. *American Society of Animal Science*. 51, 932–942.
- Levine, D.M., Berenson, M.L., Stephan, D., 2012. *Estatística: Teoria e Aplicações*. 6th ed. LTC, Rio de Janeiro, RJ.

- Marai, I.F.M., Daader, A.H., Soliman, A.M., El-Menshaw, S.M.S., 2009. Non-genetic factors affecting growth and reproduction traits of buffloes under dry management housing in Egypt. *Livestock Research for Rural Development*. 21, 1–13.
- Marai, I.F.M., Haebe, A.A.M., 2010. Buffalo's biological functions as affected by heat stress - A review. *Livestock Science*. 127, 89–109.
- Mosher, M.D., Ottobre, J.S., Haibel, G.K., Zartman, D. L., 1990. Estrus rise in body temperature in the bovine II. The temporal relationship with ovulation. *Animal Reproduction Science*. 23, 99–107.
- Nabenishi, H., Ohta, H., Nishimoto, T., Morita, T., Ashizawa, K., Tsuzuki, Y., 2011. Effect of the temperature-humidity index on body temperature and conception rate of lactating dairy cows in southwestern Japan. *J. Reprod. Dev.* 57,(4),450–6.
- Nessim, M.G. Heat-induced biological changes as heat tolerance indices related to growth performance in buffaloes. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Cairo, Egypt.
- Osawa, T., Tanaka, M., Morimatsu, M., Hashizume, K., Syuto, B., 2004. Use of infrared thermography to detect the change in the body surface temperature with estrus in the cow. *Proceedings from the Society for Theriogenology Annual Conference*, Lexington, Kentucky.
- Purohit, R.C., Hudson, R.S., Riddell, M.G., Carson, R.L., Wolfe, D. F., Walker, D.F., 1985. Thermography of the bovine scrotum. *American Journal of Veterinary Research*. 46, 2388–2392.
- Redden, K.D., Kennedy, A.D., Ingall, S.J.R., Gilson, T.L., 1993. Detection of estrus by radiotelemetric monitoring of vaginal and ear skin temperature and pedometer measurements of activity. *Journal of Dairy Science*. 76, 713–721.
- Ricarte, A.R.F., Façanha, D.A.E., Costa, L.L.M., 2014. Possibilidades na utilização da

termografia infravermelha no diagnóstico reprodutivo de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*. 8, (2), 380–384.

Roelofs, J.B., Van Eerdenburg, F.J., Soede, N.M., Kemp, B., 2005. Pedometer readings for estrous detection and as predictor for time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology*. 64, 1690–1703.

Ruediger, F.R., Chacur, M.G.M., Alves, F.C.P.E., Oba, E., Ramos, A.A., 2016. Digital infrared thermography of the scrotum, semen quality, serum testosterone levels in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) and their correlation with climatic factors. *Semina: Ciências Agrárias*. 37, 221–232.

Sá Filho, M.F., Santos, J.E.P., Ferreira, R.M., Sales, J.N.S., Baruselli, P.S., 2011. Importance of estrus on pregnancy submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*. 76, 466-463.

SAS Institute. 2009. Statistical Analysis System. Version 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Scolari, S.C., Clark, S.G., Knox, R.V., 2011. Vulvar skin temperature changes significantly during estrus in swine as determined by digital infrared thermography. *Journal of Swine Health and Production*. 19, 151–155.

Sevegnani, K.B., Fernandes, D.P.B., Silva, S.H.M.G., 2016. Evaluation of thermoregulatory capacity of dairy buffaloes using infrared thermography. *Engenharia Agrícola*. 36(1), 1-12.

Silanikove, N., 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livestock Production Science*. 67, 1-18.

Simões, V. G.; Lyazrhi, F.; Picard-Hagen, N.; Gayraud, V.; Martineau, G. P.; Waret-Szkuta, A., 2014. Variations in the vulvar temperature of sows during proestrus and estrus as determined by infrared thermography and its relation to ovulation. *Theriogenology*. 82, 1080–1085.

Singh, J., Nanda, A.S., Adams, G.P., 2000. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. *Animal Reproduction Science*. 60/61, 593–604.

Stewart, M.; Webster, J.R., Stafford, K.J., Schaefer, A.L., Verkerk, G.A., 2010. Technical note: Effects of an epinephrine infusion on eye temperature and heart rate variability in bull calves. *Journal of Dairy Science*. 93, 5252–5257.

Stull, R., 2011. Wet-Bulb Temperature from Relative Humidity and Air Temperature. *American Meteorological Society*. 50, 2267 – 69.

Sykes, D.J., Couvillion, J.S., Cromiak, A., Bowers, S., Schenck, E., Crenshaw, M., 2012. The use of digital infrared thermal imaging to detect estrus in gilts. *Theriogenology*. 78, 147–152.

Talukder, S., Kerrisk, K.L., Ingenhoff, L., Thomson, P.C., Garcia, S.C., Celia, P., 2014. Infrared technology for estrus detection and as a predictor of time of ovulation in dairy cows in a pasture-based system. *Theriogenology*. 81, 925–935.

Titto, E.A.L., Velloso, L., Zanetti, M.A., Cresta, A., Toledo, L.R.A., Martins, J.H., 1998. Teste da tolerância ao calor em novilhos nelore e marchigiana. *Revista Portuguesa de Zootecnia*. 5, (1), 67–70.

Wagenmaker, E.R., Breen, K.M., Oakley, A.E., Pierse, B.N., Tilbrook, A.J., Turner, A.I., 2009. Cortisol interferes with the estradiol-induced surge of luteinizing hormone in the ewe. *Biology of Reproduction*. 80, 458–463.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o protocolo hormonal para sincronização da ovulação à base de progesterona, estrogênio e GnRH, com ou sem a adição de eCG o desenvolvimento do diâmetro e da irrigação do folículo ocorreu de forma progressiva entre o dia da retirada do presário vaginal de progesterona e o dia da ovulação, sendo que o aumento da irrigação foi mais evidente próximo a ovulação. O desenvolvimento luteínico ocorreu de forma progressiva, tanto em seu diâmetro quanto em sua irrigação, ocorrendo uma queda de sua irrigação devido a luteólise, previamente a diminuição do seu diâmetro. Essas alterações foram acompanhadas pela concentração plasmática de progesterona. O grupo em que foi administrada a eCG apresentou uma maior concentração de progesterona durante a fase luteínica, sendo este acompanhado por melhor aporte sanguíneo do corpo lúteo e do folículo pré-ovulatório.

A termografia digital superficial por infravermelho mostrou-se eficaz na mensuração das alterações de temperaturas em diferentes regiões do corpo causadas por eventos fisiológicos. Utilizando a termografia digital superficial foi possível observar que as temperaturas vulvares sofrem uma redução após a ovulação, devido ao aumento da concentração plasmática de progesterona e as temperaturas da mufla e olho apresentam potencial para auxiliar na avaliação de bem-estar animal.

Dessa maneira, a termografia digital superficial e a ultrassonografia doppler podem ser utilizadas no estudo dos eventos fisiológicos inerentes a reprodução de fêmeas bubalinas, auxiliando na compreensão destes em pesquisas. A utilização de protocolo hormonal com eCG é recomendado em búfalas, podendo colaborar com a taxa de prenhez, e a termografia mostrou potencial para auxiliar no diagnóstico do cio em programas de IATF, sendo necessários novos estudos para a padronização da técnica.