



## Exame andrológico de bubalinos *Andrological examination of buffalos*

Marc Henry<sup>1</sup>, Mayara Ferreira Brito, Beatriz Parzewski Neves, Patrícia A Auler, Jaci Almeida, Guilherme Oliveira Andrade, Verônica Becerra Becerra, Luísa Bergmann

Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>1</sup>Correspondência: [henrym2601@gmail.com](mailto:henrym2601@gmail.com)

### Resumo

A revisão tem como objetivo reavivar as particularidades da espécie bubalina visando a avaliação andrológica. São abordadas as particularidades e anormalidades de desenvolvimento do sistema genital do macho, aspectos da puberdade e maturidade sexual, particularidades do comportamento reprodutivo, características do espermatozoide, líquido seminal e do ejaculado de búfalos.

**Palavras-chave:** *Bubalus bubalis*, sêmen, qualidade espermática.

### Abstract

*The literature review focuses particularities of the buffalo specie and is directed to veterinarians aiming the breeding soundness evaluation of bulls. Anatomical and abnormal developmental aspects of the genital tract are approached; puberty and sexual maturity, particularities of the reproductive behavior, characteristics of the sperm cells, seminal fluid and ejaculate are discussed.*

**Keywords:** *Bubalus bubalis*, semen, sperm quality.

### Introdução

A avaliação andrológica dos animais domésticos visa determinar a aptidão reprodutiva de um indivíduo. Para isso aspectos da saúde geral do animal, genética e normalidade do sistema genital e da produção espermática devem ser considerados.

A meta é estabelecer com precisão qual o “potencial reprodutivo” de um macho, i.e., quantas fêmeas ele estaria apto a fertilizar sem que ocorra uma queda nos índices de fertilidade desejados por ciclo estral (60%). No entanto, a obtenção deste “índice” é tarefa que exige uma avaliação completa do animal, o que nem sempre é possível. Primeiro é necessário excluir os machos com qualquer defeito de desenvolvimento do sistema genital. Além da avaliação da qualidade seminal, é desejável estimar sua produção espermática diária, avaliar adequadamente a sua capacidade física de executar a cópula e complementar com uma avaliação da libido/capacidade de monta em sistema de monta a campo. Este último parâmetro é o mais difícil de precisar.

Em vistas do interesse crescente da produção de bubalinos, seja com finalidade de produção de leite e subprodutos, seja para produção de carne, e considerando que o sucesso de qualquer sistema de produção é altamente dependente da eficiência reprodutiva, essa revisão pretende reforçar as particularidades da avaliação do potencial reprodutivo de touros bubalinos e contextualiza-las sob uma ótica adicional. Esses aspectos foram anteriormente abordados em outros trabalhos no Brasil e no mundo (Sansone et al., 2000; Vale et al., 2008; Ohashi et al., 2011; entre outros).

### Características anatômicas do sistema genital de machos bubalinos

O sistema genital de touros bubalinos apresenta grande similaridade com o de touros bovinos, tanto na presença de seus diversos constituintes (testículos, epidídimos, glândulas anexas [ampola dos ductos deferentes, vesiculares, próstata e bulbo uretrais] e pênis) como na localização topográfica de cada um. Destaca-se como diferença principal o tamanho de cada estrutura. Em comparação ao reprodutor bovino, as estruturas tendem a ser ligeiramente menores nos búfalos (Vale et al., 1981). As dimensões médias, por exemplo, das glândulas vesiculares estão entre 5 cm por 1,8 cm, e as das ampolas do ducto deferente aproximadamente 9,3 cm por 0,5 cm (em animais com peso entre 400 e 600kg) (Vale et al., 1981). O pênis do búfalo é fibroelástico e apresenta “S” peniano, assim como em bovinos, no entanto, apresentam comprimento e diâmetro menores – comprimento 80,1 e diâmetro 1,95 cm – e a glândula é menos desenvolvida (Vale et al. 2008).

O tamanho testicular por idade segue um padrão próprio da espécie sendo particularmente diferente do encontrado em bovinos, sobretudo se comparado aos taurinos. Estão disponíveis algumas tabelas de referência para determinadas faixas etárias (Ohashi, 1993; Vale et al, 2004 citado em CBRA, 2013). Regra geral, deseja-se

que touros de um ano possuam de 20 cm a 23 cm de circunferência escrotal, enquanto animais acima de três anos, considerados sexualmente maduros, apresentem circunferência acima de 30cm. Cabe ressaltar a grande variação existente entre animais, pela incipiência dos programas de seleção genética na espécie, e entre raças. Além disso, ao se avaliar uma população, as características de criação dos animais jovens, como por exemplo, a duração do aleitamento materno e a utilização de substitutos do leite, podem interferir no crescimento corporal inicial, e consequentemente no crescimento testicular (Barth et al., 2008).

Chama a atenção a região de inserção do escroto ao abdome nos búfalos. Esta não sofre um estreitamento evidente como o encontrado em bovinos, sendo percebida mais retilínea nas bordas laterais, na região da transição escroto-abdome. Adicionalmente, quando o cremaster e a túnica dartos estão em contração os testículos se alojam com maior facilidade nesta base alargada do escroto podendo dificultar a palpação e a mensuração dos testículos.

Assim como em todo o corpo, poucos pelos são encontrados no óstio prepucial e escroto. A bainha prepucial é curta, mais próxima ao abdome, e se assemelha a encontrada em touros bovinos de origem europeia (Fig. 1).



Figura 1. Inserção retilínea da base do escroto (A) e prepúcio de macho bubalino (B)

#### Anormalidades do desenvolvimento do sistema genital de machos bubalinos

Alterações do trato reprodutivo masculino encontradas na maioria dos animais domésticos também têm sido descritas em bubalinos. Essas patologias podem ser de causa genética e/ou congênita, como hipoplasia testicular (menor tamanho testicular, uni ou bilateral), aplasia testicular (ausência de desenvolvimento da gônada, uni ou bilateral), criptorquidismo, alterações de escroto (torções, bipartições, ou anomalias de inserção), alterações de glândulas anexas, entre outros. As patologias também podem ser adquiridas ou infecciosas, como o caso da degeneração testicular, resultante de algum processo estressante ao qual o testículo foi submetido por período extenso (Ohashi et al, 2011).

A incidência de patologias encontradas em um levantamento feito pelos autores em uma população de 2.280 machos, criados em diferentes regiões do Brasil está descrita na tabela 1. O diagnóstico da patologia foi baseado exclusivamente na inspeção e palpação das estruturas não sendo acompanhado de coleta seminal. Foram classificadas como patológicas as anormalidades presentes em gravidade ou intensidade inquestionáveis. Foram incluídas em uma mesma categoria as torções de escroto e/ou torções do cordão espermático/testículos. A ausência de um dos testículos foi incluída na categoria criptorquidismo ou monorquidismo em função da impossibilidade momentânea de se fazer um diagnóstico diferencial.

Tabela 1 – Incidência de patologias no sistema genital de machos bubalinos em diversas regiões do Brasil

Regiões	Número total de animais avaliados (n)	Testículo anormalmente alongado n (%)	Cripto ou mono orquidismo n (%)	Hipoplasia testicular n (%)	Torção escrotal e/ou testicular n (%)	Escroto bipartido n (%)
"A"	533	16(3,0)	2(0,4)	12(2,2)	11(2,0)	31(5,8)
"B"	1314	10(0,7)	6(0,4)	2(0,1)	152(11,6)	118(8,9)
"C"	433	2(0,5)	1(0,2)	0 (0)	13(3,0)	35(8,1)
Total	2280	28(1,2)	9(0,4)	14(0,6)	176(7,7)	184(8,1)



Pôde se observar que a ocorrência de anormalidades de desenvolvimento do sistema genital nos machos bubalinos foi considerável e foi encontrada em rebanhos em todas as regiões avaliadas. A incidência de cada anormalidade variou de uma região para outra indicando ter um componente "rebanho" na ocorrência das mesmas.

Em um grupo de 319 búfalos avaliados, Ohashi et al. (1995) reporta a incidência de 0,62% de hipoplasia. Em outro grupo de 123 touros examinados a incidência de hipoplasia testicular foi de 8,9 % (Vale e Ribeiro, 2009). Barbosa et al. (2010) relata uma incidência de problemas testiculares de 24,2% em um grupo de 305 reprodutores, dos quais 3,9 % era hipoplasia testicular. Das anomalias de escroto, 7,8% dos casos foram incluídos na categoria escroto bífido.

Vale e Ribeiro (2009) atribuem à frequência elevada de anormalidades de desenvolvimento do sistema genital em machos à alta consanguinidade que se encontra o rebanho brasileiro. Portanto, o decréscimo nesta incidência de anormalidades passa por um trabalho adequado de orientação e convencimento pela assessoria técnica.

### Puberdade e maturidade sexual em búfalos

Uma das formas de se definir a puberdade é quando no ejaculado encontra-se pelo menos 50 milhões de espermatozoides por ml e a motilidade espermática  $\geq 10\%$  (Wolf et al, 1965 -bovino; Ahmad et al., 1989-búfalo). Outra definição baseia-se na simples presença de espermatozoides no ejaculado (Backer et al, 1988-bovino). A definição de ocorrência baseada na presença de espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero avaliados por cortes histológicos também tem sido usada (França, 1987-suíno; Melo e Vale Filho, 1992-búfalo), enquanto outros associam os achados de ejaculado, a presença de libido e a capacidade de monta para considerar o animal púbere (Vale et al., 2008).

Ohashi (1988), baseando-se na apresentação dos primeiros instintos reprodutivos pelos machos (monta em machos e em fêmeas, interesse sexual, disputas por dominância e início da caracterização fenotípica masculina) considerou em um primeiro momento os animais púberes com idade média aos 8 a 9 meses, muito antes de apresentarem o início da produção espermática. Em trabalho posterior, este mesmo autor, ao analisar a contagem total de células espermáticas em determinado segmento do túbulo seminífero (cortes histológicos) observou que a evolução da produção espermática ocorre de forma gradual e lenta até os 12-14 meses de idade (Ohashi, 1993).

Segundo Oba (1993), em revisão sobre a fisiologia reprodutiva da espécie bubalina, a puberdade e a maturidade sexual em búfalos, ocorrem mais tardiamente quando comparada à espécie bovina, além da puberdade ser diretamente influenciada pela época de nascimento, estação do ano, disponibilidade de alimentos, raças, cruzamentos, manejo e diferenças individuais. Já Vale et al. (2002), sugerem que os búfalos entram na puberdade aos 12 meses, com peso corporal médio de 300 – 350kg e com uma circunferência escrotal de 22 – 25cm.

Segundo Vale et al. (2008) a maturidade sexual é atingida no momento em que o sêmen apresenta parâmetros desejáveis para um reprodutor (concentração, vigor, motilidade espermática, volume de ejaculado e redução das patologias espermáticas a níveis aceitáveis). Portanto, para o reconhecimento da maturidade sexual nos machos é importante o acompanhamento periódico e sequencial da evolução das características do sêmen do indivíduo, até a estabilização do quadro espermático, considerando, principalmente, os aspectos qualitativos do ejaculado.

Na literatura há divergência sobre o momento em que ocorre a maturidade sexual, isto se deve principalmente ao tipo de criação (extensiva, semi-confinada, confinada), a raça (Murrah, Jafarabadi, Mediterrâneo e Carabao), o tipo de manejo, região onde está situada a criação dos animais, nutrição e seleção genética. Ohashi (1993) relata a ocorrência de maturidade sexual em búfalos mestiços ao redor dos 24 a 30 meses de idade. Segundo Vale et al. (2008) tanto a puberdade quanto a maturidade sexual são mais tardias na subespécie Carabao (*Bubalus bubalis* variedade *Kerebau*).

O conceito de maturidade sexual tem que ser diferenciado do momento em que o animal se torna apto para a reprodução. O reprodutor está apto para a reprodução antes de atingir a maturidade sexual. A maturidade sexual é quando o reprodutor apresenta um quadro espermático estável, o crescimento testicular cessa, as características sexuais secundárias estão plenamente expressas e o máximo potencial de libido/cobrição é atingido. Cada uma dessas características pode ser atingida em idades diferentes, a maturidade é quando todas foram expressas. No estudo de Vale et al. (2004) ainda houve crescimento testicular acima de 53 meses (Tabela 2).

A tabela 2 resume os achados de literatura, onde pode-se verificar a idade a puberdade e maturidade sexual em diferentes raças, evidenciando uma variação de acordo com o país, local de criação, manejo e método de definição de puberdade.



Tabela 2 – Puberdade e maturidade sexual de machos bubalinos de diferentes raças.

Autor	Raça	Idade à puberdade (meses)	Idade à maturidade (meses)	Local	Método de diagnóstico
Ohashi et al. (1988)	Murrah	8-9	18-24	Brasil	Comportamento sexual
McCool e Entwistle (1989)	Carabao	24	-	Austrália	Produção espermática diária por grama de testículo
Melo (1991)	Mesticos Murrah x Mediterraneo	16	-	Brasil	Histologia testicular
Ohashi (1993)	Mesticos Murrah x Mediterraneo	12 - 24	-	Brasil	Histologia
Melo e Vale Filho (1993)	Mesticos Murrah x Mediterraneo	18 - 24	-	Brasil	Histologia
Vale et al. (2001)	Murrah	-	30 – 36	Brasil <sup>1</sup> Amazônia	
Vale et al. (2002)	Murrah	12	-	Brasil	
Ribeiro (2006)	Murrah	< 15	20	Brasil <sup>2</sup> Amazônia	
Ribeiro (2006)	Murrah	24 - 36	-	Brasil <sup>3</sup> Amazônia	
Koojaenak (2006)	Carabao	-	3 – 4 anos	Tailândia	
Ahmad et al. (2010)	Nili-Ravi	22,8	-	Paquistão	Histologia

<sup>1</sup>Rebanho bem manejado; <sup>2</sup>Rebanho de elite; <sup>3</sup>Criacao extensiva. (Adaptado de Ayala, 2011).

### Comportamento reprodutivo e coleta do sêmen

O bubalino é considerado um animal fácil de adaptar e ser capacitado para a coleta de sêmen em vagina artificial (Sansone et al., 2000; Vale, 2011). Recomenda-se que, quando possível, o treinamento se inicie a partir dos 14-15 meses, pois nesse período os machos, sobretudo quando são criados juntos, apresentam intensa atividade de monta uns nos outros (homossexualismo).

Para coleta de sêmen recomenda-se a utilização de vagina artificial, cujo modelo é o mesmo utilizado em bovinos, podendo ser um pouco mais curta – em torno de 30 a 35 cm de comprimento. Não há necessidade de lubrificação (lubrificação natural do pênis é suficiente) e a temperatura interna da vagina artificial deve estar entre 42 e 45°C (Sansone et al., 2000; Ohashi et al., 2011; Vale, 2011). Recomenda-se, para cada sessão de coleta por vagina artificial, a realização de falsas montas para aumentar a qualidade do ejaculado, e quando efetivas, recomenda-se a utilização de dois ejaculados, espaçados de 30 minutos (Sansone et al., 2000; Ohashi et al., 2011; Vale, 2011).

O macho bubalino é considerado de mais baixa libido que os touros da espécie bovina (Vale et al., 2008). Atribui-se esse fato a uma menor circulação de andrógenos (Nikam et al., 2005). Portanto o tempo de reação do macho bubalino pode ser um pouco mais longo que aquele observado no bovino, em torno de 10 a 15 minutos (Vale, 2011).

Considerando esse aspecto, característico da espécie, a avaliação de libido comumente praticada em bovinos deve ser empregada com ressalvas na espécie bubalina. Geralmente a avaliação é realizada em ambiente e tempo questionáveis, diferentes do que acontece em ambiente natural, como os sistemas extensivos de criação podem propiciar. Os testes de libido/capacidade de monta em bovinos têm mostrado com substancial grau de acuidade os reprodutores de baixa libido, mas a estimativa de quantas fêmeas cada reprodutor estaria apto a cobrir sem qualquer prejuízo de fertilidade é uma meta mais complicada de ser alcançada. A maneira mais precisa de alcançar esse objetivo seria acompanhar a real atividade do reprodutor em monta a campo. É essencial para alcançar esta meta que o número de fêmeas venha a desafiá-lo e por um período que o permita passar pelo período inicial de ansiedade do início da estação de monta. Na espécie bubalina, estudos dessa natureza seriam indicados com o intuito de melhor definir a proporção macho fêmea que venha a potencializar o uso de cada macho em monta natural.

Além do método de vagina artificial, os métodos de eletroejaculação e massagem de ampolas dos ductos deferentes, por palpação retal, também são possíveis. Contudo, por serem muito reativos aos estímulos elétricos, recomenda-se que seja preconizado apenas em animais jovens e com contenção adequada, evitando-se acidentes (Ohashi et al, 2011). Quanto ao sêmen coletado por massagem de ampolas, a avaliação da qualidade



seminal deve ser criteriosa e considerar que pode não representar a realidade do ejaculado (como ocorre em outras espécies).

### Características bioquímicas do espermatozoide e sêmen de bubalinos

O espermatozoide bubalino apresenta uma razão de lipídeos e fosfolipídeos na membrana plasmática, menor que aquela encontrada em bovinos. A quantidade de fosfolipídeos estimada no espermatozoide de búfalos Murrah foi aproximadamente 0,064 mg/10<sup>9</sup> células (Sarmah et al, 1983), enquanto para *Bos taurus* essa quantidade foi estimada em 0,416 mg/10<sup>9</sup> células (Jain e Anand, 1976 citado por Andrabi, 2009). Desses fosfolípedes os principais componentes da membrana do espermatozoide bubalino são a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina e a esfingomielina (Sarmah et al., 1983). As diferenças apontadas podem ser um fator responsável por uma menor resistência ao choque frio, pois alteram a fluidez da membrana.

Quanto ao plasma seminal, o que foi observado é que o total de lipídeos é maior que no plasma seminal de bovinos (483,95 mg/dL em búfalos Murrah versus 265,46 mg/dL em Jersey). Já a quantidade de colesterol encontrada no plasma seminal de búfalos é significativamente menor que em *Bos taurus* (Nikam et al., 2005). Considerando o plasma seminal como uma fonte de colesterol para a membrana do espermatozoide, e que este auxilia na manutenção da sua integridade estrutural, a menor disponibilidade de colesterol pode também afetar negativamente o processo de congelamento (Nikam et al., 2005).

Quanto aos constituintes inorgânicos do plasma seminal também são apontadas diferenças em comparação aos de bovinos. Para cálcio os valores reportados estão próximos a 22,36 mg/dL (bovinos – 28 mg/dL), e para magnésio próximos a 11,94 mg/dL (bovino - 9,8 mg/dL). Esses dois minerais foram altamente correlacionados com parâmetros como motilidade de massa, motilidade progressiva e viabilidade espermática, sendo que quanto melhores os parâmetros cinéticos maiores as concentrações desses minerais (Eghbali et al., 2010).

### Características físicas do ejaculado

A coloração do ejaculado depende da concentração da amostra, portanto podem ser encontrados ejaculados de aquosos a leitosos e cremosos, podendo apresentar, quando a concentração for muito alta, rasgos de cor azul escura quando olhado contra a luz (Jainudeen et al., 1981/1982; Vale, 2011).

O volume é uma característica também variável, principalmente de acordo com a idade do touro. Em touros jovens geralmente espera-se obter volumes entre 1 e 3 mL. Já em touros adultos, plenamente maduros, podem-se obter amostras de 4 a 8 mL (Vale, 2011; Ohashi et al., 2011).

Assim como na maioria dos ruminantes domésticos é desejável encontrar turbilhonamento no ejaculado, acima de 3, em uma escala de 0 a 5 (Vale, 2011). Em trabalho realizado por Jainudeen et al., 1981/1982 observou-se que o movimento de “onda” de alta magnitude somente era percebido em ejaculados com concentrações maiores que 800 milhões de células/mL e motilidade total maior que 70%.

A motilidade espermática é uma variável importante e sua análise é fundamental para a determinação da qualidade do ejaculado. Deve ser avaliada imediatamente após a coleta, de forma subjetiva, em microscópio, ou por metodologia computadorizada, CASA. Segundo escala elaborada por Vale (2011) um ejaculado pode ser considerado de muito boa motilidade quando apresentar acima de 80% de espermatozoides móveis e de pobre motilidade se apresentar abaixo de 40%.

Quanto a concentração espermática no ejaculado bubalino normal é esperada uma variação de 0,6 x 10<sup>6</sup> a 1,2 x 10<sup>6</sup> /mL (Vale, 2011). Em estudo realizado na Bahia com touros búfalos, Aguiar et al. (1994) encontraram uma concentração média de 1.166,3 ± 17,5 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ mL. Para contagem de células em câmara de Neubauer, Vale (2011) recomenda a diluição em formol salina de 1:200.

Outro importante parâmetro que avalia a qualidade do ejaculado é a porcentagem de espermatozoides vivos na amostra. Segundo Sansone et al. (2000) uma amostra de sêmen com mais de 30% de espermatozoides mortos, antes do resfriamento, não pode ser aceita para o processo de criopreservação. A avaliação de viabilidade (integridade de membranas) pode ser realizada pela coloração com Eosina. Nessa coloração os espermatozoides vivos irão se apresentar claros ou sem coloração, enquanto os mortos terão forte tonalidade rósea (Vale, 2011). A preparação úmida, quando os espermatozoides são fixados em solução formol-salina, também é empregada para a avaliação da morfologia espermática, utilizando-se para análise um microscópio de contraste de fase (X1000). A coloração de espermatozoides em esfregaço seco é uma alternativa quando não for possível avaliar uma preparação úmida.

Em relação ao pH, o sêmen de búfalo coletado através de vagina artificial, apresenta um pH variando entre 6,5 a 7,2. O pH deve ser determinado imediatamente após a coleta, pois o sêmen bubalino tem uma maior tendência a se acidificar por conter uma concentração elevada de açúcares. Estes são transformados em ácido láctico diminuindo o pH do sêmen, e, por consequência, aumentando o índice de alterações irreversíveis do espermatozoide (Vale, 2011).



### Considerações finais

A avaliação andrológica de touros bubalinos é uma necessidade absoluta em sistemas de produção contemporâneos. Se o condicionamento de machos bubalinos à coleta seminal pelo método de vagina artificial não parece ser um problema, o uso do eletroejaculador e a massagem das ampolas são métodos que tem que ser empregados com restrição nesta espécie. A restrição ao uso da eletroejaculação é principalmente devido à alta sensibilidade de alguns machos, particularmente os mais velhos, podendo reagir de forma violenta aos estímulos elétricos, como pela qualidade questionável da amostra coletada nos dois métodos que pode prejudicar a precisão da avaliação do potencial do reprodutor. Outro aspecto é a dificuldade de manter búfalos adultos em regime de coleta pela vagina artificial por períodos prolongados.

A incidência de anormalidades de desenvolvimento de partes do sistema genital encontradas em rebanhos distribuídos em todo território deve ser considerada com rigor. Também é imprescindível a construção de tabelas de referência do desenvolvimento testicular nesta espécie e por raça, envolvendo a participação conjunta dos técnicos que militam com búfalos. A luta é para que estas tabelas 'referência' venham direcionar os trabalhos de seleção genética com maior precisão até que outras tecnologias de seleção andrológica venham a ser desenvolvidas. A dificuldade está na obtenção de informações que de fato representem o potencial genético dos reprodutores e das populações avaliadas. Para isso acontecer é necessário que os machos em todas as categorias de idade sejam criados sob boas práticas de manejo, particularmente manejo nutricional. Desta forma os valores encontrados para cada categoria de idade representarão melhor o potencial genético de cada animal.

Pode-se observar que na área da andrologia os desafios a serem vencidos na espécie bubalina são particularmente interessantes. O incentivo à elaboração e a participação em programas de seleção genética associados ao controle das características reprodutivas é uma meta a ser cumprida por todos os técnicos que assessoram sistemas produtivos bubalinos. A andrologia tem uma grande contribuição a dar.

### Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. Produção do INCT da Pecuária.

### Referências

- Ahmad N, Shahab M, Khurshid S, Arslan M.** Pubertal development in the male buffalo: longitudinal analysis of body growth, testicular size and serum profiles of testosterone and oestradiol. *Anim Reprod Sci*, v.16, p.161-170, 1989.
- Ahmad N, Umair S, Shahab M, Arslan M.** Testicular development and establishment of spermatogenesis in Nili-Ravi buffalo bulls. *Theriogenology*, v.73, p.20-25, 2010.
- Andrabi S.** Factors Affecting the Quality of Cryopreserved Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.552-569, 2009.
- Ayala, HDM.** Ultrassonografia testicular, em machos bubalinos criados em regime extensivo no estado do Pará. 2011. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural – UFPA, Belém, PA, 2011.
- Baker JF, Stewart TS, Long CR, Cartwright TC.** Multiple regression and principal components analysis of puberty and growth in cattle. *J Anim Sci*, v.66, p.2167-2158, 1988.
- Barbosa EM, Ribeiro HFL, Rolim Filho ST, Ferreira RN, Garcia OS, Ayala HDM, Vale WG.** Prevalence of reproductive abnormalities in the buffalo genital tract in Amazon Region, Brazil. *Rev Vet*, v.21, suppl.1, p.955-957, 2010.
- Barth AD, Brito LF, Kastelic JP.** The effect of nutrition on sexual development of bulls. *Theriogenology*, v.70, p.485-94, 2008.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3 ed, Belo Horizonte: CBRA, 104p., 2013.
- Eghbali M, Shoushtari SMA, Rezaei SA.** Calcium, Magnesium and Total Antioxidant Capacity (TAC) in Seminal Plasma of Water Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Bulls and their Relationships with Semen Characteristics. *Vet Research Forum*, v.1, n.1, p.12-20, 2010.
- França LR.** Desenvolvimento testicular de suínos da raça Piau, do nascimento aos 12 meses de idade. 1987. 79f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, 1987.
- Jainudeen MR, Bongso TA, Dass S.** Semen characteristics of the swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci*, v. 4, p. 213-217, 1981/82.
- Koonjaenak S.** Semen and sperm characteristics of Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls for artificial insemination in Thailand, in relation to season. 50f. Doctoral thesis. Swedsh University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2006.
- Melo MIV, Vale Filho VR.** Puberdade em búfalos mestiços. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.44, p.537-542, 1992.



- Melo MIV, Vale Filho VR.** Análise quantitativa do processo espermatogênico de búfalos jovens. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.17, p.75-80, 1983.
- McCool CJ, Entwistle KW.** The development of puberty and sexual maturity in the Australian Swamp Buffalo. *Bull. Theriogenology*, v.32, p.171-184, 1989.
- Nikan SR, Deshmukh BT, Vadnere NB.** et al. Comparative appraisal of seminal plasma lipid profile in buffalo and cow bulls. *J Bombay Vet Coll*, v.13, p.46-49, 2005.
- 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, 202p. 1993.
- Ohashi OM.** Aspecto reprodutivo do macho bubalino. In: *Bubalinos: fisiologia e patologia da reprodução*. Fundação Cargill, Campinas, p.69-86, 1988.
- Ohashi OM.** Estudo morfofisiológico do testículo de búfalos mestiços (*B. bubalis*) em diferentes idades [dissertation]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 1993.
- Ohashi OM, Vale WG, Sousa JS, Silva AOA.** Disturbance of testicular development in buffaloes (*Bubalus bubalis*): *Hypoplasia and aplasia*. *Buffalo Journal*, v.1, p.97-101, 1995.
- Ohashi OM, Santos SSD, Miranda MS, Cordeiro MS, Costa NN, Silva TVG.** Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.88-94, 2011.
- Sansone G, Nastri MJF, Fabbrocini A.** Storage of buffalo (*Bubalis bubalis*) semen. *Anim Repr Sci*, v. 62, p. 55-76, 2000.
- Sarmah BC, Kaker ML, Razdan MN.** Total lipids and phospholipids in buffalo semen (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.20, n.5, 1983.
- Vale WG, Sousa JS, Ohashi OM, Ribeiro FHL.** Biometria do sistema genital de búfalos. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 4, p.66-74, 1981.
- Vale WG, Gastal DW, Senel-Oliveira MV, Mondadori RG.** Relationship of age, bodyweight and scrotal circumference in Murrah buffalo bulls. In: *World Buffalo Congress, 5, 2001, Maracaibo, Venezuela. Proceedings...* Maracaibo: WBC, 2001 v.2, p.256-262.
- Vale WG, Silva AOA, Sousa JS, Pereira WLA, Magalhães AN, Oliveira CM, Ribeiro HFL.** Arrested development of the mesonephric ducts in a Murrah buffalo bull. In: *Buffalo Symposium of Americas, 1, 2002, Belém, PA, 2002. Proceedings...* Belém: BSA, 2002.
- Ribeiro HFL.** Aspectos reprodutivos de bubalinos criados na região Amazônica. *Rev Cien Agr, Belém*, n.45, 2006.
- Vale WG, Ribeiro HFL, Souza JS, Silva AOA, EM Barbosa, ST Rolim Filho.** Seleção e avaliação andrológica do reprodutor bubalino. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.32, p.141-155, 2008.
- Vale WG, Ribeiro HFL.** Inheritance causes of buffalo bulls infertility in Brazil. *Buffalo Newslett*, n.24, p.3-9, 2009.
- Vale WG.** Avances biotecnológicos em reproducción de búfalos. *Tecnología em Marcha*, v.24, n.5, Revista Especial, p. 89-90, 2011.
- Wolf FR, Almquist JO, Hale EB.** Prepubertal behavior and pubertal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. *J Anim Sci*, v.24, p.761, 1965.
-