

Biometria testicular e sua influência no comportamento sexual de búfalos (*Bubalus bubalis*)

Testicular Parameters and its Influence in Buffaloes (*Bubalus bubalis*) Sexual Behaviour

Mariana Hyppolito, Mariana Furtado Zorzetto, Edjalma Rodrigues da Silva-Junior, Stella Maris Teobaldo Tironi, Alessandra Gomes Souza, Viviane Maria Codognoto, Andressa Filaz Vieira, Leticia Cristina Salgado, Nayara Fernanda Silva Marques & Eunice Oba

ABSTRACT

Background: Brazil is one of the greatest bovine meat exporter in the world. However, the technologies applied at buffalo's reproduction is not specific for this specie, adapted technics were established from the cattle breed. When the animal shows weight gain, gonadal and behavioral physiology follow this tendency and the reproductive status become good and satisfactory. Thus, the aim of this study was to compare the reproduction characteristics of male buffaloes and its testicular parameters with sexual behavior.

Materials, Methods & Results: Seven males Murrah breed with 67.29 ± 11.4 months of age were maintained at confinement for artificial shading. The testicular parameter was performed in restraint trunk and the sexual behavior evaluation was done with an estrus female. The sexual behavior was performed with an estrous female as a dummy. The testicular biometry was measured at the beginning and at the end of the experimental design, with the follow parameters: length, width, depth/thickness, scrotal circumference and the total volume. The data were submitted to the analysis of variance, and the means was compared with the Student-Newman-Keuls test, with significance difference $P < 0.05$ between the medians. The differences in the parameters were scrotal circumference (23.36 cm vs 24.86 cm), testicular length (8.71 cm vs 9.77 cm), right testicular width (8.57 cm vs 9.53 cm) and testicular volume ($1.627.40 \text{ cm}^3$ vs $2.149,68 \text{ cm}^3$), respectively. The sexual behavior showed an increase in the Flehmen reflex, mounts (service capacity) and libido (2.00 vs 11.71; 0.57 vs 5.43; regular behavior vs very good behavior, respectively).

Discussion: An increase in the testicular circumference was observed at the end of the experimental period with the values between 23.36 cm vs 24.86 cm. However, even with this increase of the testicular parameters it is lower than other male buffaloes with 36 months age. In Brazilian conditions, the testicular circumference variation is between 24.5 cm and 34 cm in animals with 60 months of age. These data shows that there are variations of the testicular parameters due to different systems of buffaloes breeding. When compared to cattle, buffaloes shows lower input of reproductive biotechnology. At the same way, the testicular growth and development depends of the nutrition and management used at the farm. In an inefficient system, buffaloes and bovine breeding could lose weight, testicular mass, and reduce testicular parameters. Besides that, the buffaloes can perform an improvement of a general condition when improvement of nutrition care occurs. The testicular parameters presents high correlation with the corporal and testicular development, which can be correlate to age and weight. Those parameters could help with the reproductive ability of the buffalo. The sexual behavior was increased and observed in the Flehmen reflex, service capacity and libido after the animal's adaptation to the reproductive management. The buffaloes are animals extremely adaptable to different conditions, but need a period to adapt. Previous sexual experience is important during the social organization of the harem and helps in the practice of the sexual act. In these experimental conditions, we conclude that is necessary a social and behavior adaptation to the buffalo bull to present a better value of sexual characteristics to improve the fertility and production of Murrah buffaloes.

Keywords: adaptability, andrology, behavior, reproductive management.

DOI: 10.22456/1679-9216.96815

Received: 22 July 2019

Accepted: 17 November 2019

Published: 8 December 2019

Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. CORRESPONDENCE: E.R. Silva-Junior [edjalma.vet@hotmail.com]. Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science - UNESP. CEP 18.610-970 Botucatu, SP, Brazil.

INTRODUÇÃO

A exploração bubalina revela aptidão para produção de carne, leite e energia apresentando um crescimento promissor da cadeia produtiva em questão [3]. Entretanto, apesar do crescimento comercial da espécie, há escassez de dados e pesquisas relacionadas ao comportamento reprodutivo do macho bubalino.

O touro bubalino, assim como as demais espécies domésticas em equilíbrio comportamental, pode apresentar ganho de peso e melhor conversão alimentar. Conseqüentemente, a fisiologia gonadal e comportamental acompanham a tendência e apresentarem índices reprodutivos satisfatórios [12].

Durante a avaliação andrológica, as manifestações de comportamento sexual ficam dependentes do bem-estar [16] e da sazonalidade reprodutiva que a espécie pode apresentar [14]. Essas manifestações comportamentais devem ser observadas com cautela, pois há adaptações das biotecnologias bovinas, resultando em avaliações deficientes e com descarte de touros que não apresentaram interesse sexual em tempo hábil [7].

A literatura registra que quando há ganho de peso, é possível considerar que os níveis de cortisol estão basais e exercem pouca influência sobre o comportamento reprodutivo. Da mesma maneira, a circunferência escrotal está associada com o peso corporal e manifestações positivas sobre a monta e comportamento sexual [16].

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi observar as características reprodutivas de touros bubalinos da raça Murrah, comparando os dados da biometria testicular e comportamento sexual com a avaliação do comportamento reprodutivo durante o treinamento para a coleta de sêmen.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e delineamento experimental

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA n°73/2012) e realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu, São Paulo. Os animais ficaram alojados no confinamento experimental da FMVZ, campus Lageado. Foram utilizados sete búfalos machos da raça Murrah, com idade média de $67,29 \pm 11,44$ meses, confinados em baía coletiva e

sombreamento artificial. A alimentação era composta por concentrado comercial (18% de proteína bruta), sal mineral e feno que eram ofertados pela manhã (08 h) e pela tarde (16 h). A água ficou disponível a todo momento aos animais.

Houve um período de adaptação de 30 dias, para a uniformização da população ruminal e socialização entre os animais. Neste período, os animais foram condicionados à serem guiados pelo cabresto, estimulação ao salto e coleta do sêmen com o auxílio de vagina artificial, realizada uma vez por semana até o final do experimento (13 semanas).

Para a observação do comportamento reprodutivo dos machos, foi utilizado uma fêmea da mesma espécie e raça como manequim. Para tal, foi induzido o estro com a administração de 2,0 mL (4 mg), por via intramuscular de Cipionato de Estradiol - ECP®¹ e foi observado a manifestação clínica do estro 24 h após a administração do hormônio.

Após o período de adaptação, o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com medidas repetidas de tempo. Sendo que foi considerado como fator de comparação o início e o final do período de coleta do sêmen, ao qual, o animal foi considerado a unidade experimental para todas as variáveis do estudo.

Biometria testicular

A biometria dos testículos foi mensurada no início e final do delineamento experimental, com as seguintes unidades: comprimento (COT), largura (LT), profundidade/espessura (PT) e circunferência escrotal (CE).

Para a mensuração do comprimento dos testículos, utilizou-se um paquímetro posicionado no sentido dorso-ventral, com a exclusão da cabeça e da cauda do epidídimo. Do mesmo modo, a largura foi obtida da região mediana, no sentido látero-medial. Já a profundidade, também foi medida na região mediana, mas no sentido crânio-caudal.

Procedeu-se com a aferição da CE, através da tração dos testículos até a base do escroto. A leitura se deu em centímetros, aferida por fita metálica moldada em forma de alça e posicionada no ponto equivalente ao maior diâmetro e na região mediana dos testículos, envolvendo simultaneamente as duas gônadas e o escroto [13].

O volume testicular foi calculado com os dados das aferições do comprimento e largura dos testículos, sendo efetuado pela fórmula de cilindro [13] e, foi o método que mais se aproximou do valor obtido pelo

deslocamento de líquidos, onde: Volume Testicular (VOLT) = $2\{(r^2) \times \pi \times h\}$. Segundo esta equação o volume expresso em cm^3 , representa ambos testículos. O raio (r) foi calculado a partir da largura média dos dois testículos (largura dividido por dois), a altura (h) representa o comprimento médio dos testículos e $\pi = 3,14$.

Comportamento sexual

As observações do comportamento sexual foram realizadas em curral medindo 50 m^2 , próximo ao local onde os animais permaneciam confinados. Cada macho foi exposto individualmente à fêmea previamente estroginizadas. As atitudes manifestadas pelos touros búfalos foram observadas e anotadas durante 15 min, para posterior comparação dos comportamentos e classificação da libido de cada búfalo individualmente.

As observações foram realizadas durante o período matutino (8:00 a 10:00) uma vez ao dia, durante 78 dias e totalizaram 78 observações. Para retirar o efeito individual humano, as observações eram realizadas por três técnicos treinados e em locais diferentes do curral. Os comportamentos observados e quantificados de cada macho foram:

1- Cabeçada (Cab): quando o macho empurra a fêmea pela região do flanco utilizando a cabeça;

2- Vocalização (Vo): quando o animal vocalizou em direção a fêmea, marcando território;

3- Reflexo de Flehmen (RF): consiste no movimento de estender a cabeça e o pescoço, contraindo as narinas, elevando e curvando o lábio superior. Este movimento normalmente ocorre depois de ter cheirado a urina ou períneo da fêmea e está relacionado com a estimulação sexual;

4- Tentativa de monta (TM): quando o macho exibe estímulo, impulso para monta, mas não a executa;

5- Monta (Mo): quando o macho salta sobre a fêmea, mas não há penetração do pênis e nem ejaculação.

Além destes comportamentos, foi verificado o tempo de reação do macho durante a monta de cada animal, sendo o tempo iniciado no momento em que o animal monta a fêmea e terminando com sua descida.

Outra avaliação do comportamento sexual foi baseada a partir do interesse sexual do macho bovino com modificações para a espécie bubalina, onde inicia a busca pela fêmea, seguido de uma sequência de intervenções comportamentais como a busca de posições de cobertura e reações de monta pelo touro que podem ser rápidas, ou demorar algum tempo [10].

Para realizar o teste de libido e habilidade de monta (capacidade de serviço), os machos foram colocados com as fêmeas em estro, e sua capacidade de serviço foi avaliada durante a colheita de sêmen. Nos Quadros 1 e 2, seguem as classificações do teste de libido de acordo com as reações observadas nos animais.

A observação do comportamento sexual dos machos foi o foco principal durante o período de observação dos animais, sendo individualmente avaliados. As observações se procederam no mesmo período do dia (matutino), durante o mesmo horário (entre as 8 e 10 h da manhã), para que não houvesse influência no manejo e condicionamento dos animais à coleta de sêmen e cobertura.

Análise estatística

Os dados obtidos pela avaliação visual e parâmetros da biometria testicular foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo pós-teste estatístico de Student-Newman-Keuls (SNK), adotando $P < 0,05$ como diferença significativa entre as médias.

RESULTADOS

Após o período de adaptação dos animais e uniformidade do plantel dos touros bubalinos, podemos observar que houve ganho de peso nos animais. Tal característica pode estar associada com o bem-estar dos animais, os quais se sentiram confortáveis e demonstraram que estavam adaptados ao ambiente, característica que já foi mencionada para os bubalinos.

Acompanhando a mesma tendência de crescimento corporal, houve um leve aumento na circunferência escrotal dos animais, sem diferença estatística ($P = 0,05$), que pode estar associado ao crescimento corporal e ganho de peso dos animais.

As medidas de biometria testicular de COTD, COTE e LTD apresentaram diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o período inicial e final do experimento, acompanhando o crescimento para as medidas mencionadas na Tabela 1. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nas medidas da largura testicular esquerda e profundidade de ambos os testículos.

Conseqüentemente, como houve aumento das medidas testiculares através da mensuração da biometria, o volume testicular apresentou valores superiores no final do período experimental, com diferença significativa na comparação entre as médias ($P < 0,05$).

Tabela 1. Média (\pm desvio padrão médio) do peso e parâmetros testiculares de búfalos da raça Murrah (n= 7) com idade média de 67,29 \pm 11,44 meses.

| Parâmetro | Fase | | DPM | Valor de P |
|-------------------------|----------------------|----------------------|--------|------------|
| | Inicial | Final | | |
| Peso vivo (kg) | 630,86 ^b | 668,29 ^a | 48,84 | 0,02 |
| CE (cm) | 23,36 ^b | 24,86 ^a | 1,4 | 0,05 |
| COTD (cm) | 8,71 ^b | 9,77 ^a | 0,57 | 0,01 |
| COTE (cm) | 8,57 ^b | 9,53 ^a | 0,55 | < 0,001 |
| LTD (cm) | 5,41 ^b | 5,99 ^a | 0,77 | 0,03 |
| LTE (cm) | 5,50 | 5,84 | 0,83 | 0,09 |
| PTD (cm) | 5,67 | 6,01 | 0,44 | 0,18 |
| PTE (cm) | 5,86 | 5,61 | 0,50 | 0,08 |
| VOLT (cm ³) | 1627,40 ^b | 2149,68 ^a | 475,16 | 0,01 |

DPM: Desvio médio padrão; CE: Circunferência escrotal; COTD: Comprimento testículo direito; COTE: Comprimento testículo esquerdo; LTD: Largura testículo direito; LTE: Largura testículo esquerdo; PTD: Profundidade testículo direito; PTE: Profundidade testículo esquerdo; VOLT: Volume testicular. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre as médias, pelo teste *t* de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Tabela 2. Frequência de eventos comportamentais sexuais e tempo de monta de machos bubalinos da raça Murrah na presença de fêmeas que apresentaram comportamento de estro (n= 7).

| Evento | Fase | | DPM | Valor de P |
|-------------------------|-------------------|--------------------|--------|------------|
| | Inicial | Final | | |
| Cheiradas e lambidas | 2,00 | 2,00 | 0,00 | NS |
| Cabeçada | 1,57 | 2,00 | 0,58 | 0,07 |
| Vocalização | 0,57 | 1,29 | 1,00 | 0,09 |
| Reflexo de Flehmen | 2,00 ^a | 11,71 ^b | 6,55 | <0,001 |
| Tentativa de monta | 0,86 | 1,57 | 0,97 | 0,10 |
| Monta | 0,57 ^b | 5,43 ^a | 3,21 | 0,01 |
| Tempo de monta (s) | 34,29 | 130,00 | 101,69 | 0,11 |
| Classificação da libido | 3,00 ^b | 5,00 ^a | 1,57 | <0,001 |

DPM: Desvio padrão médio; NS: não significativo; Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre as médias, pelo teste *t* de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Quadro 1. Classificação comportamental da libido, segundo as reações observadas nos búfalos da raça Murrah (n= 7) durante o período de observação.

| Classificação | Reações |
|---------------|--|
| 0 | Sem interesse |
| 1 | Interesse sexual demonstrado apenas uma vez |
| 2 | Interesse sexual demonstrado mais de uma vez |
| 3 | Procura e interesse persistente na fêmea |
| 4 | Uma monta ou tentativa de monta, sem serviço |
| 5 | Mais de uma monta ou tentativa de monta, sem serviço |
| 6 | Monta e serviço |

Quadro 2. Classificação das reações do teste comportamental executado em búfalos da raça Murrah durante o período de observação.

| Reação | Classificação 1 | Classificação 2 |
|--------|-----------------|-----------------|
| 0-1 | Ruim | Insatisfatório |
| 2-4 | Regular | Moderado |
| 5-6 | Muito bom | Satisfatório |

Comportamento sexual

Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$), para os comportamentos sexuais de cheiradas e lambidas, cabeçada, vocalização, tentativa de monta e tempo de monta. Entretanto, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para o comportamento de reflexo de Flehmen, monta e classificação da libido apresentados na Tabela 2.

DISCUSSÃO

Houve crescimento no valor do CE na fase final do delineamento experimental, que variou de 23,36 vs. 24,86 cm, conforme apresentado na Tabela 1. Porém, mesmo com o aumento do parâmetro, encontra-se inferior à média observada para os valores de CE descrita para búfalos com idade igual ou superior aos 36 meses com médias acima de 30 cm, considerados adultos e maduros sexualmente [7]. Entretanto, nas condições brasileiras, a variação da circunferência escrotal pode ser de 24,5 cm a 34 cm em animais até 60 meses. Este fato nos remete que não há a padronização dos touros bubalinos e, que a seleção para melhoramento genético através do exame andrológico pode estar um pouco atrasada nas condições nacionais, quando comparada com os bovinos [8].

O crescimento corporal e gonadal está associado a adequada nutrição [12], que apresenta um crescimento exponencial durante a puberdade (18-24 meses), e uma estabilidade do crescimento ao redor dos 36 meses [4]. Sendo assim, CE realizada no exame andrológico está associada com o manejo reprodutivo pré-púbere [16]. De fato, o crescimento da CE no presente experimento foi de aproximadamente um cm nos animais considerados adultos. Porém, animais que mantêm uma adequada nutrição, sem restrição alimentar durante o desenvolvimento, podem apresentar crescimento corporal e testicular adequados para a idade [4].

Podemos considerar os touros que apresentarem os valores de CE médio de 38 cm (54 a 60 meses) aceitáveis e menores de 32 cm questionáveis [14].

O crescimento e desenvolvimento corporal e testicular depende do tipo de sistema de criação em-

pregado na propriedade. Búfalos que são criados em sistema extensivo, com longos períodos de estiagem e pastagem inadequada, sofrem com perda de peso, redução da massa testicular, com conseqüente diminuição da circunferência escrotal [16]. Entretanto, os animais podem se recuperar nos períodos mais favoráveis de acordo com a adaptabilidade bubalina [9].

No presente estudo, os animais eram de origem do sistema de pastejo contínuo e haviam passado por um período final de seca. Logo, os baixos valores encontrados de CE podem ser decorrentes da falta de pastagem de boa qualidade. Apesar disso, os animais ainda apresentaram aumento da CE, peso vivo, COTD, COTE, LTD e VOLT, quando suplementados com a nova dieta e manejo. Corroborando com a adaptabilidade que pode ser encontrada na espécie bubalina [5,9,14].

Para o comprimento testicular direito e esquerdo, e largura testicular esquerdo, os valores diferiram entre as fases estudadas, os quais apresentaram um aumento no tamanho ($8,7 \pm 0,52$ vs. $9,77 \pm 0,62$ cm; $8,57 \pm 0,62$ vs. $9,53 \pm 0,48$ cm; $5,41 \pm 0,59$ vs. $5,99 \pm 0,95$ cm, respectivamente), tais parâmetros foram próximos aos encontrados por Crudeli & Konrad [4], que observaram valores de comprimento testicular esquerdo e direito de 10,4 e 10,8 cm, respectivamente, e largura testicular esquerda de 5,6 cm para búfalos com idade acima de 36 meses, estando os valores encontrados no estudo dentro da normalidade. Tais medidas apresentaram alta correlação com o desenvolvimento corporal e circunferência escrotal, bem como correlação positiva entre idade e peso corporal [4], que são dois parâmetros utilizados na avaliação da capacidade reprodutiva tanto do macho bovino quanto no bubalino.

Pode-se observar também o aumento do volume testicular de $1627,40 \pm 352,58$ para $2149,68 \pm 597,74$ cm³, durante as fases do delineamento experimental. Foram encontrados valores superiores de $534,25 \pm 25,36$ cm³ para búfalos mestiços (Murrah X Mediterrâneo) com idade maior ou igual a 60 meses [1].

Neste contexto, as medidas de CE, VOLT, COTE, COTD, LTE, LTD e peso corporal, podem indicar compatibilidade de seleção para crescimento corporal e fertilidade nos programas de seleção de reprodutores em búfalos, sendo necessário mais estudos.

Já as observações comportamentais dos machos, verificou-se um aumento na frequência dos comportamentos de reflexo de Flehmen, monta e libido ($2,00$ vs. $11,71$; $0,57$ vs. $5,43$; e regular vs. Muito

bom, respectivamente). Este fato pode ser explicado pelo estímulo sexual e condicionamento dos animais, uma vez que o comportamento sexual do macho está associado à detecção do estro e a capacidade de cópula com a fêmea, que envolve basicamente a libido e capacidade de serviço.

Esse estímulo sexual que os machos apresentam na presença das fêmeas é decorrente das substâncias químicas presentes na urina durante o estro, resultando no aumento da frequência do reflexo de Flehmen [11].

Uma experiência sexual prévia entre as fases analisadas é um fator social a ser considerado, pois vale ressaltar que durante o período experimental houve dominância dentro do grupo, pois os animais conviviam em conjunto. Além disso, o contato prévio dos machos com as fêmeas pode fornecer ao macho a prática na execução da cópula ou na desinibição de machos inexperientes [2].

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais pode-se concluir que é necessário um período de adaptação dos animais, e os parâmetros da biometria testicular podem ter correlação com a condição corporal do touro reprodutor da raça Murrah, assim como a sua manifestação no comportamento sexual.

MANUFACTURER

¹Zoetis Brasil. São Paulo, SP, Brazil.

Ethical approval. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº73/2012) e realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu, São Paulo.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 **Ayla H.D.M. 2011.** Ultrassonografia testicular, em machos bubalinos criados em regime extensivo no estado do Pará. 67f. Belém, PA. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará e Universidade Federal Rural da Amazônia.
- 2 **Bench C.J., Price E.O., Dally M.R. & Borgwardt R.E. 2001.** Artificial selection of rams for sexual performance and its effect on the sexual behavior and fecundity of male and female progeny. *Applied Animal Behavior Science*. 72: 41-50.
- 3 **Bernardes O. 2007.** Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 31(3): 293-298.
- 4 **Crudeli G.A. & Konrad J.L. 2013.** Evaluación del crecimiento em hembras y machos bubalinos en Argentina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 37(2): 115-120.
- 5 **Di Francesco D.S. 2010.** Effect of season on reproductive performance in buffalo species (*Bubalus bubalis*). 166f. Napoli, Itália. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade de Alimentos de Origem Animal, Universidade de Nápoles Frederico II.
- 6 **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). 2007.** Rondônia v.1. Porto Velho: EMBRAPA, 15p.
- 7 **Henry M., Brito M.F., Neves B.P., Auler P.A., Almeida J., Andrade G.O., Becerra V.B. & Bergmann L. 2017.** Exame andrológico de bubalinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 41(1): 188-194.
- 8 **Henry M., Brito M.F., Neves B.P., Auler P.A., Almeida J., Andrade G.O., Becerra V.B. & Bergmann L. 2017.** Peculiarities of the buffalo species for andrological evaluation - results of four years of study and weekly semen collection schedule. *Animal Reproduction*. 14(1): 1225-1223.
- 9 **Marai I.F.M. & Haeeb A.A.M. 2010.** Buffalo's biological functions as affected by heat stress - A review. *Livestock Science*. 127: 89-109.
- 10 **Oliveira C.B., Guimarães J.D., Costa E.P., Siqueira J.B., Torres C.A.A., Carvalho G.R. & Guimarães S.E.F. 2007.** Avaliação do comportamento sexual em touros Nelore: comparação entre testes da libido em curral e do comportamento sexual a campo. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 36(1): 32-42.
- 11 **Rajanarayanan S. & Archunan G. 2004.** Occurrence of flehmen in male buffaloes (*Bubalus bubalis*) with special reference to estrus. *Theriogenology*. 61: 861-866.
- 12 **Romano M.A., Barnabe V.H., Kastelic J.P., Oliveira C.A. & Romano R.M. 2007.** Follicular dynamics in heifers during pre-pubertal and pubertal period kept under two levels of dietary energy intake. *Reproduction in Domestic Animals*. 42: 616-622.

- 13 Unanian M.M., Silva A.E.D.F., McManus C. & Cardoso E.P. 2000. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 29: 136-144.
- 14 Vale W.G. 2007. Effects of environment on buffalo reproduction. *Italian Journal of Animal Science*. 6: 130-142.
- 15 Vale W.G., Magalhães N.A., Magalhães D.M. & Ribeiro H.F.L. 2004. Testis growth, body weight and testicular size rates in the Brazilian murreh buffaloes. In: *15th International Congress of Animal Reproduction* (Porto Seguro, Brazil). p.179.
- 16 Valle W.G., Ribeiro H.F.L., Sousa J.S., Silva A.O., Barbosa E.M. & Rolim Filho S.T. 2008. Seleção e avaliação andrológica do touro bubalino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 32: 141-155.