

Dinâmica folicular ovariana na espécie bubalina

Ovarian follicular dynamics in buffaloes

J.B. Siqueira¹, L.S. Leal, E. Oba

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP Botucatu, Rubião Jr, Botucatu, SP, Brasil

¹Correspondência: jbsiqueira@hotmail.com

Resumo

Considerando o aumento da população mundial de búfalos, pesquisadores do mundo inteiro têm investigado os eventos biológicos envolvidos na foliculogênese dessa espécie, com o intuito de solucionar as dificuldades para a detecção de estro, diminuir o impacto da estacionalidade reprodutiva e aprimorar biotecnologias reprodutivas, como a produção e a manipulação de embriões. Os búfalos são considerados animais sazonais (dias curtos), com duração do ciclo estral variando entre 16 a 33 dias, estro com cerca de cinco a 27 horas e ovulação ocorrendo entre 24 a 48 horas após o início do estro ou seis a 21 horas após o final do estro. O ovário da búfala é ovoide e consideravelmente menor do que o da vaca, apresentando menor número de folículos primordiais e maior taxa de atresia folicular. Os folículos primordiais, primários, secundários e terciários formados no ovário têm em média: 35; 25 a 80; 50 a 100 e 100 a 300 μm de diâmetro, respectivamente. O corpo lúteo, geralmente menor do que o da vaca, pode atingir peso e diâmetro máximo de 2,3 g e de 15 mm, respectivamente, e tem influência negativa no número de folículos superficiais. Os primeiros estudos relacionados ao crescimento folicular em bubalinos registraram a presença de padrões de uma, duas ou três ondas foliculares, propondo, desta forma, que as búfalas apresentam comportamento folicular semelhante ao de vacas, mas com suas peculiaridades. O objetivo desta revisão foi descrever as principais estruturas e os eventos envolvidos na dinâmica folicular ovariana em bubalinos.

Palavras-chave: búfalo, ovário, foliculogênese.

Abstract

Considering the increasing world population of buffaloes, researchers have been investigating biological events involved in the folliculogenesis of this specie. The main aims are to understand why the detection of oestrus is difficult in this specie, to reduce the impact of reproductive seasonality in breeding efficiency and to improve the results obtained with the use of reproductive biotechnology, such as production and manipulation of embryos. The buffaloes are considered seasonal animals (short days) with oestrous cycle length ranging from 16 to 33 days, being the oestrous length approximately 5 to 27 hours and the ovulation occurring between 24 to 48 hours after the onset of oestrus or 6 to 21 hours after the end of oestrus. The buffalo ovary is ovoid and considerably smaller than bovine ovaries, showing fewer primordial follicles and higher rate of follicular atresia. The primordial, primary, secondary and tertiary follicles produced in the ovary are on average: 35, 25 to 80, 50 to 100, and 100 to 300 μm in diameter, respectively. The corpus luteum is usually smaller than that of bovine and its maximum weight and diameter are 2.3 g and 15mm, respectively, and has negative influence on the number of superficial follicles. Initial studies focusing follicular growth in buffaloes reported one, two or three follicular waves patterns, suggesting that buffaloes have follicular growth behavior similar to that found in cows, with some specific differences. The purpose of this review is to describe the main structures and events involved in ovarian follicular dynamics in buffaloes.

Keywords: buffalo, ovary, folliculogenesis.

Introdução

Durante os últimos 28 anos, a população de búfalos no mundo aumentou cerca de 50%, associada ao aumento de 200% na produção de leite, e atualmente é estimada em aproximadamente 170 milhões de cabeças, das quais 100 milhões encontram-se na Índia (Food and Agricultural Organization (FAO), 2004). A bubalinocultura também tem expandido no país, configurando-se como alternativa para a produção de carne, visto que a população nacional desses animais em 2003 foi de 1.200.000 animais (Anualpec, 2004). A produção mundial de carne bubalina foi de 3,17 milhões de toneladas, destacando-se a Índia, o Paquistão e a China como principais produtores no Oriente. No Ocidente, a tendência é que o Brasil se torne o maior produtor de carne bubalina e, considerando sua extensão territorial e as condições favoráveis de clima e solo, essa produção pode ser a mais expressiva, a médio e longo prazos, em termos qualitativos (Oliveira et al., 2007).

No Brasil, de 1961 a 1980, o rebanho bubalino passou de 63 mil animais para 495 mil, ou seja,

expressivos 10,9% de crescimento do rebanho ao ano, enquanto o rebanho bovino, no mesmo período, crescia a taxas de 3,8% ao ano. Entre 1980 e 2005, o rebanho bubalino, com base em estatísticas oficiais, apresentou um menor ritmo de crescimento, atingindo 3,6% ao ano; mesmo assim, superior aos dos bovinos, que cresceram 1,9% ao ano no mesmo período. O crescimento acumulado do rebanho, entre 1961 e 2005, foi surpreendentemente de 1.806% (Bernardes, 2006).

O búfalo é comprovadamente um animal de fácil adaptabilidade às condições brasileiras e é caracterizado pela boa eficiência reprodutiva e pelo rápido desenvolvimento ponderal. A eficiência da espécie no país tem sido demonstrada por diversos grupos de pesquisa e, em diferentes sistemas de criação, o búfalo tem apresentado ótimo desempenho como produtor de leite e carne, o que é uma grande contribuição para a produção de alimentos (Baruselli e Carvalho, 2002).

Embora a espécie guarde certa semelhança com os bovinos, há peculiaridades que os distinguem e, em decorrência da sua potencialidade produtiva nos diferentes ecossistemas em que são criados, o conhecimento dos aspectos reprodutivos, tanto das fêmeas quanto dos machos, são requisitos básicos para a implantação dos rebanhos, como também para o melhoramento e a avaliação da fertilidade destes desses animais (Oba, 2003).

Desta forma, o potencial genético desses animais pode ser rapidamente multiplicado com o uso de biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial e a transferência de embriões. Entretanto, o uso dessas biotecnologias reprodutivas torna-se limitado devido às dificuldades de detecção do estro e às características comportamentais da espécie (Baruselli e Carvalho, 2002). Neste sentido, o objetivo desta revisão é apresentar conhecimentos sobre a dinâmica folicular ovariana em bubalinos, fornecendo informações atuais que ajudem pesquisadores a esclarecer os fenômenos que interferem na sincronização do ciclo estral e na ovulação, assim como na resposta ovariana de búfalas superovuladas, colaborando para o aumento da prolificidade desses animais.

Ciclo estral

Os búfalos são considerados animais sazonais, pois sua ciclicidade reprodutiva é, geralmente, influenciada pela sua exposição diária à luz. Em vários países do mundo, a época em que os animais apresentam maior atividade reprodutiva é o outono (fotoperíodo negativo), quando a concentração de partos ocorre de julho a dezembro, no hemisfério norte, e de janeiro a março, no hemisfério sul. Durante os meses quentes do ano, existe um aumento na incidência de “cios” silenciosos e ciclos estrais irregulares na fêmea, e diminuição da libido e qualidade seminal nos machos. Esse comportamento não é observado nas regiões equatoriais, onde a função reprodutiva é influenciada principalmente pela oferta de alimentos; nessas regiões, o búfalo é um animal poliéstrico contínuo. Os efeitos sazonais na função reprodutiva são comandados pela melatonina, hormônio sintetizado pela glândula pineal, que inibe a produção dos hormônios GnRH, FSH e LH (Bittman e Karsch, 1984; Zicarelli, 1994; Zicarelli e Vale, 2002).

A duração do ciclo estral na búfala varia entre 16 a 33 dias, com maior concentração entre 21 a 24 dias (Vale e Ribeiro, 2005). Essa amplitude se deve a fatores como clima, manejo, alimentação e genética. Animais submetidos a manejo inadequado e alimentação deficiente em energia, proteína e minerais têm tendência a apresentar estros curtos ou longos (Vale et al., 1984).

Semelhante aos bovinos, o ciclo estral da búfala apresenta quatro fases distintas: pró-estro, estro, metaestro e diestro. Entretanto, a expressividade dos sinais clínicos, dentro das diferentes fases, difere em alguns aspectos daqueles expressos pela vaca taurina e zebuína (Vale e Ribeiro, 2005). Neste sentido, a duração do estro dura cerca de cinco a 27 h (média de 20 h), e a ovulação ocorre entre 24 a 48 h após o início do estro ou seis a 21 h após o final do estro. No sul do Brasil, Baruselli (1994), observando o estro de búfalas quatro vezes ao dia (manhã/meio-dia/tarde/meia-noite), verificou duração média de estro de $14,7 \pm 7,3$ h, com a ovulação ocorrendo $16,9 \pm 6,5$ h após o final do estro. Porto-Filho et al. (2005) observaram grande variação ($11,8 \pm 5,6$ h) com relação à duração dos estros (1 a 25 h) nas novilhas estudadas. Nesse mesmo estudo, a classificação dos estros, quanto à intensidade e duração, demonstrou que a grande maioria deles apresentou alta intensidade (75,6%) e longa duração (80%), com mais da metade (57,8%) apresentando ambas as características.

Segundo Vale et al. (1984), a frequência de aparecimento de estro está diretamente relacionada à hora do dia. Esses autores observaram que, nas regiões tropicais úmidas ou mesmo em regiões de clima mais ameno, durante o verão, sob temperaturas elevadas, a fêmea bubalina tem tendência a apresentar sinais de estro à noite, quando a temperatura está mais amena. Utilizando a radiometria para detecção de estro, Porto-Filho et al. (2005) não observaram diferença significativa ($p > 0,05$) na distribuição das montas durante as 24 horas do dia.

Com relação à exteriorização dos sinais de estro, estes não são tão evidentes como em bovinos. Vale et al. (1984) observaram que a melhor forma de detecção do estro na búfala é a utilização de rufiões com buçal marcador, associada à frequente observação visual. Um dos sinais de estros mais seguros observado por esses autores foi a aceitação de monta pelo rufião, evidente em 100% dos casos. Segundo Baruselli e Carvalho (2002), a atividade homossexual nessa espécie não é tão comum, registrando somente 3,4% de fêmeas com tal comportamento. Além disso, de acordo com esses autores, as búfalas obedecem a uma hierarquia, em que as dominantes efetuam a monta e impedem as subordinadas de serem montadas pelos rufiões ou reprodutor. Porto-

Filho et al. (2005), em região com clima tropical de altitude, registraram, em 10% dos estros, fêmeas que não demonstraram qualquer comportamento de aceitação de monta, sendo tais casos caracterizados como estros silenciosos.

A ocorrência de “cios” silenciosos e anovulatórios é frequente, principalmente em animais submetidos à alimentação deficiente ou expostos a estresse térmico. A eliminação do muco através dos lábios vulvares é uma característica inconstante e depende, em muito, da observação do estro, sendo, na maioria das vezes, transparente e pegajoso no início, mudando para turvo até opaco com o avanço desse estado; ainda durante o estro, na maioria das vezes, turgidez e tônus uterino são observados (Oba, 2003).

Segundo Awasthi et al. (2007), animais com estro silencioso apresentam diâmetro do folículo ovulatório ($7,7 \pm 0,4$ vs $11,0 \pm 0,7$ mm, $P < 0,05$) e taxa de crescimento folicular diário ($0,7 \pm 0,02$ vs $1,1 \pm 0,1$ mm/dia, $P < 0,05$) menores comparados aos animais que apresentam comportamento estral evidente. Esses autores concluíram que o tamanho folicular e a lenta taxa de crescimento do folículo ovulatório são possíveis causas de estro silencioso em búfalas denominadas subestrais.

Estrutura ovariana

Os ovários de ruminantes são órgãos pares localizados no terço médio das superfícies laterais da entrada da pelve, suspensos pelo mesovário, na porção cranial do ligamento largo, conectados ao útero pelo ligamento ovárico e ao peritônio parietal pelo ligamento suspensor do ovário (Nunez, 1993). Na maioria dos animais, são formados por duas zonas diferentes: o córtex, ou zona parenquimatosa, e a medula, ou zona vascular. O córtex contém numerosos folículos em vários estádios de desenvolvimento, corpos lúteos, células intersticiais e elementos do estroma. A medula se caracteriza pela presença dos grandes vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e algumas estruturas embrionárias remanescentes. É um tecido conjuntivo frouxo, rico em fibras elásticas e reticulares (Albuquerque et al., 2004).

O ovário da búfala é ovóide e consideravelmente menor do que o da vaca (Dyce et al., 1996). Em búfalas adultas, Fadle et al. (1974) e Vale et al. (1982) descreveram medidas médias para o ovário direito (OD) de 24,0 e 25,4 mm de comprimento, 16,5 e 14,5 mm de largura e 12,5 e 15,7 mm de espessura, e para o ovário esquerdo (OE) de 22,0 e 24,7 mm de comprimento, 15,5 e 14,1 mm de largura e 14,0 e 14,8 mm de espessura. Já, em novilhas, Danell (1987) registrou para o OD 22,8 mm de comprimento, 18,2 mm de largura e 14,2 mm de espessura e OE 22,7 mm de comprimento, 16,6 mm de largura e 13,8 mm de espessura. Parkale e Hukeri (1989), com base em 128 pares de ovários, encontraram as seguintes médias: 24,8 mm de comprimento, 16,7 mm de largura e 14,6 mm de espessura (OE), e 24,4 mm de comprimento, 17,4 mm de largura e 14,6 mm de espessura (OD). Para Vale e Ribeiro (2005), os ovários apresentaram, em média, comprimento de 25 a 30 mm e largura de 14 mm.

De acordo com relatos na literatura, o peso mínimo e máximo do ovário de búfalas é de 2,9 e 6,1 g, respectivamente (El-Wishy et al., 1971), e o peso médio é de 4,6 g (Vale e Ribeiro, 2005). Danell (1987) observou peso médio de $3,4 \pm 1,3$ g para o OE e $3,6 \pm 1,5$ g para o OD, em 30 novilhas bubalinas cíclicas.

Folículos ovarianos

O folículo ovariano é considerado a unidade funcional da gônada feminina (Ariyaratna e Gunawardana, 1997). Além disso, é uma estrutura altamente organizada, constituída essencialmente pelo oócito, circundado por células foliculares (*cumulus oophorus*) e demarcado por uma membrana basal que os separa do estroma ovariano (Landim-Alvarenga, 2006). Apresenta duas funções principais: proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e a maturação do oócito e produzir hormônios esteroides, como o estradiol, e peptídeos, como inibina A e B, ativina e folistatina (Gordon, 1994; Landim-Alvarenga, 2006).

De acordo com o grau de desenvolvimento, os folículos podem ser divididos em folículos pré-antrais ou não cavitários (não possuem antro: primordiais, primários e secundários) e folículos antrais ou cavitários (possuem a cavidade antral no seu interior, repleta de líquido folicular: terciários e pré-ovulatórios; Junqueira e Carneiro, 1995). A Fig. 1 apresenta folículos primordiais, primários, secundários e pré-ovulatórios na espécie bubalina (Leal, 2008).

Os folículos primordiais formados no ovário encontram-se em estágio de quiescência. Têm cerca de 40 μ m (vacas) e 35 μ m (búfalas) de diâmetro e apresentam um oócito (20 μ m, na maioria das espécies) rodeado por uma camada única de quatro a oito células achatadas caracterizando a granulosa. O oócito pode apresentar um formato que varia de esférico a ovóide (Hulshof et al., 1992; Van Wezel e Rodgers, 1996; Fair et al., 1997b; Priedkalns e Leiser, 1998; Picton, 2001; Mondadori et al., 2007). No ooplasma, visualizam-se numerosas vesículas com distribuição homogênea, que apresentam membrana, mitocôndrias, associadas ou não aos retículos endoplasmáticos liso e rugoso; em pequeno número, observam-se complexos de Golgi e gotas lipídicas (Fair et al., 1997b; Hyttel et al., 1997).

Folículos primários representam o primeiro estágio de crescimento folicular, caracterizando-se pela presença de um oócito centralizado, circundado por uma camada única de células da granulosa de forma cúbica

(Hulshof et al., 1994; Landim-Alvarenga, 2006). Nesse tipo de folículo, as células da granulosa aumentam em número e tornam-se mais volumosas (Van Den Hurk et al., 1997); apresentam diâmetro de 60 a 100 μm (vacas) e 25 a 80 μm (búfalas) e o oócito é rodeado por uma camada completa de 11 a 20 células da granulosa de forma cubóide. O oócito é geralmente esférico e apresenta abundância de mitocôndrias de forma alongada e em divisão e aumento nos números de retículos endoplasmáticos liso e rugoso, refletindo o crescimento dos requerimentos de energia e de síntese de lipídios e proteínas pelo oócito. Complexos de Golgi e polirribossomos também estão presentes (Fair et al., 1997b; Hyttel et al., 1997; Kumar et al., 1997).

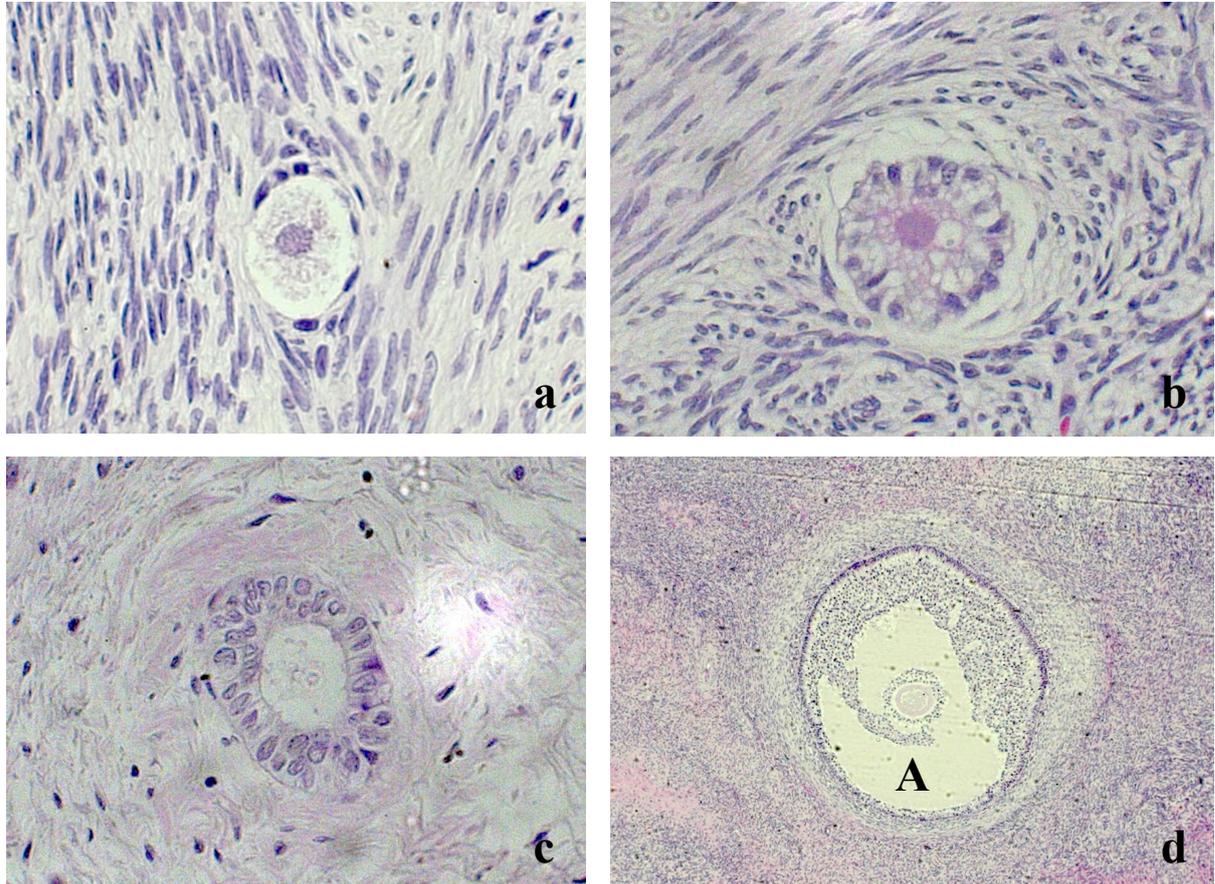


Figura 1. Micrografias de folículos ovarianos bubalinos: primordial (a; 400x); primário (b; 400x); secundário (c; 400x); e pré-ovulatório (d; 50x). A: antro folicular.

Folículos secundários caracterizam-se pela presença de um oócito centralizado, circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica (Hulshof et al., 1994; Landim-Alvarenga, 2006). Nesses folículos, em estádios mais avançados, as fibras de tecido conjuntivo se organizam paralelamente à membrana basal para formar a camada de células tecais (Van Den Hurk et al., 1997), podendo então ser identificadas células tecais diferenciadas, bem como uma membrana hialinizada, denominada zona pelúcida (Figueiredo, 1995).

A progressão para o estágio de folículo secundário é marcada pelo surgimento de uma segunda camada de células da granulosa e pela deposição inicial de material da zona pelúcida em torno do oócito de 50 a 60 μm de diâmetro (vacas; Driancourt, 1991; Hyttel et al., 1997) parado no estágio de dictiata da prófase I da meiose (oócito primário); ao mesmo tempo, os grânulos corticais são formados no ooplasma (Fair et al., 1997b). É nesse ponto do desenvolvimento que o folículo parece tornar-se responsivo ao FSH (hormônio folículo estimulante; Fair, 2003). Quando duas a três camadas de células da granulosa são formadas, é possível a identificação de células tecais em torno da membrana basal (Scaramuzzi et al., 1993). O estágio de folículo secundário é também associado aos primeiros sinais detectáveis de síntese de RNA (ácido ribonucleico) pelo oócito (Fair et al., 1997a).

Folículos terciários consistem em um oócito circundado pela zona pelúcida, corona radiata e células do *cumulus*. Possuem ainda células foliculares, uma pequena cavidade contendo líquido folicular (antro), uma membrana basal e duas camadas de células tecais (Figueiredo, 1995; Landim-Alvarenga, 2006). Folículos pré-ovulatórios (cuja nomenclatura antiga era *de Graaf*) representam o estágio final de desenvolvimento folicular e apresentam todos os componentes dos folículos terciários e um oócito secundário (divisão celular parada em

metáfase II da meiose); essa passagem do oócito primário para secundário é devido à ação do LH, chamada de maturação oocitária, caracterizada pela liberação do primeiro corpúsculo polar (revisado por Landim-Alvarenga, 2006).

A transição para o estágio de folículo terciário é caracterizada pela continuada proliferação e diferenciação das células foliculares em células da teca interna e externa, lâmina basal, células do *cumulus* e a formação de fluido na cavidade antral (Driancourt, 1991). Em bovinos, o aparecimento do antro ocorre em folículos com 120 a 160 μ m de diâmetro (Monniaux et al., 1993). No momento da formação da teca interna, é possível detectar a expressão de RNAm para receptor de LH nas células tecais (Xu et al., 1995).

À medida que o folículo cresce e o antro é formado, as células da granulosa se separam em dois subtipos: células do *cumulus*, que são íntima e metabolicamente ligadas ao oócito, e células murais, que formam a parede do folículo (Gilchrist et al., 2004). Em folículos terciários mais desenvolvidos, as células da granulosa imediatamente ao redor do oócito tornam-se colunares e radialmente dispostas, formando a *corona radiata* (Priedkalns e Leiser, 1998). As células do *cumulus* são altamente especializadas e têm projeções celulares que atravessam a zona pelúcida e formam pequenas junções (tipo *gap junctions*) com o citoplasma do oócito (Rodriguez e Farin, 2004). A comunicação entre as células do *cumulus* e o oócito é bidirecional e, além das junções *gap*, é mediada por sinais parácrinos (Gandolfi et al., 2005).

Em búfalas, Kumar et al. (1997) relataram diâmetros médios de 20 a 30 μ m (oócito), 50 a 100 μ m (folículo), 30 a 60 μ m (oócito) e 100 a 300 μ m (folículo) para folículos secundários e terciários, respectivamente. Mondadori et al. (2007) registraram diâmetros médios de 35, 41,8 e 53,3 μ m para folículo primordial, primário e secundário, respectivamente, e diâmetro médio de 24,9, 26,9 e 29,4 μ m para os oócitos localizados nos folículos primordial, primário e secundário, respectivamente.

Sabe-se que as búfalas apresentam menor número de folículos primordiais e maior taxa de atresia folicular do que as vacas (Danell, 1987; Le Van Ty et al., 1989). Danell (1987) encontrou 12.636 e 10.132 folículos primordiais em novilhas bubalinas cíclicas e não cíclicas, número muito inferior ao previamente reportado para vacas (150.000; Erickson, 1966). Os resultados de Carvalho (2005) evidenciaram um número médio de 15.449 folículos pré-antrais morfologicamente normais por ovário em búfalas impúberes, adultas gestantes e não gestantes. Em revisão realizada por Vale e Ribeiro (2005), os autores descreveram 60 a 100 mil folículos primordiais para vacas (*Bos taurus taurus*) e apenas 12 a 20 mil folículos primordiais para búfalas. Settergren (1964) constatou taxa de atresia de 50% nos folículos de vacas, inferior à encontrada por Danell (1987; 70,6%). Além do mais, os ovários bubalinos também contêm menor número de folículos antrais do que ovários bovinos (46,3 vs. 90 folículos \geq 1 mm por par de ovários; Settergren, 1964; Danell, 1987; Kumar et al., 1997; Palta e Chauhan, 1998; Gupta et al., 2001).

Em geral, a estrutura do folículo pré-antral de búfalos é similar ao estudado em outras espécies de mamíferos, entretanto algumas diferenças são observadas, as quais indicam características espécie-específicas, como a quantidade de vesículas citoplasmáticas, o formato e o conteúdo interno das mitocôndrias, o desenvolvimento da zona pelúcida e a junção das células da granulosa com o oócito. Acredita-se que algumas diferenças morfológicas podem ser responsáveis por diferenças funcionais observadas na produção *in vitro* de embriões e na dinâmica folicular em *Bubalus bubalis* quando comparadas com as subespécies de *Bos taurus* ou *Bos indicus* (Mondadori et al., 2007).

O corpo lúteo (CL)

Segundo Fields e Fields (1996), o CL é formado a partir da hiperplasia e da diferenciação das células da granulosa e das tecas do folículo ovulatório. É uma estrutura primariamente reconhecida pela habilidade em sintetizar e secretar progesterona (P_4), hormônio que está intimamente relacionado com a manutenção de um ambiente adequado ao desenvolvimento embrionário e manutenção do próprio CL, durante o período compreendido entre a ovulação e o reconhecimento materno da gestação (aproximadamente 14^o-17^o dia pós-ovulação nos bovinos).

A avaliação do CL fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea e possibilita a adequação de procedimentos de manipulação ou sincronização do ciclo estral (Viana et al., 1999). O CL das búfalas está comumente inserido no estroma ovariano, sendo geralmente menor do que na vaca, podendo atingir um peso e um diâmetro máximo de 2,3g e de 15 mm, respectivamente (Roy e Mullick, 1964).

O CL, quando presente no ovário de búfalas, ocupa uma grande área do ovário, restando menos tecido ovariano para o desenvolvimento folicular, fator responsável pelo desenvolvimento de menos folículos superficiais em búfalas gestantes (Leal, 2008). Segundo este autor, de um total de 172 ovários bubalinos avaliados, 104 (60,5%) não apresentavam CL, e 68 (39,5%) continham CL. O número médio de folículos superficiais contabilizados nos ovários sem CL foi 24,9 \pm 15,5, e nos ovários com CL 16,4 \pm 11,6. Da mesma forma, Das et al. (1996) notificaram que a presença do CL reduz significativamente o número de folículos ovarianos em búfalas. Em contradição, quando Abdoon e Kandil (2001) estudaram o efeito da presença do CL no número de folículos ovarianos superficiais de búfalas egípcias (pântano), obtiveram 5,8 \pm 0,3 (com CL) e 4,3 \pm 0,2 (sem CL) folículos/ovário ($P < 0,05$). Para os autores, a razão para essa incoerência foi atribuída à raça ou

às diferenças genotípicas na função ovariana entre búfalos de rio e de pântano.

No estudo de Leal (2008), todas as búfalas gestantes apresentavam CL. Quanto às fêmeas “vazias”, 54,7% também possuíam ovários com CL. Os diâmetros médios para os CL de búfalas não gestantes e gestantes, nas fases inicial, intermediária e final da prenhez, foram, respectivamente, $12,7 \pm 5,7$ mm ($n = 36$); $17,3 \pm 3,3$ mm ($n = 13$); $17,6 \pm 2,2$ mm ($n = 10$); $16,8 \pm 2,7$ mm ($n = 11$). Em apenas três corpos lúteos de búfalas (4,3%), foram encontradas cavidades na massa luteal, e essas fêmeas estavam “vazias” no momento do abate. Esses resultados foram similares aos achados de Neves et al. (2002) em vacas zebus. Segundo estes pesquisadores, as cavidades luteais tendem a se obliterar em CL cíclicos e gestacionais, por isso a baixa incidência desse tipo de CL em fêmeas gestantes.

Barile et al. (2007) compararam o diâmetro médio do CL em búfalas que emprenharam ou não, após a inseminação artificial (IA). Os valores obtidos para fêmeas prenhes e não prenhes foram: $19,6 \pm 1,0$ e $16,6 \pm 1,0$ mm (sete dias após a IA); $21,2 \pm 0,9$ e $18,5 \pm 1,0$ mm (14 dias após a IA); $20,1 \pm 0,9$ e $16,3 \pm 1,0$ mm (21 dias após a IA); $20,5 \pm 0,9$ e $11,9 \pm 1,2$ mm (28 dias após a IA) e $21,1 \pm 0,9$ e $11,3 \pm 1,7$ mm (35 dias após a IA).

Segundo Leal (2008), o tamanho do CL não se altera conforme o avanço da gestação nas búfalas. Porém, quando Singh et al. (1990) verificaram o tamanho e o peso do CL em búfalas prenhes, essas variáveis aumentaram até o quarto mês de gestação, permanecendo estáveis até o quinto mês (momento final de avaliação dos autores).

Dinâmica folicular ovariana

A foliculogênese é definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e finalizando-se com o estágio de folículo maduro ou pré-ovulatório (Saumande, 1981; Picton, 2001); em ruminantes, a foliculogênese tem início ainda durante a vida fetal (Rüsse, 1983). O estudo da dinâmica folicular ou foliculogênese, nos diferentes momentos do ciclo estral, pode ajudar a elucidar fenômenos envolvidos com procedimentos de sincronização de estros e superovulação em fêmeas bovinas e bubalinas (Oba e Souza, 2003).

A foliculogênese ocorre em dois estádios, dependentes ou não de gonadotrofinas, e pode ser dividida em três fases: recrutamento, seleção e dominância folicular (Driancourt, 1991). O eixo hipotálamo-hipófise-ovário, por meio de suas gonadotrofinas, é fundamental na regulação do desenvolvimento folicular. O hormônio folículo estimulante (FSH), importante para o desenvolvimento folicular inicial, e o hormônio luteinizante (LH), envolvido na seleção, no crescimento, na maturação e na ovulação do folículo dominante, são os reguladores primários durante a fase dependente de gonadotrofinas (Driancourt, 1991; Adams, 1994).

Basicamente, o recrutamento é o processo pelo qual um grupo de folículos torna-se apto num ambiente com estimulação gonadotrófica hipofisária suficiente (FSH predominante) para prosseguir seu caminho no sentido da ovulação ou atresia. Seleção é o processo pelo qual um único folículo diverge dos demais e escapa da atresia, com competência potencial para ovular (fase FSH-LH predominante). Dominância é o meio pelo qual o folículo selecionado se destaca entre os outros folículos da mesma onda, de forma a impedir o recrutamento de uma nova onda folicular e o crescimento desses outros folículos (fase LH predominante). A última onda folicular do ciclo estral fornece o folículo ovulatório, ao passo que os folículos dominantes da(s) primeira(s) onda(s) sofrem atresia. Essa atresia é determinada pela presença de um CL ativo no ovário, com ampla produção de progesterona. A progesterona exerce um efeito de retroalimentação (*feedback*) negativa no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, reduzindo a amplitude e a frequência dos pulsos de LH, o que inviabiliza os processos de maturação final do folículo e da ovulação (Lucy et al., 1992; Savio et al., 1993; Ginther et al., 1996). Associado a isto, o estradiol e a ativina promovem o crescimento e a diferenciação folicular, prevenindo a luteinização precoce dos folículos, enquanto os andrógenos, a progesterona, a inibina e a folistatina atuam contrariamente (Findlay et al., 1992).

Os primeiros trabalhos relacionados ao crescimento folicular em bubalinos foram realizados por Singh et al. (1984), que observaram a presença de estruturas ovarianas durante o ciclo estral em novilhas da raça Surti. Esses autores notaram, pela palpação via retal, que 65,4% das novilhas cíclicas apresentavam folículos maiores que 8 mm no meio do ciclo estral (entre o 9º e o 13º dia). Posteriormente, com base na avaliação histológica ovariana, Danell (1987) observou a existência de duas ondas de crescimento folicular em novilhas bubalinas. A primeira onda iniciou-se no 3º dia, permanecendo até o 13º dia do ciclo estral, enquanto a segunda onda iniciou-se no 9º dia, mantendo-se até o término do ciclo estral. Esses resultados demonstraram que as búfalas apresentavam comportamento folicular semelhante ao apontado para bovinos.

Nesta mesma linha, outros estudos demonstraram desenvolvimento folicular ovariano com padrão de ondas em búfalos da raça Mehsana (Awasthi et al., 2007) e Murrah (Taneja et al., 1996; Baruselli et al., 1997; Manik et al., 1998); nesses trabalhos, a presença de uma, duas ou três ondas de crescimento folicular foi registrada, sendo mais frequentes os ciclos de duas ondas.

Awasthi et al. (2007) avaliaram o padrão de crescimento e de regressão de folículos ovarianos em búfalos do rio, por meio de ultra-sonografia, e verificaram padrão de uma ($n = 5$) e duas ondas ($n = 3$) de crescimento folicular durante o ciclo estral, que diferiram significativamente em relação à média do intervalo

interovulatório ($21,0 \pm 0,54$ dias vs $22,7 \pm 0,33$ dias) e interestro ($20,8 \pm 0,58$ dias vs $22,3 \pm 0,66$ dias). A média da taxa de crescimento linear do folículo ovulatório foi significativamente maior nos ciclos de duas ondas comparada ao ciclo de uma onda ($1,17 \pm 0,33$ mm/dia vs $0,32 \pm 0,01$ mm/dia). Em geral, já está comprovado que o número de ondas foliculares em cada ciclo é correlacionado com o comprimento do ciclo, que, por sua vez, é dependente da meia-vida do corpo lúteo. Desta forma, ciclos estrais de uma onda estão associados com uma curta fase luteal e caracterizados por curtos comprimentos do ciclo estral (Baruselli et al., 1997).

No estudo de Baruselli et al. (1997), foi reportado que apenas uma búfala apresentou uma única onda de crescimento folicular, caracterizada pelo ciclo estral de curta duração (13 dias) e baixas concentrações de progesterona. No entanto, o ciclo subsequente desse animal apresentou duração normal (22 dias) e níveis compatíveis de progesterona. Foi aventado por esses autores que o ciclo estral curto encontrado deveria estar relacionado a uma fase luteal de curta duração no período pós-parto. Taneja et al. (1996) também registraram a ocorrência de uma onda de crescimento folicular em búfalos, entretanto os detalhes desse padrão de crescimento não foram reportados pelos autores.

De acordo com Awasthi et al. (2007), a onda solitária do ciclo de uma única onda emerge significativamente mais tarde do que a primeira onda do ciclo de duas ondas. Entretanto, Taneja et al. (1996) não observaram essa diferença entre ciclos de uma ou duas ondas foliculares. Awasthi et al. (2007) observaram diferenças no perfil de crescimento do folículo dominante solitário em ciclos de uma onda folicular, que se apresentou em três fases distintas: fase de crescimento, regressão e de recrescimento, culminando em ovulação. Essa característica difere do padrão de crescimento do folículo dominante ovulatório de ciclos em búfalos com duas e três ondas, caracterizado por contínuo crescimento do folículo sem nenhuma regressão até o momento da ovulação (Baruselli et al., 1997; Manik et al., 1998). Um padrão de crescimento similar, para o folículo dominante, nos ciclos de uma onda folicular, também foi reportado por Taneja et al. (1996). Esta observação suporta indiretamente a hipótese de que somente o tamanho do maior folículo pode não ser o único critério a ser usado para classificar um folículo como dominante, em búfalos (Guibault et al., 1993).

Em búfalas que apresentaram duas ondas de crescimento folicular por ciclo estral, a primeira e a segunda ondas iniciaram-se nos dias $1,8 \pm 0,6$ e $7,8 \pm 2,0$ do ciclo, respectivamente (Taneja et al., 1996); estes autores registraram valores de $15,5 \pm 0,9$ mm para o diâmetro máximo do folículo ovulatório, com taxa média de crescimento de $1,0 \pm 0,1$ mm/dia. Resultados semelhantes foram registrados no estudo de Baruselli et al. (1997), no qual o início da primeira e da segunda ondas de crescimento folicular, em búfalas que apresentaram duas ondas, ocorreu nos dias $1,16 \pm 0,5$ e $10,83 \pm 1,09$, respectivamente. Animais com três ondas de crescimento folicular apresentaram o início da primeira, segunda e terceira ondas nos dias $1,10 \pm 0,32$, $9,30 \pm 1,25$ e $16,80 \pm 1,22$, respectivamente. Manik et al. (1994) encontraram diâmetro máximo do folículo ovulatório de $13,8 \pm 0,37$ mm, e uma taxa de crescimento de $0,94 \pm 0,12$ mm/dia durante $11,8 \pm 1,39$ dias.

Baruselli et al. (1997) registraram maior incidência de búfalas com ciclos de duas ondas de crescimento folicular (63,3%) e observaram que as fêmeas que apresentaram três ondas de crescimento folicular tiveram a fase luteal mais longa ($10,40 \pm 2,11$ vs $12,66 \pm 2,91$ dias; $P < 0,05$), intervalo interovulatório ($22,27 \pm 0,89$ vs $24,50 \pm 1,88$ dias; $P < 0,01$) e ciclo estral ($21,84 \pm 1,01$ vs $24,00 \pm 2,21$ dias; $P < 0,01$). Nos animais que apresentaram três ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral, o diâmetro máximo dos folículos da primeira onda foi significativamente maior do que o diâmetro máximo dos folículos da segunda onda ($1,33 \pm 0,18$ vs $1,11 \pm 0,21$ cm).

Não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) quanto ao diâmetro máximo do primeiro folículo dominante e do folículo ovulatório entre ciclos de duas ondas ($1,51 \pm 0,24$ vs $1,55 \pm 0,16$ cm, respectivamente) e ciclos de três ondas de crescimento folicular ($1,33 \pm 0,18$ vs $1,34 \pm 0,13$ cm, respectivamente). No entanto, observaram-se diferenças estatisticamente significativas quanto ao diâmetro máximo do primeiro folículo dominante ($1,51 \pm 0,24$ vs $1,33 \pm 0,18$ cm) e do folículo ovulatório ($1,55 \pm 0,16$ vs $1,34 \pm 0,13$ cm), entre ciclos de duas e três ondas de crescimento folicular, respectivamente. Considerando que neste estudo, as búfalas com três ondas de crescimento folicular apresentaram associação entre as altas concentrações de progesterona e o reduzido diâmetro máximo dos folículos, foi sugerido que maiores concentrações de progesterona também inibem o crescimento folicular nessa espécie (Baruselli et al., 1997). Utilizando progesterona exógena (medroxiprogesterona), Garcia et al. (2008) verificaram aumento no número de folículos pequenos nos ovários dos animais tratados e diminuição no número de grandes folículos por retardar o crescimento dos folículos com diâmetro maior que 5,0 mm entre os dias 0 e 7 do tratamento.

Ainda no estudo de Baruselli et al. (1997), a segunda onda folicular emergiu mais cedo em ciclos de três ondas comparados aos ciclos de duas ondas de crescimento folicular ($9,30 \pm 1,25$ dias vs $10,83 \pm 1,09$ dias; $P < 0,01$). Resultados semelhantes foram encontrados em bovinos (Fortune, 1993). Este autor observou que a fase de crescimento e a fase estática do primeiro folículo dominante diferem entre si em ciclos de duas e de três ondas foliculares. O primeiro folículo dominante cresce por um período mais prolongado e atinge diâmetros superiores em ciclos de duas ondas do que naqueles de três ondas de crescimento folicular, o que apresenta similaridade aos resultados obtidos com bubalinos.

Padrão de desenvolvimento folicular em ondas também foi observado em búfalas pré-púberes. Presicce et al. (2003) registraram em novilhas com idades entre cinco e nove meses, médias de duas a seis ondas

foliculares regulares. O intervalo médio entre a emergência das ondas foi de $9,9 \pm 2,8$ dias, e o diâmetro do folículo dominante e do primeiro folículo subordinado foi $8,4 \pm 1,2$ e $4,8 \pm 0,6$ mm, respectivamente ($P < 0,05$).

Gimenes et al. (2007) avaliaram a divergência folicular por meio de ultra-sonografia e a capacidade ovulatória em búfalos. O diâmetro dos dois maiores folículos foi de $7,2 \pm 0,3$ mm e de $6,4 \pm 0,3$ mm para o folículo dominante e o subordinado, respectivamente, no início do desvio folicular, e a capacidade ovulatória foi adquirida quando o folículo dominante alcançou 8,5 mm.

Considerações finais

O esclarecimento de aspectos fisiológicos do ciclo estral e da dinâmica folicular ovariana é fator importante que permite aos pesquisadores utilizarem essas ferramentas no intuito de se aperfeiçoar o uso de biotecnologias da reprodução para aumentar o ganho genético e produtivo de criações de búfalos.

Referências bibliográficas

- Abdoon ASS, Kandil OM.** Factors affecting number of surface ovarian follicles and oocytes yield and quality in Egyptian buffaloes. *Reprod Nutr Dev*, v.41, p.71-77, 2001.
- Adams GP.** Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle implications for synchronization & super stimulation. *Theriogenology*, v.41, p.19-24, 1994.
- Albuquerque KP, Marquez JA, Prado IN, Kutsunugi E, Macedo RMG.** Morfologia ovariana em novilhas bubalinas terminadas em confinamento em função do uso de promotor de crescimento ou esferas de chumbo no útero. *Acta Scient Anim Sci*, v.26, p.233-240, 2004.
- Anualpec 2004:** Anuário da pecuária brasileira. Sao Paulo: Instituto FNP, 2004. 376p.
- Ariyaratna HBS, Gunawardana VK.** Morphology and morphometry of ovarian follicles in the goat. *Small Rumin Res*, v.26, p.123-129, 1997.
- Awasthi MK, Kavani FS, Siddiquee GM, Sarvaiya NP, Derashri HJ.** Is slow follicular growth the cause of silent estrus in water buffaloes? *Anim Reprod Sci*, v.99, p.258-268, 2007.
- Barile VL, Terzano GM, Allegrini S, Maschio M, Razzano M, Neglia G, Pacelli C.** Relationship among preovulation follicle, corpus luteum and progesterone in oestrus synchronized buffaloes. *Ital J Anim Sci*, v.6, p.663-666, 2007.
- Baruselli PS.** Sexual behaviour in buffaloes. In: World Buffalo Congress, 4, 1994, São Paulo, SP. *Proceedings ...* São Paulo: WBC, 1994. p.158-173.
- Baruselli PS, Carvalho NAT.** Reproduction Management and artificial insemination in buffalo. In: 1 Buffalo Symposium of Americas, 1, 2002, Belém, PA. *Proceedings ...* Belém, PA: BSA, 2002. p.119-143.
- Baruselli PS, Mucciolo RG, Visintin JA, Viana WG, Arruda RP, Madureira EH, Oliveira CA, Molero-Filho JR.** Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v.47, p.1531-1547, 1997.
- Bernardes O.** Os búfalos no Brasil. In: Simpósio Búfalos de las Américas, 3; Simposio Europa-América, 2, Medellín, Colômbia. *Memórias/Proceedings ...* Medellín: SBA, 2006. v.3, p.14-20.
- Bittman EL, Karsch FJ.** Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day lengths in the ewe. *Biol Reprod*, v.30, p.583-593, 1984.
- Carvalho FCA.** *Análise estrutural e ultraestrutural de folículos pré-antrais de fetos e de fêmeas bubalinas (Bubalus bubalis) em diferentes fases reprodutivas.* 2005. 95f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP.
- Danell B.** *Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers.* 1987. 124f. Thesis (Doctorat) - Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Das GK, Jain GC, Solanki VS, Tripathi VN.** Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. *Theriogenology*, v.46, p.1403-1411, 1996.
- Driancourt MA.** Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, v.35, p.55-68, 1991.
- Dyce KM, Sack WO, Weinsing CJG.** *Textbook of veterinary anatomy.* Philadelphia: WB Saunders, 1996. 856p.
- El-Wishy AB, Abdu MSS, Hemoudas N, El Saway SA.** Reproduction in buffaloes in Egypt: morphological features of the ovaries of cattle and buffaloes in relation to their function. *Z Tierz Zuechtungsbiol*, v.88, p.47-63, 1971.
- Erickson BH.** Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J Reprod Fertil*, v.10, p.97-105, 1966.
- Fadle WSA, Fahmy MFA, El Shafey SM.** Histological studies on the ovaries of Egyptian buffaloes with special reference to the corpus luteum. *Veterinaermedizin*, v.21, p.581-91, 1974.
- Fair T.** Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.203-216, 2003.

- Fair T, Hulshof SCJ, Hyttel P, Boland M, Greve T.** Nucleous ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. *Mol Reprod Dev*, v.46, p.208-215, 1997a.
- Fair T, Hulshof SCJ, Hyttel P, Greve T.** Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol*, v.195, p.327-36, 1997b.
- Fields MJ, Fields PA.** Morphological characteristics of bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology*, v.45, p.1295-1355, 1996.
- Figueiredo JR.** *Isolement, caractérisation et culture de follicules préantraux chez les bovins*. 1995. 113f. Thèse (PhD) - Université de Liège, Liège, Belgium.
- Findlay JK, Robertson DM, Clarke IJ, Klein R, Doughton BW, Xiao S, Russel DL, Shukovski L.** Hormonal regulation of reproduction-general concepts. *Anim Reprod Sci*, v.28, p.319-328, 1992.
- Food and Agriculture Organization.** FEOSTAT: Agriculture data. Disponível em: <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture/>. Acessado em: 2004.
- Gandolfi F, Brevini TA, Cillo F, Antonini S.** Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev Sci Technol*, v. 24, p.413-423, 2005.
- Garcia AR, Nahúm BS, Lourenço Júnior JB, Costa NA, Gonçalves KS, Miyasaki MYA, Andrade AFC, Arruda RP.** Associação da medroxiprogesterona ao protocolo Ovsynch para inseminação artificial em tempo fixo de búfalas cíclicas (*Bubalus bubalis*) criadas na Amazônia Oriental. *Acta Amazônica*, v.38, p.369-378, 2008.
- Gimenes LU, Carvalho NAT, Sá Filho MF, Torres-Júnior JRS, Ayres H, Vannuci LL, Bianconi LL, Bisinotto RS, Reichert RH, Beltran MP, Nogueira GP, Baruselli PS.** Follicle selection by ultrasonography and plasmatic characteristics and ovulatory capacity in buffaloes. *Ital J Anim Sci*, v.6, p.629-631, 2007.
- Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT.** Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci*, v.82, p.431-446, 2004.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Friche PM, Gibbons JR, Kot K.** Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, v.55, p.1187-1194, 1996.
- Gordon I.** Recovering the primary oocyte. In: Gordon I. *Laboratory production of cattle embryos*. Cambridge, UK: CAB International; Raven Press, 1994. p.71-82.
- Guibault LA, Rouillier P, Matton P, Glencross RG, Beard AJ, Knight, PG.** Relationships between the level of atresia and inhibin contents (alfa subunit and alfa-beta dimer) in morphologically dominant follicles during their growing and regressing phases of development in cattle. *Biol Reprod*, v.48, p.268-276, 1993.
- Gupta PSP, Nandi S, Ravindranatha PM, Sarma PV.** Isolation of preantral follicles from buffalo ovaries. *Vet Rec*, v.148, p.543-544, 2001.
- Hulshof SCJ, Bevers MM, Van Den Donk HA, Van Den Hurk R.** The isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. In: International Congress on Animal Reproduction, 12, 1992, The Hague, The Netherlands. *Proceedings...* The Hague: ICAR, 1992. v.1, p.336-338.
- Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, Van Den Hurk R.** Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. *Vet Q*, v.16, p.78-80, 1994.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T.** Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p.23-32, 1997.
- Lucy MC, Savio JD, Badinga RL, De La Sota RL, Thatcher WW.** Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*, v.70, p.3615-26, 1992.
- Junqueira LC, Carneiro JC.** *Histologia clássica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 433p.
- Kumar A, Solanki VS, Jindal SK, Tripathi VN, Jain GC.** Oocyte retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. *Anim Reprod Sci*, v.47, p.189-195, 1997.
- Landim-Alvarenga FC.** Fecundação e clivagem. In: Prestes NC, Landim-Alvarenga FC. *Obstetrícia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.1-21.
- Le Van Ty DC, Chupin D, Driancourt MA.** Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. *Anim Reprod Sci*, v.19, p.171-178, 1989.
- Leal LS.** *Estudo morfofisiométrico de ovários e maturação ovocitária in vitro em bubalinos e bovinos nas diferentes fases da atividade reprodutiva*. 2008. 180f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Manik RS, Madan ML, Singla SK.** Ovarian follicular dynamics in water buffaloes (*Bubalus bubalis*): ultrasonically monitoring individual follicles for wave hypothesis. *Theriogenology*, v. 41, p.246, 1994. Resumo.
- Manik RS, Singla SK, Palta P, Madan ML.** Ovarian follicular dynamics monitored by real time ultrasonography during oestrus cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Asian Aust J Anim Sci*, v.11, p.480-485, 1998.
- Mondadori RG, Luque MCA, Santin TR, Bão SN.** Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.97, p.323-333, 2007.
- Monniaux D, Mariana JC, Cogné Y, Rabahi F, Monget P, Mermillod P, Baril G, Tomanek M, Pisselet C, Chupin D, Poulin N, Brébion P, Bosc M, Nicolle A, Ontine J, Durand P.** Contrôle de la maturation terminale des follicules au cours de la phase folliculaire chez les mammifères domestiques. *Contracept Fertil Sex*, v.21, p.403-407, 1993.
- Neves MM, Marques Jr AP, Santana CV, Lima FPC, Zambrano WJ.** Características de ovários de animais

- zebu (*Bos taurus indicus*) coletados de abatedouros. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.54, p.651-654, 2002.
- Nunez QM.** Morfologia del tracto genital de los pequeños ruminantes. *Rev Cient*, v.3, p.77-86, 1993.
- Oba E.** Tópicos atualizados ligados à reprodução na espécie bubalina. In: Contribuição ao estudo dos bubalinos: período de 1972-2001: palestras. Botucatu, SP: FMVZ/UNESP, 2003. p. 179-198.
- Oba E, Souza MIL.** Avanços na reprodução de bovinos e bubalinos. In: Contribuição ao estudo dos bubalinos: período de 1972-2001: palestras. Botucatu, SP: FMVZ/UNESP, 2003. p.541-564.
- Oliveira RL, Assunção DMP, Barbosa MAAF, Ladeira MM, Silva MMP, Oliveira RL.** Desempenho produtivo e custos com alimentação de novilhos bubalinos alimentados com dietas com diferentes fontes de lipídios. *Rev Bras Zootec*, v.36, p.727-732, 2007.
- Palta P, Chauhan MS.** Laboratory production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Reprod Fertil Dev*, v.10, p.379-391, 1998.
- Parkale DD, Hukeri VB.** Study of biometry of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovaries. *Indian J Anim Reprod*, v.10, p.17-19, 1989.
- Picton HM.** activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*, v.55, p.1193-1210, 2001.
- Priedkalns J, Leiser R.** Female reproductive system. In: Dellmann HD, Eurell J. (Ed.). *Textbook of veterinary histology*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. p.247-269.
- Porto-Filho RM, Baruselli PS, Madureira EH.** Uso da radiotelemetria para detecção do estro em fêmeas búfalas: luteólise durante duas fases do ciclo estral, ultrassonografia da ovulação e perfis hormonais. *Bol Med Vet*, v.1, p.13-32, 2005.
- Rodriguez KF, Farin CE.** Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. *Theriogenology*, v.61, p.1499-1511, 2004.
- Roy DJ, Mullick DN.** Endocrine functions of corpus luteum of buffaloes during estrus cycle. *Endocrinology*, v.75, p.284-7, 1964.
- Rüsse I.** Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat*, v.24, p.77-92, 1983.
- Saumande J.** Ovogenèse et folliculogenèse. *Rec Med Vet*, v.157, p.29-38, 1981.
- Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, de la Sota RL, Wolfenson D.** Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J Reprod Fertil*, v.97, p.197-203, 1993.
- Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Herderson KM, Martin GB, Mcnatty KP, Mcneilly AS, Tsonis CG.** A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in ewe. *Reprod Fertil Dev*, v.5, p.459-478, 1993.
- Settergren I.** The ovarian morphology in clinical bovine gonadal hypoplasia with some aspects of its endocrine relations. *Acta Vet Scand*, v.5, p.28-92, 1964.
- Singh G, Singh GB, Sharma SS, Sharma RD.** Studies on estrous symptoms of buffalo heifers. *Theriogenology*, v.21, p.849-858, 1984.
- Singh UB, Sulochana S, Sharma GP.** Histological changes in the corpus luteum of buffaloes from 30 to 150 days of pregnancy. *Ital J Anim Reprod*, v.11, p.28-30, 1990.
- Taneja M, Ali A, Singh G.** Ovarium follicular dynamic in water buffalo. *Theriogenology*, v.46, p.121-130, 1996.
- Vale WG, Ohashi OM, Sousa JS, Ribeiro HFL.** Biometria do sistema genital de búfalas (*Bubalus bubalis*). *Arq Esc Vet UFMG*, v.34, p.193-202, 1982.
- Vale WG, Ribeiro HFL.** Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. *Rev Bras Reprod Anim*, v.29, p.63-73, 2005. Disponível em: www.cbra.org.br.
- Vale WG, Weitze KF, Grunert E.** Estrous behaviour and ovarian function in water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) under Amazon conditions. In: International Congress on Animal Reproduction and AI, 10, 1984. Urbana, IL. *Proceedings ... Urbana, IL: ICAR*, 1984. v.2, p.154-156.
- Van Den Hurk R, Bevers MM, Beckers JF.** *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology*, v.47, p.73-82, 1997.
- Van Wezel IL, Rodgers RJ.** Morphological characterization of bovine follicles and their environment *in vivo*. *Biol Reprod*, v.55, p.1003-1011, 1996.
- Viana JHM, Ferreira AM, Sá WF, Camargo LSA.** Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.51, p.251-256, 1999.
- Xu ZZ, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Younquist RS.** Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod*, v.53, p.951-957, 1995.
- Zicarelli L.** Management in different environmental conditions. In: World Buffalo Congress, 4, 1994, São Paulo. *Proceedings...* São Paulo: USP; WBC, 1994. p.15-39.
- Zicarelli L, Vale WG.** Patronos reprodutivos estacionales y no estacionales en el búfalo doméstico. In: Berdugo JA, Vale WG. (Ed.). *Memorias del Curso Internacional de Reproducción Bufalina. 2002, Medellín, Colombia*. Medellín: CATI, 2002. p.33-58.