

SORAIA SANTOS DE OLIVEIRA RODRIGUES SILVA

**CICLO ESPERMATOGÊNICO DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)
MANTIDA EM CONDIÇÕES ABIÓTICAS CONTROLADAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586c
2017

Silva, Soraia Santos de Oliveira Rodrigues, 1974-
Ciclo espermatogênico de rã-touro (*Lithobates
catesbeianus*) mantida em condições abióticas controladas /
Soraia Santos de Oliveira Rodrigues Silva. – Viçosa, MG, 2017.
xi; 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Tarcizio Antônio Rêgo de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.24-30.

1. Anuros. 2. *Lithobates catesbeianus*. 3.
Espermatogênese. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 597.8

SORAIA SANTOS DE OLIVEIRA RODRIGUES SILVA

**CICLO ESPERMATOGÊNICO DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)
MANTIDA EM CONDIÇÕES ABIÓTICAS CONTROLADAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Rafael Alves Viana

Sirlene Souza Rodrigues Sartori

Oswaldo Pinto Ribeiro Filho
(Orientador)

“Portanto... Plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

William Shakespeare

*Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio incondicional de sempre.
Ao meu esposo e meu filho pela paciência, incentivo e compreensão nas várias
horas de ausência. Aos meus irmãos Marcelo e Gustavo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me mostrar que os seus caminhos são sempre infinitamente maiores que os meus sonhos.

Aos meus pais, aos quais eu nem tenho palavras para agradecer (vocês são o motivo de mais esta vitória).

Ao meu esposo Ubirajara e ao meu filho Yago, por me apoiarem e me incentivarem sempre. Vocês são o meu porto seguro. Amo!

Aos meus irmãos, Gustavo e Marcelo, por estarem sempre comigo (amo vocês).

Aos meus tios, Luzia e Carlos, pela torcida de sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (DMV), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de aprofundar-me profissionalmente.

À CNPq, pela bolsa que me possibilitou fazer o mestrado.

Ao professor Tarcízio Antônio Rego de Paula, pelos ensinamentos tão valiosos e pela orientação.

Ao professor Oswaldo Pinto Ribeiro Filho, pela coorientação, ensinamentos e por ceder espaço e animais para que este projeto fosse concretizado.

Ao professor Sergio Luís Pinto da Matta, pela coorientação, ensinamentos, confiança e auxílio para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao professor Jorge Abdala Dergam Dos Santos, pelo auxílio e confiança.

Ao professor Marcelo Maia Pereira pela tão preciosa ajuda. Obrigada!

À querida Rosinéia, por nunca deixar a parte burocrática ficar pendente! São tantas “coisinhas” que, sem sua ajuda Rosi, não seria possível chegar ao “finalmente”. Obrigada!

À querida amiga Priscilla, muito obrigada pela ajuda, companheirismo, risadas e lógico, pelos “sustos”. Senti muito a sua falta na fase final!

Ao amigo Rafael Vianna, meu muito obrigada por ser sempre companheiro e prestativo. Quando eu crescer, quero ser como você! (mial).

À Fernanda. Muito obrigada Fê, pelos ensinamentos e por ser sempre tão prestativa, apesar da correria de sempre!

Ao amigo Marcus, obrigada pelo socorro e por daqui em diante dividir comigo algumas broncas!

Aos meninos do Ranário Experimental que contribuíram para que este trabalho fosse finalizado: Thássio Nogueira e Samuel Paglioto. Obrigada pela ajuda!

Aos funcionários do Ranário, Álvaro Magela Ferreira, Everaldo Gregório e José Antônio de Freitas, pelos ensinamentos, pela convivência e pelos auxílios diários.

BIOGRAFIA

Soraia Santos de Oliveira Rodrigues Silva, filha de Antônio Benedito de Oliveira e Maria da Conceição Santos de Oliveira, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 31 de outubro de 1974. Concluiu o Ensino Médio em agosto de 1996. Em 2008, iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas na Universidade Vale do Rio Doce. Em agosto de 2014 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em setembro de 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO.....	1
1. OBJETIVOS.....	4
1.2 Objetivo Geral.....	4
1.3 Objetivos Específicos.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Local e acomodação dos animais.....	11
3.2 Coleta das amostras.....	11
3.2.1 Processamento histológico.....	12
3.2.2 Coleta e análise de dados.....	12
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	14
4.1 Determinação do estágio de desenvolvimento gonadal.....	14
4.2 Descrições biométricas dos animais em diferentes fases de desenvolvimento gonadal.....	16
4.3 Índices Gonadossomático, Adipossomático e Hepatossomático nas diferentes fases de desenvolvimento gonadal.....	17
4.4 Descrição do conteúdo testicular em diferentes fases de desenvolvimento corpóreo e gonadal.....	19
4.5 Alterações celulares ocorridas durante as fases de desenvolvimento gonadal.....	20
CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
ANEXOS.....	31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Corte histológico de testículo de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) evidenciando: A cisto, B lúmen, C túnica própria, D intertúbulo e E núcleo da célula de Sertoli.....**31**
- Figura 2** - Células da linhagem espermatogênica de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Espermatogonia A (Estg A), esperm. B (Estg B), espermatócito primário (Espt. pri.), esperm. secundário (Espt. sec.), espermátide arredondada (Espd.arred.) e esperm. Alongada (Espd. along.).....**32**
- Figura 3** - Porcentagens dos tipos de cistos dos túbulos seminíferos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em três estádios de desenvolvimento gonadal (Início de maturação, Maturação avançada e Maturação intermediária) dos 120 aos 246 dias de vida. Espermatogonia A (Estg A), espermatogônia B (Estg B), espermatócito primário (Espt. pri.), espermatócito secundário (Espt. sec.), espermátide arredondada (Espd.arred.) e espermátide alongada (Espd. along.).....**33**
- Figura 4** - Médias de peso do animal (M. peso) e medias ajustadas de: comprimento rosto-cloacal (M. CRC), peso dos testículos (M. test.), corpo adiposo (M.C.A.) e fígado (M. Fíg.) de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em três estádios de desenvolvimento gonadal (Início de maturação, Maturação intermediária e Maturação avançada) dos 120 aos 246 dias de vida.....**34**
- Figura 5** - Médias das porcentagens dos componentes do parênquima testicular: cisto, lúmen, túnica própria, intertúbulo e núcleo da célula de Sertoli de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em três estádios de desenvolvimento gonadal (Início de maturação, Maturação intermediária e Maturação avançada) dos 120 aos 246 dias de vida.....**35**
- Figura 6** - Médias dos índices adipossomático (IAS), hepatossomático (IHS) e gonadossomático (IGS) de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em três estádios de desenvolvimento gonadal (Início de maturação, Maturação intermediária e Maturação avançada) dos 120 aos 246 dias de vida.....**36**

RESUMO

SILVA, Soraia Santos de Oliveira Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2017. **Ciclo Espermatogênico de Rã-Touro (*Lithobates Catesbeianus*) mantida em Condições Abióticas Controladas.** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Coorientadores: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho e Sérgio Luis Pinto da Matta.

Os testículos de anuros são descritos como órgãos pares, arredondados, compactos, geralmente amarelados, esbranquiçados ou branco-leitosos. Em anuros a espermatogênese é cística, e nos cistos as células germinativas se encontram no mesmo estágio de desenvolvimento. A compreensão do ciclo reprodutivo de anuros torna-se necessário para definir as características da sazonalidade do desenvolvimento das células germinativas. O trabalho foi executado com o objetivo da avaliação quantitativa do desenvolvimento gonadal, bem como do processo espermatogênico e dos índices somáticos em rãs-touro mantidas em condições abióticas de temperatura, umidade e luminosidade controladas. Foram utilizadas 108 rãs machos com idade de 120 a 246 dias. Foram avaliados o desenvolvimento do peso e comprimento corporal, a morfologia gonadal e os índices somáticos durante um período de 124 dias. Foram também quantificados os parâmetros produtivos espermáticos, como: proporção dos diferentes tipos de células contidas nos lóbulos seminíferos e proporção intertubular. A partir da proporção volumétrica dos diferentes tipos de cistos foram definidos os estádios de desenvolvimento testicular, sendo considerado: No início da maturação os animais tinham 120 dias de idade. A média dos índices gonadossomáticos, adipossomático e hepatossomático foram de 0,018%, 3,836% e 4,464%, respectivamente. Os cistos continham em média, maior quantidade de espermatogônia B, seguido de espermatócitos primários e espermatogônia A. Na transição do início de maturação para a maturação intermediária, os animais tinham 148 dias de idade. A média dos índices gonadossomáticos, adipossomático e hepatossomático foram de 0,029%, 4,50% e 4,99%, respectivamente. Os cistos encontrados em maior proporção foram de espermatogônia B, seguido de espermatócito primário e espermatogônia A. Na transição da maturação intermediária para maturação avançada, os animais tinham 196 dias de idade. A média dos índices gonadossomáticos, adipossomático e hepatossomático foram de 0,041%, 4,48% e 4,41%, respectivamente. Os cistos encontrados em maior proporção foram de

espermatogônia B, seguido de espermatócito primário e espermatíde alongada. Na maturação avançada, os animais tinham 246 dias de idade. A média dos índices gonadosômáticos, adipossômático e hepatossômático foram de 0,062%, 7,28% e 6,29%, respectivamente. Os cistos encontrados em maior proporção foram de espermatócito primário, seguido de espermatogônia B e espermatíde alongada. Os estádios de desenvolvimento testiculares ocorrem concomitantemente com o estágio dos animais. O desenvolvimento gonadal está relacionado com o estágio fisiológico reprodutivo. O ciclo espermatogênico de rãs-touro mantidas em ambiente controlado é cíclico e contínuo.

ABSTRACT

SILVA, Soraia Santos de Oliveira Rodrigues, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2017. **Spermatogenic Cycle of Bullfrog (*Lithobates Catesbeianus*) held in Controlled Abyotetic**. Advisor: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Co-advisors: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho and Sérgio Luis Pinto da Matta.

The anuric testicles are described as peer organs, rounded, compact, usually yellowish, whitish or milky white. In anurans the spermatogenesis is cystic, and in the cysts the germ cells are at the same stage of development. The comprehension of the reproductive cycle of anurans becomes necessary to define the seasonality characteristics of germ cell development. This work aimed the quantitative evaluation of the gonadal development, as well as the spermatogenic process and the somatic indices in bullfrogs maintained under abiotic conditions of controlled temperature, humidity and luminosity. Were used 108 male frogs, ranging from 120 to 246 days. The developments of body weight and length, gonadal morphology and somatic indices were evaluated during the time of 124 days. Sperm productive parameters were also quantified, such as: proportion of different types of cells contained in the seminiferous lobes and intertubular ratio. From the volumetric ratio of the different types of cysts the stages of testicular development were defined, being considered: At the beginning of maturation the animals were 120 days old. The mean gonadosomatic, adiposomal and hepatosomatic scores were 0.018%, 3.836% and 4.464%, respectively. The cysts contained, on average, a greater amount of spermatogonia B, followed by primary spermatocytes and spermatogonia A. At the transition from early maturation to intermediate maturation, the animals were 148 days old. The mean gonadosomatic, adiposomal and hepatosomatic scores were 0.029%, 4.50% and 4.99%, respectively. The cysts found in the highest proportion were spermatogonia B, followed by primary spermatocytes and spermatogonia A. At the transition from intermediate maturation to advanced maturation, the animals were 196 days old. The mean gonadosomatic, adiposomal and hepatosomatic rates were 0.041%, 4.48% and 4.41%, respectively. The cysts found in the highest proportion were spermatogonia B, followed by primary spermatocytes and elongated spermatids. At advanced maturation, the animals were 246 days old. The mean gonadosomatic, adiposomal and hepatosomatic scores were 0.062%, 7.28% and 6.29%, respectively. The cysts found in the highest proportion were primary spermatocytes, followed by

spermatogonia B and elongated spermatids. Testicular development stages occur concurrently with the stage of the animals. Gonadal development is related to the reproductive physiological stage. The spermatogenic cycle of bullfrogs kept in a controlled environment is cyclical and continuous.

INTRODUÇÃO

Os anuros pertencem à classe dos anfíbios e são elementos importantes nas teias ecológicas, atuando como presas ou predadores. Enquanto predadores agem como controladores de insetos e pequenos vertebrados, e são sensíveis ao desequilíbrio ecológico, são considerados indicadores biológicos e ambientais (STEBBINS; COHEN, 1995). Enquanto presas, servem de alimento para uma grande quantidade de animais vertebrados e invertebrados (DUELLMAN; TRUEB, 1994; TOLEDO, 2005; TOLEDO et al., 2007).

Apresentando ciclo de vida complexo, tem uma das fases aquática (fase larval), e outra terrestre (WASSERSUG, 1975). Essas duas fases diferem em vários aspectos, como no modo de respiração, locomoção e alimentação, que refletem no comportamento e na resposta aos fatores ambientais (DUELLMAN; TRUEB, 1994).

São animais ectotérmicos e consequentemente o metabolismo de seu corpo varia de acordo com a temperatura do meio onde habitam. Quando a temperatura está abaixo da temperatura de conforto, as rãs diminuem o consumo de alimentos e sua taxa de crescimento, podendo até parar de alimentar-se (FIGUEIREDO et al., 2001). Assim, a diferença no tempo de desenvolvimento desses animais nas diversas regiões climáticas é atribuída principalmente à temperatura média de cada região (LIMA et al., 2001).

Alterações em outros fatores abióticos, como fotoperíodo e precipitação, também podem representar impacto no sucesso reprodutivo das rãs, uma vez que sua fisiologia é bastante exigente, necessitando de condições abióticas específicas para a reprodução adequada (HAYES et al., 2010). Neste sentido, o controle da espermatogênese é mantido pela interação entre ritmos endógenos e fatores externos (PANIAGUA et al., 1990; SASSO-CERRI et al., 2004).

Há um grande número de registros de declínios de anfíbios ao redor do planeta (CRUMP et al., 1992; POUNDS; CRUMP, 1994; BERTOLUCI; HEYER, 1995; LA MARCA; LÖTTERS, 1997; LIPS, 1999; YOUNG et al., 2001; RON et al., 2003). Esse declínio populacional dos anfíbios foi o primeiro a ser reconhecido como fenômeno mundial no início da década de noventa, do século passado (WAKE; VREDENBURG, 2008), tendo intensificado consideravelmente em 2010, devido a um sinergismo de fatores, tais como mudanças climáticas, ações antrópicas e presença de patógenos

que afetaram tais populações (HAYES et al., 2010). Das 6.260 espécies de anfíbios conhecidas até o momento, quase um terço (32,4%) estão ameaçadas ou extintas, totalizando 2.030 (IUCN, 2016).

Outros fatores como a perda do habitat e a fragmentação que conduzem ao isolamento da população, levando ao acasalamento consanguíneo e aos efeitos de borda, também influenciam nesse declínio (KATS; FERRER, 2003).

O declínio populacional de anfíbios causa um desequilíbrio nos níveis tróficos podendo acarretar prejuízos quantitativos e qualitativos na agricultura e aumento de algumas doenças humanas como a malária, a dengue e a febre amarela, uma vez que a alimentação básica dos anuros são insetos, muitos deles vetores e hospedeiros (PASCUAL; GUERRERO, 2008). Uma análise estomacal feita em rã-touro, registrou 86,20% de uma dieta rica em invertebrados como: Aracnídeos, *Mollusca*, *Myriapoda*, Anelídeos, Crustácea e *Insecta* (LEIVAS et al., 2012) e em rã-manteiga (*Leptodactylus latrans*) constatarem um domínio numérico de representantes da Classe *Insecta* (MAIA, 2008).

A perda da biodiversidade de anuros poderia acarretar, também, em um prejuízo para a descoberta e a fabricação de novos medicamentos (CAMARGO, 2005; PUKALA et al., 2006), uma vez que os anuros apresentam substâncias farmacologicamente ativas em sua pele com funções principais de protegê-los contra infecções por microrganismos e, também, como mecanismo de defesa contra predadores (BERNARDE; SANTOS, 2009). Algumas dessas substâncias possuem atividade antiviral e são descritas como inibidoras dos vírus da herpes e HIV (VANCOMPERNOLLE et al., 2005). Podem também servir como antibióticos, antifúngicos (ULVATNE, 2003) e até como analgésicos (BOSMANS et al., 2004).

A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é originária do centro e do leste da América do Norte e é a maior espécie de anfíbio anuro daquela região (WANG; LI, 2009). Inicialmente classificada como *Rana catesbeiana* apenas recentemente foi reclassificada como *Lithobates catesbeianus* (FROST et al., 2006).

O Brasil foi um dos pioneiros na produção e comercialização em larga escala da rã-touro para consumo humano (SCHLOEGEL et al., 2010). A criação em cativeiro foi introduzida em 1935, no Estado do Rio de Janeiro, quando foram trazidos os primeiros exemplares da espécie. A rã-touro adaptou-se bem às condições climáticas brasileiras, possuindo alta prolificidade e rápido crescimento, tendo maior

desempenho em cativeiro que outras espécies de rãs nativas como a *Leptodactylus latrans* e *Leptodactylus labyrinthicus* (FIGUEIREDO, 2010; GIOVANELLI et al., 2008).

Em regiões tropicais onde o clima é sazonal, a atividade reprodutiva é associada ao período úmido, com maior pluviosidade (HOOGMOED; GORZULA, 1979). Outro fator climático, como o fotoperíodo, também apresenta grande influência na reprodução da rã touro (RIBEIRO FILHO et al., 1998). Quando observadas rãs touro criadas em cativeiro, há um aumento na frequência de exemplares em maturação reprodutiva avançada no período de novembro a janeiro, coincidindo com o período de fotoperíodo longo e temperatura em ascensão (COSTA, 1992).

Os testículos da rã-touro localizam-se na cavidade celomática, próximos aos rins e são descritos como órgãos pares, arredondados, compactos, geralmente amarelados, esbranquiçados ou branco-leitosos e envoltos por uma camada de tecido conjuntivo fibroso chamada túnica albugínea (LOFTS, 1974; COSTA, 1992; OLIVEIRA et al., 2007). Histologicamente o testículo dos anuros é dividido em compartimentos tubular e intertubular. O compartimento tubular tem a função espermatogênica e é formado por um conjunto de túbulos com membrana basal acelular associada a células mioides contendo no seu interior cistos, ou agrupamentos de células germinativas, envoltas por células de Sertoli (PUDNEY, 1993; SANTOS et al., 2006). Já o compartimento intertubular ou intersticial tem a função esteroidogênica, é bem vascularizado, sendo constituído por células de Leydig (células esteroidogênicas), macrófagos, mastócitos e componentes do tecido conjuntivo (PIERANTONI, 1999; KOULISH et al., 2002).

Analisando a influência dos fatores ambientais sobre o ciclo reprodutivo de rãs touro, Gomes et al. (2012) observaram diferença significativa no Índice Gonadossomático (IGS) entre as diferentes estações do ano, nesse sentido, os testículos apresentam alterações morfométricas de acordo com o período reprodutivo e também fatores abióticos (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Segundo Huang et al. (1997), o tempo de duração das distintas etapas do ciclo reprodutivo é principalmente dependente da temperatura ambiente, e as etapas do ciclo são mais curtas à medida que a temperatura aumenta.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

O presente estudo foi realizado com o objetivo de analisar o desenvolvimento testicular e parâmetros reprodutivos da rã- touro, em ambiente controlado, com idades entre 120 e 246 dias.

1.2 Objetivos Específicos

- Acompanhamento do desenvolvimento biométrico do comprimento e pesos corporal, testiculares, além dos pesos dos corpos adiposos e do fígado.
- Acompanhamento do desenvolvimento dos índices: gonadossomático, adipossomático e hepatossomático.
- Acompanhamento do desenvolvimento testicular a partir da descrição dos arranjos celulares dos túbulos seminíferos, bem como a proporção das células germinativas e a proporção do compartimento intertubular em diferentes estágios.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Entre os vertebrados terrestres, os anfíbios posicionam-se na base da evolução para o meio terrestre. São considerados animais intermediários entre a forma de vida aquática e a terrestre (LOFTS, 1984; DUELLMAN; TRUEB, 1986). Os anuros pertencem à classe dos anfíbios e são elementos importantes nas teias ecológicas atuando como presas ou predadores. Enquanto predadores agem como controladores de insetos e pequenos vertebrados, e por serem sensíveis ao desequilíbrio ecológico, são considerados indicadores biológicos e ambientais (STEBBINS; COHEN, 1995). Apresentam ciclo de vida complexo sendo uma das fases aquática (fase larval) e a outra terrestre (WASSERSUG, 1975).

Ao sair do ambiente aquático para o terrestre, vários anfíbios precisam passar por uma série de mudanças pós-embrionária envolvendo transformações estruturais, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais. Essas alterações são denominadas de metamorfose (DUELLMAN; TRUEB, 1986).

Sendo considerados os vertebrados terrestres mais ameaçados de extinção, têm como fatores a perda do habitat e a fragmentação que conduz ao isolamento da população, levando ao acasalamento consanguíneo e aos efeitos de borda (KATS; FERRER, 2003).

O declínio populacional de anfíbios foi o primeiro reconhecido como fenômeno mundial no início da década de 1990 (WAKE; VREDENBURG, 2008), tendo aumentado consideravelmente em 2010, devido a um sinergismo de fatores, tais como mudanças climáticas, ações antrópicas e presença de patógenos que afetaram tais populações (HAYES et al., 2010). Das 6.260 espécies de anfíbios conhecidas até o momento, quase um terço (32,4%) estão ameaçadas ou extintas, totalizando 2.030 (IUCN, 2016).

A perda de habitat tem um efeito direto nas populações de anuros, uma vez que isso pode afetar mais fortemente as espécies com ciclo de vida larval aquáticas, impactando diretamente no tamanho da população, estrutura e distribuição em uma única geração (IUCN, 2003).

A fuga ou introdução intencional desses animais de criadouros na natureza, estabelecendo-se como uma espécie invasora, tem provocado grande impacto sobre as populações de anfíbios anuros nativos (SCHLOEGEL et al., 2009). A rã-touro

geralmente ocupa corpos d'água onde se reproduz e prolifera, apresentando um período reprodutivo anual de setembro a março. Nessa fase, os machos apresentam comportamento territorialista agressivo (GOVINDARAJULU et al., 2006).

As alterações dos fatores abióticos como: temperaturas, fotoperíodo e precipitação podem representar impacto no sucesso reprodutivo dos anuros, uma vez que, sua fisiologia é bastante exigente em condições abióticas específicas para a reprodução adequada (HAYES et al., 2010).

A diferença no tempo de desenvolvimento desses animais nas diversas regiões climáticas é atribuída principalmente à temperatura média de cada região (LIMA et al., 1992).

Em pesquisas realizadas com consumo de alimento e ganho de peso diários, foi analisado o desempenho de rã-touro com peso médio inicial de 37g, em três diferentes temperaturas (20°C, 25°C e 30°C). Os autores concluíram que o melhor crescimento das rãs ocorreu na faixa de temperatura entre 25°C e 30°C (BRAGA; LIMA, 2001).

Padrões anormais de gametogênese em anfíbios podem resultar em um mau desenvolvimento do indivíduo e prejudicar a reprodução. Um dos fatores exógenos que pode levar a esta anormalidade são os pesticidas agrícolas, os quais contribuem globalmente para o declínio populacional dos anfíbios (BRUHL et al., 2013; HAYES et al., 2003; MANN et al., 2009).

O tecido hepático desempenha várias funções durante o período espermatogênico como formação e armazenamento de lipídios, hidratos de carbono e produção de esteróides vinculados às proteínas, ambos utilizados para a atividade metabólica dos testículos durante a ação dos hormônios esteróides (KAO et al., 1993). Em rã-touro há uma redução do IHS (Índice Hepatossomático) no período de julho e agosto – período fora da época reprodutiva – (GOMES et al., 2012). A redução desse índice também foi observada em *Rana ridibunda* (LOUMBOURDIS; KYRIAKOPOULOU, 1991) e em *Rana rugulosa* (KAO et al., 1993).

O corpo adiposo constitui uma característica estrutural comum aos anfíbios (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Possuem prolongamentos digitiformes e estão localizados na parte cranial dos testículos, geralmente possuem coloração amarelada e estão aderidos ao mesórquio e são ricos em colesterol e triglicerídeos servindo de reserva nutricional para as gônadas (BROWM, 1964; FITZPATRICK, 1976). São

também fontes de energia metabólica que são utilizadas para manter as atividades testiculares em taxas normais (PASANEN; KOSKELA, 1974; FROST, 1983; COSTA, 1992). A perda dessa fonte de energia pode prejudicar o processo reprodutivo, levando à regressão testicular, como foi relatada em *Rana esculenta* (CHIEFFI, 1975; RASTOGI, 1986). Em *Rana perezi* foram observadas variações sazonais no peso deste órgão, sendo que os valores mais elevados eram relatados entre janeiro e abril (DELGADO et. al, 1989). Em rã touro o IAS (Índice Adipossomático) apresentou uma diminuição em seu percentual entre setembro e fevereiro, com um ponto mínimo em janeiro (COSTA 1992; GOMES et. al., 2012). Em *Rana rugulosa* o IAS foi superior em julho e agosto (KAO et. al., 1993).

Em regiões tropicais onde o clima é sazonal, a atividade reprodutiva é associada ao período úmido, com maior pluviosidade (HOOGMOED; GORZULA, 1979; AICHINGER 1987). Já em regiões com estação seca bem definida os machos de muitas espécies não evidenciam seus caracteres sexuais secundários (NOBLE, 1931, *apud* SALTHER; MECHAM, 1974).

Estudos realizados em anuros sugerem que o controle da espermatogênese seja mantido pela interação entre ritmos endógenos e fatores externos (PANIAGUA et al., 1990 SASSO-CERRI et al., 2004). Analisando fatores ambientais sobre o ciclo reprodutivo de rãs touro, observou-se uma diferença significativa no IGS (Índice Gonadossomático) nas diferentes estações do ano (GOMES et al., 2012).

Os testículos dos anuros localizam-se na cavidade celomática, próximos aos rins, e são descritos como órgãos pares, arredondados, compactos, geralmente amarelados, esbranquiçados ou branco-leitosos e envoltos por uma camada de tecido conjuntivo fibroso que é a túnica albugínea (LOFTS, 1974; COSTA, 1992; OLIVEIRA et al., 2002). Possivelmente, apresentam variações anatômicas na forma e no peso de acordo com o período reprodutivo (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Em machos de anuros são encontrados órgãos de Bidder, que são estruturas vestigiais e que, dependendo das variações hormonais, podem transformar-se em ovário ou permanecerem como não funcionais (OLIVEIRA et al., 2007).

No interior dos testículos encontra-se um sistema de ductos coletores que parecem originar-se nos lóbulos seminíferos e, depois, convergem a ductos coletores comuns que, no final, formam os ductos eferentes desembocando nos rins (COSTA et al., 1998). Nos animais adultos estes ductos conduzem os espermatozóides até a

pelve renal, que posteriormente são transportados para a bexiga urinária, assim como a urina, por meio do ureter. No momento do acasalamento os espermatozóides são eliminados através da cloaca (SPRANDO; RUSSELL, 1988; VIEIRA, 1993; PIERANTONI, 1998).

As rãs apresentam os testículos organizados em dois compartimentos, o tubular e o intertubular ou intersticial. O compartimento tubular é formado por lóbulos seminíferos convolutos, onde se encontra o epitélio seminífero que é composto pelas células de Sertoli e pelas células germinativas, que estão em várias fases de desenvolvimento em cistos epiteliais. Na parede tubular abaixo do epitélio, localizam-se a membrana basal e as células peritubulares mióides. O compartimento intertubular ou intersticial é bem vascularizado e constituído por células de Leydig (células esteroidogênicas), macrófagos, mastócitos e componentes do tecido conjuntivo. Semelhantemente aos demais vertebrados, os testículos dos anuros exercem as funções espermatogênicas e esteroidogênica (BILLARD, 1990; PIERANTONI, 1998; KOULISH et al., 2002).

Baseado na distribuição topográfica das células germinativas, a organização testicular pode ser diferente entre as diversas espécies de anfíbios (GRIER, 1993). Em rã-touro foi relatado por Assis (2011) a não existência de regionalização do parênquima testicular quanto à atividade espermatogênica, sendo esta ativa em todo o testículo.

A divisão da espermatogônia-tronco dá origem ao processo espermatogênico que é complexo, cíclico, organizado e coordenado, resultando em células formadoras de gametas e células comprometidas com a manutenção celular (FRANÇA; RUSSEL, 1998; RUSSEL et al., 1990; NÓBREGA et al., 2009). Nos anfíbios e peixes teleósteos, a espermatogênese é cística, ou seja, a organização do processo espermatogênico ocorre em cistos no interior dos quais as células germinativas encontram-se no mesmo estágio de desenvolvimento. Estes cistos são originados quando as células de Sertoli envolvem as células germinativas no princípio do processo espermatogênico, permitindo que estas multipliquem-se e desenvolvam-se sincronicamente, constituindo uma unidade clonal até a formação dos espermatozoides (GRIER, 1993; PUDNEY, 1993; SCHULZ et al., 2010). As espermatogônias são as primeiras células da linhagem espermatogênica e em rã-touro foram observados dois tipos: espermatogônia primária, que é a maior célula da linhagem, ocorrendo sempre isolada

no interior do cisto, com um núcleo grande e cromatina condensada; espermatogônia secundária, que é menor que a espermatogônia primária, apresentando-se em um grupo de duas ou mais dentro dos cistos, com um núcleo grande e basófilo e cromatina condensada, o que lhe confere um aspecto granuloso (COSTA, 1998; LOFTS, 1974). Carlos e Matta (2009) relataram que, em rã-touro, após oito divisões mitóticas, as espermatogônias secundárias tornam-se espermatócitos primários.

Os espermatócitos primários são menores que as espermatogônias secundárias e apresentam um núcleo esférico basófilo. Essas células dão origem aos espermatócitos secundários que são menores que suas antecessoras e apresentam um núcleo com a cromatina condensada formando um arranjo em círculo incompleto, o que deixa a região central clara, conferindo-lhe a forma de “U” (COSTA, 1998; HERMOSILLA, 1983; LOFTS, 1974).

As espermatídes arredondadas são células de núcleo esférico, compacto e basófilo. Sua origem advém da divisão dos espermatócitos secundários. As espermatídes alongadas são resultados da divisão das espermatídes arredondadas e passam por uma transformação nuclear, tornando-se alongadas e organizadas em feixes (COSTA, 1998; HERMOSILLA, 1983; SANTOS, 2006).

Os espermatozóides resultam do processo de espermiogênese, com a transformação das espermatídes alongadas. Apresentam-se com o núcleo bastante alongado, tendo a forma de bastonete. São fortemente basófilos e acumulam-se no lúmen dos túbulos seminíferos, onde são canalizados para os túbulos coletores e deixam os testículos em direção aos rins, via mesórquio (COSTA, 1998; HERMOSILLA et al., 1983).

Costa (1992), estudando o desenvolvimento gonadal de machos de rã-touro, definiu cinco estágios de maturação a partir das análises biométricas e de microscopia testicular, sendo: estágio 1 (juvenil), túbulos seminíferos contendo principalmente espermatogônias primárias; estágio 2 (início de maturação), os túbulos seminíferos apresentam lúmen mais dilatado e com muitos cistos de espermatogônias secundárias além de espermatócitos nas fases 1 e 2; estágio 3 (maturação intermediária), os túbulos seminíferos apresentam espermatogônias em número reduzido e com um aumento na quantidade de cistos, contendo espermatócitos secundários e havendo também espermatídes em pequenas quantidades e espermatozóides livres no interior dos túbulos seminíferos; estágio 4 (maturação

avançada), os lóbulos seminíferos encontram-se com o lúmen amplo e povoado por espermatozóides, os cistos de espermatogônias apresentam-se em pequena quantidade e, entre eles, predominam espermatócitos secundários e espermatídes; estágio 5 (esgotado), os túbulos seminíferos apresentam diâmetro maior e continham em seu lúmen espermatozóides residuais, apresentando ainda, alguns cistos em diferentes fases de desenvolvimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e acomodação dos animais

O experimento foi realizado no Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa a partir da autorização do Comitê de Ética de Uso de Animal de Produção da UFV (CEUAP) cujo protocolo foi: nº 040/2015.

Foram utilizadas rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) com idade de 120 dias a contar da desova (trinta dias pós-metamórficos), acondicionadas em uma sala contendo dez baias suspensas climatizadas, com população de trinta animais por baia. A área total de cada baia foi de 1,54m², contendo canaleta com água e comedouro, com uma área livre de 0,945m² entre eles. A temperatura das baias foi mantida a 27±1°C, mediante uso de sistema de aquecimento elétrico sob o piso, controlado por termostato. Foi utilizado fotoperíodo artificial com a utilização de lâmpadas de luz branca (100 Watts), controladas por temporizador para obtenção de claro/escuro 12:12. A limpeza das baias foi feita diariamente com a retirada de sobra de ração, limpeza da canaleta e troca total da água. As rãs foram alimentadas duas vezes ao dia “ad libitum”, utilizando ração extrusada comercial com 44g de proteína bruta (PB) e 1% de larva de *Musca domestica* (LINNAEUS, 1758) como atrativo.

3.2 Coleta das amostras

Quatro rãs-touro machos foram coletadas aleatoriamente a cada quatro dias e pesadas em balança de precisão de 0,001g. Em seguida foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax – 0,3 ml/100g de animal; Cristália), sacrificados e fotografados para posterior aferição do comprimento rosto-cloacal (CRC) no programa ImageJ. Foram feitas 27 coletas, totalizando 108 animais. As rãs encontravam-se com idade de 120 a 246 dias de vida.

As gônadas foram retiradas e pesadas em balança de precisão de 0,0001g. Os corpos adiposos e o fígado foram retirados e pesados em balança de precisão de 0,001g para cálculo do índice gonadossomático $IGS = \left(\frac{PG}{PC} \times 100\right)$, lipossomático $LAS = \left(\frac{PA}{PC} \times 100\right)$ e hepatossomático $IHS = \left(\frac{PF}{PC} \times 100\right)$, respectivamente, onde PC = Peso do

corpo, PA = Peso total do corpo gorduroso, PF = Peso total do fígado e PG = Peso total das gônadas.

As gônadas foram fixadas imediatamente, em solução de Karnovsky e mantidas em temperatura refrigerada de 4°C, por 24 horas e, em seguida, conservadas em álcool 70% em temperatura ambiente.

3.2.1 Processamentos histológicos

O processamento histológico foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV.

Uma das gônadas, em cada animal, foi escolhida aleatoriamente e desidratada em série de concentrações crescentes de álcoois (70°, 80°, 90° e 100° GL), permanecendo meia hora em cada meio, com posterior infiltração em dois banhos de resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin®, Leica) e incluídos, no mesmo tipo de resina, com adição de endurecedor. Foram realizados cortes histológicos em micrótomo Leica RM 2255, utilizando navalha de vidro e obtendo-se cortes de 3µm. Os cortes foram corados com solução de azul de toluidina- borato de sódio 1%.

3.2.2 Coleta e análise dos dados

Foram realizadas fotos no Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, utilizando microscópio Olympus BX53 com câmera acoplada Olympus DP73.

Foi realizada a proporção volumétrica do parênquima testicular, a partir da mensuração em vinte campos aleatórios de fotografias em aumento de 200x e, através do programa ImageJ, onde foram padronizados retículos com 266 intersecções sobre cada imagem, perfazendo um total de 5.320 pontos contabilizados por animal. No compartimento tubular foram considerados cistos, núcleo de células de Sertoli, túnica própria e lúmen.

Foi ainda analisada a proporção volumétrica dos cistos em seus diferentes estádios de desenvolvimentos. Para tal foram contabilizados 10 campos aleatórios de fotografias em aumento de 200x, através do programa ImageJ, onde foram padronizados retículos com 199 intersecções sobre cada imagem, perfazendo um

total de 1.920 pontos contabilizados para cada animal. Os cistos foram classificados de acordo com o tipo de célula germinativa e assim foram considerados seis tipos de cistos, contendo: espermatogônias A; espermatogônias B; espermatócitos primários; espermatócitos secundários; espermatídes arredondadas e espermatídes alongadas. As células foram caracterizadas conforme sua morfologia específica.

Os dados foram submetidos a testes para verificar a normalidade e homocedasticidade e, após esta verificação, foram submetidos à regressão polinomial, calculados médias, desvios padrão e o intervalo de confiança considerando $p < 0,05$, por meio do *software* STATISTICA 7 (STATSOFT, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do estágio de desenvolvimento gonadal

A partir da proporção volumétrica dos diferentes tipos de cistos nos testículos (Figura 2), foram definidos os estágios de desenvolvimento testicular. Essa classificação foi baseada na idade dos animais e nas características histológicas dos testículos, sendo considerado:

- Início da maturação, animais com 120 dias de idade, com peso médio corporal de 62,58g. Os cistos continham em média, maior quantidade de espermatogônia B, seguido de espermatócitos primários e espermatogônia A;
- Transição do início de maturação para a maturação intermediária, animais com idade de 148, com peso médio de 57,43g. Os cistos encontrados em maior proporção foram de espermatogônia B, seguido de espermatócito primário e espermatogônia A;
- Transição da maturação intermediária para maturação avançada, animais com 196 dias de idade e peso corporal médio de 123,40g. Os cistos encontrados em maior proporção foram de espermatogônia B, seguido de espermatócito primário e espermátide alongada;
- Maturação avançada, animais com 246 dias de idade e peso corporal médio de 220,10g. Os cistos encontrados em maior proporção foram de espermatócito primário, seguido de espermatogônia B e espermátide alongada.

Uma vez que o desenvolvimento morfológico desses animais é diretamente afetado pela temperatura do meio em que vivem, o nosso experimento foi realizado em ambiente abiótico controlado para um melhor desenvolvimento corpóreo dos animais a serem estudados. Para Braga e Lima (2001), o melhor crescimento das rãs-touro ocorreu na faixa de temperatura entre 25°C e 30°C. A média dessa temperatura foi mantida durante todo o período do nosso experimento.

Quando Costa et al. (1998) realizaram o estudo do desenvolvimento gonadal de machos de rã-touro, em ambiente abiótico não controlado, definiram cinco estágios de maturação a partir das análises biométricas e microscópicas dos testículos, sendo: (1) juvenil, peso médio dos animais era de 17,92g e os túbulos seminíferos estavam ocupados, principalmente, por espermatogônias primárias; (2) início de maturação,

animais com peso médio de 66,80g e com muitos cistos de espermatogônias secundárias e apresentavam também, espermatócitos na fase 1 e 2; (3) maturação intermediária, as espermatogônias encontravam-se em número reduzido e houve um aumento em número de espermatócito secundário e a ocorrência de espermátides, bem como pequenas quantidades de espermatozoide livres no interior dos túbulos seminíferos que se encontravam mais abertos. O peso dos animais nessa fase era de 128,30g; (4) maturação avançada, os túbulos encontravam-se com pequenas quantidades de cistos de espermatogônias e com predominância de espermatócitos secundários e espermátides. O peso médio dos animais nesta fase era de 240,42g; e (5) esgotado, os túbulos continham alguns cistos em várias fases de desenvolvimento nas paredes internas.

Não encontramos o primeiro estágio (juvenil) descrito por Costa et al. (1998), pois, diferente do visualizado pelo autor, nesse experimento o estágio de início de maturação, os testículos já estavam ocupados por um percentual maior de cistos, contendo espermatologia B, e os animais encontravam-se com uma média de peso superior ao relatado pelos autores. No nosso experimento, esse estágio (início de maturação) assemelhou-se ao estágio 2 (início de maturação) descrita por Costa et al. (1998), uma vez que, as médias de peso e porcentagens dos tipos de células encontradas nos cistos eram basicamente os mesmos. Já na maturação intermediária e maturação avançada os dados desta pesquisa não foram semelhantes aos descritos por Costa em seu trabalho. Isso, provavelmente, deve-se ao fato do controle abiótico ter sido aplicado em todos os estágios do nosso experimento. Segundo Lima et al. (1992), a diferença no tempo de desenvolvimento desses animais é atribuída, principalmente, à temperatura média onde eles se encontram.

No último estágio da nossa pesquisa (maturação avançada), a maioria dos animais apresentavam os caracteres secundários (papo amarelado, calo nupcial e vocalização constante) bem evidenciados. Apresentavam também bastante espermatozoides livres no lúmen, o que, juntamente com os caracteres secundários, indica que os animais já estavam aptos para o acasalamento.

Não foi visualizado, neste trabalho, o último estágio (esgotado) descrito por Costa et al. (1998). Isso provavelmente deve-se ao fato que os animais analisados já estavam aptos para o acasalamento, mas ainda não tinha ocorrido.

4.2 Descrições biométricas dos animais em diferentes fases de desenvolvimento gonadal

No início da maturação, os animais apresentavam média de pesos corpóreo, testiculares, do corpo adiposo e do fígado de 62,58g, 0,00113g, 2,43g, e 2,8g, respectivamente. O comprimento médio nessa fase foi de 8,62cm.

Na fase de transição do início de maturação para a maturação intermediária, os animais apresentaram média de pesos corpóreo, testiculares, corpo adiposo e do fígado de, 57,43g, 0,017g, 2,59g e 2,84g, respectivamente, e tinham o comprimento médio de 8,85cm.

Na fase de transição da maturação intermediária para a maturação avançada a média de peso corpóreo, testiculares, do corpo adiposo e do fígado foi de 123,40g, 0,049g, 5,58g e 5,49g, respectivamente. A média do comprimento nessa fase foi de 11,33cm. Já na fase final de maturação avançada, a média de peso corpóreo, testiculares, corpo adiposo e do fígado foi de 220,1g, 0,141g, 16,23g e 13,65g, respectivamente. A média de comprimento para os animais nessa fase foi de 13,52cm.

Os dados acima representados demonstram que, o ambiente não interferiu no desenvolvimento dos animais. Isso indica que tanto os fatores abióticos como as técnicas de manejos utilizadas propiciaram boas condições para o bom desenvolvimento dos animais (ORTON et al., 2014).

O fator de condição (K) é um auxílio para a determinação do estado de desenvolvimento do animal e das gônadas. O comprimento e o peso do corpo, pesos do corpo adiposo, do fígado e das gônadas, são parâmetros que estão relacionados ao desenvolvimento gonadal do animal e seu estágio de maturação (MOZSÁR, et al., 2015).

Foi observada correlação positiva entre os índices gonadossomática, hepatossomático e biométricos. Desta forma, o desenvolvimento reprodutivo dos animais ocorre concomitantemente com o desenvolvimento corpóreo e dos órgãos relacionados à produção de hormônios gonadotróficos. O crescimento entre esses parâmetros foi linear até o período de 246 dias (Gráfico 2).

Pesquisas realizadas sobre o desenvolvimento gonadal de rã-touro em cativeiro e ambiente controlado, relatam que a primeira maturação gonadal dos

machos inicia-se com o comprimento de 8,09cm e peso de 45g. E com peso médio de 240,42g podem ser considerados reprodutores em potencial (LIMA et al., 1998).

Assis (2011), analisando a estereologia e funcionalidade dos testículos de rã-touro sexualmente madura, encontrou peso médio dos testículos de 0,3g, o que foi superior ao encontrado em nosso trabalho na fase final da maturação avançada. Isso provavelmente deve-se à idade e ao peso dos animais analisados.

4.3 Relações dos índices gonadossomático, adipossomático e hepatossomático nas diferentes fases de desenvolvimento gonadal

No início da maturação o valor médio do índice gonadossomático (IGS) encontrado foi de 0,02%, já na fase de transição para a maturação intermediária, o índice médio foi de 0,03%; o valor médio na transição entre os estágios de maturação intermediária e avançada foi de 0,04%; e na fase final da maturação avançada a média foi de 0,06%.

A variação crescente dos IGS demonstra que os animais estavam amadurecendo sexualmente, uma vez que este índice está relacionado com o desenvolvimento sexual do animal (Gráfico 4), seguindo a mesma tendência de outros vertebrados como peixes (WU et al., 2017). Os resultados encontrados por Costa et al. (1998) assemelham-se aos nossos dados somente em um estágio de desenvolvimento que é o descrito pelo autor como início de maturação, onde o IGS encontrado foi de 0,04%. Em nossos resultados, esse valor encontrado pelo autor foi obtido na fase de transição entre maturação intermediária e maturação avançada. Em estudos com ciclo reprodutivo de rã-touro os resultados encontrados de IGS nos diferentes estágios foram de 0,04% (estágio 1), 0,049% (estágio 2), 0,08% (estágio 3) e 0,12% (estágio 4) (COSTA et al., 1998). Em estudo realizado por Assis (2011), com rãs-touro adultas, o IGS médio foi de 0,094%.

O índice adipossomático (IAS) apresentou valores médios de 3,84, 4,50, 4,48 e 7,28 para as fases de início de maturação, transição do início de maturação para maturação intermediária, transição entre maturação intermediária para avançada e final da maturação avançada, respectivamente. O corpo adiposo é utilizado como fonte de energia em diferentes situações ambientais, sendo utilizado principalmente durante o período reprodutivo, onde os animais o utilizam para a produção dos

hormônios gonadotróficos, e também como reserva de energia, pois, na fase de acasalamento os animais param de se alimentar. Os resultados encontrados demonstram que os animais obtiveram o IAS crescente (Gráfico 4). Esse crescimento acentuado na fase final de maturação avançada ocorre devido ao fato do animal estar-se preparando para o ato do acasalamento. Costa et al. (1998) relataram que valores superiores para índice lipossomático aos noventa dias podem estar relacionados ao acúmulo de energia como preparatório para a reprodução.

Estudos com rãs-touro mostraram diminuição no percentual ILS entre setembro e fevereiro, com um ponto mínimo em janeiro (COSTA 1992; GOMES et al., 2012). Em *Rana rugulosa* o ILS foi superior em julho e agosto (KAO et al., 1993). Esses dados relatados pelos autores acima citados corroboram com os resultados encontrados em nosso trabalho, o que indica que os animais estavam-se preparando fisiologicamente para a reprodução.

Nos animais do presente experimento, o índice hepatossomático (IHS) apresentou médias de 4,46, 4,99, 4,41 e 6,29 para o início de maturação, transição do início de maturação para intermediária, transição da maturação intermediária para a avançada e final de maturação avançada, respectivamente. O índice decresce até os animais atingirem 190 dias de vida (maturação intermediária) e posteriormente ocorre um crescimento até a fase final de desenvolvimento aos 246 dias (Figura 7). Esse declínio ocorre devido à alta atividade hepática na produção hormonal, uma vez que o fígado desempenha papel fundamental para a produção de hormônios que irão atuar no desenvolvimento das células da linhagem espermatogênica.

Kao et al. (1993) relataram que o tecido hepático desempenha várias funções durante o período espermatogênico, como formação e armazenamento de lipídios e hidratos de carbono e produção de esteróides vinculados às proteínas, ambos utilizados para a atividade metabólica dos testículos durante a degradação dos hormônios esteróides. Durante o inverno ocorre uma redução do IHS em rã-touro (GOMES et al., 2012), *Rana ridibunda* (LOUMBOURDIS; KYRIAKOPOULOU, 1991) e em *Rana rugulosa* (KAO; ALEXANDER; YANG et al., 1993). Os resultados dos autores acima, vêm confirmar que nossos resultados estão coerentes com o que já foi realizado em pesquisas anteriores.

4.4 Descrição do conteúdo testicular em diferentes fases de desenvolvimento corpóreo e gonadal

As proporções médias dos cistos, lúmen, túnica própria, intertúbulo e núcleo da célula de Sertoli (Gráfico 3) no início de maturação foram de 79,02%, 1,34%, 5,54%, 7,28% e 6,83%, respectivamente. Nesse estágio, os cistos encontram-se em maior proporcionalidade devido à proliferação celular, ocupando todo o interior do lóbulo, isso se confirma pela baixa percentagem do lúmen (Gráfico 3).

Na fase de transição entre o início de maturação e maturação intermediária, os componentes testiculares apresentaram proporção média de 79,10%, 4,45%, 5,48%, 5,88% e 5,08%, respectivamente para cistos, lúmen, túnica própria, intertúbulo e núcleo de célula de Sertoli (Gráfico 3). Os cistos nessa fase continuam ocupando todo espaço do lóbulo, como na fase anterior. A diferença encontrada é a porcentagem de lúmen, que aumentou 332,08%, o que nos indica a ocorrência de mudança de estágio celular.

Para a fase de transição entre a maturação intermediária e a maturação avançada as proporções médias dos cistos, lúmen, túnica própria, intertúbulo e núcleo da célula de Sertoli (Figura 1) foram de 77,01%, 8,90%, 8,06%, 4,11% e 1,93%, respectivamente. Os lóbulos seminíferos continuam sendo ocupados pelos cistos quase em sua totalidade. Nessa fase, o aumento do lúmen em relação à fase anterior foi de 200%, significando que possivelmente os animais encontravam-se no início de produção e liberação de espermatozoide (Gráfico 3).

No final de maturação avançada as porcentagens médias dos cistos, lúmen, túnica própria, intertúbulo e núcleo da célula de Sertoli (Figura 1) foram de 53,85%, 30,72%, 5,79%, 7,58% e 2,05%, respectivamente (Gráfico 3). A porcentagem média de cistos e de núcleo das células de Sertoli diminuíram com o decorrer do experimento. Isso se deve ao fato de que, no interior dos lóbulos seminíferos, outro componente testicular, como o lúmen, teve um acréscimo constante em seu percentual até o final do experimento. Já a porcentagem para túnica própria e intertúbulo manteve-se basicamente constante em todas as fases da pesquisa. O percentual médio do lúmen apresentou aumento crescente, principalmente após a fase de maturação intermediária. Isso indica que os testículos estavam em processo

de maturação, uma vez que os cistos contendo células espermatogênicas ao final do processo rompem-se para liberar os espermatozoides no lúmen.

Costa et al. (1998), estudando ciclo reprodutivo de rã-touro criada em cativeiro, sem controle dos fatores abióticos, determinaram que a fase que marca o início de maturação é a presença dos lóbulos seminíferos com lúmen abertos, com presença de muitos cistos de espermatogônias secundárias em suas paredes, além de espermatócitos nas fases 1 e 2.

Assis (2011), ao estudar a estereologia e funcionalidade dos testículos de rã-touro sexualmente maduros, relatou que 86% do parênquima testicular era ocupado pelos túbulos seminíferos. No nosso experimento esse resultado foi diferente ao relatado pelo autor, uma vez que, em todas as fases, esse índice foi superior a 92,41%.

4.5 Alterações celulares ocorridas durante as fases de desenvolvimento gonadal

Em análise da histologia dos animais do presente experimento, encontramos as seguintes características: as espermatogônias são as maiores células da linhagem espermatogênica, contêm o citoplasma hialino e apresentam um núcleo grande e menos corado em comparação às outras células, isso ocorre devido ao fato da cromatina apresentar-se pouco condensada. As espermatogônias encontram-se isoladas na periferia dos lóbulos e próximas ao epitélio seminífero.

As espermatogônias B são menores que as espermatogônias A, e cada cisto contém duas ou mais células. Possuem o núcleo grande e com aspecto granulado e seu citoplasma é menor em relação ao da espermatogônia A. Os espermatócitos primários têm origem da divisão mitótica das espermatogônias B e mostram-se com núcleo bem evidente e corado, e com citoplasma reduzido comparado ao das células que os antecederam.

Os espermatócitos secundários são oriundos dos espermatócitos primários por meio do processo de meiose. Seu diâmetro é menor que as células que os antecederam e possuem um núcleo com cromatina condensada e basófila. As espermátides arredondadas são menores que os espermatócitos secundários e possuem o núcleo intensamente corado, encontram-se dispersas no interior do lóbulo.

As espermatídes alongadas possuem núcleo condensado e alongado, ocupando quase todo o hialoplasma. Encontram-se posicionadas em grupos formando feixes em direção ao lúmen (Figura 2).

Essas descrições estão de acordo com os relatados por Costa et al. (1998) e Santos (2006).

Na fase de início de maturação os animais apresentavam cistos contendo espermatogônias A, espermatogônias B, espermatócito primário, espermatócito secundário, espermatíde arredondada e espermatíde alongada nas proporções médias de 13,25%, 61,49%, 21,08%, 2,45%, 0,38% e 1,35%, respectivamente (Gráfico 1).

Observando os dados proporcionais dessa fase podemos afirmar que ocorre uma fase que antecede o início das coletas dos nossos dados aos 120 dias. Isso deve-se ao fato da presença de cistos contendo espermatogônias B estar em maior proporcionalidade que os cistos contendo espermatogônias A.

Segundo Costa et al. (1998), estudando o desenvolvimento gonadal de machos de rã-touro, foi definido o estágio 1 (juvenil) como sendo de animais com os lóbulos seminíferos ocupados, principalmente, por espermatogônias primárias.

Na fase de transição do início de maturação para maturação intermediária, as porcentagens médias obtidas foram de 6,96%, 64,26%, 24,61%, 2,59%, 0,05% e 1,54% de espermatogônia A, espermatogônia B, espermatócito primário, espermatócito secundário, espermatíde arredondada e espermatíde alongada, respectivamente (Gráfico 1). Estes dados coincidem com os relatados por Costa et al. (1998), que descrevam a fase 2 (início de maturação) como sendo a fase em que os cistos continham maior quantidade de espermatogônias secundárias e apresentavam também espermatócitos na fase 1 e 2.

Na fase de transição entre a maturação intermediária e maturação avançada, a média de proporção foi de 2,09%, 44,99%, 31,80%, 7,63%, 4,18% e 9,30% para espermatogônia A, espermatogônia B, espermatócito primário, espermatócito secundário, espermatíde arredondada e espermatíde alongada, respectivamente (Gráfico 1). Apesar de não ter sido quantificado, foram visualizados espermatozóides livres no lúmen dos lóbulos seminíferos, indicando que, nessa fase, os animais já estavam-se tornando sexualmente maduros. O que coincide com o relatado por Costa et al. (1998), que descreveu para o estágio 3 (maturação intermediária): cistos

contendo espermatogônias em número reduzido e aumento no número de espermatócitos secundários, bem como a ocorrência de espermátides e de pequenas quantidades de espermatozóides livres no interior dos túbulos seminíferos que se encontravam mais abertos.

Na fase final da maturação avançada, as proporções médias de espermatogônias A, espermatogônias B, espermatócito primário, espermatócitos secundários, espermátides arredondadas e espermátides alongadas foram de 3,14%, 27,45%, 35,53%, 7,95%, 4,04% e 21,89%, respectivamente (Gráfico 1). Nessa fase os animais apresentavam, visualmente, uma maior quantidade de espermatozoides livres no lúmen e as características fenotípicas reprodutivas eram bastante evidentes como, papo amarelo esverdeado e calo nupcial, caracterizando animais reprodutores em potencial.

Costa et al. (1998) relatam que, no estágio 4 (maturação avançada), os túbulos seminíferos estavam com o lúmen amplo e repletos de espermatozóides e que continham também, pequenas quantidades de cistos de espermatogônias e havia a predominância de espermatócitos secundários e espermátides.

As alterações ocorridas durante as fases de transição são caracterizadas pelo desenvolvimento das células da linhagem espermatogênica em relação ao início de maturação até a maturação intermediária. As proporções celulares indicam a alta atividade testicular, demonstrando a sequência contínua da formação de células.

CONCLUSÃO

- A fase determinada como início de maturação é quando a atividade das células testiculares encontram-se no começo de suas diferenciações, isso ocorre quando os animais encontram-se com peso médio de 62,58g e comprimento médio de 8,62cm e o término da maturação ocorre quando os animais apresentam peso e comprimento médio de 220,4g e 13,52cm, respectivamente.
- Os estágios de desenvolvimento testiculares ocorrem concomitantemente com o estágio dos animais. O desenvolvimento gonadal está relacionado com o estágio fisiológico reprodutivo.
- O ciclo espermatogênico de rãs-touro mantidas em ambiente controlado é cíclico e contínuo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AICHINGER, M. **Annual activity patterns of anurans in the seasonal neotropical environment.** *Oecologia*, 71: 583-592. 1987.
- ASSIS, L. H. C. **Análise estereológica e funcional do testículo de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) sexualmente maduras, com ênfase na cinética espermato gênica, proliferação e número de células de sertoli por cisto espermato gênico.** Belo Horizonte, MG: UFMG, 98p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- BRAGA L.G.T.; LIMA S. L. **Influência da Temperatura Ambiente no Desempenho da Rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) na Fase de Recria.** *Revista Brasileira de Bootecnia*. 30(6):1659-1663, 2001.
- BERNARDE, P. S.; SANTOS, R. A. **Utilização medicinal da secreção (“vacina-do-sapo”) do anfíbio kambô (*Phyllomedusa bicolor*) (Anura: Hylidae) por população não-indígena em Espigão do Oeste.** Rondônia, Brasil. *Revista Biotemas*, Acre, n. 22, p.1-8, 22 set. de 2009.
- BERTOLUCI, J. & HEYER, W. R. **Boracéia Update.** *Froglog Newsletter of The Iucn Ssc Daptf*, 14: 2-3, 1995.
- BILLARD, R. et al. **Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish.** *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 39, n. 1, p. 65-79, 1982.
- BOSMANS, F. et al. J. **The poison Dart frog’s batrachotoxin modulates Nav1.8.** *FEBS Letters*, v. 577, p. 245– 248. 2004.
- BROWM, G. W. Jr. **The metabolism of amphibia.** In: MOORE, J. A. (Ed.) *Physiology of the amphibia*. New York: Academic Press, 1-98. 1964.
- BRÜHL, Carsten A. et al. **Terrestrial pesticide exposure of amphibians: An underestimated cause of global decline?** *Scientific Reports*, v. 3, p. 1135, 2013.
- CAMARGO, Antonio Carlos Martins de. **Perspective for pharmaceutical innovation in Brazil-center for applied toxinology (CEPID-center for research, innovation and dissemination-FAPESP).** *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 11, n. 4, p. 384-390, 2005.
- CARLOS, J.; MATTA, S.L.P. (2009). **Microscopic morphology and testis morphometry of captivity-bred adult bullfrogs (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802).** *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52(6): 1461-1472.
- CHIEFFI, G. et al. **The function of fat bodies in relation to the hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis in the frog, *Rana esculenta*.** *Cell and tissue research*, v. 161, n. 2, p. 157-165, 1975.

COSTA, C.L.S. **Desenvolvimento do aparelho reprodutor e fatores associados ao ciclo reprodutivo da rã-touro (*Rana catesbeiana*), no sistema anfigranja**. Viçosa, MG: UFV, 98p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1992.

COSTA, CINIRO et al. **Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva**. Revista Brasileira de Zootecnia= Brazilian Journal of Animal Science, p. 642-650, 1998.

COSTA, CINIRO et al. **Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva**. Revista Brasileira de Zootecnia= Brazilian Journal of Animal Science, p. 651-657, 1998.

CULLEY JUNIOR, D.D. **Have we turned the corner on bullfrog culture?** Aquacul. Manage., 7(3): 20-24; 1981.

CRUMP, M. L.; HENSLEY, F. & CLARK, K. **Apparent declines of the Golden toad: underground or extinct?** Copeia, 629-640:1992.

DELGADO, M. J.; GUTIERREZ, P.; ALONSO-BEDATE, Mercedes. **Seasonal cycles in testicular activity in the frog, *Rana perezi***. General and comparative endocrinology, v. 73, n. 1, p. 1-11, 1989.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biologia de Anfíbios**. Johns Hopkins University Press. (1o Ed.) 669 p; 1986.

DUELLMAN, William E.; TRUEB, Linda. **Biology of amphibians**. JHU press, 1994.

FIGUEIREDO, Mario Roberto Chim et (Prese) al. **Efeito da Temperatura e do Fotoperíodo sobre o Desenvolvimento do Aparelho Reprodutor de Rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802)**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 30, n. 3, p. 916-923, 2001.

FIGUEIREDO, R. B. **A ranicultura no Brasil é renda certa para o produtor**. Revista Eletrônica Nordeste Rural, de 12 abr. 2005. Disponível em: <<http://www.nordesterural.com.br/nordesterural/matler.asp?newsId=2291>>. Acesso em: 3 jul. 2010.

FITZPATRICK, Lloyd C. **Life history patterns of storage and utilization of lipids for energy in amphibians**. American Zoologist, v. 16, n. 4, p. 725-732, 1976.

FONTANELLO, D.; SOARES, H. A.; MANDELLI, J. R. J.; SANTOS, L. E.; PENTEADO, L. A.; CAMPOS, B. E. S.; REIS, J. M. **Estação de reprodução de *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802), criados em ranário comercial e influência de fatores climáticos sobre o número de desovas**. Boletim do Instituto de Pesca, 11: 123-130; 1984.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. **The testis of domestic animals**. Male reproduction; a multidisciplinary overview, p. 198-219, 1998.

FROST, Darrel R. et al. The amphibian tree of life. **Bulletin of the American Museum of natural History**, p. 1-291, 2006.

FROST, John S. **Comparative feeding and breeding strategies of a sympatric pair of leopard frogs (*Rana pipiens complex*)**. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, v. 225, n. 1, p. 135-140, 1983.

GIOVANELLI, Joao G. R.; HADDAD, Célio F. B.; ALEXANDRINO, Joao. **Predicting the potential distribution of the alien invasive American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil**. Biological Invasions, v. 10, n. 5, p. 585-590, 2008.

GOMES, Marcos de Lucca Moreira et al. **Stereological analyses of the annual variation of captive bullfrog adult testes (*Lithobates catesbeianus*, Shaw 1802)**. J. Morphol. Sci, v. 29, n. 3, p. 182-186, 2012.

GOVINDARAJULU, P.; PRICE, W. S.; ANHOLT, B. R. **Introduced bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in western Canada: Has their ecology diverged?**. Journal of Herpetology, v. 40, n. 2, p. 20-24, 2006.

GRIER, H. J. **Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier**. The Sertoli Cell, p. 704-739, 1993.

GUYTON, Arthur Clifton; HALL, John E.; GUYTON, Arthur C. **Tratado de fisiologia médica**. Elsevier Brasil, 2006.

HAYES, T. B. et al. **The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective**. Journal of Experimental Biology, v. 213, n. 6, p. 921-933, 2010.

HAYES, Tyrone et al. **Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*)**: laboratory and field evidence. Environmental health perspectives, v. 111, n. 4, p. 568, 2003.

HERMOSILLA, I. B.; URBINA, A. P.; CABRERA, J. C. P. **Espermatogénesis en la rana chilena *Caudiverbera caudiverbera* (Linne, 1758) (Anura, Leptodactylidae)**. Bol. Soc. Biol. Concepción, v. 54, p. 103-115, 1983.

HOOGMOED, MARINUS S.; GORZULA, S. J. **Checklist of the savanna inhabiting frogs of the El Manteco region with notes on their ecology and the description of a new species of treefrog (Hylidae, Anura)**. Zoologische Mededelingen, v. 54, n. 13, p. 183-216, 1979.

HUANG, Wen-San; LIN, Jun-Yi; YU, John Yu-Lin. **Male reproductive cycle of the toad *Bufo melanostictus* in Taiwan**. Zoological science, v. 14, n. 3, p. 497-503, 1997.

IUNC - International Union for (PRESEN) Conservation of Nature. **100 of the world's worst invasive alien species**, New Zeland, 2003. Disponível em: <http://www.issg.org/database/species/reference_files/100English.pdf>. Acesso em 03 out. 2016.

KAO, Y-I; Alexander, P. S.; Yang, V. V. C.; Yu, Y-L. **Annual patterns of testicular development and activity in the chinese bullfrog (*Rana rugulosa*)**. Zool. Sci., 10, 337-351 (1993).

KATS, Lee B.; FERRER, Ryan P. **Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. Diversity and Distributions**, v. 9, n. 2, p. 99-110, 2003.

KOULISH, Sasha; KRAMER, Charles R.; GRIER, Harry J. **Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae)**. Journal of Morphology, v. 254, n. 3, p. 292-311, 2002.

LA MARCA, E. & LÖTTERS, S. **Monitoring of declines in Venezuelan *Atelopus* (Amphibia: Anura: Bufonidae)**. Herpetologica Bonnensis, 1997:207-213, 1997.

LEIVAS, Peterson T.; LEIVAS, Fernando WT; MOURA, Maurício O. **Diet and trophic niche of *Lithobates catesbeianus* (Amphibia: Anura)**. Zoologia (Curitiba), v. 29, n. 5, p. 405-412, 2012.

LIMA, S. L.; VALLES, G. A. **Desenvolvimento de instalações e Técnicas de Manejo para a criação intensiva de girinos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 10., 1998. Recife: Associação Brasileira de Aquicultura, p.273, 1998.

LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. **A tecnologia de criação de rãs**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 168p. 1992.

LIMA, Samuel Lopes et al. **Estimativa do tamanho da primeira maturação sexual da rã-touro**. Brasileira de Zootecnia = Brazilian Journal of Animal Science, p. 416-420, 2001.

LIPS, K. R. **Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panamá**. Conservation Biology, 13:117-125, 1999.

LOFTS, Brian. **Amphibians**. In.: LAMMINI, G. E. Marshall's physiology of reproduction. (4ª Ed). Hong Kong; Shek Wah Tong Printing Press, 1: 127-205, 1984.

LOUMBOURDIS, Nikos S.; KYRIAKOPOULOU-SKLAVOUNOU, Pasqualina. **Reproductive and lipid cycles in the male frog *Rana ridibunda* in Northern Greece**. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, v. 99, n. 4, p. 577-583, 1991.

MAIA, L. H. D. **Dieta de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) (Anura: Leptodactylidae) em condições naturais na região de Viçosa, Minas Gerais**. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais – MG, 2008.

MANN, Reinier M. et al. **Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment**. Environmental pollution, v. 157, n. 11, p. 2903-2927, 2009.

MOZSÁR, Attila et al. **Relationship between Fulton's condition factor and proximate body composition in three freshwater fish species.** Journal of Applied Ichthyology, v. 31, n. 2, p. 315-320, 2015.

NÓBREGA, R. H.; BATLOUNI, S. R.; FRANÇA, L. R. **An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish.** Fish physiology and biochemistry, v. 35, n. 1, p. 197-206, 2009.

OLIVEIRA, Classius; DE SOUZA; SANTOS, Lia Raquel; ZIERI, Rodrigo. **Variações anatômicas no aparelho reprodutor masculino de Chaunus ornatus (Wied-Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae).** Biota Neotropica, v. 7, n. 1, p. 43-48, 2007.

ORTON F.; BAYNES A.; CLARE F.; DUFFUS A. L. J.; LARROZE S.; SCHOLZE M.; GARNER T. W. J.; **Body size, nuptial pad size and hormone levels: potential non-destructive biomarkers of reproductive health in wild toads (*Bufo bufo*).** Ecotoxicology, V. 23, pp 1359–1365, 2014.

PANIAGUA, R.; FRAILE, Benito; SAEZ, F. J. **Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians.** Histology and histopathology, 1990.

PASANEN, Seppo; KOSKELA, Pentti. **Seasonal and age variation in the metabolism of the common frog, *Rana temporaria* L. in northern Finland.** Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, v. 47, n. 2, p. 635-654, 1974.

PASCUAL, A. Diaz; GUERRERO, Ch. **Diet composition of bullfrogs, *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae) introduced into the Venezuelan Andes.** Herpetological Review, v. 39, n. 4, p. 425, 2008.

PIERANTONI, Riccardo. **Male reproductive system, amphibians.** 1999.

POUNDS, J. A. & CRUMP, M. L. **Amphibian declines and climate disturbances: the case of the golden toad and the Harlequin frog.** Conservation Biology, 8:75-82, 1994.

PUDNEY, J. **Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell.** The Sertoli Cell, p. 611-57, 1993.

PUKALA, Tara L. et al. **Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity.** Natural product reports, v. 23, n. 3, p. 368-393, 2006.

RASTOGI, Rakesh K. et al. **Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*: II. The male.** General and comparative endocrinology, v. 62, n. 1, p. 23-35, 1986.

RIBEIRO FILHO, Oswaldo Pinto; LIMA, S. L.; SEIXAS FILHO, J. T. **Reprodução induzida de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) com o uso de extrato bruto hipofisário.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 27, n. 4, p. 658-663, 1998.

RON, S. A.; DUELLMAN, W. E.; COLOMA, L. A. & BUSTAMANTE, M. R. **Population decline of the jambato toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador**. Journal of Herpetology, 37:116-126, 2003.

RUSSELL, Lonnie Dee. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Cache River Press, 1990.

SALTHER, S. N., MECHAM, J. S. **Reproductive and courtship patterns**. In: LOFTS, B. (Ed.) Physiology of the amphibia, New York: Academic Press. p.310-521. 1974

SANTOS, Lia Raquel de Souza. **Ciclo reprodutivo de machos de *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae)**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2006.

SASSO-CERRI, Estela et al. **Testicular morphological changes during the seasonal reproductive cycle in the bullfrog *Rana catesbeiana***. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, v. 301, n. 3, p. 249-260, 2004.

SCHLOEGEL, L. M. et al. **The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil**. Animal Conservation, v. 13, n. s1, p. 53-61, 2010.

SCHULZ, Rüdiger W. et al. **Spermatogenesis in fish**. General and comparative endocrinology, v. 165, n. 3, p. 390-411, 2010.

SPRANDO, R. L.; RUSSELL, L. D. **Spermiogenesis in the bullfrog (*Rana catesbeiana*): a study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination**. Journal of morphology, v. 198, n. 3, p. 303-319, 1988.

STEBBINS, R. C. & COHEN, N. W. **A. Natural History of Amphibians**. Princeton University Press. New Jersey. 316p, 1995.

TOLEDO, L. F. **Predation of juvenile and adult anurans by invertebrates: current knowledge and perspectives**. Herpetological Review, 36: 395-400, 2005.

TOLEDO, L. F.; RIBEIRO, R. S.; HADDAD, C. F. B. **Anurans as prey: an exploratory analysis and the size relationships between predators and their preys**. Journal of Zoology, 271: 170-177, 2007.

ULVATNE, H. **Antimicrobial Peptides: Potential Use in Skin Infections**. American Journal of Clinical Dermatology, v. 4, n. 9, p. 591-595. 2003.

VANCOMPERNOLLE, S. E. et al. **Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin Potently Inhibit Human Immunodeficiency Virus Infection and Transfer of Virus from Dendritic Cells to T Cells**. Journal of Virology, v. 79, n. 18, p. 11598–11606. 2005.

VIEIRA, Márcio Infante. **Rã touro gigante: características e reprodução**. 1984.

VIZOTTO, L. D. **Produção de girinos**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE AQUICULTURA E 20 ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTORES, 20, 1980, Jaboticabal, SP. Brasília, DF: ABRAQ; ABCR, p. 125-52. 1981.

WAKE, D. B.; VREDENBURG, V. T. **Are we in the midst of the sixth mass extinction?** A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 11466-11473, 2008.

WANG, Y.; LI, Y. **Habitat selection by the introduced American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) on Daishan Island**. *Journal of Herpetology*, v. 43, n. 2, p. 205-211, 2009.

WASSERSUG, Richard J. **The adaptive significance of the tadpole stage with comments on the maintenance of complex life cycles in anurans**. *American Zoologist*, v. 15, n. 2, p. 405-417, 1975.

WU, Di et al. **Structural characteristics of gonadal development and hermaphroditic phenomenon in freshwater pearl mussel, *Sinohyriopsis schlegelii* (*Hyriopsis schlegelii*)**. *Tissue and Cell*, v. 49, n. 3, p. 440-446, 2017.

YOUNG, B. E.; LIPS, K. R.; REASER, J. K.; IBÁÑEZ, R.; SALAS, A. W.; CEDENO, J. R.; COLOMA, L. A.; SANTIAGO, R.; LA MARCA, E.; MEYER, J. R.; MUNOZ, A.; BOLANOS, F.; CHAVES, G. & ROMO, D. **Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin América**. *Conservation Biology*, 15:1213-1223, 2001.

ANEXOS

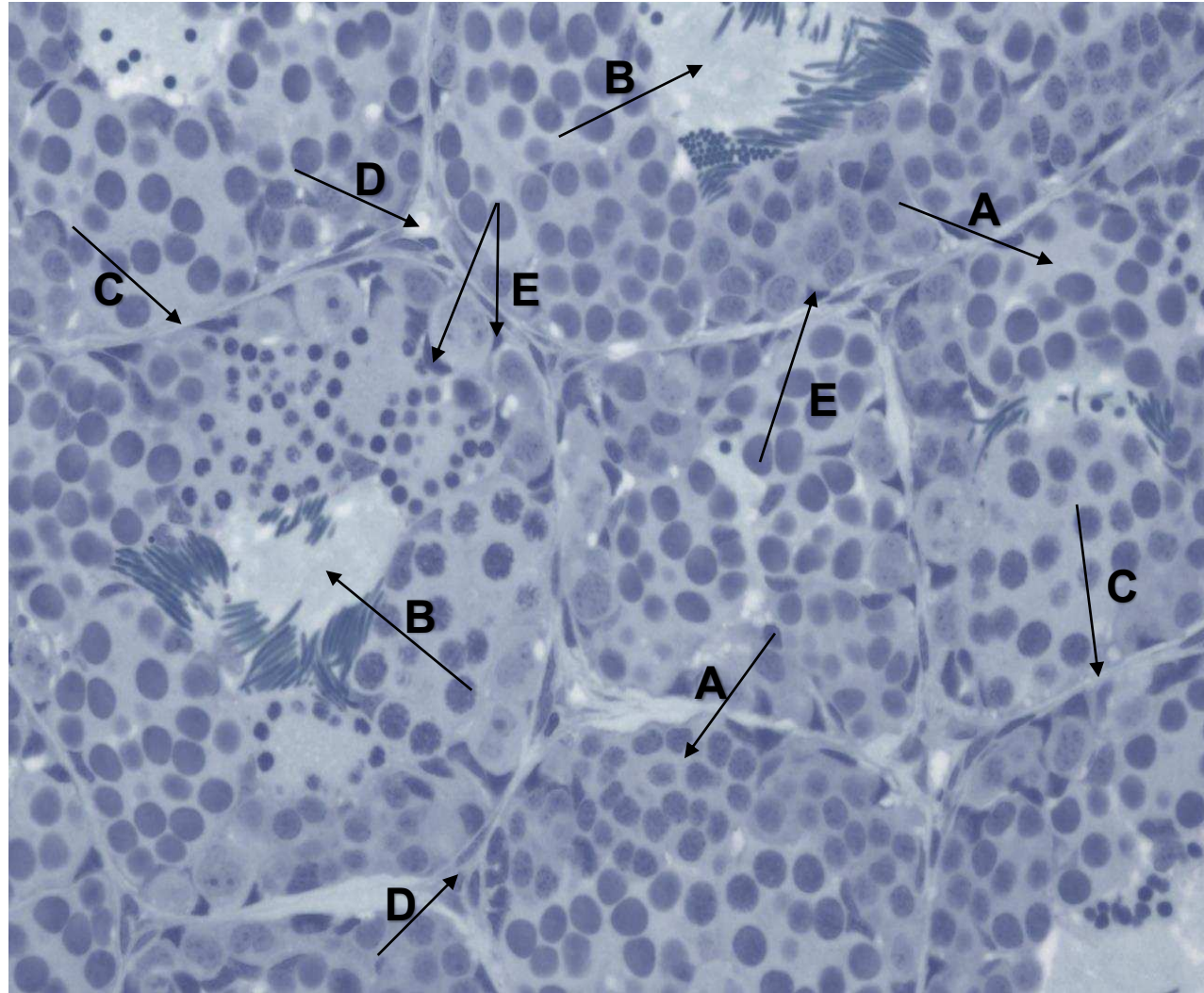


Figura 1 - Corte histológico de testículo de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) evidenciando: A cisto, B lúmen, C túnica própria, D intertúbulo e E núcleo da célula de Sertoli. Fonte: Fotografia da autora.

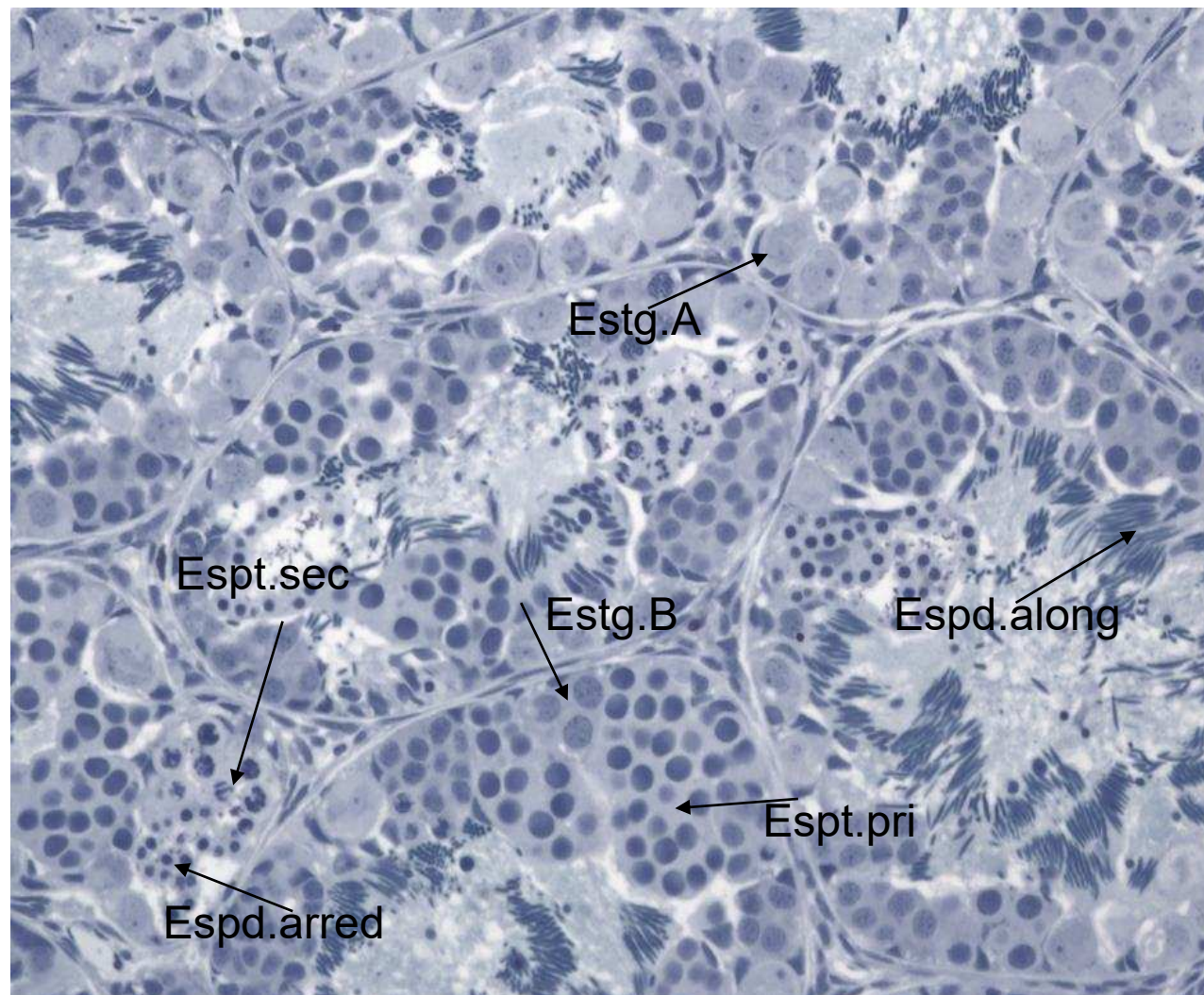


Figura 2 - Células da linhagem espermatogênica de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Espermatogonia A (Estg A), esperm. B (Estg B), espermatócito primário (Espt. pri.), esperm. secundário (Espt. sec.), espermátide arredondada (Espd.arred.) e esperm. Alongada (Espd. along.).
Fonte: Fotografia da autora.

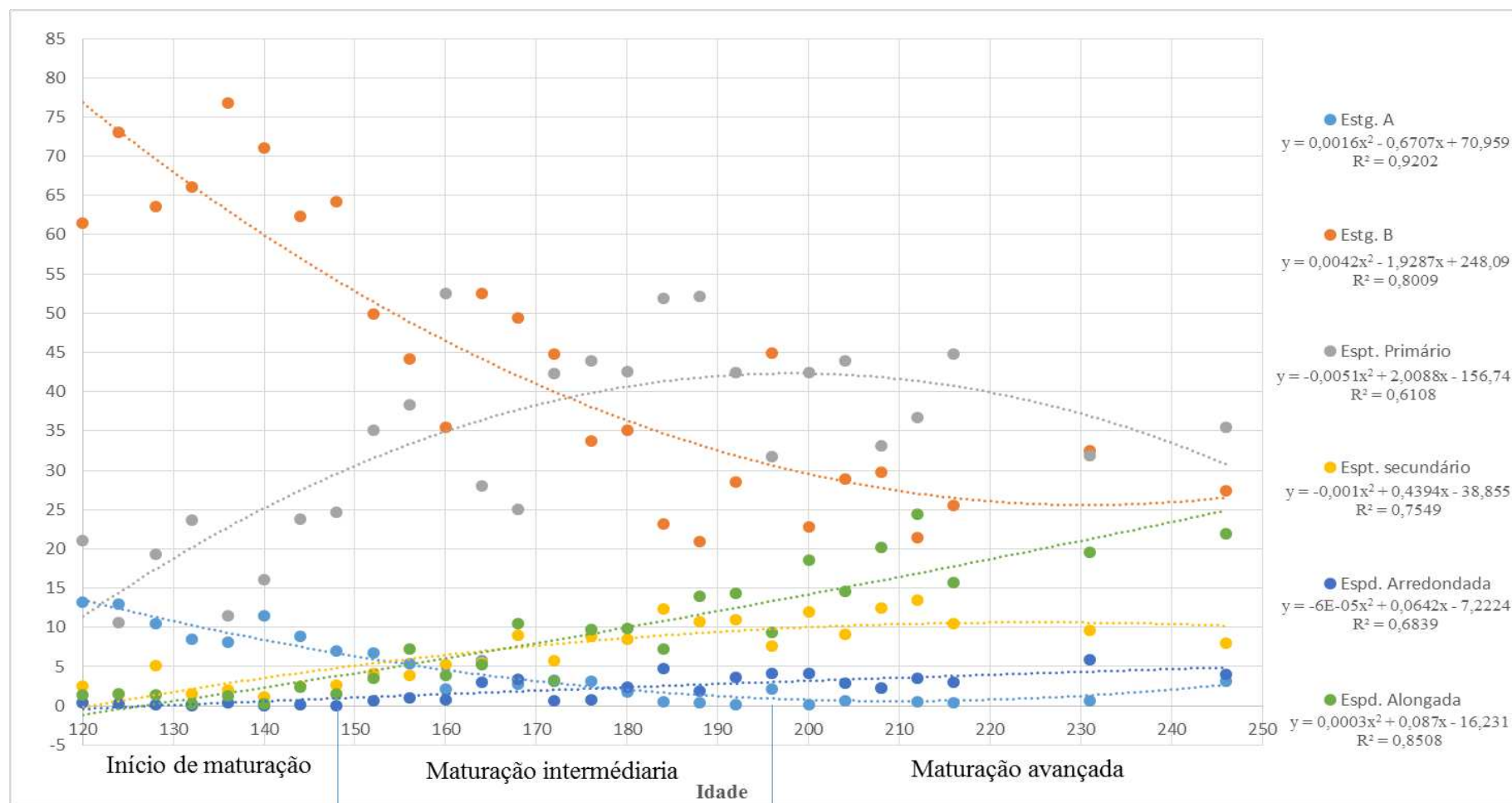


Figura 3 - Porcentagens dos tipos de cistos dos túbulos seminíferos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em três estádios de desenvolvimento gonadal (Início de maturação, Maturação avançada e Maturação intermediária) dos 120 aos 246 dias de vida. Espermatogonia A (Estg A), espermatogônia B (Estg B), espermatócito primário (Espt. pri.), espermatócito secundário (Espt. sec.), espermatíde arredondada (Espd.arred.) e espermatíde alongada (Espd. along.). Fonte: Gráfico feito pela autora.

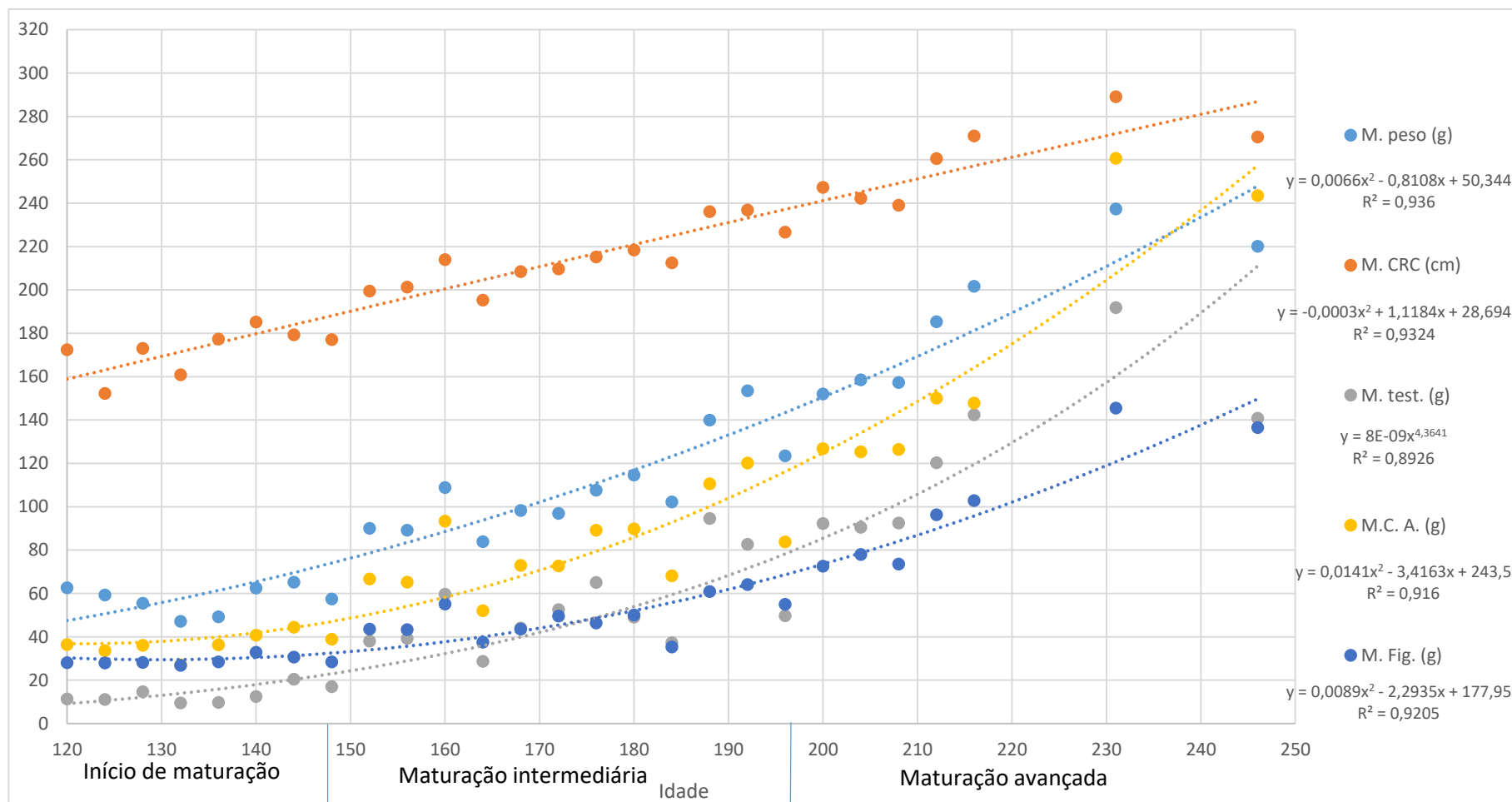


Figura 4 - Médias de peso do animal (M. peso) e medias ajustadas de: comprimento rosto-cloacal (M. CRC), peso dos testículos (M. test.), corpo adiposo (M.C.A.) e fígado (M. Fig.) de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em três estágios de desenvolvimento gonadal (Início de maturação, Maturação intermediária e Maturação avançada) dos 120 aos 246 dias de vida. Fonte: Gráfico feito pela autora.

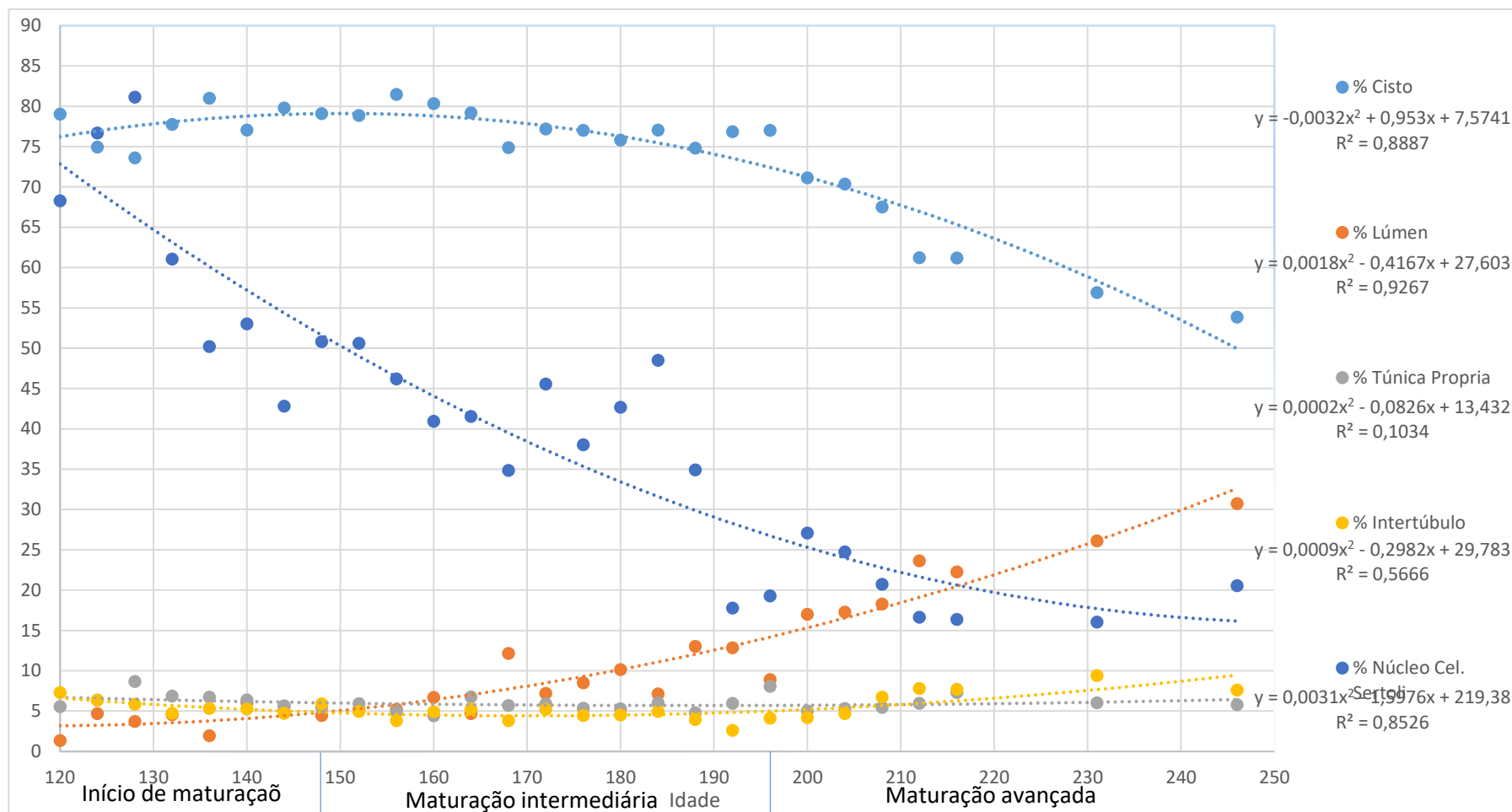


Figura 5 - Médias das porcentagens dos componentes do parênquima testicular: cisto, lúmen, túnica própria, intertúbulo e núcleo da célula de Sertoli de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em três estágios de desenvolvimento gonadal (Início de maturação, Maturação intermediária e Maturação avançada) dos 120 aos 246 dias de vida. Fonte: Gráfico feito pela autora.

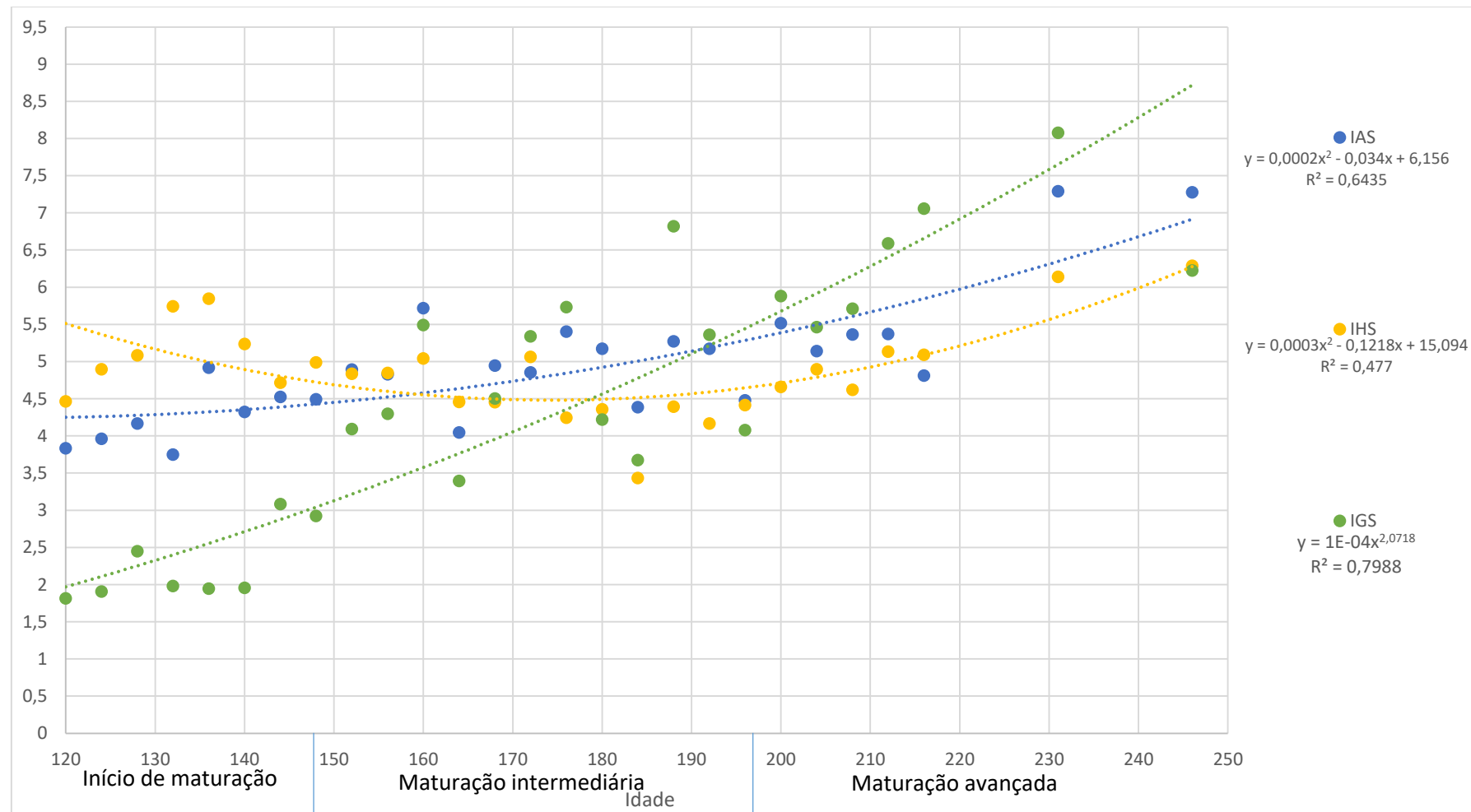


Figura 6 - Médias dos índices adipossomático (IAS), hepatossomático (IHS) e gonadosomático (IGS) de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em três estádios de desenvolvimento gonadal (Início de maturação, Maturação intermediária e Maturação avançada) dos 120 aos 246 dias de vida. Fonte: Gráfico feito pela autora.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DE PRODUÇÃO
CEUAP/UFV

Campos Universitários – Viçosa, MG – 36570-000 – Telefone: (31) 3099.3275 – e-mail: ceuar@ufv.br – site: www.ceuap.ufv.br

Viçosa, 18/11/15

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento gonadal, processo espermato gênico e produção espermática em rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*), mantidas em condições abióticas controladas", protocolo nº 040/2015, sob a responsabilidade de Tarcizio Antonio Rego de Paula - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho nacional de controle da experimentação animal (concea), e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais de produção da universidade federal de viçosa (ceuap-ufv) em reunião de 14/Ago/2015.

Vigência do Projeto: de 01/10/2015 a 01/10/2016

Espécie/linhagem: Rãs-touro N° de animais: 130

Peso: 60 a 320g Idade: — Sexo: Macho Origem: Ranicultura- UFV

CERTIFICATE

We certify that the project entitled "Gonadal development, spermatogenic process and sperm production in Bull frogs (*Lithobates catesbeianus*) raised in abiotic conditions" protocol nº 040/2015, under the responsibility of Tarcizio Antonio Rego de Paula - which involves the production, maintenance and / or use of animals belonging to the phylum chordata, subphylum vertebrata (except man), for scientific research purposes (or education) - is in accordance with the law nº. 11.794, of October 8, 2008, Decree nº. 6899 of July 15, 2009, and the rules issued by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and was approved by the Ethics Commission on the use of farm animals of Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) in its meeting on Aug. 14th, 2015.

Duration of the Project: from Oct. 01st, 2015 to Oct. 01st, 2016.

Species / strain: Bullfrogs N° of animals: 130

Weight: 60 to 320g Age: — Sex: Male Source: Ranicultura- UFV

Mário Luiz Chizzotti
Coordenador da CEUAP/UFV