

CHRISTIANO DEMÉTRIO DE LIMA RIBEIRO

**DESCRIÇÃO ESPERMÁTICA DO SÊMEN DE RÃ-PIMENTA
(*Leptodactylus labyrinthicus*)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

CHRISTIANO DEMÉTRIO DE LIMA RIBEIRO

DESCRIÇÃO ESPERMÁTICA DO SEMEN DE RÃ-PIMENTA
(*Leptodactylus labyrinthicus*)

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

APROVADA: 25 de setembro de 2009

Prof. José Cola Zanuncio
(Coorientador)

Prof. Luiz Carlos dos Santos
(Coorientador)

Prof. José Teixeira de Seixas Filho

Dr. Rodrigo Diana Navarro

Prof. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho
(Orientador)

A Deus, que na sua infinita misericórdia me fez conhecer o seu plano profético. Toda glória e honras sejam dadas a Ele!

Aos meus pais Marcelo e Aparecida e meus irmãos Gustavo e Tiara, pelo carinho e exemplo.

À minha amada esposa Jesyane e ao meu amado filho Ezequiel, companheiros de todas as horas, pelo amor, pelo carinho, pelo exemplo, pela paciência e pela perseverança. Amo vocês!

À minha sogra, D. Ângela, pelo carinho, pela dedicação, pelo incentivo, pelo exemplo e pela disposição em sempre ajudar.

Ao Prof. Hélio Barbosa e esposa Sra. Marília, pelo carinho e pela assistência recebida.

Ao amigo Prof. João Luis Lani, pelos conselhos espirituais e acadêmicos.

Ao amigo José Mauro Torres, pelo carinho e prontidão sempre presentes.

Dedico

*“O coração do entendido adquire o conhecimento,
e o ouvido dos sábios busca a sabedoria”.*

Provérbios 18:15

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Biologia Animal (DBA), do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa.

Ao amigo e Professor Oswaldo Pinto Ribeiro Filho, pela orientação, pelos conselhos, pela amizade, pelo incentivo e pelo apoio na realização deste e de outros trabalhos, também a paciência.

Aos Professores Luiz Carlos dos Santos, Luis David Solis Murgas e Jose Cola Zanuncio, pela coorientação e pelas sugestões na realização deste trabalho.

Ao Professor Paulo Cecon, pelas orientações estatísticas.

Aos Professores José Teixeira de Seixas Filho e Dr. Rodrigo Diana Navarro, por fazerem parte da banca examinadora e pelas suas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao querido amigo e Professor Marcelo José Vilela (*in memoriam*), pelo apoio e incentivo na minha vida acadêmica.

Ao amigo Professor José Emílio Zanzirolani de Oliveira, pelas sugestões dadas e pela oportunidade de um crescimento profissional.

Aos amados irmãos da Igreja Cristã Maranata, pelas constantes orações e pela assistência recebida. Um corpo só, um só espírito!

Aos amigos Leonardo e Lúcio, responsáveis pelo Maanaim de Timóteo, por terem aberto as portas para a coleta de alguns exemplares de rã-pimenta.

Ao Colégio Carmo de Viçosa, em especial ao diretor e amigo Gilton Natan Soares de Almeida e à pedagoga e amiga Isabel Miranda Milagres, pela compreensão, pelos ensinamentos e pela cooperação no dia-a-dia.

Aos meus cunhados Ronaldo, Ronildo e Jesylaine, pela cooperação nas coletas e nos experimentos.

Aos amigos e colegas do Ranário Experimental, Marcelo, meu “coorientador”, Ronaldeira, meu “braço direito”, Cláudio “lagartixa”, Ângela, Emanuel e Calado, pelo convívio e pela ajuda na realização do trabalho.

Aos funcionários do Ranário Experimental da UFV, Everaldo, Álvaro, José Antônio, Carlos Roberto e Raimundo, pelo convívio e auxílio durante a execução deste trabalho.

Aos funcionários da Piscicultura, Paulo e João "Pindóia", pelo auxílio e pela amizade.

Ao amigo Márcio Dionísio, pelas contribuições científicas e pela disposição contínua.

Ao Sr. Antônio Iria, pelo auxílio na coleta e pela troca de experiências.

Ao amigo José Roberto, pela contribuição na formatação deste trabalho.

Ao Professor Nelson Coeli, pela revisão ortográfica deste trabalho.

BIOGRAFIA

Christiano Demétrio de Lima Ribeiro, filho de Marcelo Vieira Ribeiro e Geralda Aparecida de Lima Ribeiro, nasceu em 7 de novembro de 1979, em Caratinga, Minas Gerais.

Em janeiro de 2005, graduou-se no curso de Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa - UFV.

Em agosto de 2007, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa.

Em 25 de setembro de 2009, submeteu-se aos exames finais de defesa de dissertação.

ÍNDICE

	Páginas
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>).....	3
2.2 Características reprodutivas da rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>).....	3
2.3 Fatores abióticos que influenciam a reprodução em anuros	4
2.4 Mecanismos neuroendócrinos da reprodução de anuros	5
2.5 Hormônios utilizados na reprodução artificial de rãs	5
2.6 Biologia seminal de anuros	7
2.7 Espermatogênese de anuros.....	7
2.8 Morfologia dos espermatozoides de anuros	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Coleta dos animais	11
3.2 Manutenção dos animais em laboratório.....	16
3.3 Preparo e aplicação do GnRHa nos exemplares de rã-pimenta	20
3.4 Coleta do sêmen.....	21
3.5 Análise microscópica do sêmen.....	22
3.6 Características seminais de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>).....	22
3.6.1 Volume e cor	22
3.6.2 Vigor, motilidade e concentração espermática	23
3.7 Comprimentos totais, da cabeça, da membrana ondulante que envolve a cabeça, da área da cabeça e da cauda do espermatozoide de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>).....	23

3.8 Análise dos dados.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Resposta dos exemplares de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>) à indução à espermiacção com acetato de buserelina .	24
4.2 Análise do sêmen	25
4.2.1 Volume e cor	25
4.2.2 Vigor, motilidade e concentração espermática	26
4.3 Análise da morfologia externa e da morfometria do espermatozoide de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>)	27
5. CONCLUSÕES.....	34
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
APÊNDICE.....	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Membro anterior desenvolvido de macho de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>).....	14
FIGURA 2. Acúleos na região ventral superior de machos de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>)	14
FIGURA 3. Vista geral das baias utilizadas para alojar os machos de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>). A: vista externa superior; B: vista interna frontal.....	15
FIGURA 4. Abertura da cavidade bucal para início da alimentação induzida utilizando uma toalha de mão para vendar os olhos da rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>).....	17
FIGURA 5. Peso dos exemplares de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>) durante a alimentação induzida com tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	18
FIGURA 6. Comprimento rostro-cloacal (CRC) dos exemplares de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>) durante a alimentação induzida com tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	19
FIGURA 7. Aplicação hormonal na cavidade celomática de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>).	20
FIGURA 8. Coleta do sêmen de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>), dentro da baia individual, utilizando-se pipeta de vidro de 2 mL..	22
FIGURA 9. Fotomicrografia de luz de espermatozoides de rã-pimenta <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (destacados pela seta). Obj 40, zoom 2.	28
FIGURA 10. Fotomicrografia de luz de espermatozoides de rã-pimenta <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> (destacados pela seta). Obj 40, zoom 2, corada com azul de metileno.	29
FIGURA 11. Fotomicrografia de luz de espermatozoides de rã-pimenta <i>Leptodactylus labyrinthicus</i> evidenciando a forma da cabeça e a cauda bifurcada. Obj 40, zoom 2, corada com azul de metileno.....	31

FIGURA 12. Fotomicrografia de luz de espermatozoides de rã-pimenta *Leptodactylus labyrinthicus* analisada pelo programa IMAGE PRO PLUS®. Obj 40, zoom 2, corada com azul de metileno 1%. L1–L3=comprimento da cabeça; T2=área da cabeça; L5–L11=comprimento da cauda; L12–L13=raios da Membrana ondulatória.....

32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Identificação das áreas predeterminadas para coleta de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>), com datas das coletas, temperatura do local no momento das coletas, municípios, local e coordenadas.....	13
TABELA 2. Fotoperíodos de cada baía onde estavam acondicionados os exemplares de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>).	16
TABELA 3. Peso (g) dos exemplares de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>) durante a alimentação induzida com tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	18
TABELA 4. Comprimento rostro-cloacal (CRC) dos exemplares de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>) durante a alimentação induzida com tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>). .	19
TABELA 5. Tempo de aplicação x dose hormonal (acetato de buserelina) nos exemplares de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>)	21
TABELA 6. Análise da presença de espermatozoides de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>) nos oito tempos de coleta ..	24
TABELA 7. Volume de sêmen coletado na cloaca de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>) em oito tempos de coleta ...	26
TABELA 8. Comprimentos totais, da cabeça, área da cabeça (μm^2) e comprimento da cauda do espermatozoide de rã-pimenta (<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>), em μm	30
TABELA 9. Área da cabeça (A), comprimento total (CT), da cabeça (CC) e da cauda (CCA) dos espermatozoides de alguns anuros.	33

RESUMO

RIBEIRO, Christiano Demétrio de Lima M. Sc. Universidade Federal de Viçosa. Setembro de 2009. **Descrição espermática do sêmen de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*)**. Orientador: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho. Coorientadores: Luiz Carlos dos Santos, Luis David Solis Murgas e José Cola Zanuncio.

O presente trabalho foi desenvolvido no Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), de 6/4/2009 a 7/6/2009, onde avaliaram as características seminais e a morfologia do espermatozóides da rã-pimenta. Oito machos de rãs-pimenta, aptos à reprodução, de Viçosa, Cajuri, Timóteo e Governador Valadares foram coletados. A temperatura adotada foi de $25,0 \pm 1,5$ °C, com dois fotoperíodos: 12:12 LD (LD = Light Dark) e 14:10 LD. Utilizou-se o hormônio análogo acetato de buserelina (GnRHa) na dosagem de 0,4 µg (= 0,1 mL) para indução a espemiação, aplicado na cavidade celomática do animal com uma seringa hipodérmica com agulha de 25,0 x 0,7 mm. Esse procedimento foi realizado durante dois dias consecutivos: cinco doses no primeiro dia, com intervalo de uma hora entre doses, e três doses no segundo, com a primeira dose no mesmo horário do dia anterior e com intervalo de 1 h entre doses. No primeiro dia cinco coletas do sêmen dos exemplares de rã-pimenta (uma, duas, três, quatro e cinco horas após a primeira aplicação do hormônio) foram realizadas. O efeito do tratamento foi avaliado com microscópio óptico de luz com campo claro (aumento de 400x), onde se analisaram lâminas com sêmen. Foi considerado como positivo as lâminas com presença de espermatozoides. Uma alíquota do sêmen *in natura* de cada animal, correspondente ao valor de uma gota (aproximadamente 0,05 mL), foi colocada sobre uma lâmina de vidro e, sobre a alíquota, uma lamínula. O vigor, motilidade e concentração espermática foram avaliados. Hormônio induziu somente no segundo dia (5 h de tratamento no primeiro dia e, após 24 h, mais duas horas de tratamento), totalizando 26 h para coletar o sêmen, com fotoperíodo de 14:10 LD. Um fotomicroscópio Olympus BX-40 foi utilizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, e realizou-se a captura de imagem, de 28 espermatozóides com auxílio do

programa de análises de imagem IMAGE PRO PLUS[®], obtendo-se a área da cabeça e comprimentos total, da cabeça, cauda e membrana que envolve a cabeça. Os intervalos mínimos-máximos (médias) foram: área da cabeça: 15,57 – 50,15 (29,83) μm^2 , comprimento total: 26,89 – 76,06 (51,202) μm e da membrana que envolve a cabeça.

ABSTRACT

RIBEIRO, Christiano Demétrio de Lima M. Sc. Universidade Federal de Viçosa. September 2009. **Descripción of semen of sperm-pepper frog (*Leptodactylus labyrinthicus*)**. Adviser: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho. Coadvisers: Luiz Carlos dos Santos, Luis David Solis Murgas and José Cola Zanuncio.

This study was developed at Ranário Experimental in Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG) from April 6th, 2009 to June 7th, 2009, and aimed to assess the seminal characteristics and analyze the morphology of semen and sperm peppermint frog (*Leptodactylus labyrinthicus*). We collected eight male rã-pimenta, suitable for reproduction, in Viçosa, Cajuri, Timóteo and Governador Valadares. The assumed temperature was 25.0 ± 1.5 C° with two photoperiods: LD 12:12 (LD = Light Dark) and 14:10 LD. For induction of spermiogenesis, we used the hormone analogue buserelin acetate (GnRHa) at a dose of 0.4 mg (= 0.1 mL), charged in the coelomic cavity of the animal with the aid of a hypodermic needle 25, 0 x 0.7 mm. This procedure was performed for two consecutive days: five doses on the first day with an hour interval between doses, and three doses in the second, with the first dose at the same time the day before and 1 h interval between doses. On the first day were collected five of the semen specimens of frog pepper (one, two, three, four and five hours after the first hormone application). To verify the effect of treatment was used an optical microscope with bright field (400x increase), which examined slides with semen. It was considered positive the slides with the presence of spermatozoa. An aliquot of fresh semen from each animal, corresponding to a value of one drop (approximately 0.05 mL) was placed on a glass slide and the tax rate, a cover slip. Force, motility and sperm concentration were evaluated. The animals responded positively to the hormone only the second day (5 h of treatment the first day and after 24 h, two more hours of treatment), totaling 26 h to collect semen, photoperiod of 14: 10 LD. In Plant Anatomy Laboratory, Universidade Federal de Viçosa, we used the light microscope Olympus BX-40 and held image capture, which was used for the analysis of 28 sperm, with the help of the program analyzes the image IMAGE PRO PLUS®, the head area and total length, head, tail and the membrane surrounding the head. The relevant time

minimum-maximum (average) were: the head area: 15.57 to 50.15 (29.80) μm^2 ,
total length: 26.89 -76.06 (21.21) μm and the membrane surrounding the head.

1. INTRODUÇÃO

A rã-pimenta, *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824), (Leptodactylidae), ocorre da Venezuela ao sudeste do Brasil e leste do Paraguai e sua biologia reprodutiva é pouco conhecida (AGOSTINHO, 1988). Esta espécie é somente menor que a rã-gigante-africana (*Conraua goliath*).

A rã-pimenta é geralmente encontrada durante a noite, nas margens de brejos e locais de água corrente onde há formação de remanso com vegetação. Durante o dia, procura local protegido, como buracos, pedras ou pedaços de madeira, onde permanece até o anoitecer.

Características externas como dorso vermelho ou marrom-claro, com manchas; superfícies ventrais da coxa amarela, com pequenas manchas podem identificar a rã-pimenta. Seu nome popular é devido a secreções na pele, com cheiro característico de pimenta que em contato com os olhos ou com a mucosa da pele, causam irritação.

Os girinos de rã-pimenta são onívoros, mas o adulto é carnívoro, podendo se alimentar de outros anfíbios, répteis, pequenos pássaros e mamíferos (SANTANA, 1998).

A população da rã-pimenta, no Brasil, vem diminuindo e podem estar ocorrendo pela constante degradação dos ecossistemas naturais especialmente por ações antrópicas, caça predatória, e a introdução de espécimes exótica.

O período reprodutivo da rã-pimenta é sazonal, iniciando-se em agosto e terminando em janeiro, com picos mais acentuados em setembro, outubro e novembro. O pico de desovas é influenciado pela temperatura e umidade (AGOSTINHO, 1988).

A desova compreendem um ninho de espuma geralmente encontrada nas margens de poças d'água. Cerca de 85% dos ovócitos depositados não são fecundados, quais juntamente com a albumina são fonte inicial de alimentos para os girinos. Isto garante a sobrevivência por um longo período dentro do ninho, até a ocorrência de chuvas, quando são levados para o corpo d'água e encontram alimento disponível (PRADO et al., 2005).

A dispersão de vertebrados depende da adaptação de seus ciclos reprodutivos ao ambiente. O controle dos ciclos reprodutivos requer que os organismos detectem as mudanças no ambiente e ajustem seus parâmetros fisiológicos com as condições necessárias, através do sistema neuroendócrino. O conhecimento do ciclo reprodutivo é fundamental para se compreender as estratégias do ciclo de vida, para preservação da rã-pimenta e fornecem subsídios para análises filogenéticas dessa espécie.

A importância da rã-pimenta para o ecossistema brasileiro e a falta de estudos sobre o sêmen, justificam o desenvolvimento desse trabalho.

Foi realizado este trabalho com objetivo de avaliar as características do sêmen e dos espermatozóides de rã-pimenta.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*)

Leptodactylus labyrinthicus (Spix, 1824) (Amphibia, Anura, Leptodactilidae), cuja denominação mais comum é rã-pimenta ou gia, foi descrita como *Rana labyrinthica* por Spix, em 1824, e redefinida em novo gênero (*Leptodactylus labyrinthicus*) (CEI, 1980). A população de girinos dessa espécie não forma agregados, e os animais pós-metamórficos distribuem em baixa densidade (JIM, 1980).

Adultos de rã-pimenta possuem dorso manchado ou barrado, mais ou menos uniforme; lábio com barras verticais claras; superfície posterior da coxa raramente uniforme, com marcas claras raramente contrastando sobre o fundo escuro; porção superior da tíbia distintamente barrada ou não; duas pregas dorso laterais de contorno escuro ou não, contínuas ou interrompidas, estendendo-se de um quarto à metade da distância do olho até a cloaca; prega de contorno escuro, do olho até acima do tímpano, contínua ou não, até a clavícula; e prega interrompida de contorno escuro, do tímpano até a lateral do corpo (HEYER (1979). Adultos de rã-pimenta se alimentam de pássaros e cobras (CEI, 1980) e sapos (CARDOSO; SAZIMA, 1972).

A rã-pimenta criada em cativeiro ingeriu carne crua sem de estímulo (LIMA E AGOSTINHO, 1985).

2.2 Características reprodutivas da rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*)

Machos de rã-pimenta apresentam polegar com acúleo nupcial e acúleos na região ventral superior, que auxiliam aderir à fêmea durante amplexo nupcial durante o período reprodutivo (Figura 2), durante o amplexo nupcial ocorrem a eliminação de ovócitos pela fêmea para o meio externo e a eliminação de espermatozoides pelo macho, ocorrendo assim a fecundação (SANTANA, 1998).

A fêmea de rã-pimenta põe seus ovócitos em ninhos de espuma, construindo com o macho em lama próxima a áreas alagadas e somente 3 a 11% dos ovócitos são fertilizados. Os demais são chamados de ovócitos

tróficos, destinados à alimentação dos girinos e provavelmente foram postos pela fêmea após a partida do macho. Esses ovócitos tróficos são importantes no crescimento e desenvolvimento dos girinos que nascem dos ovócitos fertilizados. O ninho é carregado para lagoa, porém a escassez de chuva pode forçar os girinos a permanecerem dias sem alimentação, e, portanto, os ovócitos não fertilizados podem ser sua única fonte de alimento (PRADO et al., 2005).

2.3 Fatores abióticos que influenciam a reprodução em anuros

A pluviosidade e a temperatura são vitais para a reprodução na maioria das espécies de Anuras (AICHINGER, 1987) e determinam a época favorável do ano e a duração em que se mantêm ativos, determinando sua distribuição estacional. Padrões cíclicos estão correlacionados e ajustados às mudanças sazonais, sendo a temperatura o fator mais importante. A temperatura regula os ciclos reprodutivos de rãs e sapos (HUANG et al., 1997).

A reprodução de rã-touro é influenciada por fatores climáticos (RIBEIRO FILHO et al., 1998). (EASLEY et al., 1979) enfocam a importância dessas influências ambientais na espermição de rã-touro.

A temperatura ambiente e o fotoperíodo foram os fatores abióticos que influenciam a reprodução de rã-touro, sendo a temperatura ótima para a reprodução em torno de 20 °C (FONTANELLO et al., 1984).

A maturação sexual de rã-touro pode ser controlada pela temperatura, obtendo-se o melhor desenvolvimento gonadal entre 26 e 29 °C (FIGUEIREDO et al., 2001).

A temperatura em regiões tropicais e subtropicais raramente é um fator limitante, pois são quase constantes e ótimas. No entanto em regiões temperadas afetam a secreção de gonadotrofina pela hipófise na maioria das espécies e alteram a sensibilidade do epitélio germinal aos hormônios gonadotrópicos no outono e no inverno (SALTHER E MECHAM, 1974).

Diferenças sazonais no metabolismo dos anfíbios representam a transição entre a utilização de energia para a reprodução (nos adultos a energia é dirigida para um esforço reprodutivo, com a produção de ovócitos e esperma, além do comportamento das rãs em época de acasalamento) e

a preparação de reservas suficientes para que as rãs suportarem os invernos mais rigorosos (BRATTSTROM, 1979).

2.4 Mecanismos neuroendócrinos da reprodução de anuros

Os sistemas nervoso e o endócrino atuam em conjunto na reprodução com de diferentes grupos de hormônios produzidos por órgãos ao longo do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HAFEZ, 2004).

A atividade gametogênica em rã-manteiga é controlada pela secreção gonadotrófica do lóbulo anterior da hipófise. O ciclo reprodutivo dessa espécie nas fases da gametogênese e do período de ovulação, correspondem, às esferas da ação dos hormônios gonadotrópicos (gonadotrofina A e gonadotrofina B) (CEI, 1949,1950).

2.5 Hormônios utilizados na reprodução artificial de rãs

O GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) tem peso molecular de 1.183 dáltons sendo sintetizado e armazenado no hipotálamo basal médio e fornece uma ligação humoral entre os sistemas endócrino e nervoso. Pulsos de GnRH são liberados no sistema porta-hipotálamo-hipofisário em resposta à estimulação nervosa e promovem a liberação de LH e FSH da hipófise-anterior (HAFEZ, 2004).

O efeito de análogos do hormônio GnRH sobre a desova e espermição de rã-touro pode ter aplicações práticas importantes para estimulação da atividade gonadal e a aquisição de gametas nessa espécie. Estes consistem em modificações na molécula do GnRH ativo, necessárias para o aumento do desempenho desse peptídeo. Em geral, modificações como 'Pro POT.9' (NHET), substituições com D-aminoácidos e a combinação dessas modificações produzem moléculas resistentes à degradação enzimática, estáveis na conformação biologicamente ativa e caracterizadas, portanto, por uma maior afinidade e potência (ALONSO, 1997).

A rã-touro portadora de micobacteriose foi induzida com hormônio acetato de buserelina à espermição, após foi realizada coleta do sêmen e determinou-se concentração espermática (AFONSO, 2004).

Ambiente controlado (luz e temperatura) pode alterar os níveis de andrógenos circulantes nos machos de rãs-verde (*Rana esculenta*) tratadas em diferentes fases do ciclo testicular, embora esses animais possuam potencialmente um tipo de espermatogênese contínua. Esses autores verificaram também que a atividade gonadotrópica da hipófise, somada à resposta dos testículos às gonadotrofinas e à resposta de órgãos periféricos, alvos do andrógeno, não é igualmente sensível à temperatura (IELA et al., 1980).

Desovas de *Leptodactylus labyrinthicus* foram obtidas após a aplicação de extratos de duas hipófises diluídas em solução fisiológica e para as fêmeas foi estabelecida dosagem em função do peso (AGOSTINHO, 1988).

Rã-touro induzida ao acasalamento com 7mg/Kg de extrato de hipófise de rã-touro apresentaram desova com 24.310 ovos (RIBEIRO FILHO et al., 1998).

O extrato bruto hipofisário (EBH) de rã-touro deve ser utilizado em animais com características sexuais secundárias para resposta positiva ao tratamento (RIBEIRO FILHO, 1994; AGOSTINHO, 1995), o mesmo para acetato de buserelina (GnRHa) (ALONSO, 1997; AFONSO, 2004; TORTELLY NETO, 2006).

A rã-manteiga e rã-touro, quando induzidas à espermiacão por gonadotropina coriônica humana (hCG), não dependem de esteróides sintéticos complementares para a indução à espermiacão (ROSEMBLIT et al., 2006) e outras espécies de anfíbios também foram induzidos por hCG (POZZI e CEBALLOS, 2000; KOBAYASHI et al. 1993).

Machos de rã-manteiga e de rã-touro espermiaram após 97,5 horas e 1 hora após serem induzidos por acetato de buserelina, ambos apresentavam características sexuais secundárias específicas e a utilização de hormônios na reprodução é uma ferramenta importante para a criopreservação de gametas (PEREIRA, 2009).

2.6 Biologia seminal de anuros

Os espermatozoides são células únicas em forma e função, sendo os maduros produtos finais de processos complexos de desenvolvimento sem passar por divisões ou diferenciações. O exame do sêmen é o método-padrão de avaliação da fertilidade de reprodutores (HAFEZ, 2004).

O sêmen de anuros apresenta semelhanças com o de peixes e a motilidade espermática é a principal característica em comum e a sua iniciação depende da interação com o meio aquático. Os espermatozoides são imóveis no trato reprodutivo, mas ao entrar em contato com o meio circundante, modificações na concentração osmótica ou iônica ocorrem e alteram a polarização do cálcio da membrana, dando início à motilidade (COSSON, 2004; MORISAWA et al., 1983).

O decréscimo da osmolaridade dos espermatozoides de anuros inicia sua motilidade, enfatizando o emprego de metodologias de coleta de sêmen sem a contaminação das amostras seminais (HOLLINGER; CORTON, 1980).

A concentração dos espermatozoides é o número de espermatozoides por volume de sêmen, é importante para sua utilização. Rã-touro portadora de micobacteriose espermiou após aplicação do hormônio acetato de buserelina na região peritoneal do animal (AFONSO, 2004).

A motilidade espermática é a principal variável para avaliar a qualidade do sêmen. Sendo necessário para sêmen de rã-touro portadora de micobacteriose três horas para realizar coletas após aplicação do hormônio acetato de buserelina e os espermatozoides de anfíbios anuros são coletados com motilidade (TORTELLY NETO, 2006).

2.7 Espermatogênese de anuros

O ciclo espermatogênico de anuros apresentou três períodos dezembro a março, repouso total da atividade gametogênica; abril a setembro, atividade degenerativa; e outubro a dezembro, espermatogênese. No último período ocorrem a expulsão de grandes massas de espermatozoides e o maior desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários. No entanto, temperaturas ótimas em laboratório podem favorecer o processo espermatogênico durante o período de

inverno. Fatores genéticos diferenciam a regulação hormonal do ciclo sexual de duas raças de *Leptodactylus ocellatus* na Argentina. Na primeira, reticulata, os machos apresentam espermatogênese contínua, e na segunda, típica, há interrupção estacional da atividade espermatogênica (CEI, 1950).

Os testículos de anuros são descritos como órgãos pares, arredondados, compactos, geralmente amarelados, esbranquiçados ou branco-leitosos. Provavelmente, apresentam variações anatômicas de forma e peso de acordo com o período reprodutivo (DUELLMAN e TRUEB, 1994), e outras alterações morfofuncionais associadas à reprodução (LOFTS, 1974), como descrito para algumas espécies (MONTERO e PISANÓ, 1990, 1992; LAMPO e MEDIALDEA, 1996; HUANG et al., 1997; OLIVEIRA; VICENTEINI, 1998). Os testículos são revestidos pela túnica albugínea com parênquima testicular constituído por tecido germinativo arranjado em lóbulos seminíferos delimitados por tecido conjuntivo frouxo (OLIVEIRA e VICENTINI, 1998; OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA e ZIERI, 2005).

A caracterização dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino é importante para o aprimoramento das técnicas de manejo da rã-touro. A morfologia dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino dessa espécie mostrou em nível de microscopia de campo de luz, um testículo com diferentes fases morfológicas. Túbulos seminíferos, estruturas enoveladas e envoltas por tecido conjuntivo, foram observadas em seu interior cujo lume varia de diâmetro com o desenvolvimento. O processo de espermatogênese ocorre continuamente nos indivíduos adultos de rã-touro (COSTA et al., 1998).

Espécies de anfíbios anuros que habitam regiões tropicais e subtropicais, em que a temperatura ambiental não é sujeitam a grandes flutuações sazonais apresentam produção contínua de espermatozoides durante todo o ciclo reprodutivo anual (LOFTS, 1974).

Os testículos e ovários das três ordens de anfíbios estão conectados por meio de ductos genitais próprios, constituindo a via gametogênica representada pelos ductos eferentes e de Wolff, nos machos, e pelos ovidutos ou ducto de Müller, nas fêmeas. Estruturas vestigiais, que

permanecem como não funcionais como órgão de Bidder, que ocorrem em machos. (OLIVEIRA et al., 2003, 2007)

A análise da anatomia e histologia testicular de *Dendropsophus minutus*, concluiu que o ciclo gametogênico é contínuo (OLIVEIRA et al. 2007).

Os machos de rã-touro com peso acima de 45 g encontravam em processo de maturação e animais com peso médio de 240,42 g já poderiam ser considerados reprodutores em potencial. Pode-se afirmar que os machos de rã-touro apresentam precocidade sexual (LIMA et al.,1998),

2.8 Morfologia dos espermatozoides de anuros

Poucos trabalhos estudaram biologia reprodutiva e a morfologia externa do espermatozóide de anuros.

Os espermatozoides dos anfíbios são, geralmente, células alongadas e modificadas para nadar, tendo cabeça e cauda com peça intermediária e principal (DUELLMAN e TRUEB, 1994). A formação desses gametas envolve um processo extenso e complexo, iniciando com a proliferação e diferenciação das espermatogônias, passando pela meiose e terminando com a espermiogênese (RASTOGI et al., 1988), alterações morfológicas e bioquímicas que transformam as espermatídes em espermatozoides (PHILIPS, 1974).

De 11 espécies de anuros da Índia de Sri Lanka, três do gênero *Limnonectes* e a *Euphlyctis hexadactylus* apresentaram espermatozoides com cabeça cilíndrica e cauda fina. Os tamanhos dos espermatozoides em sete espécies do gênero indiano *Rana* (*Limnonectes*, *Euphlyctis*, e *Hoplobatrachus*), praticamente tiveram mesmo tamanho e não evidenciaram qualquer divergência na morfologia de seus espermatozoides (KURAMOTO E JOSHY, 2000, 2001).

Análises ultra estruturais da espermiogênese de *Eupemphix nattareri* (Anura, Leiuperidae), mostraram a vesícula acrossômica alongada e cônica, o *perforation* é uma estrutura cônica alongada, fibrilar e eletrodensa. A peça intermediária apresenta dois centríolos perpendiculares embebidos no material pericentriolar, onde se encontra o centríolo distal, responsável pelo desenvolvimento do flagelo. A cauda consiste de um axonema, uma fibra

justaxonemal, e na região mediana da cauda se encontra uma extensa membrana ondulante (ZIERI et al., 2008).

Os espermatozoides de *Rhacophorus chenfui*, *R. dugritei*, *R. dugritei* e *R. omeimontis* são semelhantes (QIN et AL., 2008) e para *R. viridis amamiensis*, *R. owstoni* e *R. moltrecht*, possuem cabeça e cauda fina enrolada (KURAMOTO, 1996).

Espermatozoides anormais cauda enrolada, macroencefalia, microencefalia, gota proximal, cabeça isolada normal, gota distal e cauda dobrada foram encontrados no sêmen de rã-manteiga e rã-touro (Pereira, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi executado no Ranário Experimental do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, de 6/4 a 7/6/2009.

3.1 Coleta dos animais

A coleta dos animais, autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA/SISBIO 17.152-1), foi realizada no período de fevereiro a abril de 2008 e fevereiro a abril de 2009, nos municípios mineiros de Viçosa, Cajuri, Timóteo e Governador Valadares (Tabela 1). As coordenadas dos locais visitados foram aferidas com GPS, modelo GARMIN 12, com precisão de 3 m.

Os animais foram coletados com o puçá e de uma lanterna de mão, das 18h 30 às 23h. Após a captura, foram individualmente marcados com fios coloridos amarrados no membro posterior direito, todos com uma numeração pré estabelecida (CAMARGO FILHO, 2009), e acondicionada em sacos plásticos transparentes. Um termômetro digital infravermelho para verificação foi utilizado da temperatura da água onde os exemplares foram coletados. Esses dados foram anotados em um caderno de campo.

TABELA 1. Identificação das áreas predeterminadas para coleta de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*), com data das coletas, temperatura do local no momento das coletas, municípios, local e coordenadas

	Animais							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Datas da coleta	10/02/08	28/02/08	17/03/08	05/04/08	08/02/09	02/03/09	03/04/09	18/04/09
Temperatura (°C) no momento da coleta	24	27	20	21	25	20	21	26
Município/MG	Timóteo	Governador Valadares	Viçosa	Cajuri	Timóteo	Cajuri	Viçosa	Timóteo
Local da coleta	Sítio Maanaim	Sítio Valadares	Nova Viçosa Sítio do Grilo	Sítio do Clube	Sítio Maanaim	Sítio do Clube	Fruticultura UFV	Sítio Maanaim
Coordenadas	S19° 34' 57" W 42° 38' 40"	S18° 51' 04" W41° 56' 58"	S 20° 46' 18,9" W 42° 53' 56,1"	S 20° 47' 26" W 42° 47' 48"	S19° 34' 57" W42° 38' 40"	S 20° 47' 26" W 42° 47' 48"	S 20° 45' 27,1" W42° 52' 07,9"	S19° 34' 57" W42° 38' 40"

Número de animais/município – Viçosa: 2; Cajuri: 2; Timóteo: 3; Governador Valadares: 1.

Os exemplares coletados eram todos machos, aptos à reprodução (Figura 1), localizados pela vocalização. Foi encontrado no polegar de cada pata anterior um acúleo nupcial proeminente e alguns deles apresentaram acúleos na região ventral superior da cintura escapular (Figura 2). Os animais responderam ao estímulo sexual (massagem com os dedos na região da cintura escapular) com um amplexo vigoroso.



FIGURA 1. Membro anterior desenvolvido de macho de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*).



FIGURA 2. Acúleos na região ventral superior de machos de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*).

Os animais coletados foram transportados em caixas de polietileno (45 x 25 x 35 cm) para o laboratório do Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa, onde se foi feita a biometria. Eles foram pesados em balança digital com precisão de 0,01 g e medidos com paquímetro digital de 0,001 cm de precisão. Logo após, os exemplares foram levados para baias individuais, com 1,54 m² cada, identificadas por números, onde havia dois comedouros e um pequeno reservatório de água (Figura 3). A temperatura de cada baia foi controlada por com termostato, a $25,0 \pm 1,5$ °C.

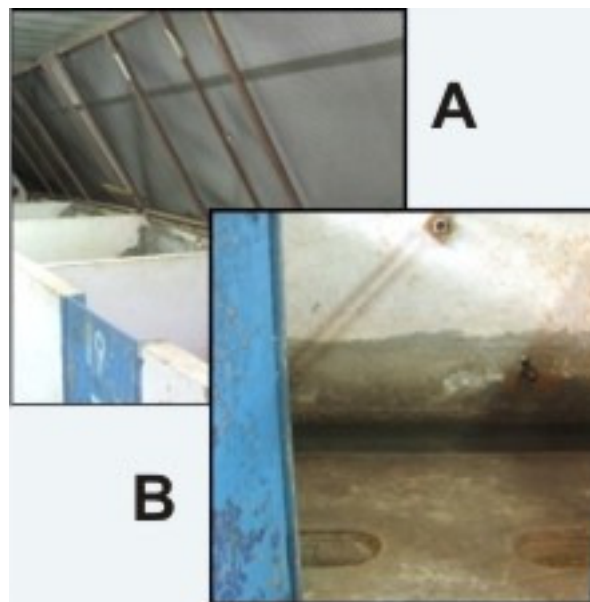


FIGURA 3. Vista geral das baias utilizadas para alojar os machos de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*). A- vista externa superior e B – vista interna frontal.

Os fotoperíodos adotados foram de 12:12 LD para quatro e de 14:10 LD para as outras quatro, com lâmpadas incandescentes de 100 W, controladas por um temporizador (Tabela 2).

Grades sobre cada baia foram colocadas para evitar fugas.

Cinco animais morreram (baias 1, 2, 4, 5 e 7) Durante o período de adaptação e por isto, trabalhou-se com três animais (baias 3, 6 e 8).

TABELA 2. Fotoperíodos de cada baia onde estavam acondicionados os exemplares de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*)

Número da baia	Fotoperíodo
3	12:12 LD
6	12:12 LD
8	14:10 LD

3.2 Manutenção dos animais em laboratório

O manejo diário das baias com os exemplares de rã-pimenta, aptos à reprodução, era realizado pela manhã; quando a água do reservatório interno de cada baia era trocada, para eliminação das impurezas: fezes, urina e girinos e imagos de rã-touro.

Girinos e imagos de rã-touro *ad libitum* foram fornecidos aos exemplares, todas as manhãs. Essa alimentação foi ofertada de fevereiro de 2008 a março de 2009. Entretanto, esse alimento não foi bem aceito pelos animais, o que pode ter prejudicado o desenvolvimento gonadal, dos mesmos. Por isto a partir de abril de 2009, a alimentação induzida com filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*) na proporção de 5% do peso vivo (PV) dos animais. O alimento era pesado e cortado, com uma tesoura, em pedaços de aproximadamente 9 cm² e colocado na cavidade bucal dos animais, onde o próprio animal deglutia-o aos poucos. Esperavam-se alguns instantes para que o alimento era ingerido em sua totalidade (CAMARGO FILHO, 2009). Esse procedimento ocorria nas baias onde os animais se encontravam. Estes foram capturados com uma toalha de mão, a qual cobria os olhos, a fim de diminuir o estresse (Figura 4).



FIGURA 4. Abertura da cavidade bucal para início da alimentação induzida utilizando uma toalha de mão para vendar os olhos da rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*).

Esse procedimento foi realizado a cada 24 h. O alimento foi ofertado duas vezes ao dia quando os animais atingiam um PV de 500 g, na proporção de 2,5% do PV pela manhã e 2,5% do PV à tarde. Esse manejo foi utilizado para se evitar o regurgitamento do alimento.

Semanalmente, os animais eram retirados das baias para limpeza e desinfecção do piso e das paredes, especialmente do reservatório de água. Os animais foram pesados, em balança digital com precisão de 0,01 g, e medidos com paquímetro digital de 0,001 cm de precisão (Tabelas 3 e 4 e Figuras 5 e 6), para se ajustar o alimento a ser fornecido.

TABELA 3. Peso (g) dos exemplares de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) durante a alimentação induzida com tilápia (*Oreochromis niloticus*)

	Peso (animal) g							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Dia Coleta	354,33	283,25	405,68	351,25	276,98	288,12	633,67	516,72
06/04/2009	350,40	281,03	401,25	292,36	260,23	278,52	613,33	499,63
13/04/2009	383,65	303,54	430,69	322,14	395,63	315,24	641,20	528,87
20/04/2009	443,33	399,93	500,68	480,77	351,55	368,50	728,50	650,09
27/04/2009	540,69	461,40	617,12	576,12	395,05	409,05	860,60	704,44
04/05/2009	577,60	524,03	705,88	657,25	439,12	438,48	939,03	775,73
11/05/2009	634,60	578,15	769,60	719,40	509,50	496,62	994,50	829,00
18/05/2009	679,20	645,84	797,29	776,93	521,46	514,22	1.137,38	857,53

M: mortalidade.

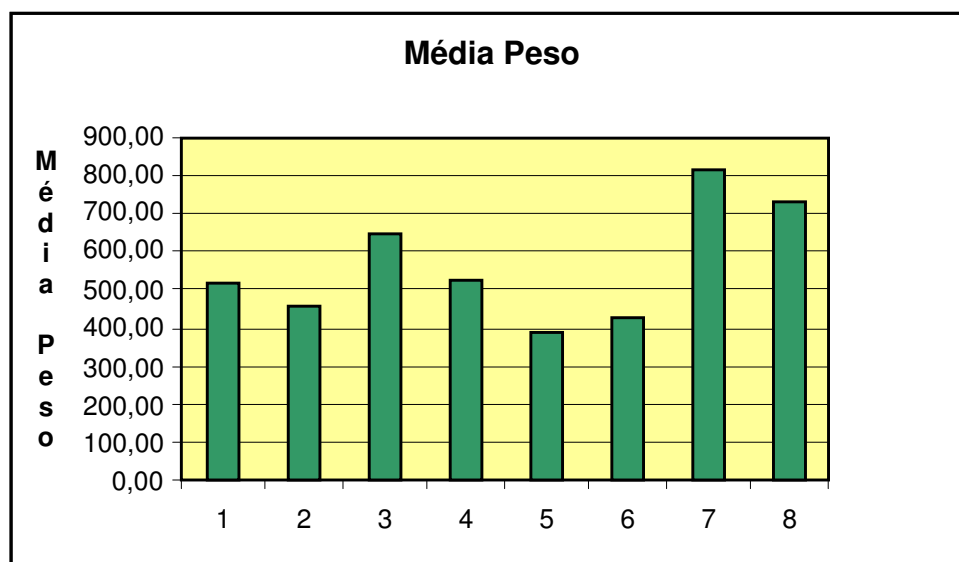


FIGURA 5. Peso dos exemplares de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) durante a alimentação induzida com tilápia (*Oreochromis niloticus*).

TABELA 4. Comprimento rostro-cloacal (CRC) dos exemplares de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) durante a alimentação induzida com tilápia (*Oreochromis niloticus*)

Coleta	CRC (animal) cm							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	cm							
06/04/2009	16,50	17,00	18,00	18,00	15,00	17,00	19,00	18,00
13/04/2009	16,50	17,00	18,00	18,00	15,00	17,00	19,00	18,00
20/04/2009	16,50	17,00	18,00	18,00	15,00	17,00	19,50	18,00
27/04/2009	16,50	17,50	18,50	19,00	15,00	17,00	19,50	18,50
04/05/2009	17,00	17,50	18,50	19,00	15,50	17,50	20,00	18,50
11/05/2009	17,00	17,50	18,50	19,00	15,50	17,50	20,00	18,50
18/05/2009	17,50	17,50	19,00	19,50	15,50	17,50	20,50	18,50
25/05/2009	17,50	17,50	19,00	M	M	18,00	20,50	18,50
01/06/2009	M	M	19,00	-	-	18,00	M	18,50
07/06/2009	-	-	19,00	-	-	18,00	-	18,50

M: mortalidade.

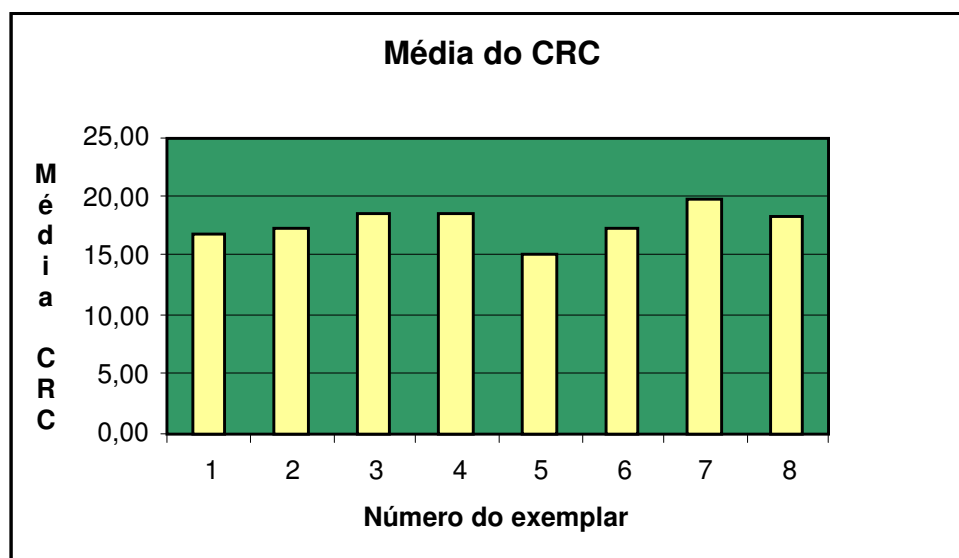


FIGURA 6. Comprimento rostro-cloacal (CRC) dos exemplares de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) durante a alimentação induzida com tilápia (*Oreochromis niloticus*).

3.3 Preparo e aplicação do GnRHa nos exemplares de rã-pimenta

Os animais permaneceram em jejum durante 48 h, para expurgo do conteúdo intestinal e foram submetidos à biometria. O peso foi obtido com balança digital com precisão de 0,01 g, e o comprimento rostro cloacal (CRC) foi medido com paquímetro digital de 0,001 cm de precisão. Logo após, os animais foram induzidos com o hormônio, na cavidade celomática, utilizando-se uma seringa hipodérmica com agulha de 25 x 0,7 mm (PEREIRA, 2009). O animal era segurado pelas patas posteriores, com auxílio de uma toalha de mão para facilitar a aplicação hormonal (Figura 7). Esse trabalho foi realizado em cada baia, para que o animal permanecesse no seu ambiente e não sofresse variações de temperatura e de ambiente.



FIGURA 7. Aplicação hormonal na cavidade celomática de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*).

A aplicação foi realizada com cinco doses de 0,1 mL (0,4 µg) do hormônio no primeiro dia, no intervalo de uma hora; No segundo dia, após 24 h da primeira aplicação do primeiro dia, três doses de 0,1 mL (0,4 µg) do mesmo hormônio foram aplicadas, cada uma no intervalo de uma hora (Tabela 5). Esse número de doses no segundo dia se deveu ao fato de se

ter observada, na terceira dose, a presença de espermatozóides, e, por isso, a partir daí, foi feita a análise espermática do sêmen. Esse procedimento foi repetido após sete dias.

TABELA 5. Tempo de aplicação x dose hormonal (acetato de buserelina) nos exemplares de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*)

Aplicação Primeiro dia	Dose hormonal	Aplicação Segundo dia	Dose hormonal
T0 – 0 hora	0,1 mL	T24 – 24 ^a hora	0,1 mL
T1 – 1 ^a hora	0,1 mL	T25 – 25 ^a hora	0,1 mL
T2 – 2 ^a hora	0,1 mL	T26 – 26 ^a hora	0,1 mL
T3 – 3 ^a hora	0,1 mL		
T4 – 4 ^a hora	0,1 mL		
T5 – 5 ^a hora	0,1 mL		

3.4 Coleta do sêmen

Cinco coletas do sêmen dos exemplares de rã-pimenta foram realizadas, no primeiro dia, com intervalos de uma hora; com uma pipeta de vidro de 2 mL, introduzida na cloaca dos animais para retirada do volume seminal. Ao mesmo tempo, foi feita com os dedos uma massagem na cavidade celomática próxima à região pélvica, para facilitar a coleta do sêmen (PEREIRA, 2009). Esse procedimento foi realizado dentro de cada baia, para se evitar variações bruscas de temperatura e ambiente (Figura 8).



FIGURA 8. Coleta do sêmen de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*), dentro da baia individual, utilizando-se pipeta de vidro de 2 mL.

3.5 Análise microscópica do sêmen

Um microscópio de campo claro (aumento de 400x) foi utilizado para verificar a ação do tratamento (presença de espermatozoides). Uma alíquota, correspondente ao valor de uma gota do sêmen (aproximadamente 0,05 mL), era colocada na lâmina, sobre a qual depositava-se uma lamínula para ser analisada com coloração *in natura*.

As lâminas com espermatozoides foram coradas com solução 1% de azul de metileno, (sal designado de cloreto de azul de metileno) após essa análise inicial, para evidenciar os espermatozoides, obtendo-se a cor azul das células, melhorando assim a sua visualização.

3.6 Características seminais de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*)

3.6.1 Volume e cor

O volume de sêmen coletado na cloaca do animal foi colocado em uma proveta graduada de vidro transparente de 10 mL onde foi aferido o volume. A cor do sêmen foi classificada em transparente (nota 1) e turva (nota 2) (PEREIRA, 2009).

3.6.2 Vigor, motilidade e concentração espermática

O vigor foi classificado de 0 a 5, e a motilidade espermática, estimada em porcentagem média de espermatozoides móveis, com aumento de 400x. A concentração espermática foi estimada em uma câmara de Neubauer. Uma gota de sêmen foi diluída em formol 10% na proporção de 1:1. A solução obtida foi colocada na câmara de Neubauer, e os espermatozoides contados sobre cinco quadrados do campo de 1 mm² de acordo com a fórmula a seguir:

$$\begin{array}{ll} \text{número médio de espermatozoides} \times 25 \dots\dots\dots & 0,0001 \text{ cm}^3 \\ \text{x espermatozoides} \dots\dots\dots & 1 \text{ cm}^3 (= 1 \text{ mL}) \end{array}$$

Foi obtida, assim, a quantidade de espermatozoides por mL (SPTZ/mL).

3.7 Comprimentos totais da cabeça, da membrana ondulante que envolve a cabeça, da área da cabeça e comprimentos da cauda do espermatozoide de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*).

Os espermatozóides que ofereciam o melhor foco para visualização, em um total de 28 espermatozóides e seu comprimento total, da cabeça, da membrana ondulante que envolve a cabeça, da área da cabeça e comprimentos da cauda do espermatozoide de rã-pimenta foram mensurados, com auxílio do programa de análises de imagem IMAGE PRO PLUS[®]. A membrana que envolve a cabeça só foi medida em algumas células, devido à dificuldade de sua visualização.

A medição da peça intermediária dos espermatozoides de rã-pimenta não foi mediada, devido ao grau de dificuldade em determinar o ponto exato de seu início e fim.

3.8 Análise dos dados

As análises estatísticas foram feitas de acordo com o programa Microsoft Office Excel[®], para estatísticas descritivas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resposta dos exemplares de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) à indução à espermiacção com acetato de busserelina

Um dos três animais induzidos com o hormônio, 33,33% (animal 8), apresentou espermatozoides no sêmen. Os demais animais, não responderam ao estímulo hormonal (66,67%) (Tabela 6).

A sazonalidade e abundância de alimentos, além de fatores comportamentais, hormonais e fisiológicos são responsáveis pelo sucesso reprodutivo. Alterações de fatores ambientais, como o fotoperíodo e a temperatura, são detectadas por receptores específicos transmitidos ao cérebro e ao hipotálamo, alterando a produção e liberação de hormônios. O controle de luz e temperatura pode alterar os níveis de andrógenos circulantes nos animais. O animal com resposta positiva à presença de espermatozoides, estava nas mesmas condições de temperatura e umidade que os demais animais, apresentou as mesmas características sexuais secundárias, e recebeu o mesmo manejo em condições de fotoperíodo (14:10 LD) mais propícias para o seu desenvolvimento reprodutivo.

TABELA 6. Análise da presença de espermatozoides de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) nos oito tempos de coleta

Parâmetros/animais	Presença (+) ausência (-) de espermatozoides							
	T1	T2	T3	T4	T5	T24	T25	T26
3	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	+

T1: Tempo 1=1h após a primeira aplicação; T2: Tempo 2=2h após a primeira aplicação; T3: Tempo 3=3h após a primeira aplicação; T4: Tempo 4=4h após a primeira aplicação; T5: Tempo 5=5h após a primeira aplicação; T24: Tempo 24=24h após a primeira aplicação; T25: Tempo 25=25h após a primeira aplicação; T26: Tempo 26=26h após a primeira aplicação.

A resposta positiva ao tratamento de 33,33% é menor aos 100% encontrado para rã-touro e a quantidade de espermatozoide foi uniforme e o tempo de espermição prolongado (ALONSO 1997), espécie (PEREIRA, 2009) e habitat natural pode ser resposta para diferença.

O valor encontrado para rã-pimenta é inferior aos 42,9% dos machos de rã-manteiga que espermiaram (PEREIRA, 2009). A espécie pode explicar a diferença.

Resposta positiva para outras espécies de anuros submetidos à indução espermiática pelo hormônio (hCG) foi encontrado para *Rana nigromaculata* (KOBAYASHI et al., 1993) e *Bufo arenarum* (POZZI e CEBALLOS, 2000). O GnRH e o hCG induziram anuros a espermição.

A presença de espermatozoides no sêmen de rã-pimenta foi observado após 26 h da primeira indução, o hormônio pode ter sido insuficiente para liberar espermatozoides.

O tempo de 26 h é inferior ao encontrado para rã-touro, onde se levou 1 h (AGOSTINHO, 2000; PEREIRA, 2009), 2 h (AFONSO, 2004) e 3 h (TORTELLY NETO, 2006), e superior as 97,5 h para rã-manteiga (PEREIRA, 2009), os resultados revelam diferentes respostas para as espécies de rã-pimenta, rã-touro e rã-manteiga, e a causa pode ser a concentração hormonal existente em cada espécie e a especificidade da ação do hormônio. Os resultados afirmam que a espermatogênese de anfíbios é dependente dos hormônios andrógenos (CALLARD, 1992).

4.2 Análise do sêmen

4.2.1 Volume e cor

A análise do volume do sêmen coletados nos exemplares de rã-pimenta encontrou média de 0,19 mL (tabela 7), valor inferior aos 0,40 mL para rã-manteiga (PEREIRA, 2009) e 5,76 mL para rã-touro (PEREIRA, 2009), pode estar relacionada ao comportamento reprodutivo dessa espécie, onde a fêmea de rã-pimenta põe ovócitos em ninhos e durante o acasalamento ocorre batimento das patas posteriores do macho, formando uma camada de espuma. O reduzido espaço e o fato da desova não estar

diretamente em contato com a água e desnecessário grande volume de sêmen.

TABELA 7. Volume do sêmen coletado na cloaca de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) em oito tempos de coleta

Parâmetros/animais	Volume							
	T1	T2	T3	T4	T5	T24	T25	T26
	mL							
3	0,1	0,4	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
6	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
8	1,0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1
MÉDIA	0,43	0,30	0,20	0,16	0,10	0,10	0,20	0,10
MÉDIA TOTAL	0,19							

T1: Tempo 1=1h após a primeira aplicação; T2: Tempo 2=2h após a primeira aplicação; T3: Tempo 3=3h após a primeira aplicação; T4: Tempo 4=4h após a primeira aplicação; T5: Tempo 5=5h após a primeira aplicação; T24: Tempo 24=24h após a primeira aplicação; T25: Tempo 25=25 h após a primeira aplicação; T26: Tempo 26=26 h após a primeira aplicação.

A cor do sêmen de rã-pimenta com presença ou ausência de espermatozóide permanecendo sempre transparente. Portanto, a cor do sêmen de rã-pimenta não serve para indicar presença de espermatozoides. Resposta é diferente da cor turva encontrada para rã-manteiga e rã-touro (PEREIRA, 2009) indicando assim, para essas espécies, que a cor pode indicar presença de espermatozóide.

4.2.2 Vigor, motilidade e concentração espermática

O valor do vigor espermático encontrado foi de 1,0 para rã-pimenta revela baixo vigor espermático. Observações no microscópio óptico de campo claro mostraram que os espermatozoides possuem movimento retilíneo, com leves dobras da cabeça de um lado para o outro e lento, mas de velocidade constante. Isso pode estar ligado ao fato de que, o vigor espermático e o gasto energético diretamente proporcionais. Os espermatozoides têm de ter reserva de energia para vencerem a barreira natural criada pela espuma de albumina, considerada densa, e fecundem os poucos ovócitos viáveis. Essa característica pode também ser devido ao fato do movimento das patas posteriores dos machos para formar a

espuma de albumina, auxilia o deslocamento e distribuição dos espermatozoides por toda a desova durante ao acasalamento.

O vigor espermático de 1,0 é inferior aos 2,55 encontrados para rã-touro portadora de micobacteriose (AFONSO, 2004), aos 3,71 para rã-manteiga e aos 4,80 para rã-touro (PEREIRA, 2009). A espécie pode explicar a diferença.

A motilidade espermática de 25%, ou seja, 25 células móveis para cada 100 células vivas ou viáveis. Esta avaliação subjetiva pode apresentar variações entre observadores, a análise da motilidade é importante para a avaliação da qualidade do sêmen. O sêmen de rã-pimenta apresenta baixo valor, mas não pode concluir que seja de baixa qualidade. A fêmea de rã-pimenta desova aproximadamente 2.000 ovócitos, dos quais cerca de 85% são tróficos, ou seja, destinados à alimentação dos girinos no ninho (PRADO et al., 2005).

A motilidade espermática encontrada em rã-pimenta de 25% é inferior aos 67% encontrado para rã-touro portadora de micobacteriose (TORTELLY NETO, 2006), aos 93% para rã-touro e 77,14% para rã-manteiga (PEREIRA, 2009), a espécie pode explicar a diferença.

A concentração espermática encontrada para rã-pimenta foi de $1,1 \times 10^6$ SPTZ/mL é inferior aos $14,24 \times 10^6$ SPTZ/mL encontrados para rã-touro e aos $6,60 \times 10^6$ SPTZ/mL rã-manteiga (PEREIRA, 2009) e também foi inferior a $5,09 \times 10^6$ SPTZ/mL para rã-touro portadora de micobacteriose (TORTELLY NETO, 2006).

Os valores de volume, vigor, motilidade e concentração espermática são inferiores aos encontrados para outras espécies de rãs, uma explicação pode ser a estratégia reprodutiva de cada espécie.

4.3 Análise da morfologia externa e da morfometria do espermatozoide de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*)

O espermatozoide de rã-pimenta (Figuras 9 e 10) possui cabeça alongada com pequena concavidade na parte inicial (região acrossômica) (figura 12) e é mais delgada, parte final (região de inserção da cauda), mais espessa. Portanto, a largura da cabeça aumenta em pequena

proporção da região acrossômica até a região de inserção da cauda, tornando-a bem mais densa do que esta, o que o deixa quase que fusiforme.

Área total da cabeça (sem mensurar a membrana ondulatória) de $29,80 \mu\text{m}^2$, comprimento de $13,31 \mu\text{m}$ e largura de $2,23 \mu\text{m}$ do espermatozóide de rã-pimenta, o que a faz destacar-se na visualização ao microscópio de luz de campo claro.

O comprimento da cauda do espermatozóide de rã-pimenta de $35,64 \mu\text{m}$ é quase um terço do seu comprimento total (Tabela 8).

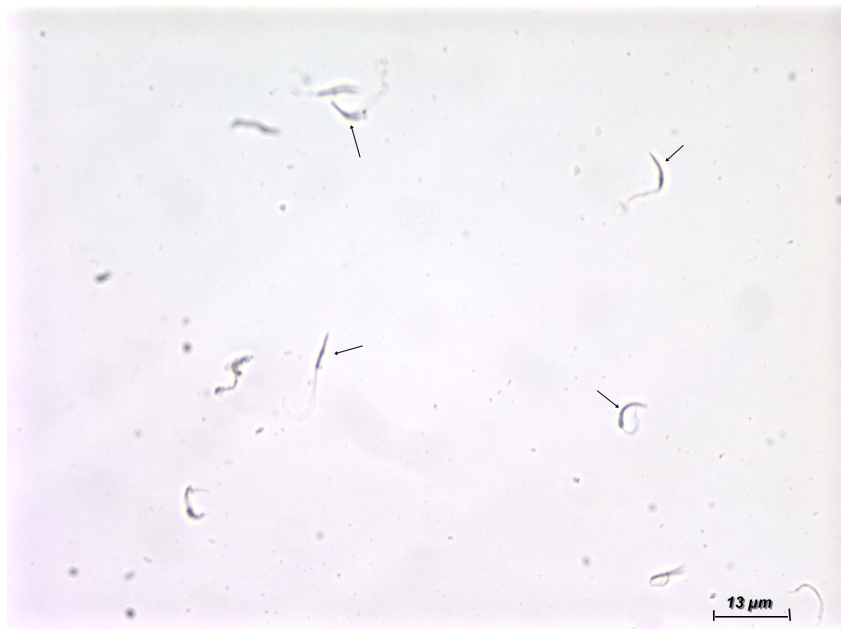


FIGURA 9. Fotomicrografia de luz de espermatozoides de rã-pimenta *Leptodactylus labyrinthicus* (destacados pela seta). Obj 40, zoom 2.

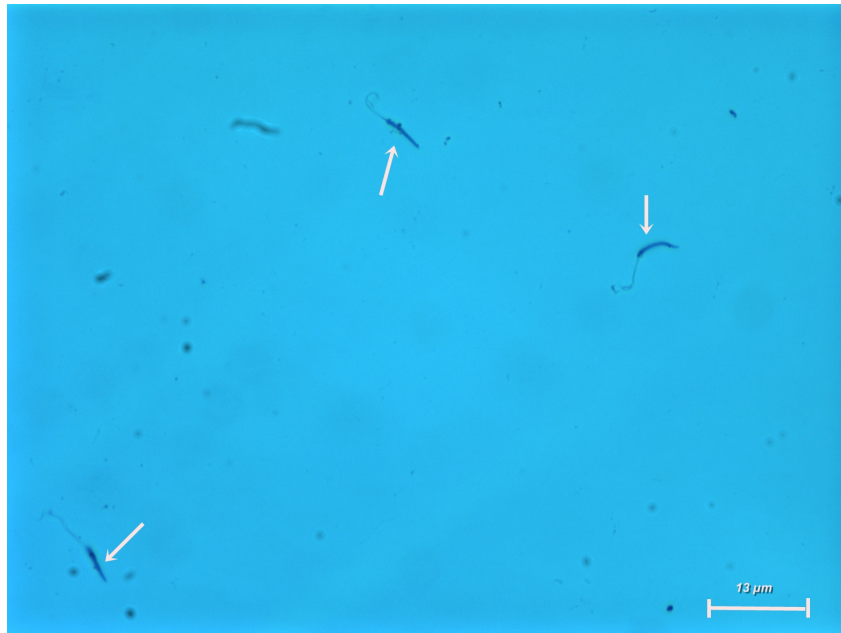


FIGURA 10. Fotomicrografia de luz de espermatozóides de rã-pimenta *Leptodactylus labyrinthicus* (destacados pela seta). Obj 40, zoom 2, corada com azul de metileno.

A cauda do espermatozóide de rã-pimenta insere-se na região posterior à peça intermediária e se alonga em um único filamento até aproximadamente um terço de seu comprimento total, onde bifurca-se em dois flagelos finos e alongados, tornando-se biflagelada (Figura 11). Esses flagelos possuem o mesmo comprimento e a mesma largura, vistos ao microscópico de campo de luz. A largura do flagelo não foi medida, devido ao grau de dificuldade para delimitá-la.

O movimento da cauda é ondulatório; cada flagelo movimenta-se independentemente, mas de forma sincronizada, formando-se ondas contínuas com movimentos simultâneos. Esses dois flagelos, juntos, provavelmente impulsionam e proporcionam mais força e capacidade para o espermatozóide romper a barreira de espuma de albumina que circunda os ovócitos.

TABELA 8. Comprimentos totais, da cabeça, área da cabeça (μm^2) e comprimento da cauda do espermatozóide (SPTZ) de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*), em μm

SPTZ	Comprimento Total	Comprimento da Cabeça	Área da Cabeça (μm^2)	Comprimento da Cauda
	μm			
1	61,97	14,62	33,12	28,85
2	72,12	14,33	34,02	38,10
3	64,88	15,29	34,23	30,64
4	61,67	14,89	33,01	28,65
5	35,81	7,82	19,98	15,82
6	26,89	7,88	17,00	9,89
7	45,26	12,87	28,11	17,15
8	54,74	15,34	36,28	18,45
9	58,17	13,39	28,51	29,65
10	35,00	8,72	17,18	17,81
11	34,35	9,02	17,86	16,49
12	33,69	7,83	19,76	13,92
13	26,83	8,02	16,92	9,91
14	32,67	6,49	15,57	17,10
15	28,36	9,17	19,80	8,56
16	50,68	16,78	35,00	15,68
17	74,84	22,89	48,74	26,10
18	76,06	22,74	50,15	25,91
19	56,34	15,41	36,35	19,99
20	45,47	15,84	32,78	12,69
21	61,65	15,07	34,26	27,38
22	30,08	12,86	29,43	17,21
23	63,21	14,14	33,83	29,38
24	61,80	12,49	27,91	33,89
25	54,06	13,28	35,52	18,53
26	60,88	17,55	37,70	23,17
27	56,10	14,72	31,58	24,51
28	64,99	15,95	34,30	30,69
Média	51,02	13,31	29,80	21,31
DP	15,45	4,16	9,1200	7,8600

O número de flagelos na cauda de rã-pimenta difere de flagelos de *Phyllomedusa* sp. (COSTA et al., 2005), *Epipedobates hahneli* (AGUIAR JR. et al., 2004) e *Colostethus stepheni*, os quais possuem uma cauda com único

flagelo, porém é semelhante ao de *Colostethus brunneus*, que possui dois flagelos (VEIGA-MENOCELLO et al., 2006).

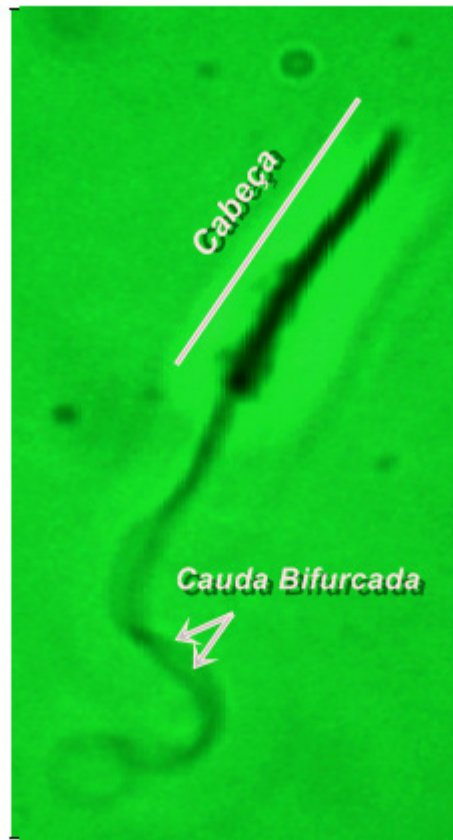


FIGURA 11. Fotomicrografia de luz de espermatozoides de rã-pimenta *Leptodactylus labyrinthicus*, evidenciando a forma da cabeça e a cauda bifurcada. Obj 40, zoom 2, corada com azul de metileno.

O filamento caudal pode ser diferente entre anfíbios, de acordo com seu modo de reprodução (ZIERI, 2008).

O espermatozóide de rã-pimenta possui membrana ondulante na região da cabeça, que tem o formato de circunferência e está inserida, inicialmente, na região da inserção da cauda, até aproximadamente o terço distal da região posterior acrossômica (Figura 12). A área da circunferência de $15,91 \mu\text{m}^2$, com raios de $2,85$ e $1,42 \mu\text{m}$, e aproximadamente 53% da área da cabeça do espermatozoide.

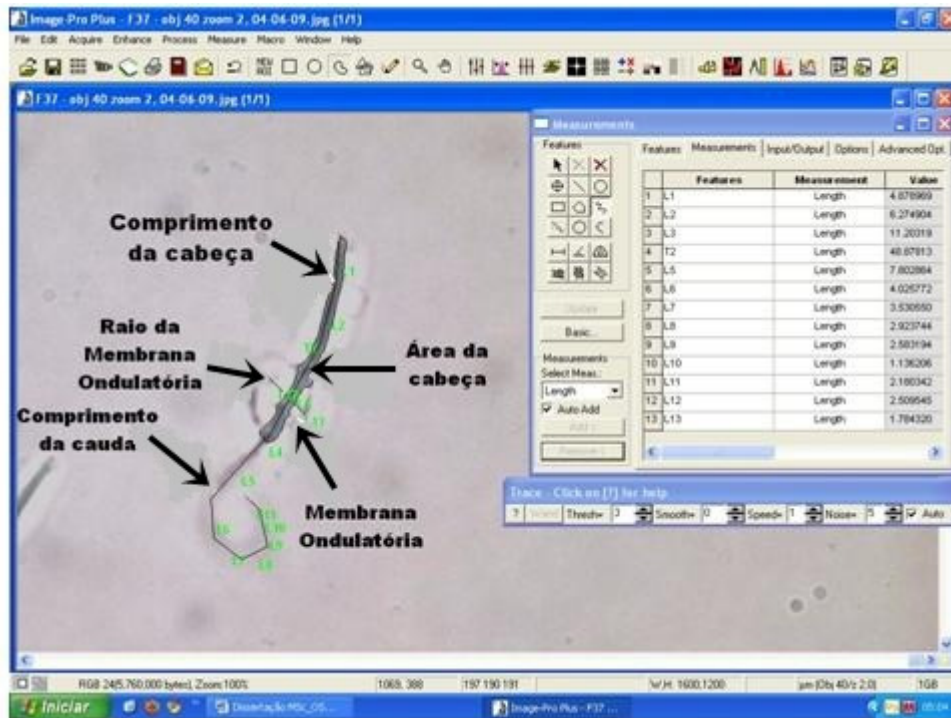


FIGURA 12. Fotomicrografia de luz de espermatozoides de rã-pimenta *Leptodactylus labyrinthicus* analisada pelo programa IMAGE PRO PLUS®. Obj 40, zoom 2, corada com azul de metileno 1%. L1–L3=comprimento da cabeça; T2=área da cabeça; L5–L11=comprimento da cauda; L12–L13=raios da Membrana ondulatória.

Apenas a delimitação de seu corpo pode-ser visualizado, ao microscópio óptico de campo de luz. Isso pode estar diretamente relacionado ao formato delgado do corpo, com aparência de um pequeno véu, que em meio à albumina provavelmente tem auxílio no deslocamento do espermatozóide em direção aos ovócitos. Não houve possibilidade de mensurar a sua espessura por ser delgada.

A membrana inserida na cabeça pode ser exclusiva dessa espécie, e pode ser uma característica importante para identificação do espermatozoide dessa espécie.

O espermatozoide de rã-pimenta, exceto pela membrana ondulatória, assemelha-se aos de outros anfíbios anuros, como *Colostethus brunneus* (VEIGA-MENOCELLO et al., 2006), *Phyllomedusa* sp. (COSTA et al., 2004), *Crossodactylus* sp. e *Epipedobates hahneli* (AGUIAR JR. et al., 2004).

A área da cabeça, comprimento total, da cabeça, cauda e membrana do espermatozoide de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) e de alguns anuros foram comparados (tabela 9).

TABELA 9. Área da cabeça (A), comprimento total (CT), da cabeça (CC) e da cauda (CCA) dos espermatozoides de alguns anuros

Medidas/animais	A	CT	CC	CCA
	μm			
<i>Leptodactylus labyrinthicus</i>	29,80	35,64	13,31	21,31
<i>Leptodactylus ocellatus</i> (PEREIRA, 2009)	NC	14,15	5,78	8,37
<i>Colostethus brunneus</i> (VEIGA-MENOCELLO et al. 2006)	NC	19,20	NC	NC
<i>Phyllomedusa sp.</i> (COSTA et al. 2004)	NC	60,62	NC	NC
<i>Epipedobates hahneli</i> (AGUIAR-JR et al. 2004)	NC	NC	23,20	32,00
<i>Lithobates catesbeianus</i> (PEREIRA, 2009)	NC	13,49	7,21	6,27

NC: não consta na literatura.

O espermatozoide de rã-pimenta é um dos maiores entre dos anuros, e pode ser usado para sua identificação, sendo o segundo em comprimento total, da cabeça e da cauda e menor, apenas, que o de *Phyllomedusa sp.* (COSTA et al., 2004).

5. CONCLUSÕES

A cor do sêmen de rã-pimenta não é parâmetro para indicar a presença de espermatozoides.

O espermatozoide de *Leptodactylus labyrinthicus* possui cauda com dois flagelos e uma membrana ondulante que envolve a parte inicial da região da inserção da cauda, até aproximadamente o terço distal da região posterior acrossômica da sua cabeça, a qual é exclusiva dessa espécie.

A descrição morfológica do espermatozóide poderá contribuir para estudos de sistemática filogenética de rãs.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O acetato de buserelina pode ser utilizado como indutor a espermição de rã-pimenta, ocorrendo a mesma na vigésima sexta hora após a sua aplicação. Quanto aos valores de vigor, motilidade e concentração espermática de *Leptodactylus labyrinthicus* são inferiores ao de *Lithobates catesbeianus*.

O comprimento total, da cabeça e da cauda do espermatozóide de rã-pimenta é maior que o de rã-manteiga e de rã-touro. O mesmo possui cauda com dois flagelos.

A dificuldade na coleta de campo e na criação em cativeiro pode interferir na realização de trabalhos com *Leptodactylus labyrinthicus*. Devido a este fato, faz-se necessária a realização de mais pesquisas para a criação em cativeiro, bem como a extração, diluição e criopreservação de sêmen extraído *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, A.F. Efeito do acetato de buserelina na indução á reprodução de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) naturalmente portadora de micobacteriose. 2004. 86f. **Dissertação** (Mestrado em Patologia e Reprodução Animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

AGOSTINHO, C.A.; WECHSLER, F.S.; NICTEROY, P.E.O.; PINHEIRO, D.F. Indução à ovulação pelo uso de LHRH análogo e fertilização em rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29 (5): 1261-1265, 2000.

AGOSTINHO, C.A. Estimativas dos parâmetros genéticos e fenotípicos de características e produção em rã-pimenta, *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824). 85f. **Dissertação** (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1988.

AGUIAR-JR, O., LIMA, A.P., BAÓ, S.N., RECCO-PIMENTEL, S.M. Sperm Ultrastructure of the Brazilian Amazon Poison frogs *Epipedobates trivittatus* and *Epipedobate hahneli* (Anura, Dendrobatidae). **Acta Zoologica**, 85 (1): 21-28, 2004.

AICHINGER, M. Annual activity patterns of anurans in a seatorial neotropical environment. **Oecologia**, 71 (1): 583-592, 1987.

ALONSO, M. Uso de análogos do GnRH para indução de desova e espermição em rã-touro, *Rana catesbeiana*, Shaw, 1802. 136f. **Tese (Doutorado)** - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 1997.

BRATTSTROM, B.H. Amphibian temperature regulation studies in the field and laboratory. **American Zoologica**, 19 (1): 345-356, 1979.

CALLARD, G.V. Autocrine and Paracrine role of esterooids during spermatogenesis: Studies in *Squalus acanthias* and *Necturus maculosus*. **Journal Experimental Zoologica**, 26 (1): 132-142, 1992.

CAMARGO FILHO, C.B. Características alimentares e potencial impactante da rã-touro *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802). 61f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2009.

CARDOSO, A.J.; SAZIMA, I. Batracofagia na fase adulta e larvária da rã-pimenta. *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824) – ANURA LEPTODACTYLIDAE. **Ciência e Cultura**, 29 (1): 1130-1132, 1972.

CEI, J.M. Amphibians of Argentina. **Monitore Zoológico Italiano**. 609p. 1980.

CEI, J.M. Factores genético- raciales que diferencian La regulacion hormonal Del ciclo sexual en *Leptodactylus ocellatus* de La argentina. **Acta zoologica Lilloana**, 9 (1): 395-426, 1949.

CEI, J.M. *Leptodactylus chaquensis* N. SP. Y El valor sistemático realde La espécie Linneana *Leptodactylus ocellatus* em La argentina. **Acta zoologica Lilloana**, 9 (1): 395-426, 1950.

COSTA, C.L.S.; LIMA, S.L.; ANDRADE, D.R.; AGOSTINHO, C.A. Caracterização morfológica dos estágios de desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 27 (4): 651-657, 1998.

COSTA, C.L.S.; LIMA, S.L.; ANDRADE, D.R.; AGOSTINHO, C.A. Caracterização morfológica dos estágios de desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 27 (4): 642-650, 1998.

COSTA, G. C., GARDA, A. A.; TEIXEIRA, R. D., COLLI, G.R., BÃO, S.N. Copmparative Analysis of the estrutura of three species, of *Phyllomedusa* (Anura, Hilidae). **Acta Zoologica**, 85 (1):257-262. 2004

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, 12 (1): 69-85, 2004.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. New York: McGraw-Hill. 1994.

EASLEY, K.A.; CULLEY JR. D.D.; HORSEMAN, N.D. et al. Environmental influences on hormonally induced spermiation of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Journal Experimental Zoologica**, v.207, n.3, p.407 - 416, 1979.

FIGUEIREDO, M.R.C.; LIMA, S.L.; AGOSTINHO. C.A.; BAÊTA, F.C. Efeito da temperatura e do fotoperíodo sobre o desenvolvimento da aparelho reprodutor de rã-touro (*Rana catebeiana* Shaw, 1802). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30 (3): 916-923, 2001.

FONTANELLO, D.; SOARES, H.A.; MANDELLI JR., J.; SANTOS, L.E.; PENTEADO, L.A.; CAMPOS, B.E.S.; REIS, J.M. Estação de reprodução da *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, criadas em ranário e a influência de fatores climáticos sobre o número de desova. **Boletim Instituto Pesca**, 11 (1): 123-130, 1984.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. 513p.

HEYER, W.R. Systematicsof the species group of the froggenus *Leptodactylus pentadactylus*, (Amphibia, Leptodactyidae). **Smithsonian Contributions to Zoology**, 301 (1): 43, 1979.

HOLLINGER, T.G.; CORTON, G.L. Artificial fertilization of gametes from the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. **Gamete Research**, 3 (1): 45-57, 1980.

HUANG, W. S.; LIN, J. Y.; YU, J. Y. L. Male reproductive cycle of the toad *Bufo menalostictus* in Taiwan. **Zoologica Science**, 14 (3): 497-503, 1997.

IELA, L.; PIERANTONI, R.E.; RASTOGI, R.K. Effect of temperature and light on the production of androgens in the male *Rana esculenta*. **Experientia**, 36 (1): 256-257, 1980.

JIM, J. Aspectos ecológicos dos anfíbios registrados na região de Botucatu, São Paulo (Amphibia, Anura). 332f. **Tese Doutorado**. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Botucatu-SP. 1980.

KOBAYASHI, T.; SAKAI, N.; ADACHI, K.; IWASAWA, H.; NAGAHAMA, Y. 17-alpha, 20-alpha-Dihydroxy-4-pregnen-3-one is the naturally occurring spermiation-inducing hormone in the testis of a frog *Rana nigromaculata*. **Endocrinology**, 133 (1): 321-327, 1993.

KURAMOTO, M. Generic Differentiation of sperm morphology in tree frogs from Japan and Taiwan. **Journal of Herpetology**, 30 (3): 437-443, 1996.

KURAMOTO, M.; JOSHY, S.H. Scanning electron microscopic studies on spermatozoa of anurans from Índia and Sri Lanka. **Amphibia-Reptilia**, 22 (2): 303-308, 2001.

KURAMOTO, M.; JOSHY, S.H. Sperm morphology of some Indian. **Herpetology**, 19 (1): 63-70, 2000.

LAMPO, M.; MEDIALDEA, V. Energy allocation patte marinus from two habitats in Venezuela. **Journal Tropical Ecology**, 12 (3): 321-331, 1996.

LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. Hábito carnívoro em rã-manteiga (*Leptodactylus ocellatus*) e rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 12. , Campinas, São Paulo **RESUMOS**. Campinas, SP. UNICAMP. 223 p. 1985.

LIMA, S.L.; COSTA, C.L.S.; AGOSTINHO, C.A.; ANDRADE, D.R.; PEREIRA FILHO, H.P. Estimativa do tamanho da primeira maturação sexual da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 27 (3): 416-420, 1998.

LOFTS, B. **Physiology of the amphibian**. New York: Academic Press, v.2. 592 p.1974.

MONTERO, R.; PISANÓ, A. Ciclo espermatogênico de dos espécies de *Telmatobius* del noroeste argentino. **Amphib-Reptilia**, v.11, p.97-110, 1990.

MONTERO, R.; PISANÓ, A. El ciclo espermatogênico anual de *Hyla putchella* andina: um análisis numérico. **Acta Zoologica Lilloana**, 41 (1): 173-180, 1992.

MORISAWA, M.; SUZUKI, R.; SHIMIZU, H.; MORISAWA, S.; YASUDA, K., Effect of osmolarity and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. **Journal Experimental Biology**, 187 (1): 95-103, 1983.

- OLIVEIRA, C.; SANTANA, A.C.; OMENA, P.M.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências**, 11 (1): 39-46, 2003.
- OLIVEIRA, C.; SANTOS L.R.S.; ZIERI, R. Variações anatômicas no aparelho reprodutor masculino de *Chaunus ornatus* (Wied-Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae) **Biota Neotropica**, 7 (1):m234-240. 2007.
- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C.A. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae), **Biociências**, 6 (1): 79-88, 1998.
- OLIVEIRA, C.; ZANETONI, C.; ZIERI, R. Morphology observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Ver. Chillena Anatomia**, 20 (3): 263-268, 2002.
- OLIVEIRA, C.; ZIERI, R. Pigmentação testicular em *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) com observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. **Revista Brasileira Zoologia**. 22 (2): 454-460. 2004.
- PEREIRA, M.M. Indução à espermiacção e características do Anuro nativo rã-manteiga (*Leptodactylus ocellatus*) e do exótico (*Lithobates catesbeianus*). 74f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2009.
- PHILLIPS, D. M. **Spermiogenesis**. New York: London Academic. 1974.
- POZZI, A.G.; CEBALLOS, N.R. Human Chorionic Gonadotropini-induced spermatiation in *Bufo anenarum* is not mediated by steroid biosynthesis. **General Comportamental Endocrinol**. 119 (1): 164-171, 2000.
- PRADO, C.P.A.; TOLEDO, L.F.; ZINA, J.; HADDAD, C.F.B. Trophic eggs in foam nests of *Leptodactylus labyrinthicus* (Anura, Leptodactylidae): an experimental approach. **Herpetological Journal**, 15 (1): 279-284, 2005.
- QIN, L. M.; ZHENG, Z. H.; JIANG, J. P.; XIE, F.; NO, Y. M. Sperm Morphology of Five *Rhacophorus* (Amphibia: Anura: Rhacophoridae) Species from China. **Asiatic Herpetological Research**, 11 (1): 105-109, 2008.
- RASTOGI, R. K.; BAGNARA, J. T.; IELA, L.; KRASOVICH, M. A. Reproduction in the Mexican leaf frog, *Ptychocheilus dacnicolor*. IV Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. **Journal of Morphology**, 197 (1): 277-302, 1988.
- RIBEIRO FILHO, O.P.R.; LIMA, S.L.; ANDRADE, D.R.; SEIXAS FILHO, J.T. Estudo da desova de Rã-touro, *Rana catesbeiana*, mediante indução do acasalamento. **Revista Brasileira Zootecnia**. 27 (2): 216-233, 1998.
- RIBEIRO FILHO, O.P. Uso de extrato bruto de hipófise na indução da desova de rã-touro. *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802). 50f. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1994.

RIBEIRO FILHO, O.P.; ANDRADE, D.R.; LIMA, S.L.; SEIXAS FILHO, J.T.; GONÇALVES, S. Reprodução induzida de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) com uso de extrato bruto hipofisário. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 27 (4): 658-663, 1998.

ROSEMBLIT, C.; POZZI, A.G.; CEBALLOS, N.R. Relationship between steroidogenesis and spermiation in *Rana catesbeiana* and *Leptodactylus ocellatus*. **Journal of Comparative Physiology B**, 176 (1): 559–566, 2006.

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

SANTANA, M.A. Estudo Anátomo-Histológico e morfométrico do Tubo Digestivo de Girinos de Rã-Pimenta, *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824). 61f. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 1998.

TORTELLY NETO, R. Tempos de coleta, avaliação espermática e histopatologia de machos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). 37f. **Dissertação** (Mestrado em Patologia e Reprodução Animal), Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. 2006.

VEIGA-MANOCELLO, A.C.; LIMA, A.P.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Sperm morphology of five species of *Colestethus* (Anura, Dendrobatidae) from Brazil, with phylogenetic comments. **Acta Zoologica**, 87 (1): 147-157, 2006.

ZIERI, R.; TABOGA, S.R.; OLIVEIRA, C. Espermiogênese em *Eupemphix nattereri* (Anura, Leiuperidae): aspectos ultra-estruturais. **Iheringia, Serie Zoologica**, 98 (2): 193-199, 2008.

APÊNDICE

Valores de comprimento rostro-cloacal (CRC) e peso de cada exemplar de rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*)

	CRC (animal) – cm								Média Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
	16,5	17	18	18	15	17	19	18	
	16,5	17	18	18	15	17	19	18	
	16,5	17	18	18	15	17	19,5	18	
	16,5	17,5	18,5	19	15	17	19,5	18,5	
	17	17,5	18,5	19	15,5	17,5	20	18,5	
	17	17,5	18,5	19	15,5	17,5	20	18,5	
	17,5	17,5	19	19,5	15,5	17,5	20,5	18,5	
	17,5	17,5	19	M	M	18	20,5	18,5	
	M	M	19	-	-	18	M	18,5	
	-	-	19	-	-	18	-	18,5	
Média	16,88	17,31	18,55	18,64	15,21	17,45	19,75	18,35	17,77

	Peso (animal) – g								Média Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
	354,33	283,25	405,68	351,25	276,98	288,12	633,67	516,72	
	350,40	281,03	401,25	292,36	260,23	278,52	613,33	499,63	
	383,65	303,54	430,69	322,14	395,63	315,24	641,20	528,87	
	443,33	399,93	500,68	480,77	351,55	368,50	728,50	650,09	
	540,69	461,40	617,12	576,12	395,05	409,05	860,60	704,44	
	577,60	524,03	705,88	657,25	439,12	438,48	939,03	775,73	
	634,60	578,15	769,60	719,40	509,50	496,62	994,50	829,00	
	679,20	645,84	797,29	776,93	521,46	514,22	1137,38	857,53	
	685,13	645,91	817,53	M	M	519,64	1.259,63	901,16	
	M	M	819,18	-	-	521,02	M	910,57	
	-	-	821,02	-	-	523,58	-	912,35	
Média	516,55	458,12	644,17	522,03	393,69	424,82	818,53	735,10	564,13
Desv.Padrão	2,44	149,36	103,88	75,21	61,61	54,19	49,47	46,14	67,78875

M: mortalidade.