

MARCELO MAIA PEREIRA

**INDUÇÃO À ESPERMIAÇÃO E CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DO ANURA
NATIVO RÃ-MANTEIGA (*Leptodactylus ocellatus*) E DO EXÓTICO RÃ-
TOURO (*Lithobates catesbeianus*)**

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

MARCELO MAIA PEREIRA

**INDUÇÃO À ESPERMIAÇÃO E CARACTERÍSTICAS SEMINAIS DO ANURA
NATIVO RÃ-MANTEIGA (*Leptodactylus ocellatus*) E DO EXÓTICO RÃ-
TOURO (*Lithobates catesbeianus*)**

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: 31 de julho de 2009.

Prof. José Teixeira de Seixas Filho

Dr. Rodrigo Diana Navarro

Profª. Sirlene Souza Rodrigues Sartori

Prof. Luiz Carlos dos Santos

Prof. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho
(Orientador)

Dedico aos meus pais

Jose Roberto e Leila

Meus irmãos

Fabiano e Renato

Minhas Tias

Vanda e Lúcia

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pelo conhecimento adquirido ao longo dos anos.

Ao Departamento de Biologia Animal pela oportunidade do curso de Pós-graduação em Biologia Animal.

Ao Professor Oswaldo Pinto Ribeiro Filho pela orientação durante a graduação e o mestrado, pela amizade, pelo convívio, pelos conselhos durante os 7 anos de convivência, pela atenção nos momentos em que precisei e pelas cachaças. Muito obrigado por acreditar no meu trabalho.

Ao Professor Luiz Carlos dos Santos pelos conselhos, pelos ensinamentos, pelas as idéias e por participar da banca examinadora sempre com excelentes idéias e pronto a ajudar.

Ao Professor Renato Neves Feio pelos conselhos, pelos ensinamentos e pelas orientações durante o mestrado.

Ao Professor José Cola Zanuncio aos conselhos, pelos ensinamentos e pelas orientações para elaboração e confecção deste trabalho, muito obrigado.

Ao Professor Jorge Abdala Dergam pelos conselhos e sugestões durante o mestrado.

Ao Professor Paulo Roberto Cecon pelas sugestões, pelas orientações, pelas informações e por sempre estar disposto a ajudar, muito obrigado.

Ao professor José Seixas Filho pela sua grande presença na banca examinadora, pelos conselhos, pelas orientações, pelas informações e pelo apoio.

Ao Professor Rodrigo Navarro, pela amizade, pelos valiosos conselhos durante a banca examinadora e os tempos de convívio e por sempre está disposto a ajudar.

A Professora Sirlene Souza Rodrigues Sartori muito obrigado pela participação na banca examinadora, pelos valiosos conselhos e informações que foram de grande importância para esta dissertação.

A todos os professores que de alguma forma me ajudaram.

Aos amigos de trabalho que sempre estiveram ao meu lado durante todo o trabalho ajudando de uma forma ou outra: Cláudio ou Lagartixa (companheiro de trabalho e bar), Ângela (pessoa que sempre esteve pronta a ajudar), Cristiano, (companheiro de trabalho, preocupações e lutas), Allan (grande amigo, sempre esteve pronto a ajudar, aconselhar e foi muito importante no aspecto psicológico

no final desta etapa), Roberto (companheiro de república e mostrou como a vida dá voltas e sempre bom ajudar as pessoas), Emanuel, Ronaldo; amigos obrigados pela ajuda nos trabalhos, companheirismo e dedicação.

Aos funcionários que sempre estiveram à disposição para ajudar tanto no trabalho braçal quanto nas idéias: Raimundo (muito obrigado), Everaldo, Paulo, Álvaro, Jose Antônio, Adnilson (muito obrigado) e João.

Aos meus pais José Roberto e Leila, e aos meus irmãos Fabiano e Renato pelo incentivo, amizade, dedicação, amor e apoio financeiro, falar a verdade não precisa dizer nada para eles, eles são minha família o que tenho de mais importante na minha vida.

Às minhas cunhadas Fernanda e Isabella pela amizade e elas sabem.

À Fernanda pela amizade, carinho, paciência e novos tempos.

Aos amigos Seu Júlio (muito obrigado), Piranho (amigão e companheiro), Mané (amigo, companheiro e sempre presente), Jabuti (grande amigo e ótimo conselheiro), Rodrigo (grande amigo), Elizeu (companheiro e um grande amigo), Precata, Dom João, Ricardo (grande amigo e sempre com muitas idéias), André (amigo e conselheiro) Azzin (grande amigo), Marcos, Allan (de novo), Cristiano (excelente amigo e companheiro), Daniel (muito obrigado pelos conselhos num momento que precisei muito), Luís e Marcos pela amizade.

Aos amigos da República ex-Toca: Boi (grande amigo), Daéb (grande conselheiro), Gordo (muito obrigado), Gustavo, Calouro e Beto pela amizade e estadias.

Ao Armindo, Rosângela, Victor, Vínicius, Rafael e Dona Nilza pela amizade, pelos conselhos e pela ajuda, vocês são muito especiais.

As amigas: Dayane (muito obrigado), Manuela, Renata, Eliane, Roberta, Alice, Miriam, Camila e Lorena pela amizade, ajuda e conselhos.

A todos que de uma forma ou outra me ajudaram a realização deste, e àquela pessoa que me esqueci de citar, mas em determinado momento vou lembrar.

Às minhas tias Vanda, Lúcia e Hislina, muito obrigado. Meus primos (RJ, SP e MG) e primas (RJ, SP e MG).

O Deus por estar ao nosso lado sempre.

A uma pessoa que um dia me disse, corre que o trem já passou, mas você ainda pode alcançá-lo.

BIOGRAFIA

Marcelo Maia Pereira, filho Jose Roberto Junqueira Pereira e Leila Maia Pereira, nasceu no município de Volta Redonda, Rio de Janeiro.

Engenheiro Agrônomo, pela Universidade Federal de Viçosa, desde 10 de agosto de 2007.

No mesmo mês da colação iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa.

SÚMARIO

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1.Introdução	1
2.Revisão de Literatura.....	4
2.1.Características da Rã-manteiga	4
2.2. Características da Rã-touro.....	5
2.3.Fatores Abióticos Influenciando a Reprodução de Anfíbios.....	6
2.4.Mecanismos Neuroendócrinos da Reprodução de Anuros.....	7
2.5.Espermatogênese de Anuros.....	7
2.6.Hormônios Utilizados na Reprodução Artificial de Rãs.....	8
2.7.Biologia Seminal de Anuros	9
3.Referências Bibliográficas.....	11
Indução a espermição e características seminais do anuro nativo Rã- manteiga, <i>Leptodactylus ocellatus</i> , Linnaeus (1758).....	16
1.Introdução.....	18
2.Material e Métodos.....	21
2.1.Local.....	21
2.2.Coletas.....	21
2.3. Período de aclimação.....	21
2.4. Indução Hormonal.....	23
2.5. Coleta do Sêmen.....	23
2.6. Volume e cor do sêmen.....	23
2.7. Vigor, Motilidade e Concentração Espermática.....	23
2.8. Análise Morfológica do Sêmen.....	24
2.9. Comprimento Total, Comprimento da Cabeça e Comprimento de	26

Cauda.....	
2.10. Delineamento experimental e análise estatística.....	26
3.Resultados e Discussão.....	28
4.Conclusão.....	38
5.Referências Bibliográficas.....	39
Indução à espermição e características seminais do anuro exótico <i>Lithobates catesbeianus</i> (Shaw, 1802) (rã-touro).....	43
1.Introdução.....	45
2.Material e Métodos.....	47
2.1.Local.....	47
2.2.Reprodutores.....	47
2.3.Indução Hormonal.....	47
2.4.Coleta do Sêmen.....	48
2.5.Volume e Cor do Sêmen.....	48
2.6.Vigor, Motilidade e Concentração Espermática.....	48
2.7.Análise Morfológica do Sêmen.....	49
2.10.Comprimento Total, Cabeça e Cauda dos Espermatozóides.....	50
2.11.Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	51
3.Resultados e Discussão.....	52
4.Conclusão.....	60
5.Referências Bibliográficas.....	61

RESUMO

PEREIRA, Marcelo Maia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2009. Indução à espermiacão e características seminais do anura nativo Rã-Manteiga *Leptodactylus ocellatus* e do exótico rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Orientador: Prof. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho, Co-orientadores: Prof. Luiz Carlos dos Santos, Prof. Renato Neves Feio, José Cola Zanuncio.

Nos últimos anos vários fatos vêm levando a extinção e a diminuição de populações de anfíbios. A criação em cativeiro e o conhecimento da reprodução podem ser estratégias para o início da reversão desse quadro. A utilização do hormônio para indução à espermiacão é necessária para a obtenção de sêmen de qualidade que será destinado para fertilização artificial, criopreservação, melhoramento animal e posteriormente repovoamento de espécies. Foram realizados dois trabalhos: o primeiro foi realizado com objetivo de verificar a utilização do acetato de buserelina como indutor a espermiacão de rã-manteiga e analisar o sêmen de rã-manteiga e o de rã-touro. O local dos trabalhos foi o Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa, o período de dois de fevereiro a três de maio de 2009. Experimento 1: Foi realizado o experimento com o objetivo induzir à espermiacão utilizando o acetato de buserelina e analisar o sêmen coletado. O local do trabalho foi o Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa, no período de dois de fevereiro a três de maio de 2009. Foram utilizados sete machos de rã-manteiga que possuíam as características sexuais secundárias: acúleos negros, membros anteriores desenvolvidos e com presença do reflexo ao amplexo. O hormônio utilizado foi o acetato de buserelina (GnRH α) na dosagem de 0,4 μ g e foi aplicado durante sete dias em intervalos de 24 horas, após 90 minutos da aplicação foi realizada a coleta diária do sêmen, os parâmetros utilizados para avaliação do sêmen foram: volume seminal, cor do sêmen, vigor espermático, motilidade espermática, concentração espermática e avaliação das morfologias dos espermatozoides. Somente três animais responderam e no total foram coletadas sete amostras de sêmen, a primeira coleta levou 97,5 horas após a primeira aplicação. O sêmen de rã-manteiga obteve em média: volume de 0,38 mL, coloração turva, vigor espermático de 3,71; motilidade espermática de 77,14%, concentração de $6,60 \times 10^6$ SPTZ/mL e 69% de espermatozoides normais. O acetato de buserelina pode ser usado como indutor a espermiacão da rã-manteiga. Foi coletado baixo volume seminal, os resultados de coloração, vigor, motilidade, concentração e o número de espermatozoides normais são aceitáveis. Experimento 2: Foi realizado o experimento com o objetivo induzir à espermiacão de machos utilizando o acetato de buserelina e analisar o sêmen coletado. O local do trabalho foi o Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa, no período de dois de fevereiro a três de maio de

2009. Foram utilizados cinco machos de rã-touro que possuíam as características sexuais secundárias: peso superior a 200g, com papo amarelado, presença do calo nupcial e com presença do reflexo ao amplexo. O hormônio utilizado foi o acetato de buserelina (GnRHa) na dosagem de 0,4 µg, após 60 minutos da única aplicação foi realizada a coleta do sêmen, os parâmetros utilizados para avaliação do sêmen foram: volume seminal, cor do sêmen, vigor espermático, motilidade espermática, concentração espermática e avaliação das morfologias dos espermatozoides. O sêmen de rã-touro obteve em média: volume de 5,76mL, coloração turva, vigor espermático de 4,80; motilidade espermática de 93%, concentração de $14,24 \times 10^6$ SPTZ/mL e 70% de espermatozoides normais. Os resultados encontrados nas amostras de sêmen de rã-touro de volume, cor, vigor, motilidade, concentração espermática e o número de espermatozoides normais são aceitáveis. O conjunto dos parâmetros utilizados para avaliação das amostras de sêmen de rã-touro é indispensável para uma excelente conclusão da qualidade do sêmen e para tomada de decisão do seu destino.

ABSTRACT

PEREIRA, Marcelo Maia, M.Sc., Federal University of Viçosa, July of 2009. The Induction of spermiation and seminal characteristics of the native butterflyfrog (*Leptodactylus ocellatus*) and the exotic bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). Adviser: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho, Co-Advisers: Luiz Carlos dos Santos, Renato Neves Feio, José Cola Zanuncio.

In recent years several facts are leading to extinction and decline of amphibian populations. Captive breeding and knowledge of reproduction may be strategies for the early signs disappeared. The use of hormone for inducing spermiation is necessary to obtain semen quality that will be used for artificial fertilization, cryopreservation, animal breeding and subsequent repopulation of species. There were two papers: the first was carried out to verify the use of buserelin acetate as an inducer of the spermiation butterflyfrog and analyze semen butterflyfrog and analyzed the semen of bullfrog. The location of the works was the Experimental Frogfarm Federal University of Viçosa, the period of two of three from February to May 2009. Experiment 1: We conducted the experiment in order to induce spermiation using buserelin acetate and analyzing the semen collected. The job site was the Experimental Frog Federal University of Viçosa, in the period of two of three from February to May 2009. We used seven male butterflyfrog who had secondary sexual characteristics: black spines, limbs and developed to reflect the presence of embrace. The hormone was used buserelin acetate (GnRHa) at a dose of 0.4 g and was applied for seven days at intervals of 24 hours, 90 minutes after the application was performed daily collection of semen parameters used for semen evaluation were: semen volume, color of semen, sperm motility, sperm motility, sperm concentration and morphology assessment of spermatozoa. Only three animals responded and in total were collected seven samples of semen, the first collection took 97.5 hours after the first application. The semen butterflyfrog obtained on average volume of 0.38 mL, color vision, motility of 3.71, sperm motility of 77.14%, concentration of 6.60×10^6 SPTZ / mL, 69% of normal spermatozoa. Buserelin acetate can be used to induce spermiation in the frog-butter. We collected low semen volume, the results of color, vigor, motility, concentration and normal sperm counts are acceptable. Experiment 2: We conducted the experiment in order to induce spermiation of males using buserelin acetate and analyzing the semen collected. The job site was the Experimental Frog Federal University of Viçosa, in the period of two of three from February to May 2009. We used five male bullfrogs that had secondary sexual characteristics: weight greater than 200g, with yellow chat, presence of callus and Bridal person's reflection to embrace. The hormone was used buserelin acetate (GnRHa) at a dose of 0.4 g, 60 minutes after single application was made to collect the semen

parameters used for semen evaluation were: semen volume, color of semen, sperm motility, sperm motility, sperm concentration and morphology assessment of spermatozoa. The semen of bullfrog obtained on average volume of 5.76 mL, color vision, motility of 4.80, motility of 93%, and concentration of 14.24×10^6 SPTZ / mL, 70% of normal spermatozoa. The results found in semen samples of bullfrog volume, color, vigor, motility, sperm concentration and normal sperm counts are acceptable. All the parameters used for evaluation of semen samples from bullfrog are essential for optimal completion of the semen quality and decision making to their destination.

1. Introdução

O declínio mundial das populações de anfíbios é observado em diferentes localidades do mundo. As causas são: flutuações naturais das populações, mudanças climáticas, aumento da incidência dos raios ultravioleta e infecção por fungos ou parasitas, sendo não somente uma causa determina o fenômeno e sim dois ou mais fatores atuando juntos (JUNCÁ, 2001).

A constante degradação sobre os ecossistemas naturais é ocasionada em virtude das ações antrópicas, que implicam alteração ou eliminação completa dos microhabitats específicos explorados por anuros, considerado o principal fator responsável pelo declínio populacional observados em diversas espécies de anfíbios (YOUNG, 2000).

Estudos realizados nas últimas décadas revelaram que a região neotropical abriga a mais rica fauna de anfíbios anuros do mundo (HEYER et al. 1990), sendo a Floresta Atlântica o bioma com maior diversidade e taxa de endemismo (DUELLMAN, 1999).

Atualmente, a Mata Atlântica está ameaçada por grandes concentrações urbanas e pólos industriais (EMBRAPA, 1996), e o resultado é o aparecimento de uma lastimável devastação, onde a Mata Atlântica reduziu a menos de 5% de sua área original (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 1998).

No bioma fragmentado da mata atlântica, ocorrem cerca de 340 espécies de anuros, que correspondem a 20% das espécies da América do Sul (HADAD e ABE, 1999). Esta riqueza é acompanhada por uma elevada porcentagem de espécies endêmicas (DUELLMAN, 1999).

Lima (1979) observou uma redução em duas populações de *Lepidodactylus ocellatus* (rã-manteiga), uma de Curitiba – PR e outra de Viçosa – MG, devido à ação humana por meio da caça.

A introdução da *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) no Brasil foi excelente para os criadores por ser um animal de alta prolificidade, excelente ganho de peso em curto espaço de tempo quando comparada com espécies nativas e boa aceitação pelo mercado consumidor (LIMA E AGOSTINHO, 1992). Em contrapartida, os ranários não possuem um sistema eficaz de contenção dos animais, permitindo a sua fuga dos mesmos para a natureza onde se instalaram (CAMARGO FILHO, 2009). Trabalhos recentes mostram que a rã-touro possui uma dieta alimentar semelhante ao da rã-manteiga e a competição por alimento pode limitar o seu sucesso ecológico (CAMARGO FILHO, 2009; SILVA, 2007).

Espécies nativas de rãs não são criadas, por falta de conhecimento da sua biologia, como fatores relacionados ao seu crescimento, à sua reprodução e alimentação (LIMA, 1979). Segundo este autor uma solução para

repovoamento de espécie em declínio populacional é a sua criação em cativeiro.

A literatura carece de uma série de informações para permitir a interferência. Para facilitar o repovoamento das espécies tanto em cativeiro quanto na natureza, é importante o conhecimento sobre o sêmen para ser usada a criopreservação e assim garantir a existência de gametas para a reprodução.

Estudos da ecologia e dos recursos naturais podem ter múltiplas finalidades, dentre elas a preservação da fauna, pois possibilita a exploração racional de um recurso faunístico (LIMA, 1986). Assim, faz-se necessário o conhecimento de uma série de parâmetros sobre a biologia das espécies no processo reprodutivo, como por exemplo, permitir a utilização de métodos de indução ao acasalamento, quando houver necessidade e não quando as condições da natureza e dos animais propiciarem (COSTA et al., 1998).

A técnica da reprodução induzida possibilita o suprimento de desova de boa qualidade. A técnica permite a incubação e eclosão dos ovos em condições climáticas favoráveis ao bom desempenho da prole. A falta de conhecimento básico sobre a reprodução de rãs dificulta o emprego desta técnica (RIBEIRO FILHO et al., 1998).

A partir do conhecimento da utilização dos hormônios na indução à reprodução de rã-touro (RIBEIRO FILHO, 1994), foi possível a coleta do sêmen (ALONSO, 1997), a extrusão de ovócitos e a fertilização artificial de rã-touro (AGOSTINHO et al. 2000) e a avaliação da morfologia espermática do sêmen de rã-touro, baseada em metodologia para mamíferos (TORTELLY NETO, 2006).

A uma carência de literatura recente sobre reprodução de rã-manteiga e o resgate da pesquisa sobre esse tema é de suma importância para uma espécie que sofre com a interferência do seu ambiente natural.

Assim, a realização deste trabalho teve como objetivo principal avaliar o sêmen, após indução a espermiacão utilizando acetato de busserelina (GnRHa), de rã-manteiga e rã-touro e como objetivos específicos:

Desenvolver um protocolo para indução à espermiacão de rã-manteiga a partir do protocolo empregado para rã-touro e analisar o sêmen coletado quanto a volume seminal, motilidade espermática, vigor espermático, concentração espermática e cor do sêmen e a morfologia do espermatozóide, quanto sua forma e seu comprimento utilizando metodologia aplicada em peixes.

Avaliar o sêmen coletado de rã-touro quanto o volume seminal, motilidade espermática, vigor espermático, concentração espermática e cor do

sêmen e a morfologia dos espermatozóides, quanto sua forma e seu comprimento utilizando metodologia aplicada em peixes.

2. Revisão de Literatura

2.1. Característica da Rã-manteiga

A classificação filogenética da rã-manteiga conforme LIMA (1979) segue em seqüência: Reino Animália; Filo Chordata; Classe Amphibia; Ordem Anura; Família Leptodactylidae; Gênero *Leptodactylus*; Espécie: *Leptodactylus ocellatus*, Linnaeus (1758).

A denominação mais comum para *Leptodactylus ocellatus*, é rã-manteiga, sendo também conhecida como paulistinha, caçote e mirim. Esta espécie possui ampla distribuição no Brasil, sendo encontrada desde o nordeste (Bahia) até ao sul (Rio Grande do Sul). Tamanho cerca de 10 cm de comprimento e peso em torno de 400 g quando adulto (LIMA, 1979).

Cei (1949) descreveu as características sexuais secundárias nos machos de *Leptodactylus ocellatus*: sacos vocais, desenvolvimento de membros anteriores com dois acúleos córneos em cada polegar, glândulas córneas negras sobre o peito e os braços, e o reflexo que denominou de “psicosexual”, que consiste no aperto que o macho dá na região axilar das fêmeas quando estão se acasalando, também denominados de amplexo, Este autor observou que os machos são maiores que as fêmeas e que, durante o período reprodutivo, a pele fica mais lisa e viscosa.

Segundo Gallardo (1964), *Leptodactylus ocellatus* quando adulta possui oito glândulas longitudinais dorsais, podendo chegar a onze, quando há presença de uma prega dorsal. Nos machos, há placas glandulares escapulares ou pós-timpânica. Nesta espécie há presença de mancha interocular escura. Ocorrem manchas escuras dorsais, em muitos casos separados entre si, formando fileiras longitudinais. Às vezes, as fileiras centrais unem-se tomando uma disposição sinuosa. Essa última característica é comumente encontrada nos exemplares dos estados de Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo.

Cei (1950) caracterizou os machos adultos em 34 características principais, sendo os mais importantes: presença de dentes vomerianos em dois grandes arcos posteriores e entre as coanas; língua oval e alongada, livre e granulosa; o primeiro dedo mais logo que o segundo; coloração castanha oviláceo claro ou mais escuro. O tímpano é amarelo ocre turvo. A região ventral é branco-amarela.

Segundo Conte e Machado (2005) os açudes circundados por florestas são os habitats utilizados pela rã-manteiga durante atividades de vocalização. Segundo esses mesmo autores esta espécie vocaliza de setembro a janeiro, na margem de açudes com ou sem vegetação rasteira sobre o solo, ou parcialmente submersa nesse caso com os membros apoiados no fundo do açude ou em galhos.

Os machos de rã-manteiga vocalizam escondidos na vegetação aquática, emitem notas curtas monótonas e de baixa frequência. A atividade das vocalizações aumenta após as chuvas (IBAMA/MMA; BRASIL, 2007).

Em outro estudo no estado do Paraná, a rã-manteiga foi encontrada vocalizando de agosto a abril, tanto no período noturno quanto no diurno (CONTE e ROSSA-FERES, 2006), esses mesmos autores classificaram a rã-manteiga em relação ao período de vocalização como de estação chuvosa, pois os machos vocalizaram na época mais quente e chuvosa do ano.

Vaz-Ferreira e Gehrau (1975) relataram em *Leptodactylus ocellatus* o comportamento epimelético, ou seja, permanência do casal no local da desova para proteger a prole, apresentando comportamento agressivo diante de predadores.

A desova ocorre na superfície da água, fazendo ninhos de espuma, contém milhares de ovos pequenos e pretos. Os girinos quase negros de hábito gregário (IBAMA/MMA; BRASIL, 2007).

Lima (1979) estudou duas populações naturais de *Leptodactylus ocellatus* uma em Curitiba-PR e outra em Viçosa-MG. Para a primeira, calculou as curvas de crescimento em comprimento e em peso, elaborou a curva de reprodução anual e classificou macroscopicamente os estádios de maturação gonadal. Para a população de Viçosa-MG, calculou as curvas de crescimento e estudou a dinâmica populacional através do método de marcação e recaptura. O tamanho médio da primeira maturação sexual dos indivíduos da população na cidade de Viçosa foi estimado em 9,34 cm para machos e 8,08 cm para fêmeas.

Lima e Verani (1984) ao estudarem uma população desta espécie em Viçosa-MG, encontraram os seguintes resultados: densidade estimada em 0,154 animais por metro quadrado, indicando uma exigência de 6,5 metros quadrados para cada indivíduo, a proporção sexual de 1:1, e a estrutura etária indicaram maior recrutamento (imago) no mês de maio.

França et al. (2004) estudaram a alimentação e nichos de uma população de *Leptodactylus ocellatus* no sudeste do Brasil, e Maneyro et al. (2004) estudaram a dieta de rã-manteiga no Uruguai e concluíram que a base da dieta de rã-manteiga inclui insetos e pequenos anfíbios.

2.2. Características da Rã-touro

A classificação filogenética da rã-touro segue em seqüência: Reino Animália; Filo Chordata; Classe Amphibia; Ordem Anura; Família Ranidae; Gênero *Lithobates*; Espécie *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), (CAMARGO FILHO, 2009).

A rã-touro é originária da América do Norte e foi introduzida no Brasil na década de 30 do século passado no estado do Rio de Janeiro, onde se iniciou a criação de rã exótica (AFONSO, 2004).

O macho adulto de rã-touro possui calo nupcial durante a época reprodutiva, onde o dedo interno espessa-se, o que facilita a apreensão das fêmeas (LIMA e AGOSTINHO, 1992).

Para Alonso (1997) as principais características sexuais secundárias nos machos de rã-touro são: região gular amarelada e o diâmetro do tímpano, que é bem maior que o dos olhos. Nas fêmeas o tímpano é do mesmo tamanho dos olhos ou ligeiramente menor e a região gular é branca.

Quanto ao dimorfismo sexual, Agostinho (1995) afirma que a definição do sexo nas rãs ocorre em níveis cromossômicos e hormonais, sendo o tipo de gônada (testículo ou ovário) a característica sexual primária e os aspectos fenotípicos, as secundárias. Entretanto, como ressalva o próprio autor, as características secundárias variam de intensidade de acordo com o período reprodutivo.

A rã-touro na fase larval ou de girino possui hábito alimentar onívoro e quando adulta é carnívora se alimenta de insetos, pequenos anfíbios e peixes (SILVA, 2007) e até de cobras peçonhentas (CAMARGO FILHO, 2009).

2.3. Fatores Abióticos Influenciando a Reprodução de Anfíbios

A temperatura tem efeitos sobre o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos de rã-touro (FIGUEREIDO et al., 2001; AGOSTINHO et al., 2003).

As pesquisas com reprodução da rã-touro têm verificado a influência dos fatores climáticos sobre o número das desovas naturais (RIBEIRO FILHO et al., 1998).

Easley et al. (1979) enfatizaram a importância do ambiente na espermiacção de rã-touro.

De acordo com Salthe e Mecham (1974), em regiões tropicais e subtropicais, a temperatura raramente é um fator limitante e a reprodução da maioria das espécies de *Anura* ocorre em função das chuvas.

Em regiões temperadas, as temperaturas mais frias do outono e do inverno afetam a secreção de gonadotropina pela hipófise na maioria das espécies estudadas, além disso, alteram a sensibilidade do epitélio germinativo aos hormônios gonadotrópicos (CEI, 1949).

Padrões cíclicos estão correlacionados entre si e ajustados a mudanças sazonais, sendo a temperatura o fator mais importante, mas podem ser citadas ainda: a alimentação, a luz, a chuva, entre outros. Existem muitas evidências indicando o papel dominante da temperatura na regulação dos ciclos reprodutivos em rãs e sapos (LOFTS, 1974).

Fontanello et al. (1984) verificaram, em ranários comerciais, que a temperatura ambiente e o fotoperíodo são os fatores abióticos que mais influenciam a reprodução de rã-touro, sendo a temperatura ótima para a reprodução em torno de 20 °C.

Iela et al. (1980) verificaram que um ambiente controlado (luz e temperatura) pode alterar os níveis de andrógenos circulantes nos machos de rã-verde (*Rana esculenta*), tratadas em diferentes fases do ciclo testicular, embora esses animais possuam potencialmente espermatogênese contínua. Verificaram também que a atividade gonadotrófica da hipófise, a resposta dos testículos às gonadotropinas da hipófise e a resposta de órgãos periféricos alvos do andrógeno não são igualmente sensíveis à temperatura.

As diferenças sazonais observadas no metabolismo de alguns 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) e a preparação de reservas suficientes para que as rãs possam suportar os invernos mais rigorosos (BRATTSTROM, 1979).

2.4. Mecanismos Neuroendócrinos da Reprodução de Anuros

Alterações de fatores ambientais, como o fotoperíodo e temperatura são detectadas por receptores específicos são transmitidos para o hipotálamo, alterando a produção e liberação de hormônios. O Hipotálamo localiza-se na base do cérebro e produz o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Os hormônios esteróides e os adeno-hipofisários determinam o desenvolvimento de vários caracteres sexuais e influenciam o cortejo e os cuidados parentais (BALDISSEROTTO, 2002).

O sistema nervoso e o sistema endócrino atuam em conjunto na coordenação da reprodução por meio de diferentes grupos de hormônios, produzidos por órgãos localizados ao longo do eixo: hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HAFEZ, 2004).

Cei (1949), Comprovou ainda que a atividade gametogênica seja controlada pela secreção gonadotrófica do lóbulo anterior da hipófise e relatou que devem ser feitas algumas considerações a respeito das distintas fases da gametogênese e do período de ovulação, que correspondem em suas linhas gerais às distintas esferas da ação dos hormônios gonadotrópicos (gonadotropina A e gonadotropina B).

2.5. Espermatogênese de Anuros

Quanto ao ciclo espermatogênico, Cei (1949) definiu três períodos distintos para rã-manteiga na região subtropical: dezembro a março, onde há repouso total da atividade gametogênica; abril a setembro, atividade degenerativa; outubro a dezembro, espermatogênese. No último período ocorre

a expulsão de grandes massas de espermatozóides e o maior desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários. Este mesmo autor ressalta que uma temperatura ótima em laboratório pode favorecer o processo espermatogênico durante o período de inverno.

Dentre as três ordens de anfíbios, testículos (nos machos) e ovários (nas fêmeas) são conectados por meio de ductos genitais próprios constituindo a via gametogênica, representada pelos ductos eferentes e ducto de Wolff nos machos e pelos ovidutos ou ducto de Müller nas fêmeas. Após a diferenciação e o desenvolvimento sexual do indivíduo, freqüentemente também são descritas estruturas vestigiais que permanecem como não funcionais, (DUELLMAN E TRUEB, 1994).

Costa et al. (1998) ao caracterizarem a morfologia dos estágios de desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino da rã-touro observou que ao longo do seu desenvolvimento, o testículo passa por diferentes fases morfológicas não visíveis macroscopicamente. Nas fases finais do processo espermatogênico, os cistos se rompem liberando as células (espermátides ou espermatozóides) para o lume dos túbulos seminíferos. No interior dos testículos, observou-se ainda um sistema de ductos coletores cuja parede é formada por uma camada única de células cúbicas. Esses ductos parecem originar nos túbulos seminíferos e, depois, convergem a ductos coletores comuns que deixam os testículos em direção aos rins, via mesórquio.

Lofts (1974) sugere que o processo de espermatogênese ocorra continuamente nos indivíduos adultos de rã-touro, o que concorda com os relatos de Costa et al. (1998), segundo o qual espécies de anfíbios anuros que habitam regiões tropicais e subtropicais, em que a temperatura ambiental não é sujeita as grandes flutuações sazonais, normalmente apresentam produção contínua de espermatozóides durante todo o ciclo reprodutivo anual.

A partir da análise da anatomia e histologia testicular de *Dendropsophus minutus* (perereca) ao longo da reprodução, Santos e Oliveira (2006) concluíram que o ciclo gametogênico é contínuo.

Lima et al. (1998) encontraram o tamanho na primeira maturação para machos de rã-touro em torno de 8,09 cm. Todos os machos com peso acima de 45 g já se encontravam em processo de maturação e animais com peso médio de 240,42g já poderiam ser considerados reprodutores em potencial.

Costa et al. (1998) determinaram cinco estádios de maturação gonadal para machos de rã touro: juvenil, início da maturação, maturação intermediária, maturação avançada e esgotado.

2.6. Hormônios Utilizados na Reprodução Artificial de Rãs

Alonso (1997) estudou o efeito de análogos do hormônio GnRH sobre a desova e espermiacão de rã-touro e concluiu que esses análogos podem ter aplicações práticas importantes para estimulação da atividade gonadal e a aquisição de gametas nessa espécie. Os análogos de GnRH consistem em modificações na molécula do GnRH necessárias para o aumento da performance deste peptídeo. Em geral, modificações como 'Pro POT.9' (NH₂), substituições com D-aminoácidos, e a combinação destas modificações produzem moléculas resistentes à degradação enzimática, estáveis na conformação biologicamente ativa e caracterizadas, portanto, por maior afinidade e potência.

Agostinho (1988) obteve desovas de *Leptodactylus labyrinthicus* após a aplicação de extratos de duas hipófises diluídas em solução fisiológica para cada fêmea foi estabelecida a concentração em função do seu peso, pois quantidades excessivas poderiam provocar edemas nas coxas do animal.

De acordo com Ribeiro Filho et al. (1998) o método de desova induzida utilizando extrato bruto hipofisário de rã-touro (EBH) foi efetivo para provocar a ovulação de rã-touro. Todas as dosagens provocaram desovas em maior ou menor intensidade e possibilitaram a redução no número de reprodutores do plantel, o controle da reprodução, o melhoramento genético dos animais, assim como o aumento da frequência de desovas anuais.

Rugh (1935), trabalhando com rã-touro, afirmou que a dose necessária para provocar a ovulação da rã decresce à medida que se aproxima da época da desova natural, e os ovários reagem diferentemente ao mesmo estímulo conforme a época do ano.

Rosemlit et al. (2006) concluíram que rã-manteiga e rã-touro quando induzidas à espermiacão por Gonadotropina Coriônica humana (hCG) não dependem de esteróides sintéticos complementar para a indução a espermiacão.

2.7. Biologia Seminal de Anuros

Os espermatozoides são únicos dentre as células quanto à forma e à função. Espermatozoides maduros são células terminais, produtos finais de processos complexos de desenvolvimento, que não passam por outras divisões ou diferenciações. O método padrão de avaliação da fertilidade de reprodutores, a não ser a avaliação direta pela constatação da desova, é o exame do sêmen (HAFEZ, 2004).

O conhecimento da concentração de espermatozoides, isto é, o número de espermatozoides por volume de sêmen é importante para sua adequada utilização (AFONSO, 2004).

O método mais utilizado para determinação da concentração espermática é a contagem direta na câmara de Newbauer (ROSEMBLIT et al., 2006).

A motilidade espermática é a principal variável utilizada para avaliar a qualidade do sêmen e os espermatozóides de anfíbios anuros já são coletados com motilidade (TORTELLY NETO, 2006).

O sêmen de anuros apresenta diversas similaridades com o sêmen de peixes (GODINHO, 2000), e a principal característica comum entre esses dois grupos é a motilidade espermática, pois em ambos a sua iniciação depende da interação com o meio aquático. Nesses grupos, os espermatozóides são imóveis no trato reprodutivo (os de anfíbios ganham motilidade na bexiga urinária), mas quando entram em contato com o meio circundante, ocorrem alterações na concentração osmótica ou iônica que alteram a polarização do cálcio da membrana, dando início a motilidade (COSSON, 2004; MORISAWA et al., 1983).

Em anuros, o decréscimo da osmolaridade inicia a motilidade espermática, o que enfatiza, inclusive, o emprego de metodologias de coleta de sêmen que evitem a contaminação das amostras seminais com urina e água. A contaminação de amostras seminais por urina já foi intensamente discutida em espécies de anuros (HOLLINGER e CORTON, 1980).

3. Referências Bibliográficas

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

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

AGOSTINHO, C.A. Manejo da reprodução. In: International meeting on frog research and technology, 1., Encontro Nacional de Ranicultura, 8., 1995, Viçosa. **Apostila de Biologia e Manejo da Reprodução de Rãs**. Viçosa: Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura, 29-42. 1995.

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

ALONSO, M. Uso de análogos do GnRH para indução de desova e espermição em rã-touro, *Rana catesbeiana*, Shaw, 1802. São Paulo, 1997 Universidade de São Paulo, USP, 136p. **(tese – DS)**. 1997.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixe aplicada á piscicultura**. Santa Maria:UFSM, 2002. 212p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis, [HTTP://www.IBAMA.gov.br/ran/index.php?id_menu=124](http://www.ibama.gov.br/ran/index.php?id_menu=124). 2007.

BRATTSTROM, B.H. Amphibian temperature regulation studies in the field and laboratory. **America Zoologica**, v.19 (único), 345-356, 1979.

CAMARGO FILHO, C.F. Características alimentares e o potencial impactante da rã-touro *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), Viçosa, 2009, 58p. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

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

CEI, J.M. *Leptodactylus chaquensis*. El valor sistemático realde La espécie Linneana *Leptodactylus ocellatus* em La argentina. **Acta Zoologica Lilloana**, v.9, 395-426, 1950.

CONTE, C.E.; MACHADO, R.A. Riqueza de espécies e distribuição espacial e temporal em comunidade de anuros (Amphibia, anura) em uma localidade de Tijucas do Sul, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22 (4), 940-948, 2005.

CONTE, C.E.; ROSSA-FERES, D.C. Diversidade e ocorrência sazonal de anuros em São José dos Pinhais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.23 (1), 345 - 350, 2006.

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

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**, v.27 (4), 651 -657, 1998.

DUELLMAN, W.E. Global distribution of amphibians: Patterns conservation, and future challenges, p. 1-31. In: W. E. Duellman (Ed). **Patterns of distribution of amphibians: a global perspective**. Baltimore e London, The John Hopkins University, 648p. 1999.

DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. New York, McGraw-Hill, 670p. Horizonte, 89-98. 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 of Experimental Zoology**, v.207 (3), 407 - 416, 1979.

EMBRAPA. **Atlas do meio ambiente do Brasil**. Brasília, serviço de produção e Informação, Terra viva, 160p. 1996.

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**, v.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 do Instituto de Pesca**, v.11, 123-130, 1984.

FRANÇA, L.F.; FACURE, K.G.; GIARETTA, A.A. Trophic and Spacial Niches of two Large-sized Species of *Leptodactylus* (ANURA) in Southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environmet**, v.39 (3), 243-248, 2004.

FUNDAÇÃO MATA ATLÂNTICA. Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados do Domínio da Mata atlântica no período de 1990-1995. **Relatório Nacional**. São Paulo, Fundação SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de pesquisas espaciais, Instituto Sócio-Ambiental, 71p. 1998.

GALLARDO, J.M. Consideraciones sobre *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia, Anura) y espécies aliadas. **Physis**, v.24 (68), 373-384, 1964.

GODINHO, H.P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21 (203), 16-20, 2000.

HADDAD, C.F.B.; ABE, A. Anfíbios e reptéis In: Workshop Floresta Atlântica e Campos Sulinos. <http://WWW.bdt.org.br/workshop/mataatlantica/BR/rp.anfib>. 1999.

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

HEYER, W.R.; RAND, A.S.; CRUZ, C.A.G.; PEIXOTO, O.L.; NELSON, C.E. Frogs of Boracéia. **Arquivos de Zoologia, São Paulo**, v.31 (4), 231-410, 1990.

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

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

JUNCÁ, F.A. Declínio Mundial das Populações de Anfíbios. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v.1 (1), 84-87, 2001.

LIMA, S.L. Alimentação de uma população natural de rã-manteiga *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) e técnicas aplicadas a sua criação intensiva. (AMPHIBIA, ANURA, LEPETODACTYDAE). São Carlos, 1986, 86p (**tese de doutorado**). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1986.

LIMA, S.L. Crescimento, relações biométricas, reprodução e dinâmica populacional de *Leptodactylus ocellatus* (AMPHIBIA, ANURA, LEPETODACTYLIDAE) em Viçosa-MG e Curitiba-PR. Curitiba, 1979, 112p. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1979.

LIMA, S.L. e VERANI, J.R. Crescimento pós-metamórfico em uma população natural de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) em Viçosa, MG. (AMPHIBIA, ANURA, LEPETODACTYDAE). **Revista Brasileira de Biologia**, v.1, 111-116, 1984.

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**, v.27 (3), 416-420, 1998.

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

MANEYRO, R.; NAYA, D.E.; ROSA, I.; CANAVERO, A.; CAMARGO, A. **Revista Iheringia. Série Zoológica**, v. 94 (1), 57-61, 2004.

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**, v.187, 95-103, 1983.

RIBEIRO FILHO, O.P. Uso de extrato bruto de hipófise na indução da desova de rã-touro. *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802), Viçosa, 50p. **Dissertação** (mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1994.

RIBEIRO FILHO, O.P.; LIMA, S.L.; ANDRADE, D.R.; SEIXAS FILHO, J.T. Estudo da desova de Rã-touro, *Rana catesbeiana*, mediante indução do acasalamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27 (2), 216-233, 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**, v.176, 559–566, 2006.

RUGH, R. Pituitary - induced sexual reactions in the annura. **Biology Bulletin**, v.68, 74-81, 1935.

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

SANTOS, L.R.S.; OLIVEIRA, C. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.24 (1), 67-70, 2006.

SILVA, E.T. Análise da dieta da rã-touro – *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) em condições naturais em Viçosa, Minas Gerais. Viçosa, 2007, 57p, **Monografia** (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2007.

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

VAZ-FERREIRA, R.; GEHRAU, A. Comportamento epimelético de La rana comum, *Leptodactylus ocellatus* (L) (AMPHIBIA, LEPETODACTYDAE).

Atencion de La cria y actividades alimentares y agressivas relacionadas. **Physis**, v.34 (88), 1-14, 1975.

WOYNAROVICH, E.; HORVÀTH, L. **Propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: FAO, CODEVASF, CNPQ, 1989. 225p.

YOUNG, B.E.; LIPS, K.R.; REASER, J.K.; IBAÑES, R.; SALAS, A.W.; CEDEÑO, J.R.; COLOMA, L.A.; RON, S.; MARCA, E.; MEYER, J.R.; MUÑOZ, A.; BOLAÑOS, E.; CHAVES, G.; ROMO, D. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. **Conservation Biology**, v.15 (5), 1213-1223, 2000.

Indução a espermição e características seminais do anuro nativo Rã-Manteiga, *Leptodactylus ocellatus*, Linnaeus (1758)

PEREIRA, Marcelo Maia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2009. Orientador: Prof. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho, Co-orientadores: Prof. Luiz Carlos dos Santos, Prof. Renato Neves Feio, José Cola Zanuncio.

Resumo

O conhecimento da ação do hormônio acetato de buserelina na indução a espermição em rã-manteiga pode permitir a coleta de sêmen para estudos de fertilização artificial e criopreservação. Foi realizado o experimento com o objetivo induzir à espermição utilizando o acetato de buserelina e analisar o sêmen coletado. O local do trabalho foi o Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa, no período de dois de fevereiro a três de maio de 2009. Foram utilizados sete machos de rã-manteiga que possuíam as características sexuais secundárias: acúleos negros, membros anteriores desenvolvidos e com presença do reflexo ao amplexo. O hormônio utilizado foi o acetato de buserelina (GnRHa) na dosagem de 0,4 µg e foi aplicado durante sete dias em intervalos de 24 horas, após 90 minutos da aplicação foi realizada a coleta diária do sêmen, os parâmetros utilizados para avaliação do sêmen foram: volume seminal, cor do sêmen, vigor espermático, motilidade espermática, concentração espermática e avaliação das morfologias dos espermatozóides. Somente três animais responderam e no total foram coletadas sete amostras de sêmen, a primeira coleta levou 97,5 horas após a primeira aplicação. O sêmen de rã-manteiga obteve em média: volume de 0,38 mL, coloração turva, vigor espermático de 3,71; motilidade espermática de 77,14%, concentração de $6,60 \times 10^6$ SPTZ/mL e 69% de espermatozóides normais. O acetato de buserelina pode ser usado como indutor a espermição da rã-manteiga. Foi coletado baixo volume seminal, os resultados de coloração, vigor, motilidade, concentração e o número de espermatozóides normais são aceitáveis.

Palavras chaves: rã-manteiga, reprodução, sêmen, espermatozóide e motilidade espermática

Induction of spermiation and seminal characteristics of native frogs Butter Frog, *Leptodactylus ocellatus*, Linnaeus (1758)

PEREIRA, Marcelo Maia, M.Sc., Federal University of Viçosa, July of 2009. Adviser: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho, Co-Advisers: Luiz Carlos dos Santos, Renato Neves Feio, José Cola Zanuncio.

Abstract

Knowledge of the action of the hormone buserelin acetate in inducing spermiation in butterflyfrog may allow the collection of semen for the study of artificial fertilization and cryopreservation. Experiment was conducted in order to induce spermiation using buserelin acetate and analyzing the semen collected. The job site was the Experimental Frogfarm Federal University of Viçosa, in the period of two of three from February to May 2009. We used seven male butterflyfrog who had secondary sexual characteristics: black spines, limbs and developed to reflect the presence of embrace. The hormone was used buserelin acetate (GnRHa) at a dose of 0.4 g and was applied for seven days at intervals of 24 hours, 90 minutes after the application was performed daily collection of semen parameters used for semen evaluation were: semen volume, color of semen, sperm motility, sperm motility, sperm concentration and morphology assessment of spermatozoa. Only three animals responded and in total were collected seven samples of semen, the first collection took 97.5 hours after the first application. The semen butterflyfrog obtained on average volume of 0.38 mL, color vision, motility of 3.71, sperm motility of 77.14%, concentration of 6.60×10^6 SPTZ / mL, 69% of normal spermatozoa. Buserelin acetate can be used to induce spermiation in the frog-butter. We collected low semen volume, the results of color, vigor, motility, concentration and normal sperm counts are acceptable.

Key words: butterflyfrog, reproduction, semen, spermatozoa e spermatic motility

1. Introdução

A rã-manteiga (*Leptodactylus ocellatus*) tem ampla distribuição no Brasil, sendo encontrada desde o nordeste até ao sul (Rio Grande do Sul). Está presente em uma área que sofreu grande interferência antrópica e sofre com a pressão da caça.

O declínio mundial das populações de anfíbios é observado em diferentes localidades do mundo (JUNCÁ, 2001). Um dos fatores são a constante degradação sobre ecossistemas naturais das espécies em virtude das ações antrópicas, (YOUNG, 2000); a introdução da espécies exóticas como a rã-touro (CAMARGO FILHO, 2009) e a caça (LIMA, 1979).

A criação em cativeiro de rãs nativas como a rã-manteiga, com fins de repovoamento na natureza, pode ser uma das soluções para diminuir o problema. Para isso é importante o conhecimento da sua reprodução e da ação de hormônios reprodutivos na indução para obtenção de gametas para criopreservação e a fertilização artificial.

Há uma carência de literatura recente sobre a biologia reprodutiva e principalmente sobre a fisiologia reprodutiva e dos gametas de rã-manteiga, o que dificulta a realização de experimentos e reforça a necessidade de trabalhos com esta espécie nativa.

O conhecimento de indutores à espermiação, dosagens dos hormônios e tempo de coleta do sêmen são importante para adoção da técnica da reprodução induzida a qual pode ser utilizada para obtenção de girinos para criação em cativeiro para repovoamento.

A utilização de hormônios para indução à reprodução em anfíbios a nível experimental e a eficácia do tratamento foi constatada por Lofts (1974) a partir da aplicação de Hormônio Luteinizante de mamífero (LH) e gonadotropina coriônica humana (hCG).

Ribeiro Filho et al. (1998) verificou resposta à injeção de extrato bruto hipofisário (EBH) de rã-touro em casais de rã-touro e encontrou uma desova com 24.310 óvulos.

A aplicação de EBH de rã-touro deve ser realizada em animais portadores de características sexuais secundárias próprias ao acasalamento para que a resposta seja positiva ao tratamento (AGOSTINHO, 1995; RIBEIRO FILHO et al., 1998), da mesma forma a aplicação do acetato de buserelina (GnRH_a) (ALONSO, 1997; AFONSO, 2004; TORTELLY NETO, 2006).

Alonso (1997) estudou o efeito dos análogos do hormônio GnRH sobre a desova e a espermiação de rã-touro e concluiu que esses análogos podem ter aplicações práticas importantes para estimulação da atividade gonadal e a

aquisição de gametas nesta espécie. Determinou para rã-touro a dose de 0,4µg de acetato de buserelina para indução a espermição, desde que as condições estejam favoráveis (temperatura, fotoperíodo e umidade relativa).

Agostinho et al. (2000) apresentaram a técnica de fertilização artificial em rã-touro com a utilização do LHRH análogo para indução de gametas. Técnica adaptada da utilizada para peixes (WOYNAROVICH E HORBATH, 1989). Obteram coleta uniforme de sêmen e realizaram análise seminal por meio dos parâmetros volume e concentração espermática.

Rosemblit et al. (2006) determinaram para rã-touro e para rã-manteiga que a utilização de hCG para indução à espermição não necessita de outros hormônios complementares e determinaram a concentração espermática “in-vitro” para as duas espécies.

Vários trabalhos sobre à ultra-estrutura dos espermatozoides de anfíbios anuros foram realizados (VEIGA-MENONCELLO et al., 2006; AGUIAR Jr et al., 2006; COSTA et al., 2005; AGUIAR JR. et al., 2004; LEE e JAMIESON, 1993), como objetivo nos estudos de filogenia.

Estudos “in-natura” dos gametas de anfíbios anuros começaram a partir da utilização da técnica de indução hormonal como exemplo a utilização de extrato bruto de hipófise de rã-touro, sendo a rã-touro induzida ao acasalamento (RIBEIRO FILHO, 1994). Alguns trabalhos sobre espermatozoide “in natura” de rãs foram realizados (ALONSO, 1997; AGOSTINHO et al., 2000; AFONSO, 2004; TORTELLY NETO, 2006).

Afonso (2004) utilizou o hormônio acetato de buserelina na indução à espermição de rã-touro portadoras de micobacteriose com aplicação na região intraperitoneal. Após a coleta do sêmen determinou-se a quantidade de espermatozoide por animal.

Tortelly Neto (2006) realizou análise seminal e espermática de rã-touro portadora de micobacteriose, utilizando acetato de buserelina como hormônio indutor e adotando os parâmetros: volume, cor, odor, motilidade progressiva, vigor e concentração espermática para análise do sêmen. Características morfológicas dos espermatozoides foram utilizadas para classificar os espermatozoides. De acordo com a metodologia de mamíferos segundo (BLOM, 1973).

A avaliação espermática descrita por Blom (1973) para mamíferos divide as características morfológicas em normais, defeitos maiores (13 formas) e defeitos menores (9 formas). Tortelly Neto (2006) encontrou 12 formas consideradas anormais ao analisar sêmen “in-natura” de rã-touro portadora de micobacteriose, utilizando como base metodologia para mamíferos.

Quanto à morfologia, os espermatozóides de peixes foram classificados em normais, anormalidade primária e secundária (STREIT JR. et al., 2008; MILIORINI, 2006; MORAES et al., 2004).

O sêmen de anuros apresenta similaridades com o sêmen de peixes, e a principal característica comum entre esses dois grupos é a motilidade espermática, já que em ambos a sua iniciação depende da interação com o meio aquático (COSSON, 2004).

Foi realizado este trabalho com o objetivo de desenvolver uma técnica de indução hormonal para a espécie nativa rã-manteiga com base na técnica utilizada para rã-touro e de analisar o sêmen e os espermatozóides de rã-manteiga utilizando parâmetros adotados para peixes.

2. Material e Métodos

2.1. Local

O experimento foi realizado no Laboratório do Ranário experimental da Universidade Federal de Viçosa (UFV), durante o período de vinte e sete de abril a três de maio de 2009.

2.2. Coletas

Foram realizadas trinta e quatro dias de coleta de espécimes de *Leptodactylus ocellatus* (rã-manteiga) no seu ambiente natural (campo), sendo trinta coletas no município de Viçosa – MG, duas no município de Vieiras – MG e duas no município de Coimbra – MG, sob licença de número 17.252-1 (IBAMA/SISBIO). As coletas dos animais foram do dia dezoito de setembro de 2008 ao dia quatro de março de 2009.

As coletas foram realizadas no período noturno (19:00 h e 23:00 h). Os animais foram capturados com auxílio de um puçá, sendo usada uma lanterna para visualização do animal. Depois da captura os animais foram colocados em uma sacola plástica transparente, que foram colocadas em um embornal para o seu transporte. Um termômetro digital infravermelho foi utilizado para verificar a temperatura do local da coleta do animal e as observações foram anotadas em um caderno de campo.

Dos trinta e quatro dias de coletas, três dias não se coletaram animais (um dia no município de Coimbra e dois no município de Viçosa), no total foram coletados 51 animais (27 machos, 13 fêmeas e 11 jovens).

A temperatura nos locais das coletas ficou dentro da faixa de 20°C a 26°C.

Os animais coletados foram transportados para o laboratório do Ranário da UFV, onde foi realizada a biometria. Sendo pesados em balança digital com precisão de 0,01g, e medidos com auxílio de um paquímetro digital de 0,001cm de precisão.

2.3. Período de aclimação

Os animais machos coletados foram conduzidos a uma sala experimental climatizada (temperatura de 29,5°C ± 1,5°C e fotoperíodo de 12;12 LD) e colocados individualmente em caixas plásticas de cor branca com 0,40m de altura, 0,50m de largura e 0,60m de comprimento. Cada caixa continha 3 kg de terra de um horizonte B de latossolo vermelho-amarelo distribuída por toda a base e um vasilhame redondo de vidro com capacidade de 1L. Sobre as caixas foi colocada uma grade para evitar fugas. Os animais

permaneceram sempre nesta sala climatizada, mesmo durante a realização das biometrias e do experimento.

No dia 27 de abril de 2009 os exemplares machos com peso acima de 100g, presença de acúleos negros, membros anteriores desenvolvidos (figura 1) e presença de reflexo do estímulo ao amplexo nupcial foram selecionados (figura 2) para o experimento de indução hormonal e coleta de sêmen.

Dos vinte sete animais machos coletados somente sete foram selecionados para o experimento, sendo que treze animais morreram durante o período de adaptação ou aclimatação, seis animais não apresentaram as características exigidas e um animal estava debilitado por lesões. Dos animais selecionados o tempo de aclimatação foi 138 dias para a realização do experimento.

Dos animais selecionados os animais de número 1, 2, 4, 6 e 7 foram coletados no município de Viçosa - MG, o animal de número 3 foi coletado no município de Vieiras – MG e do número 5 no município de Coimbra – MG.

Na tabela 1 está representando os dados referentes aos animais selecionados desde a coleta até o dia da biometria de seleção dos animais para o experimento.

Tabela 1. Data de coleta do animal, peso dos animais durante o período de aclimatação até o dia de seleção para o experimento (138 dias), e comprimento dos animais aos 138 dias de *Leptodactylus ocellatus* Linnaeus (1758)

Animal	Data de Coleta (0)	Biometria								
		Peso (g) em dias de cativeiro								Comp. (cm) 138 dias
		0	1	30	60	90	120	138	Ganho de Peso	
1	22/09	150,10	140,67	135,78	129,01	140,24	138,34	127,80	- 22,30	10,155
2	05/10	197,39	203,90	200,89	195,31	188,85	174,09	200,01	2,71	11,068
3	16/10	220,48	221,90	221,89	216,21	209,00	207,49	221,98	1,50	13,100
4	02/11	118,90	112,89	115,89	108,39	102,89	105,27	111,80	- 7,10	9,945
5	07/11	213,89	219,89	217,89	212,35	191,87	NC	194,00	- 19,89	11,863
6	25/11	169,90	163,89	170,01	177,92	172,35	164,53	190,46	20,56	10,752
7	06/12	179,89	176,90	172,90	165,89	170,20	159,92	181,59	1,70	11,533

NC= Dado não foi coletado.

A água foi trocada todos os dias e fornecidos aos animais imagos e girinos de rã-touro para os reprodutores.

2.4. Indução Hormonal

Para indução à espermição foi utilizado o produto comercial Conceptal® à base do hormônio acetato de busserelina (GnRH análogo).

Os espécimes de rã-manteiga receberam uma aplicação diária de 0,1 mL de Conceptal® (0,4 µg do hormônio acetato de busserelina) na cavidade celomática durante sete dias consecutivos (figura 3).

2.5. Coleta do Sêmen

As tentativas de coletas do sêmen dos exemplares de rã-manteiga foram realizadas diariamente após noventa minutos da aplicação do hormônio. Para extração do espermatozóide foi utilizada uma pipeta de vidro de 2mL que foi introduzida na cloaca dos animais (AGOSTINHO et al., 2000) (figura 4), ao mesmo tempo foi realizada com os dedos uma massagem pelo coletador na cavidade celomática próxima à região pélvica para facilitar a coleta do sêmen.

A massagem foi realizada com cuidado, por que dependendo da força empregada pode ser coletado junto com o sêmen fezes e ou organismos (vermes) contaminando-o.

Para verificar a ação de tratamento, gotas do sêmen de cada exemplar foram colocadas em lâminas histológicas e visualizadas sob microscópio de campo claro, sendo consideradas positivas as lâminas contendo espermatozoides.

Todo o volume coletado dos animais foi colocado em uma proveta de 10 mL. A amostra com resultado positivo foi utilizada para realização dos parâmetros a seguir, as amostras com resultados negativo foram descartadas.

2.6. Volume e Cor do Sêmen

O volume das amostras de sêmen coletado foi aferido através de uma proveta graduada. A cor do sêmen foi classificada em transparente (nota 1) e turvo (nota 2).

2.7. Vigor, Motilidade e Concentração Espermática

Uma alíquota de 50µL de sêmen "in natura" de cada animal foi colocada sobre uma lâmina histológica e sobre a alíquota uma lamínula, foi observada em microscópio óptico de campo claro com objetiva de 20x. O vigor é a agilidade no deslocamento do espermatozóide e foi classificado de 0-5 e a motilidade espermática foi estimada em porcentagem média de

espermatozóides móveis observados em três campos diferentes (MILIORINI, 2006).

A concentração espermática foi estimada por meio da utilização de uma câmara de Neubauer. Uma alíquota de 10µL de sêmen foi diluída em 50µL de formol (10%). A diluição foi colocada na câmara de Neubauer e contou-se os espermatozóides de cinco quadrados do campo de 1mm², obtendo-se a quantidade de espermatozóides por mL (SPTZ/mL).

2.8. Análise Morfológica do Sêmen

As análises morfológicas do sêmen foram realizadas em microscópio de campo claro com aumento de 800x.

Uma alíquota de 10µL de sêmen foi diluída em 50µL de solução fixadora de formol 10%. A seguir, uma fração de 10 µL da amostra fixada foi depositada em lâmina histológica e coberta por lamínula. O exame consistiu da observação da morfologia de 50 espermatozóides (TORTELLY NETO, 2006), focalizados em diversos campos ao longo de toda a lâmina conforme esquematizado por Miliorini (2006).

A metodologia adotada foi baseada em metodologia utilizada para peixes (MILIORINI, 2006) por considerar que os espermatozóides de peixes e anfíbios utilizam a água como meio para fecundação e por serem animais pecilotérmicos.

Sob aumento de 800x. Foram analisadas a cabeça e a cauda dos espermatozóides. A peça intermediária por causa da dificuldade em visualizar não foi analisada.

Os espermatozóides examinadas das alíquotas do sêmen de rã-manteiga foram classificados morfológicamente em espermatozóides com anormalidades maiores e menores (tabela 2).

Tabela 1. Morfologias consideradas com anormalidades maiores e menores no sêmen de *Leptodactylus ocellatus*, adaptado de Miliorini (2006)

Morfologia anormalidades maiores	Morfologia anormalidades menores
Cabeça degenerada	Cabeça isolada normal
Macrocefalia	Gota proximal
Microcefalia	Gota distal
Cauda degenerada	Cauda dobrada
Cauda fraturada	
Cauda enrolada	

As anormalidades estão dispostas em ordem decrescente e na seqüência da análise do espermatozóide.

Quando os espermatozoides apresentaram duas ou mais anormalidades, foi considerada somente a de maior implicação, segundo proposto por Miliorini (2006).

As anormalidades Maiores foram descritas a seguir:

A macrocefalia foi observada naqueles espermatozoides que apresentavam cabeça gigante, com contorno e forma anormais.

A microcefalia foi observada em espermatozoides com cabeça de tamanho reduzido, com contorno e forma anormais.

Espermatozoides com cabeça de tamanho e forma normais, mas que apresentavam contorno irregular e ou degenerações aparentes foram considerados possuidores de cabeça degenerada.

Células espermáticas com fratura e retenção da cauda foram classificadas como espermatozoides com cauda fraturada.

A patologia de cauda fortemente enrolada consistiu da dobradura e enovelamento da cauda sobre si mesma ou sobre a cabeça. Foram considerados somente os enovelamentos que pudessem comprometer intensamente a motilidade espermática (sobre a cabeça ou com grande extensão da cauda acometida), sendo desconsiderados enovelamentos distais discretos.

Espermatozoides que apresentaram descontinuidade da cauda a partir da peça intermediária foram considerados possuidores de cauda degenerada.

As morfologias com Anormalidades Menores foram descritas a seguir:

Espermatozoides observados sem cauda, mas sem qualquer alteração de cabeça foram caracterizadas como cabeça isolada normal.

A morfologia anormal de cauda dobrada é aquela onde há dobradura da cauda, em diversos graus.

2.9. Comprimento Total, Comprimento da Cabeça e Comprimento de Cauda

Todos os espermatozóides considerados normais (240) foram medidos com auxílio de uma lente ocular graduada sob microscópio de campo claro com aumento de 800x. Foi medido o comprimento total das células, o comprimento da cabeça (com peça intermediária) e comprimento da cauda. Não foi realizada a medição da peça intermediária individualmente dos espermatozóides de rã-manteiga pela dificuldade em determinar seus limites.

2.10. Delineamento experimental e análise estatística

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foi realizada análise para todos os parâmetros avaliados com auxílio do programa de análise estatística SAEG (2007).



Figura 1. Membro anterior de exemplar macho de *Leptodactylus ocellatus* (rã-manteiga) apresentando acúleo nupcial negro.



Figura 2. Exemplar macho da *Leptodactylus ocellatus* (rã-manteiga) evidenciando membros anteriores desenvolvidos.



Figura 3. Aplicação do hormônio acetato de buserelina num macho de *Leptodactylus ocellatus* (rã-manteiga).



Figura 4. Coleta do sêmen de *Leptodactylus ocellatus* (rã-manteiga).

3. Resultados e Discussão

Foram coletadas sete amostras de cada animal ao longo do experimento, um total de quarenta e nove amostras de líquido da cloaca dos animais, destas somente sete amostras foi considerado sêmen por apresentar espermatozóides. O rendimento do trabalho em coleta de sêmen foi de 14,3%.

Na tabela 3 mostra à resposta dos animais a utilização do hormônio acetato de buserelina a indução a espermição de rã-manteiga e na figura 5 espermatozóides de rã-manteiga encontrados.

Tabela 2. Resposta dos animais *Leptodactylus ocellatus* mediante a indução à espermição com acetato de buserelina

Animal	Horas após a primeira aplicação (h)		
	97,5	121,5	145,5
1	-	-	-
2	-	+	+
3	+	+	+
4	-	-	-
5	-	-	-
6	+	-	+
7	-	-	-

(-) Resposta negativa, ausência de SPTZ. (+) Resposta positiva, presença de SPTZ.

Três animais responderam à aplicação do hormônio acetato de buserelina (42,9%), sendo que um animal respondeu no quinto, no sexto e no sétimo dia, outro animal no quinto e no sétimo dia e outro no sexto e sétimo dia.

Quatro animais não responderam à indução da espermição com a utilização do hormônio acetato de buserelina (57,1), embora estes animais apresentassem as mesmas características sexuais secundárias (acúleos negros, reflexo ao amplexo nupcial e membros anteriores bem desenvolvidos) e tivessem sido submetidas aos mesmos procedimentos de manejo, temperatura, fotoperíodo e umidade que aqueles que responderam.

Os animais que responderam ao tratamento não perderam peso ao comparar o peso no dia em que foi coletado com o peso do dia da biometria de seleção dos animais para o experimento, dos que não responderam apenas um

não perdeu peso. Dos quatro com maior peso, três são os que responderam, indicando serem animais mais velhos e fisiologicamente mais preparados para a reprodução.

Uma hipótese para o baixo índice no número de animais com resposta positiva ao tratamento pode ser a dificuldade da manutenção do peso corporal destes animais em cativeiro.

O percentual de 42,9% de animais de rã-manteiga que responderam ao tratamento foi menor ao resultado obtido por Alonso (1997), com 100% da rã-touro respondendo ao serem induzidas à espermiacção com uso do hormônio acetato de buserelina. No trabalho deste autor a quantidade de espermatozóide liberada foi uniforme e o tempo de espermiacção foi prolongado.

A temperatura adotada ($29,5^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$) no presente trabalho. Pode ter influenciado nas respostas dos machos de rã-manteiga, pois em outro trabalho de espermatogênese Rengel (1950) utilizou-se temperaturas entre 31 e 36°C para exemplares de *Leptodactylus ocellatus*, que apresentaram todos os estágios evolutivos de progênie espermática. Segundo o mesmo autor, em temperaturas altas é constante a produção de hormônios gonadotrópicos que estimulam alterações na espermatogênese.

As respostas positivas encontradas reforçam a idéia de Callard (1992) de que a espermatogênese de anfíbios é dependente dos hormônios androgênicos.

Resposta positiva mediante a indução à espermiacção também foi verificada em outras espécies de anuros, *Rana nigromaculata* (KOBAYASHI et al, 1993) e *Bufo arenarum* (POZZI e CEBALLOS, 2000), quando submetidos à indução espermática por outro hormônio (hCG).

Os animais foram alimentados com girinos e imagos de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro), diferente do ambiente natural onde os animais se alimentam de uma variedade de famílias de insetos e de anfíbios de pequeno porte (MAIA, 2008; FRANÇA et al., 2004; MANEYRO et al., 2004; LIMA, 1986). O alimento ingerido pode ser umas das causas do baixo índice de espermiacção pelos animais.

A ração com 40% de proteína bruta foi oferecida para alimentação da rã-manteiga, mas não teve aceitação, mesmo com utilização de larva de mosca (*Musca domestica*) como atrativo alimentar.

Além disso, ausência de fêmeas pode ser um fator que influenciou na resposta encontrada.

Os animais foram colocados individualmente em cada caixa, segundo Lima (1979) estes animais apresentam territorialismo.

A resposta ao hormônio somente aconteceu no quinto dia (97,5 h de tratamento). O GnRHa quando injetado em peixes estimula a liberação das gonadotropinas pela adeno-hipófise, sendo que a resposta à aplicação pode variar de um a quatro dias e geralmente duas doses são melhores do que a soma em uma aplicação (BALDISSEROTO, 2002).

A rã-manteiga levou 97,5 horas para o sêmen ser coletado enquanto o sêmen de rã-touro leva 1 hora (AGOSTINHO et al., 2000), 2 horas (AFONSO, 2004) e 3 horas (TORTELLY NETO, 2006). Esse fato pode estar relacionado com a espécie e com a alimentação, domesticação, temperatura e fotoperíodo ideal a espécie, segundo Agostinho et al. (2003) as fêmeas de rã-touro quando submetidas ao fotoperíodo de 16 horas de luz tem melhores resultados quanto ao número de desovas.

Os resultados da avaliação das amostras de sêmen dos animais encontram-se na tabela 3. As amostras 1, 3 e 5 de sêmen são do animal de número 3, as amostras 2 e 6 de sêmen são do animal de número 2 e as amostras 4 e 7 são do animal de número 6.

Tabela 3. Avaliação das amostras de sêmen de *Leptodactylus ocellatus* em volume, cor, vigor, motilidade e concentração espermática

Amostra	Volume (mL)	Cor (1-2)	Vigor (1-5)	Motilidade (0-100%)	Concentração ($10^6 \times \text{SPTZ/mL}$)
1	0,2	2	2	60	2,2
2	0,2	2	4	80	11,4
3	0,4	2	5	80	12,6
4	0,4	2	5	90	4,0
5	0,8	2	2	70	4,0
6	0,2	2	4	80	8,8
7	0,5	2	4	80	3,2
Média	0,38	2	3,71	77,14	6,60
Desvio Padrão	0,219	0	1,253	9,511	4,248

O volume seminal médio da rã-manteiga foi de 0,38mL. O maior volume coletado de uma rã-manteiga foi de 0,8mL enquanto a rã-touro se coleta valores mais altos (10,4mL).

A rã-manteiga durante o experimento se alimentou com isso aumenta a probabilidade de contaminação do sêmen por fezes quando se força à retirada de maior quantidade. Para a rã-touro a faixa média de volume coletado é de 2 a 4 mL (AGOSTINHO et al, 2000) mas os animais ficaram em jejum de 48 horas.

O vigor espermático médio encontrado foi de 3,71 (1-5) para rã-manteiga. Valor superior ao encontrado por Afonso (2004) de 2,55 para rã-touro portadora de micobacteriose.

Valores inferiores de vigor espermático foram encontrados para peixes, Mataveli et al. (2007) encontrou o valor de 3,21 de vigor espermático para tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) e Streit Jr. et al. (2008) encontrou 2,37 para piapara (*Leporinus elongatus*).

A motilidade espermática média encontrada para rã-manteiga foi de 77,14%. Valor superior ao encontrado por Tortelly Neto (2006) de 67% de para rã-touro portadora de micobacteriose.

Diferenças no valor de motilidade espermática foram encontradas em peixes onde Mataveli et al. (2007) encontraram o valor de 81,08% para a *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), Streit Jr. et al. (2008) encontraram 36,72% para a *Leporinus elongatus* (piapara), Ferreira et al. (2001) encontraram 73% para a *Rhamdia quelen* (jundiá) e Andrade-Talmelli et al. (2001) encontrou 90,90% para a *Brycon insignis* (piabanha).

Concentração espermática média do sêmen de rã-manteiga foi de $6,60 \times 10^6$ SPTZ/mL. O valor encontrado é superior aos valores encontrados por ROSEMBLIT et al. (2006) para a rã-manteiga de $11,00 \times 10^5$ SPTZ/mL e para a rã-touro de $9,00 \times 10^5$ SPTZ/mL, induzidas com hCG.

O Valor encontrado para concentração espermática para rã-manteiga é inferior ao encontrado por Tortelly Neto (2006) de $10,03 \times 10^6$ SPTZ/mL, para a rã-touro portadora de micobacteriose. Uma explicação para o menor número de espermatozóide no sêmen de rã-manteiga ao comparar com a rã-touro é a quantidade de ovócitos a serem fecundados. Segundo Ribeiro Filho et al. (1998) uma desova de rã-touro pode conter 24.000 ovócitos e rã-manteiga 1.000 ovócitos (LIMA, 1979).

Diferenças no valor de concentração espermática também foram encontradas entre as espécies de peixes, Mataveli et al. (2007) encontraram o valor de $2,63 \times 10^9$ SPTZ/mL para concentração espermática para a *Oreochromis niloticus* (tilápia do nilo), Ferreira et al. (2001) encontraram

69,9x10⁶ SPTZ/mL para a *Rhamdia quelen* (jundiá), Luz et al. (2001) encontraram 54,42x10⁶ SPTZ/mL e Andrade-Talmelli et al. (2001) encontraram 24,76x10⁶ SPTZ/mL para a *Brycon insignis* (piabanha).

O valor de concentração espermática média encontrados para rã-manteiga está dentro de uma faixa que varia entre 1,56 x 10⁵ e 1,62 x 10⁷ SPTZ/mL proposta por Agostinho et al. (2000) para rã-touro.

Todas as amostras de sêmen de rã-manteiga foram classificadas em cor turva. Segundo Tortelly Neto (2006) todas as amostras de sêmen de rã-touro na primeira coleta tende à cor turva. A cor é um indicador de maior ou menor quantidade de fluido seminal e tem influência direta na concentração de espermatozóide (Andrade-Talmelli et al., 2001).

A tabela 4 mostra os resultados encontrados nas análises morfológicas realizadas a partir das amostras de sêmen de rã-manteiga o número de espermatozóides classificados em normais, defeitos ou anormalidades maiores e defeitos ou anormalidades menores.

Tabela 4. Número e a porcentagem de espermatozóides encontrados nas amostras do sêmen de *Leptodactylus ocellatus* (rã-manteiga), classificado em normal, defeito maior e defeito menor

Amostra	Normais (1-50) (SPTZ)	Normais (%)	Def. Maior (1-50) (SPTZ)	Def. Maior (%)	Def. Menor (1-50) (SPTZ)	Def. Menor (%)
1	35	70	10	20	5	10
2	30	60	15	30	5	10
3	35	70	8	16	7	14
4	30	60	13	26	7	14
5	38	76	5	10	7	14
6	36	72	4	8	10	20
7	36	72	6	12	8	16
Média	34,50	69,00	8,50	17,00	7,00	14,00
Desvio Padrão	3,093	-	4,151	-	1,732	-

O número de espermatozóides (SPTZ) normais encontrados em 50 SPTZ analisados nas amostras de sêmen para rã-manteiga em média foi de 34,50 (69 %). Valor superior ao encontrado por Tortelly Neto (2006) de 59,33% para rã-touro portadora de micobacteriose.

O valor de 31,00% de espermatozóides encontrados nas amostras de sêmen considerados anormais está abaixo do recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) o qual recomenda não utilizar sêmen com índice de espermatozóides com anormalidade acima de 30% para bovinos e eqüinos e 20% para suínos e ovinos. A comparação com índices de animais de outras classes taxonômicas é devida a não existência de um índice para rãs.

Para peixes os valores de espermatozóides considerados anormais são maiores. Moraes et al. (2004) registraram índices de espermatozóides de *Prochilodus lineatus* (curimba) com anormalidades em torno de 40,2%, 49% para o *Leporinus macrocephalus* (piauvucu) e 37,6% para a *Cyprinus carpio* (carpa comum), para a *Leporinus elongatus* (piapara) Streit Jr. et al. (2008) encontraram índice de 54,7%

A tabela 5 mostra em números a quantidade de espermatozóides encontrados nas amostras de sêmen de rã-manteiga classificados de acordo com as anormalidades do grupo das anormalidades ou defeitos maiores.

Tabela 5. Número de espermatozóides encontrados nas amostras de sêmen de *Leptodactylus ocellatus* (rã-manteiga) classificados de acordo com os defeitos maiores

Amostra	Cab. Deg. (1- 50) (SPTZ)	Cauda Deg. (1- 50) (SPTZ)	Cauda Frat. (1- 50) (SPTZ)	Cauda Enr. (1- 50) (SPTZ)	Macro Encef. (1-50) (SPTZ)	Micro Encef. (1-50) (SPTZ)	Def. Maior (1- 50) (SPTZ)
1	0	2	6	1	0	1	10
2	1	4	7	1	0	2	15
3	0	1	4	2	0	1	8
4	0	0	4	4	2	3	13
5	0	1	2	2	0	0	5
6	0	2	1	1	0	0	4
7	0	1	3	2	0	0	6
Média	0,14	1,57	3,85	1,85	0,28	1,00	8,50
Desvio Padrão	0,377	1,272	2,115	1,069	0,755	1,154	4,151

A seqüência quantitativa e decrescente dos defeitos maiores de acordo com a quantidade de espermatozóides encontrados nas amostras de sêmen de rã-manteiga é: cauda fraturada (3,85 SPTZ), cauda enrolada (1,85 SPTZ), cauda degenerada (1,57 SPTZ), microencefalia (1,00 SPTZ), macroencefalia (0,28 SPTZ) e cabeça degenerada (0,14 SPTZ). Dentre as anormalidades a que causou maior impacto durante a sua visualização foi a de macroencefalia.

A tabela 6 mostra o número de espermatozóides encontrados nas amostras de sêmen de rã-manteiga classificados em defeitos menores.

Tabela 6. Número de espermatozóides encontrados nas amostras de sêmen de *Leptodactylus ocellatus* (rã-manteiga) classificados de acordo com os defeitos menores

Amostra	Cab. Isol. Normal (1-50) (SPTZ)	Gota Proximal (1-50) (SPTZ)	Gota Distal (1-50) (SPTZ)	Cauda Dobrada (1-50) (SPTZ)	Defeitos Menores (1-50) (SPTZ)
1	0	2	1	2	5
2	0	0	3	2	5
3	1	1	3	2	7
4	4	0	2	1	7
5	1	1	4	1	7
6	2	4	2	2	10
7	2	1	4	1	8
Média	1,42	1,28	2,71	1,57	7,00
Desvio Padrão	1,397	1,380	1,112	0,354	1,732

A seqüência quantitativa e decrescente dos defeitos menores de acordo com a quantidade de espermatozóides encontrados nas amostras de sêmen de rã-manteiga é: gota distal (2,71 SPTZ), cauda dobrada (1,57 SPTZ), cabeça isolada normal (1,42 SPTZ) e gota proximal (1,28 SPTZ).

Dentre as amostras do sêmen de rã-manteiga a morfologia anormal em média de cauda fraturada (3,75 SPTZ) foi a de maior ocorrência entre todas as anormalidades e a de cabeça degenerada (0,14 SPTZ) a de menor ocorrência entre todas as anormalidades.

De acordo com as observações realizadas, com base nos parâmetros motilidade e vigor, foi estabelecida uma seqüência qualitativa e decrescente das anormalidades, quanto à capacidade da anormalidade dificultar a fecundação. A seqüência é: Macroencefalia, cabeça degenerada, cauda degenerada, cauda fraturada, microencefalia, cauda enrolada, cabeça isolada normal, gota proximal, gota distal e cauda dobrada.

Ao comparar a ordem quantitativa com a qualitativa é verificado que as anormalidades encontradas com maior freqüência não foram às consideradas as mais importantes para dificultar a fecundação. Essa comparação mostra que apesar dos 31% dos espermatozóides encontrados no sêmen de rã-manteiga ser anormais, as anormalidades consideradas piores para a fecundação foram às menos freqüentes.

Além da porcentagem de espermatozóides considerados normais serem um parâmetro importante para a avaliação de amostras de sêmen de rã-manteiga, a classificação dos espermatozóides em defeitos maiores e menores torna-se necessária para uma maior qualificação do sêmen e a tomada de decisão para sua utilização ou não futuramente. Pois os defeitos maiores (8,50 SPTZ) foram encontrados em maior número que os defeitos menores (7,00 SPTZ) nas amostras de sêmen, mas a maioria dentro dos defeitos maiores foi das anormalidades que afetam menos a fecundação.

Espermatozóides considerados anormais não quer dizer inviáveis para fecundação, porque a fecundação ocorre no meio aquático e, além disso, a fêmea da rã-manteiga ao bater as pernas durante o acasalamento pode aumentar o movimento destes espermatozóides. Então mesmo que o valor de espermatozóides normais de rã-manteiga (69,28%) não seja alto não se pode dizer que a taxa de fecundação será baixa.

No sêmen de rã-manteiga foram encontradas as morfologias consideradas anormais: cabeça degenerada, cauda degenerada, cauda fraturada, cauda enrolada, macroencefalia, microencefalia, gota proximal, cabeça isolada normal, gota distal, cauda dobrada. Tortelly Neto (2006) encontrou anormalidades diferentes como espermatozóides subdesenvolvidos, com contorno anormal, com vacuolação e teratogênico, ao analisar o sêmen de rã-touro portadora de micobacteriose, usando metodologia de mamíferos descrita por Blom (1973).

Na tabela 7 encontram-se os resultados em média do comprimento total, da cabeça e da cauda dos espermatozóides de rã-manteiga classificados como normais. A figura 6 mostra o espermatozóides de rã-manteiga.

Tabela 7. Média (MD) e desvio padrão (DP) do comprimento total (CT), da cabeça (CB) e da cauda (CC) dos espermatozoides (SPTZ) classificados como normais de *Leptodactylus ocellatus*

Amostra	SPTZ Normal (1-50)	MDCT (μm)	DPCT	MDCB (μm)	DPCB	MDCC (μm)	DPCC
1	35	14,311	2,410	6,000	0,907	8,314	1,693
2	30	14,166	1,577	5,833	0,746	8,333	1,241
3	35	13,466	1,279	5,500	0,731	7,966	0,850
4	30	12,714	1,126	5,257	0,560	7,457	0,657
5	38	15,027	1,383	5,694	0,749	9,333	0,717
6	36	14,342	1,419	5,868	0,843	8,526	1,156
7	36	14,916	0,731	6,305	0,624	8,611	0,644
Média Total	34,64	14,158	1,659	5,787	0,803	8,379	1,175

A média do comprimento total, da cabeça e da cauda dos espermatozoides normais das amostras de sêmen de rã-manteiga foram 14,158 μm ; 5,787 μm e 8,379 μm .

O espermatozóide de rã-manteiga assemelha-se quanto à forma (fino e alongado) ao comparar com o formato de outros anfíbios anuros nativos do Brasil, como *Colostethus brunneus* (VEIGA-MENONCELLO et al., 2006), *Crossodactylus sp.* (AGUIAR Jr. et al., 2006), *Phyllomedusa sp.* (perereca) (COSTA et al., 2005) e difere do espermatozóide de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) que tem formato de cabeça mais abolido e uma cauda mais fina e curta (TORTELLY NETO, 2006).

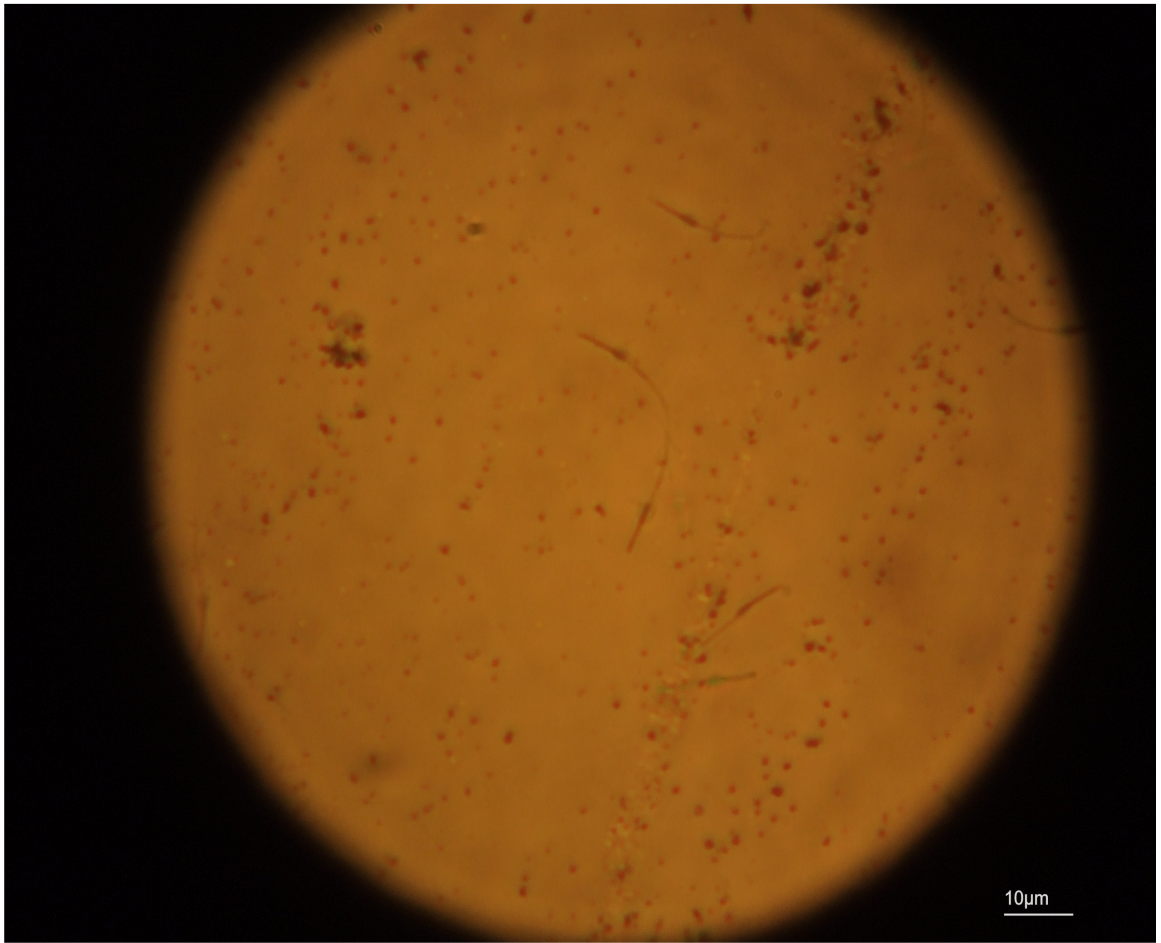


Figura 5. Espermatozóides de rã-manteiga (*Leptodactylus ocellatus*).

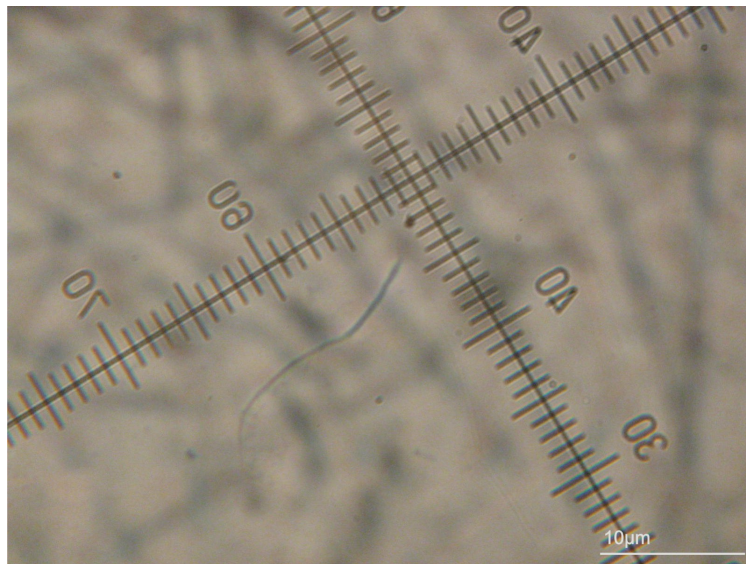


Figura 6. Espermatozóide de *Leptodactylus ocellatus*.

4. Conclusão

O acetato de buserelina pode ser utilizado com indutor a espermição de rã-manteiga.

Os animais maiores e apresentando todas as características secundárias sexuais são mais propícios ao resultado positivo na indução a espermição utilizando acetato de buserelina.

A dificuldade em coletar e a criação em cativeiro de rã-manteiga pode interferir na realização de trabalhos com essa espécie.

Foi coletado baixo volume seminal, os resultados de coloração, vigor, motilidade e a concentração foram adequados ao comparar com os de outras espécies de rã e peixes.

O número de espermatozóides normais, com defeitos maiores e menores encontrados é aceitável ao comparar com espécies de outras classes taxonômicas.

5. Referências Bibliográficas

- AFONSO, A.F. Efeito do acetato de busserelina na indução á reprodução de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) naturalmente portadora de micobacteriose. Rio de Janeiro, 2004, 86p. **Dissertação** (Mestrado em Patologia e Reprodução Animal) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.
- AGOSTINHO, C.A. Manejo da reprodução. In: International meeting on frog research and technology, 1, Encontro Nacional de Ranicultura, 8, 1995, Viçosa. **Apostila de Biologia e Manejo da Reprodução de Rãs**. Viçosa: Academia Brasileira de Estudos Técnicos em Ranicultura, 29-42. 1995.
- AGOSTINHO, C.A.; WECHSLER, F.S.; LIMA, S.L. Influência do fotoperíodo sobre a indução em rã-touro, *Rana catesbeiana*. In: **Anais**. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003.
- AGOSTINHO, C.A.; WECHSLER, F.S.; NICTEROY, P.E.O.; PINHEIRO, D.F. Indução á ovulação pelo uso de LHRH análogo e fertilização em rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29 (5), 1261-1265, 2000.
- AGUIAR Jr., O.; GIARETTA, A.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. The sperm of hylodinal species (Anura, Leptodactylidae): Ultrastructure characteristics and their relevance to interspecific relationships. **Journal of Biosciences**, v.31 (3), 379-388, 2006.
- AGUIAR Jr., O.; LIMA, A.P.; BÀO, S.N.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Sperm ultrastructure of the Brazilian Amazon poison frogs *Epipedobates trivittatus* and *Epipedobates hahmeli* (Anura, Dendrobatidae). **Acta Zoológica**, v.85, 21-28, 2004.
- ALONSO, M. Uso de análogos do GnRH para indução de desova e espermição em rã-touro, *Rana catesbeiana*, Shaw, 1802. São Paulo, 1997, Universidade de São Paulo, USP, 136p. **(tese – DS)**. 1997.
- ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; FENERICHI-VERANI, N. Características seminais de piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27 (2), 149-154, 2001.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixe aplicada á piscicultura**. Santa Maria:UFSM, 2002. 212p.
- BLOOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermgram. **Nord. Vet. Med.**, v.25. 383-391, 1973.

CALLARD, G.V. Autocrine and paracrine role of during spermatogenesis: studies in *Squalus acanthias* and *Necturus maculosus*. **Journal Experimental Zoological**, v.261, 132-142, 1992.

CAMARGO FILHO, C.F. Características alimentares e o potencial impactante da rã-touro *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), Viçosa, 2009, 58p. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2 ed, Belo Horizonte. CBRA, 1998. 49p.

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

COSTA, G.C.; GARDA, A.A.; TEIXEIRA, R.D.; COLLI, G.R.; BÀO, S.N. Comparative analysis of the sperm ultrastructure of three species of *Phyllomedusa* (Anura, Hylidae). **Acta Zoologica**, v.85, 257-262, 2004.

FERREIRA, A.A.; NuñER, A.P.O.; LUZ, R.K.; TATAJE, D.A.R.; ESQUIVEL, J.R.; RESTREPO, J.B. Avaliação qualitativa do sêmen do jundiá, (*Rhamdia quelen*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27 (1), 57-60, 2001.

FRANÇA, L. F.; FACURE, K. G.; GIARETTA, A. A. Trophic and Spacial Niches of two Large-sized Species of *Leptodactylus* (ANURA) in Southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environmet**, v.39 (3), 243-248, 2004.

JUNCÁ, F.A. Declínio Mundial das Populações de Anfíbios. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v.1 (1), 84-87. 2001.

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

LEE, M.S.Y.; JAMIESON, B.G.M. The ultrastructure of the spermatozoa of Bufonid and Hilid frogs (Anura, Amphibia): implication for phylogeny and fertilization biology. **Zoologica Scripta**, v.22, 309-323, 1993.

LIMA, S.L. Alimentação de uma população natural de rã-manteiga *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) e técnicas aplicadas a sua criação intensiva. (AMPHIBIA, ANURA, LEPETODACTYDAE). São Carlos, 86p (**tese de doutorado**). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1986.

LIMA, S.L. Crescimento, relações biométricas, reprodução e dinâmica populacional de *Leptodactylus ocellatus* (AMPHIBIA, ANURA,

LEPTODACTYLIDAE) em Viçosa-MG e Curitiba-PR. Curitiba, 1979, 112p. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1979.

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

LUZ, R.K.; FERREIRA, A.A.; REYNALTE, D.A.T.; ZANIBONI FILHO, E. Avaliação qualitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimolodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27 (1), 39-42, 2001.

MAIA. D.L.H. Dieta de *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus,1758) (Anura: Leptodactylidae) em condições naturais na região de Viçosa, Minas Gerais. Viçosa, 2008, 47p. **Monografia** (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2008.

MANEYRO, R.; NAYA, D.E.; ROSA, I.; CANAVERO, A.; CAMARGO, A. Diet of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura, Leptodactylidae) in Uruguay. **Iheringia, Sér, Zool**, v. 94 (1), 57-61, 2004.

MATAVELI, M.; MORAES, G.V.; STREIT Jr., D.P.; VARGAS, L.D.M.; SAGAGUTI, E.S. TONINATO, J.C.; BARBOSA, R.C.; MERLINI, L. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chiltralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina c. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.33 (1), 1-7, 2007.

MILIORINI, A.B. Ativadores e Concentrações de Metanol e Dimetilsulfóxido na Qualidade do Sêmen Criopreservado de Curimba (*Prochilodus Lineatus*) Lavras, MG. 97p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Viçosa. 2006.

MORAES, G.N.; STREIT Jr., D.P.; RIBEIRO, R.P.; SAKAGUTI, E.S.; SOUZA, E.D. POVH, J.A. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozóides de piauvuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Boletim do Instituto de pesca**, v.30 (2), 109-116, 2004.

POZZI, A.G.; CEBALLOS, N.R. Human chorionic gonadotropin-induced spermiation in *Bufo arenarum* is not mediated by steroid biosynthesis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 119, 164-171. 2000.

RENGEL, D. Accion de la temperatura elevada sobre la espermatogenesis de dos formas *Leptodactylus ocellatus*. **Acta Zoológica Lilloana**, v. 9, 426-450. 1950.

RIBEIRO FILHO, O.P. Uso de extrato bruto de hipófise na indução da desova de rã-touro. *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802), Viçosa, 50p. **Dissertação** (mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1994.

RIBEIRO FILHO, O.P.; LIMA, S.L.; ANDRADE, D.R.; SEIXAS FILHO, J.T. Estudo da desova de Rã-touro, *Rana catesbeiana*, mediante indução do acasalamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27 (2), 216-233, 1998.

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

SAEG **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

STREIT Jr, D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.C., VARGAS, L.D.M.; WATANABE, A.L. Qualitative of the piapara semen (*Leporinus elongatus Valenciennes*, 1850). **Brazilian Journal Biology**, v.68 (2), 373-377, 2008.

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

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

WOYNAROVICH, E.; HORVÀTH, L. **Propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: FAO, CODEVASF, CNPQ, 1989. 225p.

YOUNG, B.E.; LIPS, K.R.; REASER, J.K.; IBAÑES, R.; SALAS, A.W.; CEDEÑO, J.R.; COLOMA, L.A.; RON, S.; MARCA, E.; MEYER, J.R.; MUÑOZ, A.; BOLAÑOS, E.; CHAVES, G.; ROMO, D. Populacion declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. **Conservation Biology**, v.15 (5), 1213-1223, 2000.

**Indução à espermição e características seminais do anuro exótico
Lithobates catesbeianus (Shaw, 1802) (rã-touro)**

PEREIRA, Marcelo Maia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2009. Orientador: Prof. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho, Co-orientadores: Prof. Luiz Carlos dos Santos, Prof. Renato Neves Feio, José Cola Zanuncio.

Resumo

O conhecimento do sêmen de rã-touro ao todo que foi coletado após a indução do hormônio acetato de buserelina pode trazer informações necessárias para utilização deste para projetos de fertilização artificial, melhoramento animal e criopreservação. Foi realizado o experimento com o objetivo induzir à espermição de machos utilizando o acetato de buserelina e analisar o sêmen coletado. O local do trabalho foi o Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa, no período de dois de fevereiro a três de maio de 2009. Foram utilizados cinco machos de rã-touro que possuíam as características sexuais secundárias: peso superior a 200g, com papo amarelado, presença do calo nupcial e com presença do reflexo ao amplexo. O hormônio utilizado foi o acetato de buserelina (GnRHa) na dosagem de 0,4 µg, após 60 minutos da única aplicação foi realizada a coleta do sêmen, os parâmetros utilizados para avaliação do sêmen foram: volume seminal, cor do sêmen, vigor espermático, motilidade espermática, concentração espermática e avaliação das morfologias dos espermatozóides. O sêmen de rã-touro obteve em média: volume de 5,76mL, coloração turva, vigor espermático de 4,80; motilidade espermática de 93%, concentração de $14,24 \times 10^6$ SPTZ/mL e 70% de espermatozóides normais. Os resultados encontrados nas amostras de sêmen de rã-touro de volume, cor, vigor, motilidade, concentração espermática e o número de espermatozóides normais são aceitáveis. O conjunto dos parâmetros utilizados para avaliação das amostras de sêmen de rã-touro é indispensável para uma excelente conclusão da qualidade do sêmen e para tomada de decisão do seu destino.

Palavras chaves: rã-touro, reprodução, sêmen, espermatozóide e motilidade espermática

**Induction of spermiation and seminal characteristics of exotic frogs
Lithobates catesbeianus (Shaw, 1802) (bullfrog)**

PEREIRA, Marcelo Maia, M.Sc., Federal University of Viçosa, July of 2009. Adviser: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho, Co-Advisers: Luiz Carlos dos Santos, Renato Neves Feio, José Cola Zanuncio.

Abstract

Knowledge of the semen of bullfrog to all that was collected after the induction of hormone buserelin acetate can bring information to use for projects

of artificial fertilization, animal breeding and cryopreservation. Experiment was conducted in order to induce spermiation of males using busserelin acetate and analyzing the semen collected. The job site was the Experimental Frogfarm Federal University of Viçosa, in the period of two of three from February to May 2009. We used five male bullfrogs that had secondary sexual characteristics: weight greater than 200g, with yellow chat, presence of callus and Bridal person's reflection to embrace. The hormone was used busserelin acetate (GnRHa) at a dose of 0.4 g, 60 minutes after single application was made to collect the semen parameters used for semen evaluation were: semen volume, color of semen, sperm motility, sperm motility, sperm concentration and morphology assessment of spermatozoa. The semen of bullfrog obtained on average volume of 5.76 mL, color vision, motility of 4.80, motility of 93%, and concentration of 14.24×10^6 SPTZ / mL, 70% of normal spermatozoa. The results found in semen samples of bullfrog volume, color, vigor, motility, sperm concentration and normal sperm counts are acceptable. All the parameters used for evaluation of semen samples from bullfrog are essential for optimal completion of the semen quality and decision making to their destination.

Keys words: bullfrog, reproduction, semen, spermatozoa e spermatic motility

1. Introdução

A rã-touro foi introduzida no Brasil na década de 30 com objetivo de ser criada para venda de sua carne (BRAGA e LIMA, 2001). Esta espécie exótica encontrou em algumas regiões excelentes condições para um ótimo rendimento zootécnico (RIBEIRO FILHO et al. 1998).

A ranicultura nacional desde seu início vem sofrendo inúmeras modificações e melhoras, desde ambientes de criação a rações ofertadas aos animais, mas melhoramento genético de rãs no Brasil ainda é inexistente ou baseado na seleção dos animais que se destacam durante o estágio de engorda de um ranário.

Um das ferramentas utilizadas pelo melhoramento animal é a fertilização artificial, onde é necessária uma dose de um determinado hormônio para induzir os animais (RIBEIRO FILHO et al., 1998; ROSEMBLIT et al., 2006), que permitiram a coleta do sêmen em quantidade (ALONSO, 1997; AGOSTINHO et al., 2000; AFONSO, 2004), e em qualidade (TORTELLY NETO, 2006) para fertilizar os ovócitos das fêmeas (AGOSTINHO et al., 2000; AFONSO, 2004).

Vários trabalhos sobre a ultra-estrutura dos espermatozoides de anfíbios anuros foram realizados (LEE e JAMIESON, 1993; AGUIAR Jr. et al., 2004; COSTA et al., 2005; AGUIAR Jr et al., 2006; VEIGA-MENONCELLO et al., 2006), com o objetivo nos estudos de filogenia.

Para avaliação da quantidade de sêmen o método da medição do volume em uma proveta graduada é o utilizado (ALONSO, 1997; AGOSTINHO et al. 2000; AFONSO, 2004; TORTELLY NETO, 2006).

Para avaliação da qualidade do sêmen são utilizados os parâmetros: concentração espermática (AGOSTINHO et al. 2000; TORTELLY NETO, 2006; ROSEMBLIT et al., 2006), Vigor (AFONSO, 2004; TORTELLY NETO, 2006), motilidade (TORTELLY NETO, 2006) e a coloração (TORTELLY NETO, 2006).

TORTELLY NETO (2006) também realizou análise dos espermatozoides de rã-touro portadora de micobacteriose classificando-os de acordo com as suas características morfológicas, para classificação dos espermatozoides foi utilizada de acordo com a metodologia de mamíferos (BLOM, 1973).

A avaliação espermática descrita por Blom (1973) para mamíferos divide as características morfológicas em normais, defeitos maiores (13 formas) e defeitos menores (9 formas). Tortelly Neto (2006) encontrou 12 formas consideradas anormais ao analisar sêmen "in-natura" de rã-touro portadora de micobacteriose, utilizando como base metodologia para mamíferos.

Quanto à morfologia, os espermatozoides de peixes foram classificados em normais, anormalidade primária e secundária (Streit Jr. et al., 2008; Miliorini, 2006; Moraes et al., 2004).

O sêmen de anuros apresenta diversas similaridades com o sêmen de peixes, e a principal característica comum entre esses dois grupos é a motilidade espermática, já que em ambos a sua iniciação depende da interação com o meio aquático (Cosson, 2004).

Foi realizado este trabalho com objetivo de analisar o sêmen e os espermatozoides de rã-touro induzida com acetato de buserelina, utilizando parâmetros adotados para peixes.

2. Material e Métodos

2.1. Local

O experimento foi realizado no Laboratório do Ranário experimental da Universidade Federal de Viçosa (UFV), durante o período de dois de fevereiro a três de maio de 2009.

2.2. Reprodutores

Os cinco reprodutores de *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (rã-touro) utilizados no experimento foram coletados no dia 2 de fevereiro de 2009 no setor de engorda do Ranário Experimental da UFV. Os critérios de seleção foram: peso superior a 200g, com papo amarelado, presença do calo nupcial e reflexo ao estímulo do amplexo nupcial.

Na tabela 1 mostra o peso (balança de precisão de 0,01) e o comprimento rostro cloacal (CRC) (paquímetro de precisão de 0,001) dos animais no dia da seleção e no dia 27 de abril de 2009 dia da coleta do sêmen.

Tabela 1. Peso e comprimento rostro cloacal (CRC) dos reprodutores de *Lithobates catesbeianus* no dia da seleção (1) e no dia da coleta do sêmen (2)

Animal	Peso (1) (g)	CRC (1) (cm)	Peso (2) (g)	Peso (2) (g)
1	202,34	13,090	204,50	13,193
2	203,90	13,510	204,56	13,656
3	212,93	13,560	218,89	13,723
4	210,79	13,820	217,89	14,119
5	209,00	13,305	213,78	13,379

Os espécimes foram remanejados para uma baía experimental de cimento climatizada (temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12;12 LD) de 1m de altura, 1,2m de largura e 0,9m de comprimento com canaleta de 64l. Os animais ficaram oitenta e cinco dias de período de adaptação para o experimento.

Todos os dias a água foi trocada e fornecida à ração com 40% de proteína bruta “ad libitum” para os reprodutores.

2.3. Indução Hormonal

No dia 27 de abril de 2009 os animais foram retirados do local de manutenção e foram levados para laboratório cinco minutos antes da indução,

onde permaneceram dentro de um recipiente com 0,5 L de água por animal até a coleta do sêmen.

Para indução à espermição foi utilizado o produto comercial Conceptal® a base de acetato de buserelina (GnRH análogo).

Os reprodutores de rã-touro receberam uma aplicação de 0,1 mL de Conceptal® (0,4 µg do hormônio acetato de buserelina) na cavidade celomática.

2.4. Coleta do Sêmen

Os animais ficaram 48 horas de jejum para coleta de sêmen (AGOSTINHO et al. 2000).

Para extração do volume seminal foi utilizado uma pipeta de vidro de 2 mL, que foi introduzida na cloaca dos animais para retirada do volume seminal e ao mesmo tempo foi realizada uma massagem com os dedos a cavidade celomática próxima à região pélvica para facilitar a coleta do sêmen. As coletas de sêmen dos exemplares de rã-touro foram realizadas após 60 minutos da aplicação do produto hormonal (AGOSTINHO et al., 2000). Ao todo foram coletadas cinco amostras sendo uma de cada animal.

2.5. Volume e Cor do Sêmen

O sêmen coletado foi colocado em uma proveta graduada de vidro transparente de 10 mL e sendo aferido o volume seminal. A cor do sêmen foi classificada em transparente (nota 1) e turvo (nota 2).

2.6. Vigor, Motilidade e Concentração Espermática

Uma alíquota de 50µL de sêmen “in natura” de cada animal foi colocada sobre uma lâmina histológica e sobre a alíquota foi colocada uma lamínula, sendo observada em microscópio de campo claro com objetiva de 20x. O vigor é a agilidade no deslocamento do espermatozóide e foi classificado de 0-5 e a motilidade espermática foi estimada em porcentagem média de espermatozóides móveis observados em três campos diferentes (MILIORINI, 2006).

A concentração espermática foi estimada por meio da utilização de uma câmara de Neubauer. Uma alíquota de 10µL de sêmen foi diluída em 50µL de formol (10%). A diluição foi colocada na câmara de Neubauer e contou-se os espermatozóides de cinco quadrados do campo de 1mm², obtendo-se a quantidade de espermatozóides por mL (SPTZ/mL).

2.7. Análise Morfológica do Sêmen

As análises morfológicas do sêmen foram realizadas em microscópio campo claro com aumento de 800x.

Uma alíquota de 10µL de sêmen foi diluída em 50µL de solução fixadora de formol 10%. A seguir, uma fração de 10 µL da amostra fixada foi depositada em lâmina histológica e coberta por lamínula. O exame consistiu da observação da morfologia de 50 espermatozóides (TORTELLY NETO, 2006), focalizados em diversos campos ao longo de toda a lâmina conforme esquematizado por Miliorini (2006).

A metodologia adotada foi baseada em uma metodologia utilizada para peixes (MILIORINI, 2006) por considerar que os espermatozóides de peixes e anfíbios utilizam a água como meio para fecundação e por serem animais pecilotérmicos.

Sob um aumento de 800x, foram analisadas a cabeça, a peça intermediária e a cauda.

Os espermatozóides examinados no sêmen “in natura” de rã-touro foram classificados morfológicamente em espermatozóides com anormalidades maiores e menores.

Tabela 2. Morfologia dos espermatozóides com anormalidades maiores e com anormalidades menores no sêmen *Lithobates catesbeianus* (MILIORINI, 2006)

Morfologia anormalidades maiores	Morfologia anormalidades menores
Cabeça degenerada	Cabeça isolada normal
Peça intermediária degenerada	Gota proximal
Cauda degenerada	Gota distal
Cauda fraturada	Cauda dobrada
Cauda enrolada	
Macroencefalia	
Microencefalia	

As anormalidades estão dispostas em ordem decrescente e na seqüência da análise do espermatozóide.

Quando os espermatozóides apresentaram duas ou mais anormalidades, foi considerada a de maior implicação, segundo proposto por Miliorini (2006).

As morfologias com anormalidades maiores foram descritas a seguir:

A macrocefalia foi observada naqueles espermatozóides que apresentavam cabeça gigante, com contorno e forma anormais.

A microencefalia foi observada em espermatozóides com cabeça de tamanho reduzido, com contorno e forma anormais.

Espermatozóides com cabeça de tamanho e forma normais, mas que apresentavam contorno irregular e ou degenerações aparentes foram considerados possuidores de cabeça degenerada.

A peça intermediária degenerada consistiu das alterações em espessura (terço médio da peça intermediária), densidade, difração e comprimento da peça intermediária, envolvendo seu contorno e sua inserção na cabeça (colo).

Células espermáticas com fratura e retenção da cauda foram classificadas como espermatozóides com cauda fraturada.

A patologia de cauda fortemente enrolada consistiu da dobradura e enovelamento da cauda sobre si mesma ou sobre a cabeça. Foram considerados somente os enovelamentos que pudessem comprometer intensamente a motilidade espermática (sobre a cabeça ou com grande extensão da cauda acometida), sendo desconsiderados enovelamentos distais discretos.

Espermatozóides que apresentaram descontinuidade da cauda a partir da peça intermediária foram considerados possuidores de cauda degenerada.

As morfologias com anormalidades menores foram descritas a seguir:

Espermatozóides observados sem cauda, mas sem qualquer alteração de cabeça foram caracterizadas como cabeça isolada normal.

A morfologia anormal de cauda dobrada é aquela onde há dobradura da cauda, em diversos graus.

2.8. Comprimento Total, Comprimento da Cabeça e Comprimento de Cauda

Todos os espermatozóides considerados normais (175) foram medidos com auxílio de uma lente ocular graduada sob microscópio de campo claro com aumento de 800x.

Foram medidos o comprimento total das células, o comprimento da cabeça (com peça intermediária, pois não foi possível medir individualmente com precisão a peça intermediária do espermatozóide de rã-touro) e o comprimento da cauda.

2.9. Delineamento experimental e análise estatística

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foi realizada análise para todos os parâmetros avaliados com auxílio do programa de análise estatística SAEG (2007).

3. Resultados e Discussão

Na tabela 3 mostra os resultados por animal e em média do: volume seminal, cor do sêmen, motilidade espermática, vigor espermático e concentração espermática do sêmen de *Lithobates catesbeianus*.

Tabela 3. Avaliação das amostras de sêmen de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) em volume, cor, vigor, motilidade e concentração espermática

Amostra	Volume (mL)	Cor (1-2)	Vigor (1-5)	Motilidade (0-100%)	Concentração ($10^6 \times \text{SPTZ/mL}$)
1	5,4	2	5	95	12,2
2	10,4	2	4	90	10,2
3	7,1	2	5	95	8,8
4	2,5	2	5	90	16,8
5	3,4	2	5	95	23,2
Média	5,76	2	4,80	93,00	14,24
Desvio Padrão	3,148	0	0,447	2,738	5,850

O volume seminal médio encontrado para rã-touro de 5,76 mL é maior do que encontrado de 1,4 mL (AFONSO, 2004) e 2,08 mL (TORTELLY NETO, 2006) para rã-touro portadora de micobacteriose. Possivelmente a sanidade dos animais pode ser a resposta para a superioridade.

O maior volume de sêmen coletado de uma rã-touro foi de 10,4 mL, valor superior a faixa de 2,0 a 4,0 mL encontrada por Agostinho et al. (2000) para reprodutores de rã-touro. Os animais ficaram dentro do recipiente com água durante o período entre a indução e a coleta do sêmen diferente do autor citado, fato que pode ter influenciado na quantidade de sêmen coletado, por que os animais podem ter se hidratado mais.

O vigor espermático médio encontrado para rã-touro foi de 4,80 (1-5). Valor superior aos 2,55 encontrados por Afonso (2004) para rã-touro portadora de micobacteriose. Possivelmente a sanidade dos animais pode ser a resposta para o valor superior.

Valores inferiores de vigor espermático foram encontrados para peixes. Mataveli et al. (2007) encontraram o valor de 3,21 de vigor espermático para tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) e Streit Jr. et al. (2008) encontrou 2,37

para piapara (*Leporinus elongatus*). A fecundação entre anfíbios e peixes ocorre no mesmo ambiente (aquático), mas o vigor do espermatozóide na água ocorre de forma diferente para as diferentes espécies de anfíbios e peixes.

A motilidade espermática média encontrada para rã-touro foi de 93,00%. Valor superior ao encontrado por Tortelly Neto (2006) de 67% para rã-touro portadora de micobacteriose. Possivelmente a sanidade dos animais pode ser a resposta para a superioridade.

Diferenças no valor de motilidade espermática foram encontrada em peixes, Mataveli et al. (2007) encontraram o valor de 81,08% de motilidade espermática para a *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), Streit Jr. et al. (2008) encontraram 36,72% para a *Leporinus elongatus* (piapara), Ferreira et al. (2001) encontraram 73% para a *Rhamdia quelen* (jundiá) e Andrade-Talmelli et al. (2001) encontraram 90,90% para a *Brycon insignis* (piabanha).

A motilidade espermática revela em porcentagem o número de espermatozóides móveis numa amostra de sêmen, esse parâmetro é superior para rãs ao comparar com as espécies de peixes acima. A explicação pode ser uma estratégia (evolutiva) de sobrevivência adotada pela espécie para que com o aumento do número de espermatozóides móveis aumentam as chances de fecundação dos ovócitos.

A concentração espermática média do sêmen de rã-touro foi de $14,24 \times 10^6$ SPTZ/mL. Valor superior ao encontrado para concentração espermática por Roseblit et al. (2006) para a rã-manteiga de $11,00 \times 10^5$ SPTZ/mL e para a rã-touro de $9,00 \times 10^5$ SPTZ/mL induzidas com hCG. A superioridade de dez vezes no número de espermatozóides por mL pode ser explicada pela ação diferenciada dos hormônios (GnRH α e hCG) nos organismos dos animais e pela espécie.

O valor encontrado para concentração espermática também é superior ao valor encontrado por Tortelly Neto (2006) de $10,03 \times 10^6$ SPTZ/mL, para a rã-touro portadora de micobacteriose. Os valores de concentração espermática encontrados para rã-touro estão dentro de uma faixa que varia entre $1,56 \times 10^5$ e $1,62 \times 10^7$ SPTZ/mL proposta por Agostinho et al. (2000) para rã-touro.

Diferenças no valor de concentração espermática foram encontrada em espécies de peixes, Mataveli et al. (2007) encontraram o valor de $2,63 \times 10^9$ SPTZ/mL para concentração espermática para a *Oreochromis niloticus* (tilápia do nilo), Ferreira et al. (2001) encontraram $69,9 \times 10^6$ SPTZ/mL para a *Rhamdia quelen* (jundiá), Luz et al. (2001) encontraram $54,42 \times 10^6$ SPTZ/mL e Andrade-Talmelli et al. (2001) encontraram $24,76 \times 10^6$ SPTZ/mL para a *Brycon insignis* (piabanha).

Valores de concentração espermática para peixes foram superior ao encontrado para a rã-touro, o número de ovócitos a serem fecundados por essas espécies também é superior ao da rã-touro, este explica porque número maior de espermatozóides por mL.

Todas as amostras de sêmen *Lithobates catesbeianus* tiveram a cor turva. Todas as amostras na primeira coleta dos animais analisadas por Tortelly Neto (2006) tendem à cor turva. A cor é um indicador de maior ou menor quantidade de fluido seminal e tem influência direta na concentração de espermatozóide (Andrade-Talmelli et al., 2001).

A tabela 4 mostra em números e porcentagem de espermatozóides classificados em normais, com defeitos ou anormalidades maiores e com defeitos ou anormalidades menores das amostras do sêmen de rã-touro.

Tabela 4. Número e a porcentagem de espermatozóides encontrados nas amostras do sêmen de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro), classificado em normal, defeito maior e defeito menor

Amostra	Normais (1-50) (SPTZ)	Normais (%)	Def. Maior (1-50) (SPTZ)	Def. Maior (%)	Def. Menor (1-50) (SPTZ)	Def. Menor (%)
1	38	76	9	18	3	6
2	37	74	6	12	7	14
3	33	66	8	16	9	18
4	34	68	6	12	10	20
5	33	66	9	18	8	16
Média	35,00	70,00	7,60	15,20	7,40	14,80
Desvio Padrão	2,345	-	1,516	-	2,701	-

O número de espermatozóides (SPTZ) normais encontrados em 50 SPTZ analisados nas amostras de sêmen de rã-touro foi de 35,00 (70,00%) SPTZ, Tortelly Neto (2006) encontrou para rã-touro portadora de micobacteriose 59,33% de SPTZ normais. Possivelmente o aspecto sanitário pode ser a resposta para diferença.

Esse valor de espermatozóides considerados anormais está coerente com os recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), o

qual recomenda não utilizar sêmen com índice de espermatozóides com anormalidade acima de 30% para bovinos e eqüinos e 20% para suínos e ovinos.

Para peixes os valores de espermatozóides considerados anormais são maiores. Moraes et al. (2004) registraram índices de espermatozóides de *Prochilodus lineatus* (curimba) com anormalidades em torno de 40,2%, 49% para o *Leporinus macrocephalus* (piauvuçu) e 37,6% para a *Cyprinus carpio* (carpa comum), para a *Leporinus elongatus* (piapara) Streit Jr. et al. (2008) encontraram índice de 54,7%.

Espermatozóides considerados anormais não quer dizer inviáveis para fecundação, porque a fecundação ocorre no meio aquático, o qual pode ajudar o deslocamento dos espermatozóides.

As anormalidades foram classificadas em maiores e menores, os defeitos maiores foram encontrados em maior número, resultados este podem ser explicados pelo número de anormalidades consideradas maiores serem maior (6) que o número de anormalidades menores (4), porém este resultado deve ser analisado com maior crítica porque os defeitos maiores são mais prejudiciais a fecundação.

A tabela 5 mostra os espermatozóides classificados em defeitos maiores de acordo com cada anormalidade em números das amostras analisadas do sêmen de rã-touro.

Tabela 5. Número de espermatozóides encontrados nas amostras de sêmen de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) classificados de acordo com os defeitos maiores

Amos- tra	Cab. Deg. (1-50) (SPTZ)	Peça Int. Deg. (1-50) (SPTZ)	Cauda Deg. (1-50) (SPTZ)	Cauda Frat. (1-50) (SPTZ)	Cauda Enr. (1-50) (SPTZ)	Macro Encef. (1-50) (SPTZ)	Micro Encef. (1-50) (SPTZ)	Def. Maior (1-50) (SPTZ)
1	1	0	2	5	1	0	0	9
2	0	1	2	1	2	0	0	6
3	1	0	1	4	2	0	0	8
4	0	0	0	4	1	1	0	6
5	0	0	2	4	3	0	0	9
Média	0,40	0,20	1,40	3,60	1,80	0,20	0	7,60
Desvio Padrão	0,547	0,447	0,894	1,516	0,836	0,447	0	1,516

Entre as anormalidades classificadas em defeitos maiores a seqüência decrescente da incidência foi: cauda fraturada (3,60 SPTZ), cauda enrolada (1,80 SPTZ), cauda degenerada (1,40 SPTZ), cabeça degenerada (0,40 SPTZ), peça intermediária degenerada (0,20 SPTZ) e macroencefalia (0,20 SPTZ), a anormalidade micrencefalia não foi encontrada nas amostras do sêmen de rã-touro.

A tabela 6 mostra em números os espermatozóides classificados em defeitos menores de acordo com cada anormalidade das amostras do sêmen de rã-touro.

Tabela 6. Número de espermatozóides encontrados nas amostras de sêmen de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) classificados de acordo com os defeitos menores

Amostra	Cab. Isol. Normal (1-50) (SPTZ)	Gota Proximal (1-50) (SPTZ)	Gota Distal (1-50) (SPTZ)	Cauda Dobrada (1-50) (SPTZ)	Defeitos Menores (1-50) (SPTZ)
1	1	2	0	0	3
2	1	2	1	2	7
3	1	1	1	6	9
4	2	1	1	6	10
5	1	2	1	4	8
Média	1,20	1,60	0,80	3,60	7,40
Desvio Padrão	0,447	0,547	0,447	2,607	2,701

Entre as anormalidades classificadas em defeitos menores a seqüência decrescente da incidência encontradas no sêmen de rã-touro foi: cauda dobrada (3,60 SPTZ), gota proximal (1,60 SPTZ), cabeça isolada normal (1,20 SPTZ) e gota distal (0,80 SPTZ).

Dentre todas as anormalidades as que afetam a cauda foram as mais freqüentes é importante ressaltar, porque a cauda é parte do espermatozóide especializada na locomoção do gameta.

De acordo com as observações realizadas, com base nos parâmetros motilidade e vigor, foi estabelecida uma seqüência decrescente das anormalidades, quanto à capacidade da anormalidade dificultar a fecundação.

A seqüência é: Macroencefalia, cabeça degenerada, cauda degenerada, cauda fraturada, cauda enrolada, cabeça isolada normal, gota proximal, gota distal e cauda dobrada.

As anormalidades cauda fraturada e cauda dobrada representam 49,33% das anormalidades e estas não são as anormalidades mais prejudiciais a fecundação. Pode-se dizer que somente o percentual de espermatozóides normais, defeitos maiores e menores não é suficiente para tomada de decisão sobre a qualidade do sêmen.

No sêmen rã-touro foram encontradas as morfologias consideradas anormais de cabeça degenerada, peça intermediária degenerada, cauda degenerada, cauda fraturada, cauda enrolada, macroencefalia, microencefalia, gota proximal, cabeça isolada normal, gota distal, cauda dobrada. Tortelly Neto (2006) encontrou anormalidades diferentes como espermatozóides subdesenvolvidos, com contorno anormal, com vacuolação e teratogênico, ao analisar o sêmen de rã-touro portadora de micobacteriose, usando metodologia de mamíferos descrita por Blom (1973).

Além das análises de motilidade espermática, concentração espermática e vigor, é importante a análise das diferentes formas de espermatozóides que podem ser encontradas no sêmen de rã-touro, por exemplo, espermatozóide com anormalidade classificada em macroencefalia é móvel, mas seu vigor é baixo, dificultando a fecundação.

O conjunto de parâmetros volume, cor do sêmen, vigor, motilidade, concentração e análise das formas dos espermatozóides são indispensáveis para análise bem realizada e detalhada de uma amostra de sêmen de rã-touro para pode ser encaminhada para sua utilização em projetos de criopreservação, melhoramento animal e para cruzamento de animais da mesma espécie, mas de locais distantes.

Agostinho et al. (2000) encontrou taxa média de fecundação artificial de 39 a 83%, e constatou que a diferença é ocasionada pela hidratação irregular e pela dificuldade da respiração dos óvulos causada por formação de grumos de albumina e sugeriu modificações durante o manejo da desova, mas no trabalho as amostras de sêmen só foram avaliadas quanto aos parâmetros volume e concentração espermática, somente a adoção desses dois itens é insuficientes para dizer que não houve influência do sêmen utilizado na fertilização e que a adoção da avaliação mais detalhada das amostras de sêmen é de fundamental importância para uma conclusão sobre a taxa de fecundação.

A tabela 7 mostra em média por amostra o comprimento total, comprimento da cabeça e o comprimento da cauda dos espermatozóides de rã-touro e a figura 1 mostra um espermatozóide normal de rã-touro.

Tabela 7. Média (MD) e desvio padrão (DP) do comprimento total (CT), da cabeça (CB) e da cauda (CC) dos espermatozóides (SPTZ) classificados como normais de *Lithobates catesbeianus*

Amostra	SPTZ Normal (1-50)	MDCT (μm)	DPCT	MDCB (μm)	DPCB	MDCC (μm)	DPCC
1	38	13,272	0,719	6,969	0,304	6,303	0,529
2	37	13,078	0,818	7,131	0,528	5,947	0,612
3	33	13,783	1,068	7,351	0,666	6,432	0,679
4	34	14,272	0,761	7,575	0,560	6,696	0,529
5	33	13,088	0,753	7,058	0,736	6,029	0,171
Média Total	35	13,491	0,949	7,217	0,612	6,274	0,599

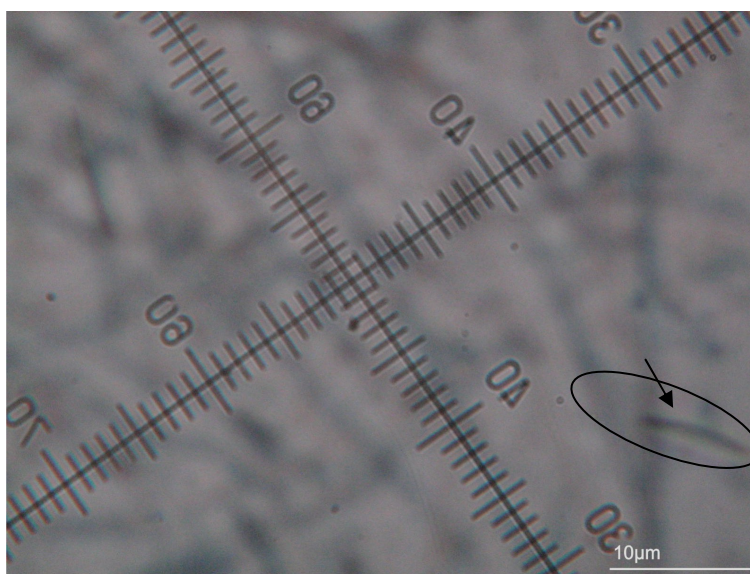


Figura 1. Espermatozóide rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), seta indica cauda do espermatozóide.

O comprimento total, da cabeça e da cauda dos espermatozóides das amostras de rã-touro foi: 13,491 μm , 7,217 μm e 6,274 μm . Os espermatozóides normais encontrados assemelham aos encontrados por TORTELLY NETO (2006) para rã-touro portadora de micobacteriose.

A cabeça do espermatozóide de rã-touro possui forma mais abaolado diferindo quanto à forma dos espermatozoides dos anfíbios anuros *Eupemphix nattereri* (perereca) (ZIERI et al., 2008), *Colostethus brunneus* (Veiga-MENONCELLO et al., 2006), *Crossodactylus sp.* (AGUIAR Jr. et al., 2006), *Phyllomedusa sp.* (perereca) (COSTA et al., 2005) que possui a cabeça fina e alongada. A diferença encontrada pode ser explicada pela rã-touro ser um animal exótico e pertencente à família *Ranidae*.

4. Conclusão

Os resultados encontrados nas amostras de sêmen de rã-touro de volume, cor, vigor, motilidade e concentração espermática são adequadas ao compara com espécies de rãs e peixes.

O número de espermatozóides normais, com defeitos maiores e menores é aceitável.

O conjunto dos parâmetros utilizados para avaliação das amostras de sêmen de rã-touro é indispensável para uma excelente conclusão da qualidade do sêmen e para tomada de decisão do seu destino.

Trabalhos futuros devem buscar faixas de valores ideais para cada parâmetro utilizado para facilitar avaliação das amostras de sêmen de rã-touro para tomada de decisão sobre o destino do sêmen.

5. Referências Bibliográficas

AFONSO, A. F. Efeito do acetato de busserelina na indução á reprodução de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) naturalmente portadora de micobacteriose. Rio de Janeiro, 2004, 86p. **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 á ovulação pelo uso de LHRH análogo e fertilização em rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.5, 1261-1265, 2000.

AGUIAR Jr., O.; GIARETTA, A.A.; RECCO-PIMENTEL, S.M. The sperm of hylodinal species (Anura, Leptodactylidae): Ultrastruture characteristics and their relevance to interspecific relationships. **Journal of Biosciences**, v.31 (3), 379-388, 2006.

AGUIAR Jr., O.; LIMA, A.P.; BÀO, S.N.; RECCO-PIMENTEL, S.M. Sperm ultrastructure of the Brazilian Amazon poison frogs *Epipedobates trivittatus* and *Epipedobates hahmeli* (Anura, Dendrobatidae). **Acta Zoológica**, v.85, 21-28, 2004.

ALONSO, M. Uso de análogos do GnRH para indução de desova e espermição em rã-touro, *Rana catesbeiana*, Shaw, 1802. São Paulo, 1997, Universidade de São Paulo, USP, 136p. **(tese – DS)**. 1997.

ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; FENERICHI-VERANI, N. Características seminais de piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27 (2), 149-154, 2001.

BLOOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermgram. **Nord. Vet. Med.**, v.25, 383-391, 1973.

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 Zootecnia**, v.30 (6), 1659-1663, 2001.

CAMARGO FILHO, C.F. Características alimentares e o potencial impactante da rã-touro *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), Viçosa, 2009, 58p. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2 ed, Belo Horizonte. CBRA, 1998. 49p.

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

COSTA, G.C.; GARDA, A.A.; TEIXEIRA, R.D.; COLLI, G.R.; BÀO, S.N. Comparative analysis of the sperm ultrastructure of three species of *Phyllomedusa* (Anura, Hylidae). **Acta Zoologica**, v.85, 257-262, 2004.

FERREIRA, A.A.; NuñER, A.P.O.; LUZ, R.K.; TATAJE, D.A.R.; ESQUIVEL, J.R.; RESTREPO, J.B. Avaliação qualitativa do sêmen do jundiá, (*Rhamdia quelen*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27 (1), 57-60, 2001.

LEE, M.S.Y.; JAMIESON, B.G.M. The ultrastructure of the spermatozoa of Bufonid and Hilid frogs (Anura, Amphibia): implication for phylogeny and fertilization biology. **Zoologica Scripta**, v.22, 309-323, 1993.

LUZ, R.K.; FERREIRA, A.A.; REYNALTE, D.A.T.; ZANIBONI FILHO, E. Avaliação qualitativa do sêmen de suruvi, *Steindachneridion scripta* (Pimolodidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27 (1), 39-42, 2001.

MATAVELI, M.; MORAES, G.V.; STREIT Jr., D.P.; VARGAS, L.D.M.; SAGAGUTI, E.S. TONINATO, J.C.; BARBOSA, R.C.; MERLINI, L. Avaliação da qualidade do sêmen de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem chiltralada, suplementada com diferentes concentrações de vitamina c. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.33 (1), 1-7, 2007.

MILIORINI, A.B. Ativadores e Concentrações de Metanol e Dimetilsulfóxido na Qualidade do Sêmen Criopreservado de Curimba (*Prochilodus Lineatus*) Lavras, MG. 97p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Viçosa.

MORAES, G.N.; STREIT Jr., D.P.; RIBEIRO, R.P.; SAKAGUTI, E.S.; SOUZA, E.D. POVH, J.A. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozoides de piauvuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Boletim do Instituto de pesca**, v.30 (2), 109-116, 2004.

RIBEIRO FILHO, O.P., Uso de extrato bruto de hipófise na indução da desova de rã-touro. *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802), Viçosa, 50p. **Dissertação** (mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1994.

RIBEIRO FILHO, O.P.; LIMA, S.L.; ANDRADE, D.R.; SEIXAS FILHO, J.T. Estudo da desova de Rã-touro, *Rana catesbeiana*, mediante indução do acasalamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27 (2), 216-233, 1998.

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

SAEG **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

STREIT Jr, D.P.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; MORAES, G.C., VARGAS, L.D.M.; WATANABE, A.L. Qualitative of the piapara semen (*Leporinus elongatus Valenciennes, 1850*). **Brazilian Journal Biology**, v.68 (2), 373-377, 2008.

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

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

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