

**LEONARDO LUIZ CALADO**

**COLETA E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE RÃ-TOURO,  
*LITHOBATES CATESBEIANUS* (SHAW, 1802)**

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

**LEONARDO LUIZ CALADO**

**COLETA E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE RÃ-TOURO,  
*LITHOBATES CATESBEIANUS* (SHAW, 1802)**

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* em Biologia Animal.

APROVADO: 26 de fevereiro de 2009

---

Prof. Ph. D. Luiz Carlos dos Santos  
(Co-Orientador)

---

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas  
(Co-Orientador)

---

Prof. Ph. D. José Cola Zanuncio

---

Prof. Dr. José Teixeira de Seixas Filho

---

Prof. Dr. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho  
(Orientador)

A Deus, na sua infinita sabedoria e amor, por me permitir esta oportunidade e experiência;  
aos meus pais Ana e Wilson por seu amor e seus conselhos, sempre apoiadores em  
todas as decisões ao longo da vida.

Dedico!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Departamento de Biologia Animal, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e a Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária.

Aos Professores Oswaldo Pinto Ribeiro Filho, Luiz Carlos dos Santos e Luis David Solis Murgas, pela orientação, a amizade, o incentivo e o apoio na realização deste trabalho.

Aos Professores, José Cola Zanuncio e José Teixeira de Seixas Filho pela participação na banca da tese.

Aos Professores Priscila Vieira Rosa Logato e Sérgio da Matta pelo apoio e sugestões.

A minha família, em especial a "Tia Nem", "Titone" e "Tiniltin", que foram sempre presentes nos momentos de dificuldades desde o meu começo de caminhada.

A minha "eterna" namorada Anelisa pelo convívio, incentivo, paciência e companhia nestes anos.

Ao amigo, Professor George Shigueki Yasui pelos ensinamentos e incentivo.

Aos amigos e colegas de Ranário Experimental, Christiano, Marcelo "morcego", Cláudio "Iagartixa", pelo convívio e ajuda na realização do trabalho.

Aos meus amigos e colegas, André "Furazoi", Antunes, Ana Júlia, Cíntia, Cris Nakazawa, Dibuca, Dvar, Elayna, Elecir, Fábio, Fabrício, Gilmara, "Grupo de Capoeira Angoleiros do Mar", Guilherme, Jaime, Jana, Leo Vaz, Marcelo, Márcio Zangeronimo, Marquinho, Rafael, Raquel, Sustanis, Simone, Thais, Thiago, Tia Tone, Uedson "Baiano", William, Zé Ruberto.

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

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

A todos que, de alguma forma, colaboraram com este trabalho.

**MEUS MAIS SINCEROS AGRADECIMENTOS.**

*“A expansão do conhecimento provém da investigação das coisas  
Quando se investiga, o conhecimento sofre expansão.  
Quando o conhecimento é expandido tornamo-nos sinceros nos propósitos.  
Quando formos sinceros nos propósitos, o coração poderá ser corrigido  
Quando este for dotado de correção a vida pessoal poderá ser cultivada.  
Quando a vida pessoal for cultivada, a comunidade poderá ser regida  
Quando a comunidade for regida poderemos governar com ordem  
Quando se puder governar com ordem resultará paz no mundo.”*

*Confúcio*

## **BIOGRAFIA**

Leonardo Luiz Calado, filho de Wilson Luiz Calado Filho e Ana Lúcia Rosa Calado, nascido em 18 de outubro de 1975, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

Em março de 2003, graduou-se no curso de Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, (UFV), onde teve bolsa de extensão, (MEC/UFV), com cultivo de tilápias.

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

Em 26 de fevereiro de 2009, vai submeter-se aos exames finais de defesa de dissertação.

## SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
2.1. Objetivos gerais.....	03
2.2. Objetivos específicos.....	03
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3.1. Características da espécie.....	04
3.2. Morfo-fisiologia reprodutiva dos machos.....	06
3.3. Técnica de indução hormonal.....	07
3.4. Biologia do sêmen.....	10
3.5. Osmolaridade.....	11
3.6. Motilidade espermática dos anuros.....	14
3.7. Motilidade espermática dos peixes.....	14
3.8. Soluções crioprotetoras.....	15
3.9. Congelamento do sêmen.....	18
3.10. Descongelamento do sêmen.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Execução dos experimentos.....	19
4.2. Manejo geral dos animais.....	20
4.2.1. Morfometria e manutenção.....	20
4.2.2. Procedimento de indução hormonal.....	20
4.2.3. Coleta de sêmen e avaliação espermática.....	21
4.3. Experimento 1: Eficácia hormonal entre diferentes indutores sobre a espermiação de rã-touro.....	22

4.4. Experimento 2: Influência da hora pós aplicação (HPA) sobre os parâmetros espermáticos.....	23
4.5. Experimento 3: Toxidez dos crioprotetores internos e externos, congelamento e descongelamento.....	23
4.6. Análise estatística.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
5.1. Experimento 1: Eficácia hormonal entre diferentes indutores sobre a espermição de rã-touro .....	26
5.2. Experimento 2: Influência da hora pós aplicação (HPA) sobre os parâmetros espermáticos .....	30
5.3. Experimento 3: Toxidez dos crioprotetores internos e externos, congelamento e descongelamento.....	35
5.3.1. Aspectos <i>in natura</i> do sêmen de rã-touro .....	35
5.3.2. Toxidez dos crioprotetores .....	36
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
9. ANEXOS.....	56



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Desencadeamento da resposta hormonal dos ranídeos em relação a um estímulo ambiental.....	09
FIGURA 2	Marcação dos exemplares de rã-touro, <i>Lithobates catesbeianus</i> (Shaw, 1802), com etiquetas plásticas fixadas á base das palmouras.....	20
FIGURA 3	Aplicação hormonal intraperitoneal dos exemplares de rã-touro, <i>Lithobates catesbeianus</i> (Shaw,1802).....	21
FIGURA 4	Coleta de sêmen do exemplar de rã-touro, <i>Lithobates catesbeianus</i> (Shaw, 1802), por meio de capilaridade utilizando pipeta volumétrica.....	22
FIGURA 5	Etapas de descongelamento do sêmen de rã-touro <i>Lithobates catesbeianus</i> , (Shaw, 1802).....	25
FIGURA 6	Volume seminal de rã-touro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> (Shaw, 1802)) ( $n= 30$ ) após indução hormonal e 12 horas de coleta.....	32

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Principais soluções diluidoras de sêmen para peixes e anuros.....	12
TABELA 2	Classificação dos crioprotetores quanto a permeabilidade através da membrana celular.....	16
TABELA 3	Concentração ótima de DMSO para criopreservação de sêmen de espécies de peixe marinho.....	17
TABELA 4	Hormônio e respectivas dosagens de aplicação para espermição de rã-touro.....	23
TABELA 5	Indutores e respectivas dosagens de aplicação utilizadas na espermição de rã-touro, <i>Lithobates catesbeianus</i> (Shaw, 1802).....	24
TABELA 6	Percentual de animais espermiados e parâmetros do sêmen mediante indução hormonal.....	27
TABELA 7	Parâmetros seminais de rãs-touro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> (Shaw, 1802)) avaliados em diferentes tempos após aplicação de acetato de gonadorelina.....	31
TABELA 8	Peso corporal, comprimento total, comprimento rostro cloacal, volume seminal, motilidade subjetiva, vigor e osmolaridade do sêmen de rã-touro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> ) antes da submissão aos tratamentos com crioprotetores.....	35
TABELA 9	Motilidade, vigor e duração do tempo de motilidade pré-congelamento de rã-touro com diferentes concentrações de DMSO e Metanol.....	36
TABELA 10	Influência das concentrações de DMSO e Metanol associados à BTS 5% (m:v) e Lactose 1%(m:v) sobre a motilidade pré-congelamento.....	37
TABELA 11	Influência das concentrações de DMSO e Metanol associados à BTS 5% (m:v) e Lactose 1%(m:v) sobre o vigor pré-congelamento.....	37

## RESUMO

CALADO, Leonardo Luiz., M.Sc. Universidade Federal de Viçosa. fevereiro de 2009. **Coleta e criopreservação do sêmen de rã-touro (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802)**. Orientador: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho. Coorientadores: Luiz Carlos dos Santos e Luis David Solis Murgas.

O impacto da introdução de espécies exóticas no Brasil e no mundo, é um grande problema ao desequilíbrio ambiental. O estudo de métodos para otimizar e melhorar a permanência das espécies nativas em declínio e utilizar o potencial das espécies exóticas para o fornecimento de alimentos sem prejuízo ao meio, tem sido um desafio para as atividades de produção animal e conservação das espécies. O objetivo do presente estudo foi desenvolver um protocolo de espermiacção induzida em rã-touro, seguido de criopreservação seminal. Três experimentos foram conduzidos na Universidade Federal de Viçosa e Universidade Federal de Lavras, estado de Minas Gerais. O primeiro experimento avaliou-se a indução da espermiacção com extrato bruto hipofisário (EBH – 5000 µg/kg), acetato de buserelina (AB – 13 µg/kg), acetato de gonadorelina (AG – 83 µg/kg) e gonadotropina coriônica humana (hCG – 830 UI/kg). Trinta machos de rã-touro foram induzidos com esses hormônios e o sêmen coletado por 12 horas. Parâmetros espermáticos (motilidade, volume, cor, vigor, odor, concentração) foram observados para se obter o melhor hormônio indutor. No segundo experimento a influência do período após indução sobre as características seminais foi avaliada. Outro grupo de machos (n=30) foi induzido com o melhor hormônio obtido do experimento anterior e amostras foram coletadas em duas, quatro, seis, oito, dez e dose horas após a primeira aplicação. No terceiro experimento a toxicidade e a criopreservação com crio-soluções compostas por DMSO (1,0; 2,5; 5,0; 7,5%) e metanol (1,0; 2,5; 5,0; 7,5%) como crioprotetores internos e Lactose e BTS a 1 e 5% foram avaliadas respectivamente. O sêmen foi diluído nas crio-soluções e a motilidade espermática, vigor e duração do tempo (n=11) foram avaliados. O sêmen foi congelado

utilizando-se as mesmas soluções crioprotetoras e os parâmetros seminais pós-descongelamento, também, foram observados. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e submetidos à análise de variância e de regressão ( $P < 0.05$ ). Somente o AG e AB induziram a espermição, onde 100% e 20% dos machos liberaram sêmen, respectivamente. O período após indução afetou o volume ( $y = 0,1084x + 1,1527$ ;  $R^2 = 0,37$ ) e não afetou os outros parâmetros. A motilidade espermática foi afetada pelo metanol ( $92,1 \pm 8,0\%$ ) ou DMSO ( $89,0 \pm 3,0\%$ ), embora o vigor ( $4,2 \pm 0,1$  e  $3,6 \pm 0,5$ ) e a duração da motilidade ( $287 \pm 10s$  and  $252 \pm 23s$ ), mostraram efeito significativo. O metanol associado ao BTS 5% e lactose 1% influenciou o parâmetro motilidade. A motilidade pós-descongelamento indicou que nenhuma das soluções mantivera a motilidade espermática. A extração seminal pode ser realizada com o acetato de gonadorelina até 10 horas após a primeira aplicação.

## ABSTRACT

CALADO, Leonardo Luiz., M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. February, 2009. **Seminal sampling and cryopreservation in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802))**. Adviser: Oswaldo Pinto Ribeiro Filho. Co-advisers: Luiz Carlos dos Santos and Luis David Solis Murgas.

The impact caused by alien species in Brazil and over the world presents consequences for native populations of frogs. The development of methodologies to preserve the native species and optimize the food production is a challenging task for aquaculture. The aim of the present study was to develop a protocol of induced spermiation in the bullfrog *Lithobates catesbeianus* followed by sperm cryopreservation. Three experiments were conducted at Universidade Federal de Lavras and Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais State. The first experiment aimed to evaluate the induced spermiation using carp crude pituitary gland (CPE – 5000 – µg/kg), buserelin acetate (BA – 13 µg/kg), gonadorelin acetate (GA – 83 µg/kg), and human chorionic gonadotropin (hCG – 830 IU/kg). Thirty males were induced with the mentioned hormones followed by sperm sampling 12 hours afterwards. Sperm parameters (sperm motility, volume, color, vigor, odor, concentration) were compared in order to obtain the best hormone inducer. In the experiment 2, we aimed to evaluate the influence of the period after inducement on sperm traits. Another group of males (n=30) were induced using the best procedure obtained above and then the sperm was sampled at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours afterwards. In the experiment 3, we have evaluated the toxicity and cryopreservation success using cryo-solutions composed by DMSO (at 1,0; 2,5; 5,0 and 7,5%) and methanol (at 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5%) as the main cryoprotectants; and BTS at 1 or 5%. Sperm was diluted using the cryo-solutions and then observed the motility parameters (sperm motility, VIGOR and duration; n=11). The sperm was also cryopreserved using the same cryo-solutions and cooled in vapour nitrogen vessel (dry-shipper), and then observed the post-thawed sperm parameters. Data were

compared by Kruskal-Wallis test and Anova followed by regression analysis ( $P < 0.05$ ). Our results indicate that only AG and AB succeed to induce spermiation, where 100% and 20% of the males released the sperm, respectively. The period after inducement have influenced the sperm parameters of volume ( $y = 0,9727 + 01327x$ ;  $R^2 = 0,50$ ) and concentration ( $y = -0,1784x + 2,5878$ ;  $R^2 = 0,86$ ), although there was not a significant effect for other parameters. Regarding the toxicity of the cryoprotectants, the sperm motility did not show a significant effect with methanol ( $92,1 \pm 8,0\%$ ) or DMSO ( $89,0 \pm 3,0\%$ ), although sperm vigor ( $4,2 \pm 0,1$  and  $3,6 \pm 0,5$ ) and the duration of motility ( $287 \pm 10s$  and  $252 \pm 23s$ , respectively) showed a significant effect. A clear interaction was observed on motility parameters when methanol at 1% was associated with BTS at 5% and lactose at 1%. Similar trend was observed when DMSO or methanol was associated with lactose or BTS. Data regarding the post-thawed motility indicate that none of the cryo-solutions succeed in maintain the sperm motility. In conclusion, the sperm sampling was optimized using gonadorelin acetate followed by sperm sampling 10 hour afterwards. Other investigations are stil necessary in order to improve the cryopreservation success.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção animal pode potencializar a qualidade e a quantidade de alimento de origem animal para o consumo humano e as espécies exóticas podem ser utilizadas para este processo já que possui características zootécnicas para tal. Espécies invasoras como a rã-touro *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), são responsáveis por impactos no ambiente, por competir por alimento e predação espécies nativas, e causar desequilíbrio trófico, por ser um predador não específico. O estudo de métodos para aperfeiçoar e melhorar a permanência de espécies nativas e utilizar o potencial das exóticas para fornecer alimento para o consumo humano sem prejuízo à fauna nativa de anuros representa um desafio a produção animal e conservação das espécies.

A introdução de espécies no ambiente contribui para o declínio de populações, principalmente de anfíbios nativos. Outras causas que colaboram para o declínio da população mundial de anfíbios incluem infecções por fungos, vírus ou bactérias, aumento da radiação ultravioleta, secas drásticas, habitats poluídos com herbicidas ou inseticidas, precipitação ácida e desmatamento (Junca, 2001 e Michael e Jones, 2004).

No Brasil, a rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), foi introduzida na região da Baixada Fluminense no Rio de Janeiro na década de 1930 para a ranicultura. Trezentos casais de rã-touro, oriundas dos Estados Unidos, deram origem ao primeiro ranário brasileiro, o Ranário Aurora. As características zootécnicas atrativas das rãs foram determinantes nos projetos de implantação da ranicultura no Brasil, que, por isso, tem apresentado bons índices de crescimento no manejo e produção animal.. (OLVERA-NOVOA et al. 2007; BRAGA et al. 2005; MARTÍNEZ et al. 2004; LIMA et al. 2003; SOMSUEB e BOONYARATPALIN, 2001; RIBEIRO FILHO, 1999; RIBEIRO FILHO, 1994; VIZOTTO, 1979).

Animais como: *Rana pipiens*, *Lithobates catesbeianus* e *Xenopus* sp. têm sido muito utilizados em pesquisa pela semelhança morfológica e fisiológica com os vertebrados superiores (CULLEY JR., 1973). Inúmeros trabalhos de fisiologia, ecologia e aspectos da biologia básica, foram realizados sem escala proporcional àqueles da biologia aplicada. Por isto a conservação de espécies de anuros e a ranicultura apresentam carência em aspectos importantes do sistema conservacionista e produtivo.

Técnicas aplicadas à reprodução, como a indução hormonal, se apresentam como ferramentas importantes, pois proporcionam vantagens como a padronização em idade e tamanho dos animais, podendo, inclusive, reduzir o período inter-reprodutivo, além de tornar factível a aplicação de biotécnicas importantes como a manipulação cromossômica (WAGGENER e CARROLL JR, 1998; ARAI, 2000). Contudo, a intensificação da produção de alimentos, taxas de ocupação do espaço e avanços tecnológicos contribuem mais para o declínio populacional de anfíbios e de espécies, o que leva a tendência de se empregar mais recursos tecnológicos para mitigar o impacto destas atividades. A melhoria da produção animal e a adoção de linhagens de melhor desempenho levariam à tendência de se empregar a rastreabilidade, o que justifica a adoção de técnicas como a reprodução artificial e a criopreservação de gametas.

O conhecimento das características seminais básicas pode aperfeiçoar o processo produtivo das espécies domésticas e criar bancos de sêmen daquelas ameaçadas de extinção. Parâmetros da capacidade fecundante dos espermatozoides e sua estocagem permitem melhorar a utilização das amostras seminais e reduzir o plantel de reprodutores de diversas espécies, e comercialmente, interferir no manejo, e nos custos de produção. Apesar dos avanços da reprodução induzida em rã-touro (ROSEMBLIT et al., 2006; AGOSTINHO et al., 2000; BROWNE et al., 2001; WAGGENER e CARROLL JR, 1998), outros aspectos são necessários para a sua otimização, entre eles o conhecimento de características andrológicas básicas tais como métodos para a obtenção, avaliação e armazenamento de amostras seminais de qualidade. Assim com o presente trabalho objetiva-se discutir e elaborar formas de obtenção de sêmen utilizando métodos de indução hormonal e extração para posteriormente armazená-lo sob congelamento em nitrogênio líquido com intuito de poder melhor aproveitá-lo para trabalhos futuros.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

A realização deste trabalho teve como principal objetivo desenvolver protocolos de indução hormonal com um análogo sintético de GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas) para otimizar a coleta e de congelamento de sêmen com extração seminal do animal vivo, pois, os demais protocolos prevêm, em sua maioria, eutanásia dos animais e extração testicular.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Identificar o indutor mais eficaz na obtenção de espermiacção;
2. Verificar o tempo mais adequado para a coleta de sêmen após aplicação do indutor mais eficaz;
3. Determinar qual o grau de toxicidade das soluções crioprotetoras e sua eficácia pré e pós-congelamento;
4. Criopreservar o sêmen da rã-touro *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802).

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Características da espécie

A espécie *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) (previamente *Rana catesbeiana*) pertence à classe dos anfíbios, ordem Anura e família Ranidae, com distribuição geográfica que se estende do Canadá, Estados Unidos até o México, embora tenha sido disseminada para outras regiões do globo, incluindo Europa e América do Sul (FLORES-NAVA, 2000). No Brasil, é a única espécie de rã utilizada em produção comercial.

A alta exigência protéica de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) leva ao hábito alimentar carnívoro dessa espécie da fase pós-metamórfica à fase adulta, incluindo insetos, pequenos mamíferos, peixes, répteis e, também, outros anfíbios (REEDER, 1964). Em cativeiro, essa rã pode receber treinamento e consumir alimentos artificiais (ração). A grande aceitação pelo consumidor e os bons preços no mercado atenuam os custos de produção e justificam a criação comercial da espécie.

A rã-touro é um animal ectotérmico com a temperatura corporal variando de acordo com a do ambiente. A sua reprodução é um fenômeno cíclico e a prole, geralmente, é produzida na época do ano mais propícia a sobrevivência. Os acontecimentos fisiológicos endógenos, que regulam a atividade funcional gonadal, são sincronizados por fatores ambientais como fotoperíodo, temperatura e umidade relativa do ar para garantir o sucesso reprodutivo (LOFTS, 1974).

A rã-touro é um animal prolífico e precoce e está apta a reprodução aos sete meses de idade, quando têm entre 150 e 200 g e podem gerar de 3.000 a 5.000 ovócitos segundo Lima e Agostinho (1988). Após dois anos, a produção de ovócitos pode aumentar e atingir valores superiores a 24.000 ovos (RIBEIRO FILHO, 1994). As rãs-touro atingem a maturidade sexual um ano após completarem a metamorfose em habitat natural, o que as torna reprodutivamente dependentes do ambiente em que se encontram (DUELLMAN e TRUEB, 1994). No entanto, rãs em cativeiro atingiram a maturidade sexual de quatro a seis meses após a metamorfose (AGOSTINHO,

1995). Em trabalho realizado por Ferreira et al. (2002) observa-se que, em condições tropicais, a postura dessa rã variou de 5.000 a 20.000 ovos, com valores semelhantes à observada por Lima e Agostinho (1988). O tamanho das fêmeas a primeira maturação foi de 10,33cm, com peso vivo de 109,78g e para os machos o valor foi de 8,09 cm e 45g, confirmando a precocidade destes em relação às fêmeas. A maturidade é atingida quando os machos alcançam 254 g e as fêmeas 209 g (COSTA, 1992).

A rã-touro tem comportamento reprodutivo como à maioria dos anuros: são animais territorialistas e os machos defendem a área escolhida em corpos permanentes de água. A reprodução, nos trópicos, acontece frequentemente na primavera e no verão, quando os machos vocalizam para atrair a fêmea, que tem como característica principal de corte, a natação e movimento lentos ao aproximarem dos machos. A estação reprodutiva pode durar todo o ano desde que as condições ambientais sejam manipuladas para isto. Os machos, ao permitirem a chegada da fêmea, realizam o amplexo axilar que pode durar horas até a liberação total dos ovócitos e do esperma. Referente ao desenvolvimento ontogênico, os ovos expostos a temperaturas acima de 27,7°C desenvolvem de maneira anormal e com menor eclodibilidade. Assim, essa espécie concentra as desovas nos períodos mais quentes do ano e as posturas são realizadas em corpos d'água com temperaturas amenas (TYNING, 1990; POUGH, 2003).

### 3.2. Morfo-fisiologia reprodutiva dos machos

O sistema reprodutor masculino da rã-touro é constituído pelas gônadas masculinas, comumente chamadas testículos, com duas estruturas ovóides amareladas, na superfície ventral anteriormente aos rins e suportadas por um ligamento denominado mesórquio. Possui, também, ductos eferentes (arquinéfricos ou de Wolffian) responsáveis pela condução dos espermatozóides aos rins mesonéfricos; um par de corpos gordurosos ou adiposos, que são estruturas digitiformes inseridas na porção anterior dos ligamentos gonadais culminando com a cloaca, anteriormente situada ao ânus, que recebe o bolo fecal proveniente do reto, urina, sêmen e ovócitos provenientes do sistema urogenital, sendo assim eliminados para o meio externo (DUELLMAN e TRUEB 1994).

Os testículos têm túbulos seminíferos contornados por uma cápsula de epitélio germinativo responsável por seu alinhamento dentro do mesmo, onde a gametogênese ocorre, uniformemente. Tais estruturas estão inseridas em um tecido intersticial composto basicamente por tecido conjuntivo, capilares, células de Leydig, esta última responsáveis pela produção de andrógenos (LOFTS, 1974). Outra célula, presente nos túbulos seminíferos e que atuam na nutrição dos espermatozóides são as de Sertoli. Essas têm citoplasma hialino, núcleo volumoso medianamente basófilo, sem nucléolos aparentes e são produtoras de inibina, uma proteína ligadora que transformam andrógenos que são produzidos nas células de Leydig em estrógenos (COSTA et al., 1998).

A espermatogênese de anuros é composta por oito divisões celulares que culmina na formação de 200 células germinativas (espermatócitos primários) a partir de uma espermatogônia, que nos anamniotas é denominada cística (LOFTS, 1974).

A *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) possui dimorfismo sexual, em alguns machos, a rugosidade nos membros anteriores, a região gular com tonalidade amarelada e diâmetro da região timpânica são relativamente maiores que a das fêmeas. As características sexuais podem variar de intensidade quando se aproxima o período reprodutivo, tornando-se mais conspícuas, quando a rã está apta para o acasalamento (ALONSO 1997). A definição sexual nas rãs ocorre em nível cromossômico e hormonal, sendo os

testículos e os ovários definidos como características sexuais primárias e aqueles fenotípicos as secundárias (AGOSTINHO, 1995). Além das características sexuais secundárias, os anuros incluem outros parâmetros como contagem diferenciada das células vermelhas do sangue, tamanho do pulmão, padrões comportamentais (como o fato de somente o macho emitir vocalizações de acasalamento) e diferenças fisiológicas e estruturais entre os sexos (LOFTS, 1974; FERREIRA et al., 2002).

Os estádios testiculares de rã-touro foram definidos em total de cinco: estágio um, caracterizado pela predominância de espermatogônias G1; dois, início da maturação, fase em que é marcante o começo da atividade espermatogênica; três, maturação intermediária, marcada pelo aumento no número de espermátócitos secundários; quatro, maturação avançada, na presente fase os testículos atingem seu grau máximo de desenvolvimento e cinco, esgotado o lume dos túbulos seminíferos, nesta fase se encontra amplo e esvaziado, apenas com a presença de espermatozóides residuais. Após o estágio cinco não se observou retorno ao estágio de repouso para os machos, o que sugere que o processo de espermatogênese ocorra continuamente nos indivíduos adultos (COSTA et al., 1998).

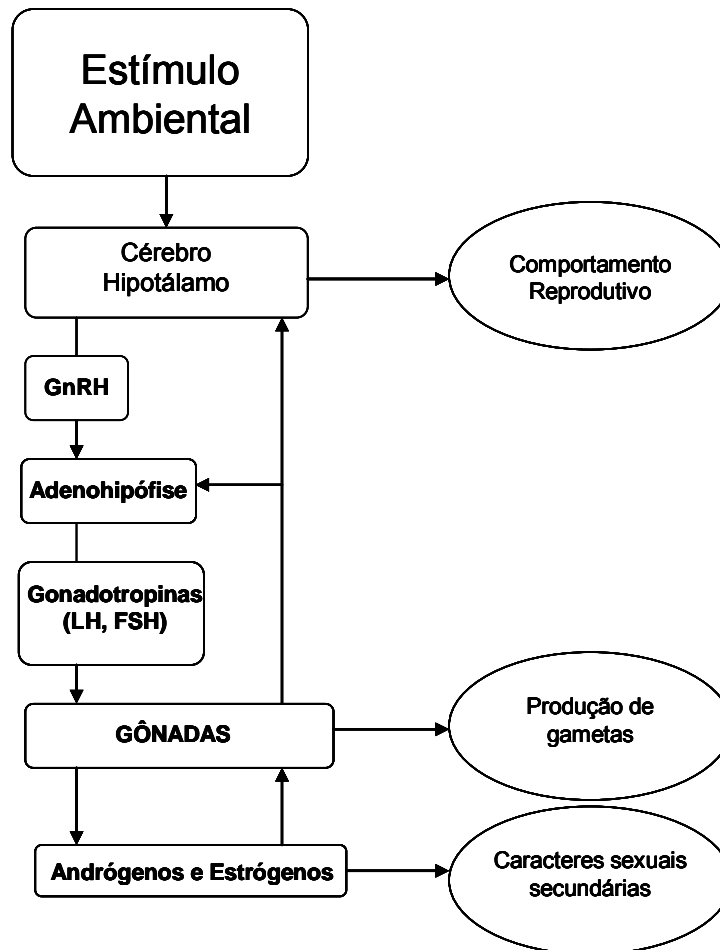
### **3.3. Técnica de indução hormonal**

A indução hormonal em animais domésticos é utilizada para aperfeiçoar a obtenção de gametas viáveis para a obtenção de esperma para bancos de sêmen, planejamento e ciclagem do período reprodutivo e melhoramento genético animal. A indução hormonal em anfíbios foi conseguida a partir da aplicação de LH mamífero e de gonadotropina coriônica humana (hCG) (LOFTS, 1974). Os anuros por apresentar fecundação externa o desenvolvimento de técnicas de inseminação artificial podem ser consideradas mais simples (KOUBA, 2009). Isto é comprovado pelo uso de hormônios exógenos para induzir a espermiacção em uma grande variedade de sapos e rãs (BROWNE et al., 2006; WAGGENER e CARROLL JR., 1998).

O hormônio exógeno para indução à reprodução age sobre as gônadas ou sobre a glândula hipófise. Esta se localiza numa depressão da caixa

craniana do osso esfenotimóide (RIBEIRO FILHO, 1994), sendo composta por cinco partes, a adeno-hipófise, (*pars distalis*, ou lobo anterior), neuro-hipófise (*pars nervosa*, ou lobo posterior), *pars intermédia* (lobo intermediário), *pars tuberalis* e *pars distalis*. A adeno-hipófise possui cinco tipos de células secretoras, com destaque para aquelas gonadotrópicas responsáveis pela síntese e secreção dos hormônios folículo estimulantes (FSH) e luteinizantes (LH) que tem como principal órgão alvo as gônadas sexuais. O controle da liberação dos hormônios adeno-hipofisários é regido pelo hipotálamo que, por intermédio da circulação porta hipofisária, secreta o hormônio liberador de gonadotropinas também conhecido como GnRH (DICKSON, 1996)

A reprodução influenciada pelas condições climáticas tem início no hipotálamo, que é estimulado e secreta os GnRH que agirão sobre a adeno-hipófise liberando gonadotropinas. Esses compostos atuam sobre as gônadas provocando a síntese de esteróides importantes no comportamento sexual, maturação das gônadas e reprodução. Estes esteróides são responsáveis pelo mecanismo de retro-alimentação sinalizando o fim do processo reprodutivo, induzindo, por seu aumento, o hipotálamo e a hipófise a diminuir as taxas secretoras de hormônios reprodutivos (AGOSTINHO, 1995). O sistema do hormônio liberador de gonadotropina é o principal regulador neuroendócrino do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal na maioria dos vertebrados incluindo os ranídeos (TSAI et al., 2003) (Figura 1).



Fonte: modificado de BALDISSEROTTO (2002)

FIGURA 1. Desencadeamento da resposta hormonal dos ranídeos em relação a um estímulo ambiental

A técnica de indução hormonal para a produção animal inclui a aplicação de extrato bruto hipofisário de animais doadores (fêmeas de rã-touro com características secundárias reprodutivas evidentes e em estágio de maturação gonadal adequado) dissolvidos em solução fisiológica de Ringer, aplicados intraperitonealmente em um animal receptor que também deve possuir estágio gonadal apto a receber a dose hormonal (LIMA e AGOSTINHO, 1988). A padronização dessa técnica mostrou que o melhor protocolo de indução ao acasalamento deveria conter duas doses de 5,5 mg de extrato bruto hipofisário de rã-touro por quilograma de peso vivo aplicadas no músculo interno da coxa (Gracillis maior) em um intervalo de seis horas, ou 7,7 mg nas mesmas condições com exceção para o intervalo de aplicações que foi de dezoito horas. A definição da aplicação para os machos, seria de 50% do total

das fêmeas em aplicação única, ao mesmo tempo em que se aplica a segunda dose nas mesmas (RIBEIRO FILHO et al., 1998a, b).

O LHRHa (10µg/kg), foi utilizado para a extrusão em *Rana catesbiana* (SHAW, 1802) enquanto 300 U.I. de hCG/animal para indução de *Bufo baxteri*. O hormônio LHRH na concentração de 0,1mg/kg foi utilizado para induzir espermição em três espécies de anuros (*Rana lessonae*, *R. esculenta*, *R. ridibunda*) (BROWNE et al., 2006; REYER et al., 2003; AGOSTINHO et al., 2000, 1996).

Amostras de sêmen testicular foram obtidas na maioria dos protocolos, sem indutores (MICHAEL e JONES, 2004; EDWARDS et al. 2004; BEESLEY et al., 1998; REINHART et al., 1998; HOLLINGER e CORTON, 1980; RICHARD, 1973; SHIVERS e JUDITH, 1971). Esse método de coleta apresenta limitações como o percentual de gametas viáveis, o que, geralmente, é atenuado superestimando a dose-inseminante (SHIMODA, 2007). Contudo, a coleta e a utilização de dosagens ótimas de espermatozoides evitam o sacrifício dos animais e propicia uma utilização mais racional do sêmen, o que pode refletir nos custos de produção e na conservação das espécies.

Diversos indutores reprodutivos como macerado de hipófise desidratada de carpa, gonadotropina coriônica humana e hormônios liberadores de gonadotropinas podem ser utilizados para a maturação final das gônadas (ANDRADE e YASUI, 2003). O uso de indutores em peixes é bem difundido para a maturação gonadal final, principalmente em fêmeas de espécies reofilicas, visto que a maturação final dos ovócitos não acontece em ambientes lênticos, e pesquisas com tais indutores ainda possuem aspectos que não foram completamente elucidados em anuras (WOYNAROVICH e HORVÁTH, 1989). O conhecimento desses processos reprodutivos é relevante para a reprodução por estar relacionado com a multiplicação de indivíduos para as fases posteriores do ciclo produtivo.



### 3.4. Biologia do sêmen

A averiguação da qualidade seminal é realizada por avaliação microscópica em várias espécies, mas esta, isolada, não é capaz de predizer com precisão a capacidade fecundante do sêmen (SOUZA et al., 2001).

Em *Crinia georgiana* as características seminais, freqüentemente, mostram extrema variação inter e intra-específicas, que pode ser devido à competição, onde o espermatozóide mais capacitado a deixar descendentes seria aquele onde os parâmetros espermáticos tais como variação numérica (concentração), volume, motilidade e longevidade fossem melhores e assim aumentando a capacidade fecundante. A motilidade e a longevidade do espermatozóide são os mais importantes para determinar a habilidade de fertilização dos machos (HETTYEY e ROBERTS, 2006). Os espermatozoides dos anuros são altamente móveis por breves períodos em um meio hiposmótico e são quiescentes em soluções balanceadas de sais (HARDY e DENT, 1986).

O sêmen de anuros apresenta semelhanças com o de peixes, e a motilidade espermática é a principal característica comum entre esses dois grupos. Em ambos sua iniciação depende da interação com o meio aquático. Nesses grupos os espermatozoides são imóveis no trato reprodutivo, mas em contato com o meio circundante apresentam alterações da concentração osmótica ou iônica que alteram a polarização do cálcio da membrana, dando início a motilidade (COSSON, 2004; MORISAWA et al., 1983). O decréscimo da osmolaridade inicia a motilidade espermática em anuros, o que enfatiza o emprego de metodologias de coleta de sêmen que evitem a contaminação das amostras seminais com a urina e água. A contaminação de amostras seminais por urina foi discutida para várias espécies de peixes (PERCHEC-POUPARD et al, 1998; DREANNO et al, 1998; LINHART et al, 1999; HARVEY, 1983; GLOGOWSKI et al., 2000) e anuros (HOLLINGER e CORTON, 1980).

### 3.5. Osmolaridade

O número de partículas presentes em uma solução afeta a motilidade dos espermatozoides que são imóveis nos órgãos reprodutivos de muitas

espécies de peixes marinhos, de água doce e de anfíbios (INODA e MORISAWA, 1987). Os espermatozóides são imóveis em um meio isotônico ou com uma osmolaridade pouco hipertônica em relação ao plasma seminal, sendo iniciada a motilidade logo encontra o meio hipotônico (BERNARDINI et al., 1988). A alta osmolaridade do sêmen em relação ao meio previne o gasto de energia pelo acionamento precoce da motilidade. O sêmen pode ser diluído em soluções para manter a osmolaridade do meio constante, a qualidade seminal também pode ser mantida ao se aumentar a disponibilidade de oxigênio para as células e reduzir a concentração de proteínas do plasma seminal capazes de degenerar com o passar do tempo. (BILLARD e COSSON, 1992). As soluções diluidoras na literatura são compostas basicamente por sais e tampões (Tabela 1). Soluções diluidoras são, também, utilizadas como imobilizadoras para atenuar efeitos de contaminação por urina e sangue, e até mesmo reimmobilizar os espermatozóides natantes devido ao aumento da osmolaridade (LINHART et al, 2005; BILLARD e ZHANG, 2001).

TABELA 1. Principais soluções diluidoras de sêmen para peixes e anuros

Solução diluidora	Componentes	Espécie utilizada	Referência
<b>Peixes</b>			
NaCl	NaCl 1,2%	<i>Brycon insignis</i>	SHIMODA (2004)
Trealose	Trehalose	<i>Cyprinus carpio</i>	WARNECKE e PLUTA (2003)
Solução de Ringer modificada	128,3mM NaCl 23,6mM KCl 2,1mM MgCl <sub>2</sub> 3,6mM CaCl <sub>2</sub>	<i>Misgurnus anguillicaudatus*</i>	ARAI et al. (1993)
Solução imobilizadora para <i>Silurus Glanis</i>	200mM NaCl; 30mM Tris-HCl	<i>Silurus glanis</i>	LINHART et al. (2005)
Solução diluidora de Kurokura	128,4mM NaCl 2,7mM KCl 1,4mM CaCl <sub>2</sub> 2,4mM NaHCO <sub>3</sub>	<i>Cyprinus carpio</i> <i>Tinca tinca</i> <i>Ctenopharyngodon idella</i>	KUROKURA et al. (1984); WARNECKE e PLUTA, (2003)
Soluções diluidoras à base de sais e açúcares	350mM glicose 30mMTris 300mM sacarose 30mMTris	<i>Cyprinus carpio</i>	HORVÁTH et al. (2003)

	350mM frutose 30mMTris		
	200mM KCl 30mMTris		
Solução diluidora para ciprinídeos	75mM NaCl 70mM KCl 2mM CaCl <sub>2</sub> 1mM MgSO <sub>4</sub> 20mM Tris-base 0,5% glicina	<i>Barbus barbus</i> <i>Chondrostoma nasus</i> <i>Ctenopharyngodon idella</i> <i>Cyprinus carpio</i> <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> <i>Leuciscus cephalus</i> <i>Rutilus meidingerii</i> <i>Vimba vimba</i>	LAHNSTEIN ER et al. (2000)

Continuação da tabela 1

<b>Anuros</b>			
Solução de DeBoer	110mM NaCl 0,44mM CaCl <sub>2</sub> 1,3mM KCl NaHCO <sub>3</sub> (pH7,3)	<i>Xenopus laevis</i>	VO e HEDRICK (2000); CHRISTENS SEN et al., (2004); REINHART et al., (1998)
Solução de Holtfreter	60 mM NaCl 1 mM KCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM Tris-hydroximetil amino metano (pH 8,0)	<i>Rana pipiens</i> <i>Rana lessonae</i> , <i>Rana esculenta</i> , <i>Rana ridibunda</i>	SHIVERS e JUDITH (1971) REYER et al. (2003)
Solução de Ringer para anfíbios	113 mM NaCl 2 mM KCl 1,35 mM CaCl <sub>2</sub> 1,2 mM NaHCO <sub>3</sub>	<i>Limnodynastes tasmaniensis</i> , <i>Rana pipiens</i>	EDWARDS et al. (2004) BRIGGS (1952)
Solução de Ringer para anfíbios simplificada	113 mM NaCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> 2 mM KCl 3,6 mM NaHCO <sub>3</sub> (pH7,2)	<i>Bufo marinus</i>	RUGH (1962); BROWNE et al. (2001)
Solução F1	41.25 mM NaCl 1.75 mM KCl 0.5 mM NaHPO <sub>4</sub> 1.9 mM NaOH 2.5 mM HEPES 0.063 mM MgCl <sub>2</sub> 0.25 mM CaCl <sub>2</sub> (pH 7.8)	<i>Xenopus laevis</i>	GLAHN e NUCCITELLI (2003)
OR2	(82.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.0 mM CaCl <sub>2</sub> 1.0 mM MgCl <sub>2</sub> , 1.0 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 5.0 mM Hepes; pH 7.8)	<i>Xenopus laevis</i>	BUGRIM et al., 2003

Fonte: YASUI (2007)

### 3.6. Motilidade espermática dos anuros

A espécie *Crinia georgiana* possui fertilização externa e por isto as características do sêmen como motilidade e longevidade do espermatozóide e do meio em que são liberados são decisivas para a determinação da paternidade (HETTYEY e ROBERTS, 2006). Por outro lado, na maioria dos Urodela o meio não tem tanta influência sobre as características do ejaculado, pois o espermatozóide é depositado em espermatóforos e estão previamente ativados (HARDY e DENT, 1986). A duração da motilidade do sêmen dos animais com fertilização externa, como os anuros, é mais curta que daqueles de fertilização interna pela exposição imediata após a espermição a um ambiente adverso (CHRISTENSEN et al., 2004).

As fases da motilidade podem ser classificadas como pouco móvel, progressivo ou hiperativo, fases estas definidas para *Xenopus laevis* e que podem ser distinguíveis ao microscópio. Espermatozóides com baixa motilidade têm acentuada vibração do corpo celular sem saírem do lugar, o espermatozóide gira em torno do próprio eixo e se move a frente em movimentos helicoidais. A hiperativação é caracterizada por alta amplitude do batimento flagelar em movimentos circulares e aumento da velocidade (CHRISTENSEN et al., 2004).

### 3.7. Motilidade espermática dos peixes

A motilidade em peixes é um dos principais parâmetros espermáticos, por estar relacionado com a capacidade fecundante do sêmen (BILLARD e ZHANG, 2001). Após a ativação os espermatozóides têm tempo limitado para a fertilização dos ovócitos e a duração da motilidade sendo espécie-específica. Na maioria dos casos tem duração de alguns minutos, como para a carpa e a tilápia (YASUI, 2007), e o dojo (YOSHIKAWA et al., 2007), mas podem durar de 30-40 segundos, como em *Epalzeorhynchus frenatus* (VIDAL JR et al., 2002), *Clarias gariepinus* (MANSOUR et al., 2004) e salmonídeos (KOBAYASHI et al., 2004; SCOTT e BAYNES, 1980).

A metodologia de observação da motilidade é importante, pois a técnica mais utilizada, a diluição em duas etapas, consiste em uma pré-diluição não

ativadora, com solução diluidora e uma diluição ativadora. Essa técnica possibilita melhor visualização e ativação simultânea dos espermatozoides no campo óptico, embora seja necessária uma solução diluidora que não comprometa a qualidade seminal (BILLARD e COSSON, 1992).

O sêmen obtido por extrusão, geralmente apresenta motilidade superior a 80% para peixes (LINHART et al., 1999 e 2005; RURANGWA et al., 2004). A motilidade espermática em anuros apresenta valores mais baixos e maior variabilidade. Além das características intrínsecas destes grupos, isto pode ocorrer devido à metodologia de coleta, com maceração testicular e, neste caso, outros tipos celulares da linhagem espermatogênica podem também, estarem presentes (CHRISTENSEN et al., 2004).

### **3.8. Soluções crioprotetoras**

O glicerol é um crioprotetor eficiente na conservação de células seminais (POLGE et al., 1949) e representou um grande avanço na criopreservação, embora houvesse pouco aprimoramento sobre as técnicas na década de 1950. Apesar disso, a implantação dessa nova tecnologia surtiu um grande impacto na criação animal, especialmente de gado (HOLT, 2000). As soluções crioprotetoras são acrescidas ao meio diluidor para proteger as células contra crioinjúrias durante o congelamento e o descongelamento. Os crioprotetores protegem as células contra as criolesões, mas em concentrações elevadas se tornam tóxicas para o espermatozoide e devem ter alta solubilidade em água e toxicidade reduzida (MILIORINI, 2006).

Os crioprotetores são classificados de acordo com a capacidade de permeabilidade através da membrana celular e são intracelulares (glicerol) e extracelulares que agem basicamente como estabilizadores de membrana (lactose). As propriedades físico-químicas são o que determinam sua capacidade de penetração pela membrana, aqueles com baixo peso molecular têm acesso facilitado ao interior da célula. Diversos crioprotetores foram classificados quanto à permeabilidade através da membrana (MILIORINI, 2006) (Tabela 2).

TABELA 2. Classificação dos crioprotetores quanto à permeabilidade através da membrana celular

Crioprotetores intracelulares (solúveis)	Crioprotetores extracelulares (não solúveis)
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Glicose
Glicerol	Sacarose
Metanol	Gema de ovo
Etilenoglicol	Leite desnatado
Propilenoglicol	Soro
Propanodiol	Água de coco
Butanodiol	Lactose, HOLT (2000)
Acetamida	

Fonte: Modificado de MILIORINI (2006)

A utilização de crioprotetores intracelulares é imprescindível para anular ou reduzir os efeitos deletérios da formação de microcristais de gelo durante o congelamento, ao removerem osmoticamente a água intracelular responsável pelo choque osmótico causado pela reidratação celular durante o descongelamento (ROBLES et al., 2005). Os crioprotetores internos têm maior interação com a membrana plasmática e podem danificar a mesma por serem tóxicos em temperaturas elevadas. Alguns protocolos que utilizam o dimetilsulfóxido preconizam sua utilização com tempo de contato entre o crioprotetor e a membrana e temperatura de 4°C para minimizar ou evitar esses efeitos (WEWETZER e DILMAGHANI, 2001). O crioprotetor mais efetivo é aquele com rápida difusão através da membrana e menor grau de toxicidade para a célula (SIMEONE, 1998). A associação entre crioprotetores solúveis e não solúveis devem ser usadas para a crioproteção das células espermáticas (GODINHO, 2003; CAROLSFELD e HARVEY, 1999).

O crioprotetor intracelular deve ser eficaz para a proteção das células pela sua capacidade de permear a membrana plasmática e toxicidade. O metanol é um crioprotetor solúvel e, com o glicerol e o dimetilsulfóxido, são os mais utilizados na crioproteção de células espermáticas de anfíbios e peixes, no entanto é considerado o mais tóxico, apesar de todos terem o grau de toxicidade variável entre espécies de organismos (BROWNE et al., 2002; BEDORE, 1999).

Polímeros, açúcares e componentes anfipáticos são utilizados como crioprotetores, incluindo compostos e moléculas como a lactose e a rafinose,

sendo a primeira utilizada em combinação com o glicerol para evitar danos às células de mamíferos carnívoros (HOLT, 2000).

As concentrações de crioprotetores variam com a espécie, tipo celular (gametas ou células somáticas) e protocolo de congelamento (slow-cooling, vitrificação, etc). Soluções de 0,5M de metanol, glicerol, DMSO e etilenoglicol soluções convertidas em percentuais de 1,6%, 4,6%, 3,9% e 14,6%, respectivamente, apresentaram proteção semelhante e evitaram a lise celular de espermatozóides (BEESLEY et al., 1998). Os percentuais de concentrações e os autores de protocolos para nove espécies de peixes marinhos com a variação entre crioprotetores, e entre crioprotetores (SUQUET et al., 2000) (Tabela 3).

TABELA 3. Concentrações ótimas de DMSO para criopreservação de sêmen de espécies de peixes marinhos

Espécies	Concentração (%)	Referência
Atlantic croaker	15	Gwo et al. (1991)
Barramundi	5	Leung (1987)
Black grouper	20	Gwo et al. (1993)
Grouper	10	Withler e Lim (1982)
Ocean pout	20	Yao et al. (1995)
Pacific herring	15	Pillai et al. (1994)
Seabream	10	Maisse et al. (1998)
Turbot	10	Dreanno et al. (1997)
Yellowtail flounder	10	Richardson et al. (1995)

Fonte: Modificado de SUQUET et al. (2000)



### 3.9. Congelamento do sêmen

Soluções de dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol e glicose foram utilizadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para testar a tolerância de células espermáticas de sêmen de *Rana sylvatica* a baixas temperaturas (BEESLEY et al., 1998). A criopreservação de células germinativas animais envolve procedimentos de armazenamento de espermatozoides no nitrogênio líquido a temperatura próxima aos  $-196^{\circ}\text{C}$ , mantendo a viabilidade gamética por tempo indeterminado (MILIORINI, 2006).

A condição de criopreservação de gametas é útil para a manutenção de sêmen viável para a fertilização sem necessitar manter grande número de reprodutores das espécies escolhidas, o que reduz os custos de manutenção dos mesmos. Além disso, elimina problemas com assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas, estabelece programas de melhoramento genético que pode preservar a variabilidade genética de espécies ameaçadas com uma maior segurança quanto à sanidade do plantel de reprodutores machos (CHEREGUINI et al., 2003; RIBEIRO e GODINHO, 2003); transporte de gametas sem perda da viabilidade (MILIORINI et al., 2005) e a utilização de todo o sêmen disponível (OHTA e IZAWA, 1996).

O congelamento deve ser lento e gradativo para não danificar a membrana plasmática, mas o do tipo vitrificação deve ser o mais rápido possível. A inserção do sêmen, mesmo acondicionado em palhetas, diretamente em nitrogênio líquido, desorganiza a membrana celular e a peça intermediária podendo levá-las ao desaparecimento. Devido a estes fatores o congelamento em vapor de nitrogênio antes do líquido, por cerca de vinte e quatro horas, reduz os danos causados a estas microestruturas (BILLARD, 1983).

Os crioprotetores ingressam no citoplasma e o fluido intracelular pode ser super-resfriado a temperaturas entre  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $-15^{\circ}\text{C}$  sem formação de cristais de gelo, por reduzirem o ponto de congelamento pela diminuição da interação das moléculas de água. Neste intervalo de temperatura há formação de cristais de gelo no meio externo e quando há redução da mesma abaixo desta faixa formam-se cristais no meio interno (ROBLES et al., 2005).

O processo de criopreservação implica em desidratação celular pela remoção da água intracelular por diferença osmótica e os crioprotetores penetram na célula por difusão pela membrana causando encolhimento da

mesma e um influxo iônico do meio externo para o interno, o que pode ser prejudicial à célula por aumentar a concentração de sais no seu interior (ROBLES et al., 2005; MAZUR, 1984).

### **3.10. Descongelamento do sêmen**

A etapa de descongelamento do sêmen é importante para a manutenção da viabilidade e utilização do mesmo e dependendo da taxa de descongelamento poderá haver formação de cristais de gelo intracelulares e causar crioinjrias. A hidratação celular ocorre por influxo de água pela membrana durante a criopreservação, ao contrário do congelamento (HOLT, 2000). O descongelamento de sêmen de *Xenopus laevis* a 37°C sem mencionar o tempo utilizado foi utilizado por Buchholz et al. (2004) e o sêmen de salmonídeos foi descongelado a 25°C por 30 segundos e 60°C por 5 segundos por Murgas et al. (2001a) e Lanhesteiner et al. (1997).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Execução dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos nas instalações da Estação de Piscicultura e no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Lavras no período de 18 de agosto a 01 de janeiro de 2009, com animais do Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa. No primeiro experimento objetivou-se testar quatro indutores a espermiacção para obtenção de sêmen de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802). No segundo experimento a influência da hora pós aplicação (HPA) dos análogos de hormônios liberadores de gonadotropinas, extrato bruto hipofisário e gonadotropina coriônica humana, sobre volume de sêmen, concentração espermática e motilidade foi avaliada. No terceiro experimento avaliou-se a toxicidade da mistura entre as quatro concentrações de soluções internas (dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5%) com uma concentração de solução externa (lactose 1%) e (Best thawing solution (BTS) 5%) sobre o sêmen, analisando-se o parâmetro motilidade, congelamento e posterior descongelamento das amostras submetidas as soluções citadas.

### 4.2. Manejo geral dos animais

#### 4.2.1 Morfometria e manutenção

Os animais foram pesados em balança eletrônica de precisão (3000g/0,1g; BS3000A<sup>®</sup>). O comprimento total e rostro cloacal foram medidos com paquímetro digital (0-150mm; King Tools<sup>®</sup>) e marcados com aplicador de pinos plásticos para linha de tecidos (*Tagfix*<sup>®</sup>) com etiquetas plásticas numeradas entre os artelhos na porção basal as palmouras finas (PEREIRA et al., 2008) (Figura 2) e mantidos em baias de sistema alagado de cultivo de 1,4 m<sup>2</sup> para a manutenção dos espécimes semi-submersos em lâmina d'água de, aproximadamente, 8 cm em sua extensão numa temperatura de 25° ± 3°C. Os

exemplares foram alimentados com ração comercial peletizada (8 mm) com 42% de proteína bruta com fotoperíodo de 13 horas de luz. Os animais permaneceram nessas condições por dois meses até o início do experimento.



FIGURA 2. Marcação dos exemplares de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), com etiquetas plásticas fixadas á base das palmouras.

#### 4.2.2 Procedimento de indução hormonal

Os reprodutores foram escolhidos, pelo estado de saúde, pelas características sexuais secundárias evidentes na época do acasalamento: região gular amarelada, presença de calo nupcial nos artelhos anteriores e capacidade de amplexo e, quando possível, pela identificação da vocalização. Os animais foram submetidos a aplicação hormonal com seringa hipodérmica e agulha de 25 x 0,7 mm introduzida intraperitonealmente no músculo reto do abdome na região ilíaca esquerda na posição ventral posterior segurando-se o exemplar com o dorso voltado para a palma da mão com o rostro voltado para baixo e o ventre exposto. As seringa foi posicionada na posição oblíqua ao corpo e a agulha introduzida levemente até a metade para não perfurar ou danificar órgãos internos (Figura 3).



FIGURA 3. Aplicação hormonal intraperitoneal dos exemplares de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802).

#### 4.2.3 Coleta de sêmen e avaliação espermática

A coleta seminal foi feita com pipeta volumétrica de 5 mL introduzida na cloaca do exemplar por suaves massagens na região ventro posterior celomática (Figura 4). A motilidade, vigor, e volume, medido imediatamente após a coleta com a própria pipeta volumétrica. A extração foi realizada após a introdução da pipeta na cloaca do exemplar até esgotamento total do sêmen com intuito de padronizar a metodologia.

Uma alíquota de 10  $\mu$ L de sêmen foi colocada em uma lâmina e avaliada em um microscópio óptico em aumento de 400 vezes para se determinar a motilidade, e o vigor imediatamente após a coleta. A motilidade subjetiva consistiu no percentual de espermatozóides móveis em determinado campo de visualização e o percentual e capacidade de movimentação do corpo celular em linha reta tiveram escalas definidas de 0 a 100%. O vigor espermático foi definido de zero a cinco sendo o vigor zero, ausência de turbilhonamento e motilidade; vigor 1, capacidade de turbilhonamento e motilidade subjetiva de 1 a 20%; vigor 2, turbilhonamento e motilidade subjetiva de 21 a 40% e assim por diante até completar o vigor 5, com turbilhonamento e motilidade subjetiva pode variar de 81 a 100%. Alíquotas de 50  $\mu$ L do sêmen coletado foram retiradas e colocadas em 250  $\mu$ L de formol citrato para avaliação de morfologia

e concentração espermática, esta realizada em câmara de Neubauer com microscópio óptico (400X).



FIGURA 4. Coleta de sêmen do exemplar de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802), por meio de capilaridade utilizando pipeta volumétrica

#### 4.3. EXPERIMENTO 1: Comparação da eficácia entre diferentes indutores sobre a espermiacão de rã-touro

Vinte e cinco animais foram separados em blocos de cinco e submetidos a aplicação hormonal para se avaliar a eficácia de indutores segundo metodologia citada com os seguintes tratamentos; solução fisiológica (T0), EBH de carpa (T1) (RIBEIRO FILHO, 1994), acetato de gonadorelina (T2), acetato de buserelina (T3) (AFONSO, 2004) e hCG (gonadotropina coriônica humana) (T4) (Tabela 4).

TABELA 4. Hormônio e respectivas dosagens de aplicação para espermiacão de rã-touro

Tratamento	Hormônio	Dosagem/kg
T0	Solução Fisiológica	0,3ml
T1	Extrato Bruto Hipofisário de carpa	5000 µg
T2	Acetato de gonadorelina	83,0µg
T3	Acetato de Buserelina	13,0µg
T4	Gonadotropina coriônica Humana	830UI

#### **4.4. EXPERIMENTO 2: Influência da hora pós aplicação hormonal (HPA) sobre os parâmetros espermáticos**

Trinta animais aleatoriamente subdivididos em seis blocos de cinco animais cada, para se ajustar a melhor hora para a coleta seminal com o hormônio mais eficaz. Uma aplicação única da dose do hormônio foi realizada na hora zero e a coleta feita em intervalos de duas em duas horas até doze horas, dose de 0,1 ml de acetato de gonadorelina. Cinco exemplares foram tomados a cada duas horas, como descrito anteriormente, e o sêmen foi extraído para análise da qualidade seminal (motilidade, vigor, concentração subjetiva visual, concentração espermática e volume).

#### **4.5. EXPERIMENTO 3: Teste de toxicidade dos crioprotetores internos e externos, congelamento e descongelamento**

Diluições entre crioprotetores internos e externos foram preparadas permanecendo cerca de uma hora em incubação para minimizar os efeitos das reações exotérmicas do álcool, evitar injúrias e manter a conservação celular (MILIORINI, 2006). Dois crioprotetores internos (DMSO e metanol) foram utilizados com dois externos (lactose a 1% e BTS a 5%). As concentrações de crioprotetor interno foram de 1,0%, 2,5%, 5,0% e 7,5% (Tabela 5).

TABELA 5. Soluções crioprotetoras para tratamento do sêmen da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802)

Tratamento	Lactose (% m:v)	Crioprotetor
DL1	1	DMSO a 1,0%
DL2	1	DMSO a 2,5%
DL3	1	DMSO a 5,0%
DL4	1	DMSO a 7,5%
ML1	1	Metanol a 1,0%
ML2	1	Metanol a 2,5%
ML3	1	Metanol a 5,0%
ML4	1	Metanol a 7,5%
Tratamento	BTS (% m:v)	Crioprotetor
DB1	5	DMSO a 1,0%
DB2	5	DMSO a 2,5%
DB3	5	DMSO a 5,0%
DB4	5	DMSO a 7,5%
MB1	5	Metanol a 1,0%
MB2	5	Metanol a 2,5%
MB3	5	Metanol a 5,0%
MB4	5	Metanol a 7,5%

Alíquotas de 400 µL de sêmen foram diluídas em 1200 µL de solução crioprotetora (1:3) e as características seminais (motilidade e vigor) foram avaliadas em microscópio óptico em um aumento de 400 vezes com a presença dos crioprotetores. As soluções sêmen:diluidor foram envazadas em palhetas de 0,5 ml, três por tratamento vedados por microesferas. A seguir as palhetas foram inseridas em raques de polietileno, acondicionadas e inseridas em botijão de vapor de nitrogênio líquido (Taylor-Wharton, modelo CP 300, tipo *dry shipper*) para resfriamento gradativo. Após 24 horas, as raques foram armazenadas em botijão (modelo DS-18 - Cryometal) por, aproximadamente, sete dias e permaneceram submersas em nitrogênio líquido, para se comprovar o tempo indeterminado de conservação. Ao final deste período as palhetas foram retiradas e descongeladas no laboratório do setor de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Estado de Minas Gerais.

O descongelamento foi individual por imersão e agitação da palheta todo o tempo em banho-maria durante 10 segundos a 37°C (BUCHHOLZ et al., 2004) para total liquidez do sêmen. A seguir, as palhetas foram secas em papel toalha, ambas as extremidades foram cortadas e o conteúdo inserido em um tupo tipo eppendorf® de 600 µL, para posterior análise. O sêmen foi



homogeneizado no tubo, sob leve pipetagem, com a própria ponteira da pipeta de precisão. Uma alíquota de 10  $\mu$ L de sêmen descongelado foi depositada por lâmina para avaliação visual das características com aumento de 400 vezes em microscópio óptico (Figura 5). Após descongelamento, a motilidade subjetiva e o vigor espermático foram analisados com escores variando de 0 a 100% e zero a 5, respectivamente.

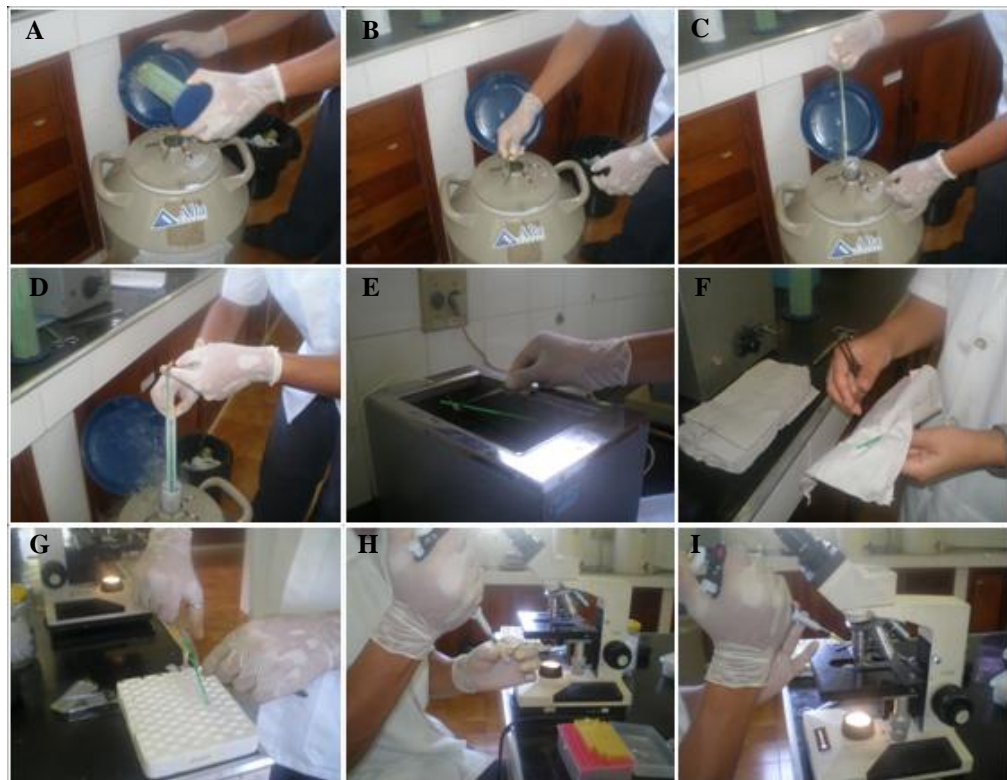


FIGURA 5. Etapas de descongelamento do sêmen de rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802): (A) abertura do botijão e retirada da tampa; (B e C) retirada do canister; (D) retirada da raque; (E) descongelamento da palheta em banho maria; (F) secagem da palheta; (G) inserção do sêmen em tubo eppendorf®; (H) retirada da alíquota de sêmen; (I) colocação da amostra na lâmina para avaliação visual.

#### **4.6. Análises estatísticas**

Os resultados foram submetidos à análise de variância, e quando necessário ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre as médias a uma probabilidade de 5%. Os dados de volume foram submetidos a análise de regressão linear e a concentração espermática à análise de variância. Os dados da variável concentração espermática, foram transformados ( $\text{Log}_{10} X$ ) para se obter a normalidade. As análises foram realizadas utilizando-se com o software SISVAR versão 5.0 (FERREIRA, 2004).

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O parâmetro morfologia espermática não foi avaliado devido a presença de aglutinações o que impossibilitou uma análise acurada do sêmen, pois subestimaria a mesma.

#### **5.1. EXPERIMENTO 1: Eficácia de diferentes indutores para a espermição de rã-touro.**

Um total de 28% dos animais induzidos apresentaram resultado positivo aos indutores; sendo 20% com acetato de gonadorelina e 8% com acetato de buserelina. Os demais 72%; 12% restantes do tratamento com acetato de buserelina, 20% do tratamento com gonadotropina coriônica humana, 20% com extrato bruto hipofisário e 20% com solução fisiológica tiveram resultado negativo para a indução. O resultado se repetiu em todos os intervalos de tempo (Tabela 6).

TABELA 6. Percentual de animais espermiados e parâmetros espermáticos mediante indução hormonal

Indutores	Hor a	Animais espermiados	Volume (ml)	Vigor (0-5)	Motilidade (%)	Concentração espermatozóide/ml
Acetato de Gonadorelina	2	5	4,56 ± 2,35	2,6 ± 1,1	67 ± 16	1,28x10 <sup>5</sup>
Acetato de buserelina		2	3,25 ± 3,89	1,5 ± 0,7	57 ± 28	3,03x10 <sup>5</sup>
Acetato de Gonadorelina	4	5	2,54 ± 2,09	2,2 ± 1,3	54 ± 25	1,82x10 <sup>5</sup>
Acetato de buserelina		2	3,17 ± 1,61	3,5 ± 2,0	28 ± 28	2,83x10 <sup>5</sup>
Acetato de Gonadorelina	6	5	1,40 ± 0,89	1,4 ± 1,5	22 ± 38	5,86x10 <sup>5</sup>
Acetato de buserelina		2	2,75 ± 3,18	1,5 ± 0,7	27 ± 32	1,00x10 <sup>4</sup>

Os resultados encontrados no que diz respeito a eficácia hormonal e tempo de resposta ao indutor foram superiores aos encontrados por outros autores confirmando a melhor atuação do análogo de GnRH, acetato de gonadorelina, provavelmente devido a ação prolongada, descrita na posologia da solução injetável. Easley et al., 1979, induzindo exemplares *Rana catesbeiana* afirmaram que 80% dos animais induzidos com LH/FSH-RH sintético obtiveram resultado positivo ao mesmo, enquanto 60% dos animais responderam ao extrato bruto hipofisário, 50% ao LH de mamíferos, 40% ao hCG e 20% com FSH tiveram resposta positiva a indução. Ao passo que o tempo de resposta ao LH foi menor que o do LH/FSH-RH sintético. O primeiro responde de uma a três horas após aplicação e o segundo em, aproximadamente, 30 minutos a partir da hora inicial de aplicação.

Os resultados mostraram uma maior eficiência do acetato de gonadorelina em relação ao percentual de animais espermiados, 100% dos animais induzidos em todas as HPAs isso, possivelmente, também, pela ação prolongada em relação aos outros hormônios. Kobayashi et al. (1993) trabalhando com *Rana nigromaculata*, induzida com 10UI/ml de hCG e 5 µg/ml de glicoproteína pituitária, obteve espermição em 60,3±8,4% e 55,4±7,8% respectivamente. Adicionalmente, com LH purificado de rês-touro, mostraram resultados satisfatórios com uma dosagem de 0,1 µg/ml, 30,0 ± 4,6% de sucesso e, também, em concentração dez vezes maior (1µg/ml), onde 50,0 ± 5,2% espermiaram.

Com a utilização de acetato de buserelina obteve-se resultado inferior ao encontrado por Alonso (1997), provavelmente, pela baixa concentração aplicada nos exemplares (13µg), que se comparados ao acetato de gonadorelina (83µg) foi, aproximadamente, seis vezes menor. O mesmo autor utilizou 2 µg/Kg de três análogos de GnRH, (buserelina, GnRH para mamíferos e GnRH para salmões) obteve 100% de espermição com buserelina contrário ao encontrado neste trabalho (8%). O análogo utilizado para salmões (73% espermiados) e para mamíferos (60% espermiados) tiveram, também, sua eficácia comprovada. A espermição de oito espécies de anuros (*Lepidobatrachus laevis*, *Xenopus laevis*, *Rana pipiens*, *Lepidobatrachus llanensis*, *Ceratophrys ornata*, *Ceratophrys cranwelli*, *Ceratophrys cornuta*, *Pysicephalus adspersus*) foi feita por Waggener e Carroll Jr (1998) com doses

hormonais variáveis de 100 a 575 µg/Kg de GnRH, eles obtiveram espermiacão que variaram de 30 minutos a 4 horas pós indução.

Não houve resposta dos animais ao extrato bruto hipofisário, no entanto, Ribeiro Filho (1998a) mencionou que machos induzidos com o mesmo hormônio apresentaram boa resposta a indução, com alta taxa de fecundação dos ovócitos.

A abundância de esperma e a hora de liberação variam com o hormônio e a dosagem do mesmo, mas uma injeção de 5 µg de LH-FSH-RH estimulou a liberação rápida e eficaz de níveis concentrados de esperma (EASLEY et al., 1979).

Em relação a HPA houve semelhança nos resultados a aqueles encontrados por Pozzi e Ceballos (2000), diferindo no hormônio (GnRH $\alpha$ ), na dosagem (83,0µg) e na espécie (*Lithobates catesbeianus*, (SHAW, 1802)). Os autores afirmaram que estudos realizados em *Bufo arenarum* mostraram que o tempo e a concentração hormonal ótima para produzir alta taxa de espermiacão são respectivamente duas horas após aplicação de 10 UI de hCG. A gonadotropina coriônica humana mostrou uma alta taxa de espermiacão produzida, quando se utilizou a mesma dose que os autores supracitados, após duas HPA em *Rana catesbiana* e *Leptodactylus ocellatus* (ROSEMBLIT et al., 2006).

Com menores valores aos deste experimento Limori et al. (2005) obtiveram resultados onde a indução hormonal teve sucesso em 79% das tentativas após administração de 5 µg de GnRH, 1000 µg de FSH e 1000 e 2000 UI de hCG a cada três, seis e doze horas após aplicação, provavelmente, devido a dosagem de hormônio utilizada. No caso do GnRH a dosagem pode ter sido subestimada enquanto as outras superestimadas causando uma resposta menos eficaz a espermiacão. O tratamento com 1000 e 2000 UI de hCG foi mais efetivo que o com GnRH.

Houve declínio da espermiacão a partir da décima hora de coleta, possivelmente pelo porte da espécie trabalhada, pela queda do efeito do hormônio sobre a liberação de gonadotropinas e esvaziamento testicular, Browne et al. (2006) administraram intraperitonealmente 300 UI de hCG, em *Bufo baxteri* e obtiveram espermiacão por vinte e cinco horas seguidas e declínio do volume a partir da quinta hora de coleta. Quarenta por cento dos machos espermiaram as duas HPA, valores inferiores aos encontrados,

provavelmente devido a dosagem aplicada, já que outros autores obtiveram melhores resultados ministrando doses de hCG dez vezes maiores para animais pertencentes ao mesmo gênero. A administração de 300 UI de hCG por 50g de peso em muitos *Bufo* produz uma alta na liberação seminal de três a seis horas pós aplicação hormonal, mas em *Rana pipiens* esta dose hormonal chega a ser alta 500 UI em combinação com LHRH, 10 µg, mesmo assim extraindo um esperma de baixa qualidade (KOUBA et al., 2009).

A obtenção de espermiacção duas horas após aplicação hormonal pode ser devido ao porte dos espécimes trabalhados e a dosagem hormonal, provavelmente, a administração de maior dose de acordo com o peso dos animais poderia reduzir o tempo de coleta aumentando a intensidade de liberação. Em *Dendrobates auratus* utilizou-se 100 UI de hCG e realizou-se a coleta em quatro machos após o intervalo de 1 hora obtendo 100% de espermiacção, possivelmente devido ao menor porte dos animais e melhor ação do hormônio (LIPKE et al., 2008).

Hormônios liberadores de gonadotropinas possuem estruturas moleculares semelhantes e por isto se obtém sucesso na indução de mamíferos e peixes e resposta semelhante às de anfíbios (ZANIBONI-FILHO e NUÑER, 2004). Portanto, o análogo do GnRH, acetato de gonadorelina, para indução e posterior extração seminal, pode ser considerado um hormônio eficiente para a espermiacção.

## **5.2. EXPERIMENTO 2: Influência da hora pós aplicação (HPA) nos parâmetros espermáticos de *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802).**

O uso do indutores mais eficaz com seis coletas em doze horas a intervalos de duas, não mostrou efeito ( $P > 0,05$ ) entre a HPA e o volume, o vigor e a concentração, que permaneceram inalterados estatisticamente. A motilidade foi de  $91,9 \pm 7,67\%$  até a 10ª HPA com efeito ( $P < 0,05$ ) entre o mesmo parâmetro e a hora pós-aplicação (Tabela 7).

TABELA 7. Parâmetros seminais de rãs-touro *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) avaliados em diferentes tempos após aplicação de acetato de gonadorelina

Características seminais	Horas após aplicação hormonal						P=	CV(%)
	2	4	6	8	10	12		
Volume <sup>1</sup>	1,56	1,76	0,94	2,66	1,91	2,65	0,0192	41,92
Motilidade	82,5	85,0	96,0	96,0	100,0	32,0	0,0095	-
Vigor	3,4	3,8	4,2	3,4	4,4	2	0,2188	-
Concentração <sup>2</sup>	2,49 x 10 <sup>5</sup>	1,60 x 10 <sup>5</sup>	1,23 x 10 <sup>5</sup>	1,36 x 10 <sup>5</sup>	1,05 x 10 <sup>5</sup>	3,0 x 10 <sup>4</sup>	0,2325	10,32

<sup>1</sup>Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05)

<sup>2</sup> espermatozóide/ml - Opção de transformação: Log<sub>10</sub> X

Os resultados do volume mostraram, em uma regressão linear simples (Figura 6), que a ação hormonal acontece a medida que há tendência de maior liberação de sêmen até um patamar de estabilização da liberação do ejaculado.

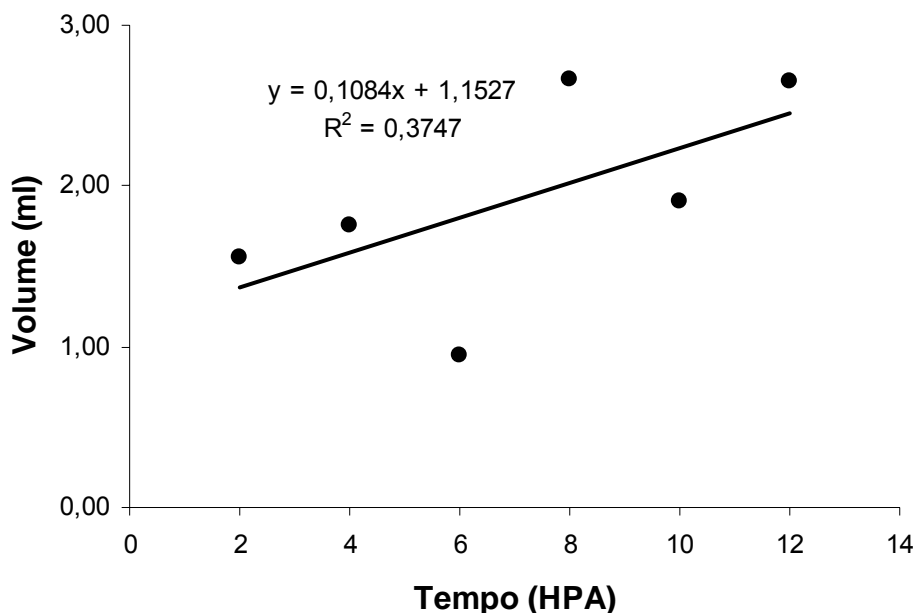


FIGURA 6. Volume seminal de rã-touro *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802) ( $n= 30$ ) após indução hormonal e 12 horas de coleta.

Os resultados encontrados com o indutor busarelina foram inferiores aos encontrados por Alonso (1997), possivelmente devido as condições do ambiente, pois apesar dos animais passarem por um período de adaptação a temperatura, umidade relativa do ar e a intensidade de luz estes, por serem controlados artificialmente, podem ter influenciados na ação hormonal. O autor afirmou que machos tratados com busarelina liberaram, em média, maior concentração de espermatozoides por indivíduo durante um maior tempo. Aqueles tratados com análogos de GnRH de mamíferos e salmão, praticamente, não alteraram a liberação de sêmen e a densidade espermática.

A faixa de variação de volume e concentração espermática deste trabalho foram respectivamente 0,94 a 2,66 ml e  $3,0 \times 10^4$  a  $2,49 \times 10^5$  espermatozoides/ml provavelmente devido a variação entre os animais durante o experimento. Waggener e Carroll Jr (1998) trabalhando com oito espécies distintas (*Lepidobatrachus laevis*, *Xenopus laevis*, *Rana pipiens*, *Lepidobatrachus llanensis*, *Ceratophrys ornata*, *Ceratophrys cranwelli*,



*Ceratophrys cornuta*, *Pysicephalus adspersus*) obtiveram uma ampla variação da densidade espermática aproximadamente  $1,0 \times 10^4$  espermatozóide/ml a  $13,8 \times 10^6$  espermatozóide/ml e volume variável de 8 a 8400  $\mu\text{L}$  de sêmen.

Agostinho et al. (2000) e Pozzi e Ceballos (2000) encontraram médias de  $1,63 \times 10^6$  espermatozóide/ml e  $8,15 \times 10^6 \pm 0,83 \times 10^6$  espermatozóides/ml, em animais induzidos com análogos de GnRH e hCG, respectivamente maiores que no presente trabalho que foi de  $1,34 \times 10^5$  espermatozóides/ml.

O volume médio obtido através da indução hormonal foi três vezes menor ( $1,9 \pm 0,7$  ml) do que aquele encontrado por Limori et al. (2005) que trabalhando com *Bufo marinus* foi de  $5,6 \pm 0,4$  ml, já concentração obtida pelo mesmo autor, após administração de FSH foi relativamente baixa ( $< 0,1 \times 10^6$  espermatozóide/ml) e ao ministrarem hCG (1000 UI e 2000 UI) durante intervalos de 6 e 12 horas, obtiveram o resultado médio de concentração de  $13,6 \pm 6,4$  e  $5,9 \pm 2,4$  e  $3,24 \pm 3,0$  e  $24,9 \pm 14,1$  ( $\times 10^6$  espermatozóide/ml; média  $\pm$  desvio padrão) respectivamente. Estes valores foram em média mais elevados que os encontrados, se comparados à média das 6 e 12 HPA, isto supostamente devido ao nível de estresse que a metodologia utilizada pode trazer durante a coleta. O percentual de motilidade média nas mesmas circunstâncias supracitadas foram respectivamente,  $66,2 \pm 16,1$  e  $30,7 \pm 25,3$  e  $64,7 \pm 22,5$  e  $39,5 \pm 32,3$  (%; média  $\pm$  desvio padrão), para as dosagens ministradas, menores que no presente trabalho que foi de  $87,8 \pm 7,9$  e  $76,0 \pm 38,1$  respectivamente, para os tempos de 6 e 12 HPA.

Os resultados obtidos demonstram que a motilidade se manteve constante da segunda até a décima HPA e a concentração também permaneceu sem alteração significativa, porém até a décima segunda HPA. O volume teve comportamento linear com uma queda significativa na sexta HPA, provavelmente, pela grande variabilidade entre os animais e problemas para extração seminal. Browne et al. (2006) encontraram após duas e três horas de coleta motilidades de 95 e 22%, respectivamente, e o alcance máximo da mesma se deu em torno de cinco horas pós administração e permaneceu constante até as vinte horas. A concentração atingiu sua maior densidade espermática após sete horas pós indução ( $12,5 \times 10^6$  espermatozóide/ml) e permaneceu constante até as 12 horas pós administração, seguido por seu

declínio. O maior volume de sêmen obtido foi com cinco horas pós indução (0,8 ml) e declinou até as 14 horas (0,2 ml) e permanecendo constante durante o restante do período. Roseblit et al. (2006) obtiveram em média  $2,5 \times 10^5 \pm 0,76 \times 10^5$  espermatozóide/ml e  $4,1 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^5$  espermatozóide/ml (resultados expressados em média  $\pm$  desvio padrão) para *R. catesbeiana* e *L. ocellatus*, induzidas com dosagens variadas de hCG (0, 1, 2, 10, 20, 40 e 100 UI/ml).

Em peixes, devido a semelhanças reprodutivas com os anuros, Miranda et al. (2005) verificaram incremento no volume seminal em *Odontesthes bonariensis*, ao comparar diversos indutores reprodutivos. O incremento em volume foi de 16,7 vezes com hCG em relação ao controle, resultado superior aos demais indutores utilizados, como a hipófise desidratada de carpa (13,5x); hipófise de salmão (12,8x); GnRHa de salmão (16,7x) e GnRHa de mamíferos (10,8x).

Em espécies como o bagre africano (*Clarias gariepinus*), a indução de machos não provocou diferença significativa no volume seminal (YASUI et al., 2007), possivelmente em função do indutor utilizado (hipófise de carpa), pois outros são mais eficientes para essa espécie (VIVEIROS et al., 2003), demonstrando tendência espécie-específica dos hormônios.

O uso de implantes de GnRHa aumentou o volume seminal em linguados (*Rhombosolea tapirina*) (LIM et al., 2004) e técnicas semelhantes de implantes mostraram incremento na produção espermática em peixes do gênero *Morone* com máximo de 15 mL/kg após dois dias, ao passo que no controle os valores oscilaram entre 2 a 3 mL/kg (MYLONAS e ZOHAR, 2001).

A aplicação de hCG (2000 UI/kg) em *Pangasius bocourti* 12 horas após a aplicação, observou-se um incremento de treze vezes o volume seminal (CACOT et al., 2003). Esses autores observaram que o uso de GnRH associado a domperidona, implicou em menor produção espermática.

O salmão do Atlântico e a truta arco-íris tiveram produção seminal em intervalos semanais e volume final de  $136,7 \pm 59,2$  mL para o salmão do Atlântico e  $22,9 \pm 14,5$  mL para trutas. Em ambos os casos, a produção decresceu na produção com tempo (GJERD, 1984).

Com referência ao período de coleta, Christ et al. (1996) observaram que Parâmetros seminais como a concentração e volume de sêmen mostraram

variação sazonal, mas a osmolaridade do plasma seminal e a qualidade dos movimentos espermáticos e a linearidade foi pouco afetada. Em geral, a qualidade de espermática é aumenta nas estações reprodutivas, com o desenvolvimento gonadal.

### 5.3. EXPERIMENTO 3: Toxicidade dos crioprotetores internos, congelamento e descongelamento

#### 5.3.1. Aspectos *in natura* do sêmen de rã-touro

O peso total e comprimento total, comprimento rostro cloacal, volume, motilidade subjetiva vigor e osmolaridade seminal de onze machos de rã-touro obtidos estão descritos na tabela 8. A motilidade do sêmen *in natura* em *Crinia georgiana* foi de 80%, com tempo de motilidade total de 120 min (HETTYEY e ROBERTS, 2007).

TABELA 8. Peso corporal, comprimento total, comprimento rostro cloacal, volume seminal, motilidade subjetiva, vigor e osmolaridade do sêmen de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) antes da submissão aos tratamentos com crioprotetores

Animais	Peso Total (g)	Comp. Total (cm)	Comp. Rostro Cloacal (cm)	Volume (ml)	Motilidade Subjetiva (%)	Vigor (0-5)	Osmolaridade mOsmol/kg
01	303,3	30,5	13,0	1,7	86,7	3,7	116,7
02	330,5	31,5	13,1	1,3	80,0	4,0	97,0
03	334,6	32,0	13,4	3,8	95,0	4,0	61,0
04	375,7	32,0	17,5	1,3	95,0	4,2	92,0
05	390,7	32,0	15,0	1,7	85,0	3,5	71,7
06	402,1	32,0	14,2	1,7	100,0	5,0	101,7
07	407,2	32,0	13,8	2,9	95,0	4,0	72,3
08	409,4	32,5	14,1	0,9	95,0	4,0	52,7
09	424,9	34,0	15,4	1,4	90,0	4,1	77,7
10	433,0	33,0	14,3	2,0	85,0	4,3	63,3
11	470,9	35,0	14,0	1,4	90,0	4,0	79,0
<b>Média</b>	<b>389,3</b>	<b>32,4</b>	<b>14,4</b>	<b>1,8</b>	<b>90,6</b>	<b>4,1</b>	<b>80,5</b>
<b>DP*</b>	<b>49,8</b>	<b>1,2</b>	<b>1,3</b>	<b>0,8</b>	<b>6,0</b>	<b>0,4</b>	<b>19,4</b>

\*Desvio Padrão da média

### 5.3.2. Toxicidade dos crioprotetores

A toxicidade dos crioprotetores internos DMSO e metanol, isoladamente, não apresentaram interação entre os parâmetros observados e a concentração dos mesmos. No entanto, entre os crioprotetores, a motilidade teve variação de  $89,0 \pm 3,0\%$  para o DMSO e  $92,1 \pm 8,0\%$  para o metanol sem diferença ao nível de ( $P>0,05$ ), enquanto o vigor, com de  $3,6 \pm 0,5$  e  $4,2 \pm 0,1$ , para o DMSO e o metanol, diferiu ao nível de ( $P<0,05$ ) de acordo com o tipo de crioprotetor. O tempo de motilidade de esperma de rã-touro variou de  $252 \pm 23$ s para o DMSO e  $287 \pm 10$ s para o metanol, com diferença entre os crioprotetores (Tabela 9).

TABELA 9. Motilidade, vigor e duração do tempo de motilidade pré-congelamento de rã-touro com diferentes concentrações de DMSO e Metanol

Crioprotetor	Parâmetro Avaliado	Dose				Média	P	CV (%)
		1,0	2,5	5,0	7,5			
DMSO	Motilidade <sup>1</sup>	92,5	90,0	85,0	88,3	89,0	$> 0,2092$	10,61
	Vigor <sup>2</sup>	4,2	3,3	3,2	3,5	3,6 A	$= 0,0387$	-
	Tempo <sup>3</sup>	280	257	226	244	252 a	$= 0,0009$	6,59
Metanol	Motilidade <sup>1</sup>	97,5	92,5	80,8	97,5	92,1	$> 0,2092$	10,61
	Vigor <sup>2</sup>	4,3	4,3	4,2	4,0	4,2 B	$= 0,0387$	-
	Tempo <sup>3</sup>	300	285	277	287	287 b	$= 0,0009$	6,59

<sup>1</sup> Não significativo ao teste F ( $P>0,05$ )

<sup>2</sup> Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P<0,05$ )

<sup>3</sup> Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste F ( $P<0,05$ )

Os crioprotetores associados aos diluidores mostraram efeito ( $P<0,05$ ) na motilidade e nas concentrações de lactose a 1% e BTS a 5% combinados com metanol a 1%. Também houve efeito ( $P<0,05$ ) das concentrações de DMSO e metanol a 2,5% também mostraram efeito com os diluidores externos (Tabela 10).

TABELA 10. Influência das concentrações de DMSO e metanol associados à BTS 5% (m:v) e lactose 1%(m:v) sobre a motilidade pré-congelamento<sup>1</sup>

Crioprotetor interno	Crioprotetor externo	Dose de crioprotetor interno <sup>1</sup>				Média
		1,0	2,5	5,0	7,5	
DMSO	BTS 5%	48,6	45,7 <sup>b</sup>	50,0	42,9	46,8
	Lactose 1%	50,0	75,0 <sup>a</sup>	50,0	40,0	53,8
	Média	49,3	60,4	50,0	41,4	
Metanol	BTS 5%	48,3 <sup>b</sup>	48,3 <sup>b</sup>	43,3	43,3	45,8
	Lactose 1%	65,0 <sup>a</sup>	65,0 <sup>a</sup>	45,0	45,0	55
	Média	56,7	56,7	44,2	44,2	
CV (%)		22,8				

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras diferentes por coluna diferem pelo teste F (P<0,05)

Não houve efeito das concentrações de crioprotetores associados ao BTS e a lactose sobre o vigor espermático como demonstrados na tabela 11 (P>0,05).

TABELA 11. Influência das concentrações de DMSO e metanol associados à BTS 5% (m:v) e lactose 1%(m:v) sobre o vigor pré-congelamento<sup>1</sup>

Crioprotetor externo	Crioprotetor interno	Dose de crioprotetor interno				Média
		1,0	2,5	5,0	7,5	
DMSO	BTS 5%	2,43	1,86	2,29	2,00	2,14
	Lactose 1%	2,22	2,67	1,89	1,89	2,17
	Média	2,33	2,26	2,09	1,94	
Metanol	BTS 5%	1,86	1,86	1,71	2,29	1,93
	Lactose 1%	2,44	2,44	2,22	2,00	2,28
	Média	2,15	2,15	1,97	2,14	
P =		0,6963				

<sup>1</sup> Não significativo ao teste de qui-quadrado (P>0,05)

A motilidade espermática pós congelamento não recuperou, possivelmente, pela concentração das soluções ou o tipo de compostos utilizados. Estes podem ter danificado as células espermáticas ou pelo nível de concentração alta do crioprotetor, no tratamento de maior percentual, pela maior presença de água nos níveis de concentrações inferiores ou pela pouca afinidade entre os crioprotetores externos com as células espermáticas, o que causaria a formação de cristais de gelo durante o congelamento e desestabilização da membrana plasmática. Browne et al. (1998) utilizando diluidores, afirmam que não houve recuperação da motilidade após congelamento no sêmen submetido a 10%(w:v) de sucrose embora sem danos morfológicos às células espermáticas. O mesmo autor, utilizando *Bufo marinus*, mostrou haver recuperação da motilidade no sêmen submetido aos tratamentos com glicerol (20%) e dimetilsulfóxido (20%) onde as taxas de motilidade pós-descongelamento foram relativamente altas ( $68,9 \pm 3,8$  e  $58 \pm 5,9\%$ ). A motilidade pré-congelamento atingiu valores acima dos 70% para tratamentos de dimetilsulfóxido e glicerol (10, 15 e 20%).

Nos anuros como *Rana sylvatica*, *Rana pipiens* e *Bufo americanus* a associação do dimetilsulfóxido e metanol com o diluidor e o crioprotetor externo, no tocante ao congelamento e descongelamento não foram eficazes, isto possivelmente devido à concentração, que pode ter sido subestimada, causando boa taxa de motilidade pré-congelamento e lise celular pós-descongelamento. As causas de motilidade zero pós-descongelamento pode ser devido às crioinjúrias, formação de cristais de gelo pela quantidade maior de água no meio. Quatro crioprotetores (soluções de 0,5M de dimetilsulfóxido, metanol, glicerol e etilenoglicol) e dois diluidores suplementares (soro bovino fetal e glutaciona), mostraram que o dimetilsulfóxido promove maior proteção às células espermáticas e resultados semelhantes aos demais crioprotetores. A associação de crioprotetores e diluidores é mais eficaz para a concentração espermática, viabilidade celular e recuperação da motilidade dos espermatozoides pós-descongelamento. A associação do dimetilsulfóxido e do soro bovino fetal é recomendada para a criopreservação e seria eficaz quando comparada ao metanol, etilenoglicol e glicerol, suplementados com o soro bovino sérico ou glutaciona (BEESLEY et al., 1998).

Em *Bufo marinus* o percentual de motilidade relativa do sêmen com os diluidores sucrose (10%, w:v), solução de Ringer e solução de Ringer mais 10% de gema de ovo e com os crioprotetores metanol, glicerol e dimetilsulfóxido em concentrações de 10, 15 e 20%, mostraram altas taxas relativas de recuperação da motilidade no tratamento com sucrose (10% w:v) ( $40,3 \pm 2,3\%$ ), seguidas de solução de Ringer e 10% de gema de ovo ( $32,0 \pm 1,9\%$ ) e solução de Ringer ( $13,7 \pm 1,2\%$ ). Os tratamentos com os crioprotetores solúveis mostraram alta taxa de recuperação da motilidade em dimetilsulfóxido ( $37,2 \pm 2,0\%$ ), seguidos do glicerol ( $29,8 \pm 1,9\%$ ) e do metanol ( $19,7 \pm 2,1\%$ ). Comparações entre crioprotetores mostraram declínio da recuperação da motilidade com a redução da mesma, com taxas de  $35,2 \pm 2,3\%$ ,  $31,3 \pm 2,0\%$  e  $19,5 \pm 1,6\%$  para 20, 15 e 10%, respectivamente (BROWNE et al., 2002).

A associação de diluidores aos crioprotetores mostrou bons resultados na recuperação de motilidade espermática em alguns tratamentos com *Bufo marinus*. A sucrose com 15% de dimetilsulfóxido e 20% de glicerol forneceu maior taxa de motilidade, enquanto aqueles com 15% de metanol e 10% de glicerol foram mais baixos. O tratamento de 15% de dimetilsulfóxido teve resultados mais satisfatórios que os demais na mesma concentração. A solução de Ringer e 10% de gema de ovo e a composta por 20% (v:v) de metanol teve maior taxa de recuperação da motilidade pós-descongelamento (BROWNE et al., 2002). A taxa de recuperação da motilidade foi menor com solução de Ringer e mais alta com a diluição de 15% (v:v) de dimetilsulfóxido e menores com o metanol em todas as concentrações (< 5%).

O soro bovino fetal ou associado ao dimetilsulfóxido, glicerol e sucrose mostrou maiores percentuais de motilidade próximos a 20% após o congelamento, embora o número de células vivas tenham sido superiores a 50% em *Eleutherodactylus coqui* segundo Michael e Jones (2004). A motilidade espermática de *Xenopus laevis* observados por Hollinger e Corton (1980) foram inferiores a 40%, resultado semelhante ao observado em mamíferos e aves por Christensen et al. (2004).

O comportamento pré-congelamento do sêmen de *Salvelinus alpinus* em concentrações diferentes de diluentes e crioprotetores, não mostrou diferença na variação da motilidade entre tratamentos com glicose e um diluente adaptado composto por 0,137M de NaCl; 0,011M de KCl; 0,004M de

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 7,5 g/L de L- $\alpha$ -lecitina. Os crioprotetores analisados a dimetilacetamida mostraram maior taxa de motilidade após ativação e não diferiu do dimetilsulfóxido. O glicerol teve baixa taxa de motilidade após a ativação (RICHARDSON et al., 2000).

A motilidade do espermatozóide do sêmen de *Pseudopleuronectes americanus* foi obtida em todos os tratamentos com interação entre os crioprotetores e os diluentes. A sucrose e o propilenoglicol forneceram maior taxa de motilidade com resultados inferiores que esse crioprotetor adicionado a solução salina e o dimetilsulfóxido associado à sucrose. Os crioprotetores mostraram diferenças sobre a motilidade, sendo que o propilenoglicol mais efetivo, seguido do dimetilsulfóxido e do glicerol, resultados semelhantes para os diluentes foram encontrados (RIDEOUT et al., 2003).

A motilidade e a taxa de sobrevivência dos espermatozóides de *Urechis uinicinctus* foram maiores com 15% (v:v) de dimetilsulfóxido, seguido pelo glicerol a 10% (v:v) segundo Ho Kang et al. (2004). O sêmen de *Tor khudree* submetidos a quatro soluções diluidoras com 10% de dimetilsulfóxido, metanol e propilenoglicol, mostrou variação na motilidade espermática pré-congelamento de  $41,67 \pm 1,67\%$  (metanol + solução 4) a  $96,67 \pm 1,67$  (propilenoglicol + solução 3) e de 0 (metanol + solução 2, 3 e 4; dimetilsulfóxido + solução 1 e 3) a  $53,33 \pm 3,33\%$  (dimetilsulfóxido + solução 2) (BASAVARAJA e HEDGE, 2004).

Cinco crioprotetores com solução de Cortland em concentrações de 6% a 20% mostraram taxa de motilidade de *Pagrus major* após o congelamento de  $36,5 \pm 4,7\%$  para soluções contendo 6% de dimetilacetamida e de  $88,6 \pm 8,0\%$  para aqueles com 15% de dimetilsulfóxido (LIU et al., 2006).

A motilidade espermática do sêmen de curimba foi de  $72 \pm 19,41\%$  a  $89 \pm 13,07\%$  antes, e de  $50 \pm 25,30\%$  a  $74 \pm 16,59\%$  após o congelamento, com concentrações fixas de 10% de dimetilsulfóxido e metanol e 4,5% de BTS, variando somente concentrações de KCl (MURGAS et al., 2007).

No pós-descongelamento a motilidade foi de 0% em todos os tratamentos e o vigor também foi 0 isso pode ser devido a fatores intrínsecos a metodologia de extração de um sêmen com menor nível de contaminação com urina ou problemas durante o congelamento como já foi citado acima. Os crioprotetores, segundo Bedore (1999), são espécie-específicos, e a seleção



de qual solução utilizar inicialmente para uma espécie deve ser realizada por tentativa e erro variando a solução interna e externa, em concentração e tipo de crioprotetor (HOLT, 2000). Para exemplificar a diferença interespecífica Carosfeld et al. (2003b) utilizaram DMSO sob as concentrações de 10% e 5% e constataram que ao descongelarem sêmen de várias espécies tais diluições eram adequadas, já para o surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) tiveram um resultado não efetivo. Muitos compostos têm eficácia testada como, crioprotetores do sêmen, porém o glicerol pode ser utilizado como meio crioprotetor, e o dimetilsulfóxido (DMSO) é ainda, mais eficaz para muitas espécies (HOLT, 2000).

Os protocolos de congelamento são responsáveis por um número em potencial de danos às células espermáticas por estresse. Além disso, a mudança brusca de temperatura e o estresse tóxico apresentado pela exposição a concentrações molares de crioprotetores são os principais causadores de injúrias, seguidos da formação de cristais de gelo no ambiente extracelular (WATSON, 2000).

O espermatozóide quando envolvido em mudanças de temperatura, principal foco da criopreservação, apresenta modificação do conteúdo lipídico da membrana celular para adaptar-se às condições do ambiente em que se encontram (HOLT, 2000).

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Dentre os indutores testados o análogo de GnRH $\alpha$  (acetato de gonadorelina) é o mais recomendado para a obtenção de sêmen de rês-touro até a décima hora após aplicação. Quanto ao grau de toxicidade dos crioprotetores pré-congelamento, todos podem ser utilizado para diluição, porém não são eficazes pós-descongelamento.

Faz-se necessário a realização de mais pesquisas para a extração, diluição e crioproteção de sêmen extraído *in vivo*. As pesquisas realizadas com reprodução artificial de anuros devem focar na extração de sêmen sem a presença de urina ou em protocolos de purificação do mesmo após extração.

Testes de toxicidade sobre os gametas de crioprotetores internos, externos e diluidores, antes da criopreservação são necessários para melhorar

a aplicabilidade destes procedimentos sobre o sêmen de espécies de anuros em extinção e a produção de alimentos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, A. M. **Efeito do acetato de buserelina na indução à reprodução da rã-touro americana (*Rana catesbeiana*, SHAW, 1802), naturalmente portadora de micobacteriose.** 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense. 2004.

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

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

AGOSTINHO, C. A.; NICTHEROY, P. E. Ensaio sobre a utilização de hormônio LHRHa na reprodução de rã-touro (*Rana catesbeiana*). In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 33., 1996, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: SBZ, p. 430-431, 1996.

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

ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.

ARAI, K. Chromosome manipulation in aquaculture: recent progress and perspective. **Suisanzoshoku,** v. 48, n. 2, p.295-303, 2000.

ARAI, K.; MATSUBARA, K.; SUZUKI, R. Production of polyploids and viable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. **Aquaculture,** v. 117, p.227-235, 1993.

BALDISSEROTTO, B. Reprodução. In: **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura.** Cap. 5. 1 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2002.

BASAVARAJA, N.; HEGDE, S. N. Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudreee*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. **Cryobiology**, v. 49, p. 149-156. 2004.

BEDORE, A. G. **Características da criopreservação do sêmen de pacu-caranha (*Piaractus mesopotamicus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)**. 1999. 53f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1999.

BERNARDINI, G.; ANDRIETTI, F.; CAMANTINI, M.; COSSON, M. P. *Xenopus* spermatozoon: correlation between shape and motility. **Gamete Research**, v. 20, p. 165-175, 1988.

BEESELEY, S. G.; CONSTANZO, J. P.; LEE JR, E. R. Cryopreservation of spermatozoa from freeze-tolerant and intolerant anurans. **Cryobiology**, v.37, p.155–162, 1998.

BILLARD, R. Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. **Cell Tissue Research**, v. 228, n. 2, p. 205-218, 1983.

BILLARD, R.; COSSON, M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 261, n. 2, p. 122-131, 1992.

BILLARD, R.; ZHANG, T. Techniques of genetic resource banking in fish. In: **Cryobanking the genetic resource – wildlife conservation for the future**. Taylor and Francis Publications, Eds. Watson, P. F. & Holt, W. V., 2001, ch. 9. p.143-170.

BRAGA, L. G. T.; OLIVEIRA, M. G. A.; LIMA, W. C. Atividade da amilase em rã-touro durante a fase pós-metamórfica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 947-951, 2005.

BRIGGS, R. An analysis of the inactivation of the frog sperm nucleus by toluidine blue. **Journal of Genetics Physiology**, v. 35, n. 5, p. 761-780, 1952.

BROWNE, R. K.; CLULOW, J.; MAHONY, M.; CLARK, A. Successful recovery of motility and fertility of cryopreserved cane toad (*Bufo marinus*) sperm. **Cryobiology**, v. 37, p. 339–345, 1998.

BROWNE, R. K.; CLULOW, J.; MAHONY, M. Short-term storage of cane toad (*Bufo marinus*) gametes. **Reproduction**, v. 121, p. 167-173, 2001.

BROWNE, R. K.; MAHONY, M.; CLULOW, J. A comparison of sucrose, saline, and saline with egg-yolk diluents on the cryopreservation of cane toad (*Bufo marinus*) sperm. **Cryobiology**, v. 44, p. 251-257, 2002.

BROWNE, R. K. SERATT, J.; VANCE C.; KOUBA A. Hormonal priming, induction of ovulation and in-vitro fertilization of the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 34, 2006.

BUCHHOLZ D. R.; FU L.; SHI Y. Cryopreservation of *Xenopus* transgenic lines. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, p. 65-69, 2004.

BUGRIM, A. FONTANILLA R. B; EUTENIER B. B.; KEIZER J.; NUCCITELLI R. Sperm initiate a  $Ca^{2+}$  wave in frog eggs that is more similar to  $Ca^{2+}$  waves initiated by IP3 than by  $Ca^{2+}$ . **Biophysical Journal**, v. 84, p.1580–1590, 2003.

CACOT, P.; EECKHOUTTE, P.; MUON, D.T.; TRIEU, N. V.; LEGENDRE, M.; MARIOJOULS, C.; LAZARD, J. Induced spermiation and milt management in *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880). **Aquaculture**, v. 215, p. 67-77, 2003.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B. Conservação de recursos energéticos de peixes: teoria e prática. **Curso de treinamento Brasileiro**. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust, 1999.

CHEREGUINI, O., GARCIA De La BANDA, I., HERRERA, M., MARTINEZ C. e De La HERA M. Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 739-747, 2003.

CHRIST, A. TOTH, G. P.; McCARTHY, H. W.; TORSELLA, J. A.; SMITH, M. K. Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Fish Biology**, v. 48, n. 6, p. 1210–1222, 1996.

CHRISTENSEN, P.; STENVANG, J. P.; GODFREY, J. P. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen, **Journal of Andrology**, v. 25, n. 2, p. 255–264, 2004.

COSTA, C. L. S. **Desenvolvimento do aparelho reprodutor e fatores associados ao ciclo reprodutivo da rã-touro no sistema anfigranja**. 1992. 97f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1992.

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, n. 4, p. 651-657, 1998.

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

CULLEY JR, D. D. Use of bullfrogs in biological research. **American Zoologist**, v. 13: p. 85-90, 1973.

DICKSON, W. M. Glândulas Endócrinas. In: SWENSSON, M. J; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 856p., cap. 34, p. 571-602, 1996.

DREANNO, C.; SUQUET, M.; DESBRUYERES, E.; COSSON, J.; LE DELLION, H.; BILLARD, R. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). **Aquaculture**, v. 169, p.247-162, 1998.

DREANNO C.; SUQUET M.; QUEMENER L.; COSSON J.; FIERVILLE, F.; NORMANT Y.; BILLARD R. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. **Theriogenology**. v. 48, p. 589-603, 1997.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of the amphibians**. The John Hopkins University Press, p. 670, 1994.

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

EDWARDS, D. L.; MAHONY M. J.; CLULOW J. Effect of sperm concentration, medium osmolality and oocyte storage on fertilisation success in a myobatrachid frog (*Limnodynastes tasmaniensis*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 347-354, 2004.

FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C.; PAIVA NETO, J. S. Introdução à ranicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo: Instituto de Pesca, v. 33, p. 1-15, 2002.

FERREIRA, D.F., **Sisvar** versão 5.0 Lavras: DEX/UFLA, 2004. 32p.

FLORES-NAVA, A. Bullfrog *Rana catesbeiana* farming in Latin America: An overview. **World Aquaculture**, v. 5, p. 23-28, 2000.

GJERD, B. Variation in sêmen production of farmed atlantic salmon and rainbow trout. **Aquaculture Research**, v. 40, p.109-114, 1984.

GLAHN, D.; NUCCITELLI, R. Voltage-clamp study of the activation currents and fast block to polyspermy in the egg of *Xenopus laevis*, **Development Growth Differentiation**, v. 45, p. 187–197, 2003.

GLOGOWSKI, J.; KWASNIK, M.; PIROS, B.; DABROWSKI, K.; GORYCZKO, K.; DOBOSZ, S.; KUZMINSKI, H.; CIERESZKO, A. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 3, p. 289-296, 2000.

GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 203, p. 16-20, 2003.

GWO J.C.,STREWN, K.,LONGNECKER, M.T.; ARNOLD, C.R. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. **Aquaculture**, v. 94, p. 355-375, 1991.

GWO J. C., cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. **Theriogonology**, v. 39, p. 1331-1342, 1993.

HARDY, M. P. e DENT, J. N. Regulation of motility in sperm of the red-spotted newt. **Journal of Experimental Zoology**, v. 240, n. 3, p. 240-385, 1986.

HARVEY, B. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. **Aquaculture**, v. 32, p. 313-320, 1983.

HETTYEY, A.; ROBERTS, J. D. Sperm traits in the quacking frog (*Crinia georgiana*), a species with plastic alternative mating tactics. **Behaviour Ecology and Sociobiology**, v. 61, p. 1303-1310, 2007.

HETTYEY, A.; ROBERTS, J. D. Sperm traits in the quacking frog (*Crinia georgiana*): intra- and interpopulation variation in a species with a high risk of sperm competition. **Behaviour Ecology and Sociobiology**, v. 59, p. 389-396, 2006.

HO KANG, K.; YU SHAO, M.; HEE KHO, K.; ZHANG, Z. F. Short-term storage and cryopreservation of *Urechis unicinctus* (Echiura: Urechidae) sperm. **Aquaculture Research**. v. 35. p. 1195-1201, 2004.

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

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47-58, 2000.

HORVÁTH, A.; MISKOLCZI, E.; URBÁNYI, B. Cryopreservation of common carp sperm. **Aquatic Living Resources**, v. 16, p. 457-460, 2003.

INODA, T. e MORISAWA, M. Effect of osmolality on the initiation of sperm motility in *Xenopus laevis*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 88a, n. 3, p. 539-542, 1987.

JUNCÁ, F. A.; Declínio mundial das populações de anfíbios, **Sitientibus Série Ciências Biológicas 1**, v. 1, p. 84-87, 2001.

KOBAYASHI, T.; FUSHIKI, S.; UENO, K. Improvement of sperm motility of sex-reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high-pH artificial seminal plasma. **Environmental Biology of Fishes**. v. 69, n. 1-4, p. 419-425, 2004.



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

KOUBA A.J.; WILLIS E.L.; VANCE C.K. Artificial fertilization for amphibian conservation: current knowledge and future considerations. **Theriogenology**, v. 71, p. 214–227, 2009.

KUROKURA, H. HIRANO, R.; TOMITA, M.; IWAHASHI, M. Cryopreservation of carp sperm. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 3, p. 245-258, 1984.

LAHNSTEINER, F. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 245-258, 2000.

LANHESTEINER, F. BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. Sperm structure and motility of the freshwater teleost *Cottus gobio*. **Journal of Fish Biology**, v. 50, n. 3, p. 564-574, 1997.

LEUNG, L. K. P. Cryopreservation of spermatozoa of barramundi. *Lates calcarifer* (Teleostei: Centropomidae). **Aquaculture**, v. 64. p. 243-247, 1987.

LIM, H. K.; PANKHURST, N. W.; FITZGIBBON, Q. P.. Effects of slow release gonadotropin releasing hormone analog on milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder, *Rhombosolea tapirina*. **Aquaculture Research**, v. 240, n. 1-4, p. 505-516, 2004.

LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. **A criação de rãs**. Rio de Janeiro: Ed. Globo (Coleção do Agricultor). 187p., 1988.

LIMA, S. L.; CASALI, A. P.; AGOSTINHO, C. A. Performance of bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) raised in the "amphifarm" system and feeding tables. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 32, n. 3, p. 512-518, 2003.

LIMORI, E.; D'OCCHIO, M. J.; LISLE, A. T.; JOHNSTON, S. D. Testosterone secretion and pharmacological spermatozoal recovery in the cane toad (*Bufo marinus*). **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 163-173, 2005.

LINHART, O.; RODINA, M.; FLAJSHANS, M.; GELA, D.; KOCOUR, M. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability, and hatching success of embryos. **Cryobiology**, v. 51, n. 3, p. 250-261, 2005.

LINHART, O.; WALFORD, J.; SIVALOGANATHAN, B.; LAM, T. J. Effects of osmolality and ions on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater- and seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Fish Biology**, v. 55, n. 6, p. 1344-1358, 1999.

LIPKE, C.; MEINECKE-TILLMANN, S.; MEYER, W.; MEINECKE, B. Preparation and ultrastructure of spermatozoa from Green Poison Frogs, *Dendrobates auratus*, following hormonal induced spermiation (Amphibia, Anura, Dendrobatidae) **Animal Reproduction Science**. 2008. Doi: 10.1016/j.anirepsosci.2008.06.005

LIU, Q.; LI, J.; ZHANG, S.; DING, F.; XU, X.; XIAO, Z.; XU, S. An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red seabream, *Pagrus major*, with 2-mL cryovials. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, n. 3, p. 289-297, 2006.

LOFTS, B. Reproduction. In: **Physiology of the amphibia**. New York : Academic Press, 1974. 3v. V. 2, cap. 3, p. 107-218.

MAISSE, G.; PINSON, A.; LOIR, M. Caractérisation de l'aptitude à la congélation du sperme de truite arc en ciel (*Salmo gairdneri*) par des critères physico-chimiques. **Aquatic Living Resources**, v. 1, p. 45-51, 1998.

MANSOUR, N.; LAHNSTEINER, F.; BERGER, B. Characterization of the testicular semen of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), and its short-term storage. **Aquaculture Research**, v. 35, p. 232-244, 2004.

MARTÍNEZ, I. P.; REAL, M.; ALVAREZ, R. Growth of *Rana perezii* Seoane, 1885 froglets fed on diets with different nutrient compositions. **Aquaculture**, v. 241, p. 387-394, 2004.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v. 247, p. 125-142, 1984.

MICHAEL, S. F.; JONES, C. Cryopreservation of spermatozoa of the terrestrial Puerto Rican frog, *Eleutherodactylus coqui*. **Cryobiology**, v. 48, p. 90-94, 2004.

MILIORINI, A. B. **Ativadores e concentrações de Metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*)**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2006.

MILIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; PEREIRA, G. J. M. Taxas de fertilização do sêmen de Curimba (*Prochilodus Lineatus*) após Congelamento. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. 16, 2005, Goiânia, GO. **Resumos...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005.

MIRANDA L. A.; CASSARA M. C.; SOMOZA, G. M. Increase of milt production by hormonal treatment in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture Research**, v.36, p. 473-479, 2005.

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

MURGAS, L. D. S.; MILIORINI, A. B.; FREITAS, R. T. F.; PEREIRA, G. J. M. Criopreservação do sêmen de curimba (*Prochilodus lineatus*) mediante adição de diferentes diluidores, ativadores e crioprotetores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 526-531, 2007.

MURGAS, L. D. S.; GUALHANONE, A.; SILVA, M. O. B.; MELLO, C. B.; FREITAS, R. T. F.; ZANGERÔNIMO, M. G. Calidad seminal del pez piraicanjuba (*Brycon orbignyanus*) post-descongelación. **Revista Anales de Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 3-10. 2001a.

MYLONAS, C. C.; ZOHAR, Y. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. **Aquaculture**, v. 202, p. 205-220, 2001.

OLVERA-NOVOA, M. A.; ONTIVEROS-ESCUZIA, V. M.; FLORES-NAVA, A. Optimum protein level for growth in juvenile bullfrog (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802), **Aquaculture**, 2007, v. 266, p. 191-199.

OHTA, H. ; IZAWA, T. Diluent for cool storage of the Japanese. eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. **Aquaculture**, v. 142, p.107–118, 1996.

PERCHEC-POUPARD, G.; PAXION, C.; COSSON, J.; JEULIN, C.; ANDRÉ, F.; BILLARD, R. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. **Aquaculture**, v. 160, p. 317-328, 1998.

PEREIRA, L. V.; CALADO, L. L.; DEMEU, F. A. ; BRHUN, F. R. P. ; PEREIRA, G. J. M. ; MELLO, R. A. ; ROCHA, C. M. B. Utilização de identificação em adultos de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) por meio de *tagfix*. In: X Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos. 10, 2008, Búzios, Rio de Janeiro. **Anais...** Búzios: ENBRAPOA, p. 350, 2008.

PILLAI, M. C.; YANAGIMACHI, R.; CHERR, G. N. *In vivo* and *in vitro* initiation of sperm motility using fresh and cryopreserved gametes from Pacific herring. *Clupea pallasii*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 269, p. 62-68, 1994.

POLGE, C.; SMITH, A.; PARKES, A., Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, p. 164-166, 1949.

POUGH, F.H; JANIS, C.H.; HEISER, J.B. **Vida dos Vertebrados**. 3. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 699 p. 2003.

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

REEDER, W. G. The digestive sistem. In: **Physiology of the Amphibia**. New York: Academic Press. 654 p., 1964.

REINHART, D.; RIDGWAY, J; CHANDLER. D. E. *Xenopus laevis* fertilisation: analysis of sperm motility in egg jelly using video light microscopy. **Zygote**, v. 6, n. 2, p. 173-182, 1998.

REYER, H.; NIEDERER, B.; HETTYEY, A. Variation in fertilisation abilities between hemiclinal hybrid and sexual parental males of sympatric water frogs (*Rana lessonae*, *R. esculenta*, *R. ridibunda*). **Behaviour Ecology and Sociobiology**, v. 54, p. 274-284, 2003.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo “piauí-açu” *Leporinus macrocephalus*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 75-79, 2003.

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

RIBEIRO FILHO, O. P. **Desempenho e avaliação de carcaça de rã-touro, *Rana Catesbeiana* (SHAW, 1802), criada em cativeiro com diferentes níveis de energia metabolizável na ração.** 1999. 94f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1999.

RIBEIRO FILHO, O. P.; LIMA, S. L.; ANDRADE, D. R.; SEIXAS FILHO, J. T. Reprodução induzida de rã-touro (*Rana catesbeiana*, SHAW, 1802) com o uso de extrato bruto hipofisário. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 2, p. 216-223, 1998a.

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, n. 4, p. 658-663, 1998b.

RICHARD, R. P. Fertilization of frog body-cavity eggs: *Rana pipiens* eggs and *Rana clamitans* sperm. **Biology of Reproduction**, v. 8, p. 362-368, 1973.

RICHARDSON, G. F.; CRIM, L. W.; YAO, Z.; SHORT, C. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen. In: Fifth International Symposium, Reproductive Physiology of Fish. 5, 1995, Austin, TX. **Proceedings...** Ed. By F. W. GOETZ e P. THOMAS. 1995, p. 136.

RICHARDSON, G. F.; MILLER, T. L.; McNIVEN, M. A. Cryopreservation of Artic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 307-315, 2000.

RIDEOUT, R. M.; LITVAK, M. K.; TRIPPEL, E. A. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 653-659, 2003.

ROBLES, V. M. M.; SANTAMARIA, Y. M. V.; CRUZ CAZALLAS, P. E. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuárias**, v. 18, n. 1, p. 34-48, 2005.

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, p. 559-566, 2006.

RUGH, R. Culturing of amphibian embryos. In: **Experimental Embryology: Techniques and Procedures**. pp 50–51, Ed. R Rugh. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1962.

RURANGWA, E; KIME D. E.; OLLEVIER, F; NASH, J. P. Measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. **Aquaculture Research**, v. 234, p. 1-28, 2004.

SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. **Journal of Fish Biology**. v. 17, p. 707-739, 1980.

SHIMODA, E. **Análise e criopreservação do sêmen de piabanha, *Brycon insignis***. 2004. 112f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2004.

SHIMODA, E. Determinação da razão ótima de espermatozoides por ovócitos de piabanha *Brycon insignis* (pisces - characidae). **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 877-882, 2007.

SHIVERS, C. A.; JUDITH, M. J. Fertilization of antiserum-inhibited frog eggs with “capacitated” sperm. **Biology of Reproduction**, v. 5, p. 229-235. 1971.

SIMEONE, F. P. **Cryopreservation manual**. New York: Nalge Nunc International Corporation, 8 p., 1998.

SOMSUEB, P.; BOONYARATPALIN, M. Optimum protein and energy levels for the Thai native frog, *Rana rugulosa* Weigmann. **Aquaculture Research**, v. 32, (Suppl. 1), p. 33-38, 2001.

SOUZA, F.F., LOPES, M.D., BARRETO, S. Avaliação da integridade estrutural e funcional da membrana de espermatozoides de cães utilizando o teste hiposmótico e a coloração com sonda fluorescente. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 462-464, 2001.

SUQUET, W.; DREANNO, C.; FAUVEL, C.; COSSON, J.; BILLARD, R. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 231-243, 2000.

TSAI, P.; LUNDEN J. B; JONES J. T. Effects of steroid hormones on spermatogenesis and GnRH release in male Leopard frogs, *Rana pipiens*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 134, p. 330-338, 2003.

TYNING, T. F. **A guide to amphibians and reptiles (Stokes Nature Guides)**. New York: Little, Brown and Company, 400 p. 1990.

VIDAL JR., M. V.; YASUI, G. S.; AOKI, P. C. M.; COSTA, A. P. R.; SHIMODA, E.; ANDRADE, D. R. Características seminais do *Labeo frenatus* (*Epalzeorhynchus frenatus*), submetidos à hipofiseção. In: XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, Goiânia-GO. 12, 2002, Goiânia, GO. **Resumos...** Goiânia: SIMBRAQ, p. 327, 2002.

VIVEIROS, A. T. M.; JATZKOWSKI, A.; KOMEN, J. Effects of oxytocin on semen release response in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**, v. 59, n. 9, p. 1905-1917, 2003.

VIZOTTO, L. D. Aspectos técnicos da ranicultura. In: I Encontro Nacional de Ranicultura, 1, 1979, Brasília, Distrito Federal. **Súmula das atividades...** Brasília: Superintendência do desenvolvimento da pesca. p. 27-60, 1979.

VO, L. H.; HEDRICK, A. J. L. Independent and hetero-oligomeric-dependent sperm binding to egg envelope glycoprotein ZPC in *Xenopus laevis*. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 766-774, 2000.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved sêmen. **Animal Reproduction Science**. v. 60, n. 61, p. 481-492, 2000.

WAGGENER, W. L.; CARROLL, E. J Jr. A method for hormonal induction of sperm release in anurans (eight species) and in vitro fertilization in lepidobatrachus species. **Development Growth Differentiation**, v. 40, n. 1, p. 19-25, 1998.

WARNECKE, D.; PLUTA, H.J. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. **Aquaculture**, v. 215, n. 1, p. 167-185, 2003.

WEWETZER, K. e DILMAGHANI, K. Exposure to Dimethyl Sulfoxide at 37°C prior to freezing significantly improves the recovery of cryopreserved hybridoma cells. **Cryobiology**, v. 43, p. 288-292, 2001.

WITHLER, F. C.; LIM, L. C. Preliminary observations on chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelus tauvina*) sperm. **Aquaculture**, v. 27, p 389-392, 2000.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. D. **A propagação artificial de peixes de água doce**. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 225 p., 1989.

YASUI, G. S, **Variação temporal da motilidade espermática da tilápia do Nilo em amostras refrigeradas e ativadas**. 2007. 51f. Dissertação (Mestrado em produção animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2007.

YOSHIKAWA, H.; MORISHIMA, K.; KUSUDA, S.; YAMAHA, E.; ARAI, K. Diploid sperm produced by artificially sex-reversed clone loaches. **Journal of Experimental Zoology**, v. 307, n. 2, p. 75-83, 2007.

YAO, Z.; CRIM, L. W.; RICHARDSON, G. F; EMERSON, C. J. Cryopreservation motility and ultrastructure of sperm from ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) an internally fertilizing marine teleost. In: Fifth International Symposium, Reproductive Physiology of Fish. 5, 1995, Austin, TX. **Proceedings...** Ed. By F. W. GOETZ e P. THOMAS. 1995, p. 149.

ZANIBONI-FILHO, E. e NUÑER, A. P. O. **Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes**. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce. São Paulo, SP: TecArt, 2004. p.45-73.



## 9.ANEXOS

ANEXO 1	Análise de regressão do efeito de diferentes tempos (horas) no volume de sêmen.....	59
ANEXO 2	Análise de regressão do efeito de diferentes tempos (horas) na concentração espermática (variável transformada em $\log_{10}x$ ).....	59
ANEXO 3	Análise de variância do efeito da dose de crioprotetor sobre a motilidade subjetiva (%) observada nos espermatozóides.....	59
ANEXO 4	Análise de variância para o efeito da dose de crioprotetor sobre vigor espermático (0-5) observado nos espermatozóides.....	59
ANEXO 5	Análise de variância do efeito da adição de diferentes concentrações de soluções crioprotetoras internas em associação com soluções diluidoras externas sobre a motilidade (%) espermática.....	60

## ANEXO 1

Análise de regressão do efeito de diferentes tempos (horas) sobre o volume de sêmen obtido em rã-touro

FV	GL	SQ	QM	Fc	P>F
Tempo	5	11,513617	2,302723	3,364	0,0192
Linear	1	5,413888	5,413888	7,909	0,0100
Quadrática	1	0,407972	0,407972	0,596	0,4480
Cúbica	1	0,698339	0,698339	1,020	0,3230
Erro	24	16,427880	0,684495		

## ANEXO 2

Análise de regressão do efeito de diferentes tempos (horas) sobre a concentração espermática do sêmen de rã-touro (variável transformada em  $\log_{10}X$ )

FV	GL	SQ	QM	Fc	P>F
Tempo	5	1,878570	0,375714	1,482000	0,2325
Erro	24	6,084049	0,253502		

## ANEXO 3

Análise de variância e teste F para o efeito da dose de crioprotetor sobre a motilidade subjetiva (%) observada nos espermatozóides

FV	GL	SQ	QM	Fc	P>F
Crioprotetor	1	0,069263	0,069263	0,069000	0,7947
Dose	3	4,782894	1,594298	1,580000	0,2092
Crio X Dose	3	1,829974	0,609991	0,605000	0,6158
Erro	40	40,356723	1,008918		

## ANEXO 4

Análise de variância e teste F para o efeito da dose de crioprotetor sobre o vigor espermático (0-5) observado nos espermatozóides

FV	GL	SQ	QM	Fc	P>F
Crioprotetor	1	14,992299	14,992299	12,875000	0,0009
Dose	3	9,419652	3,139884	2,696000	0,0587
Crio X Dose	3	1,841421	0,613807	0,527000	0,6662
Erro	40	46,578439	1,164461		

## ANEXO 5

Análise de variância do efeito da adição de diferentes concentrações de soluções crioprotetoras internas em associação com soluções diluidoras externas sobre a motilidade (%) espermática

FV	GL	SQ	QM	Fc	P>F
Crioext	1	25,178967	25,178967	10,0140	0,0020
Criooint	1	0,049423	0,049423	0,0200	0,8888
Conc	3	15,060733	3,368953	1,9970	0,1187
Crioext*Criooint	1	3,368953	3,368953	1,3400	0,2496
Crioext D/ <sup>1</sup> Criooint 1	/1 1	5,063816	5,063816	2,0140	0,1587
Crioext D/ <sup>1</sup> Criooint 2	/2 1	23,484105	23,484105	9,3400	0,0028
Crioext D/ <sup>1</sup> Criooint 1	/1 1	1,488085	1,488085	0,5920	0,4434
Crioext D/ <sup>1</sup> Criooint 2	/2 1	1,930291	1,930291	0,7680	0,3828
Crioext*Conc	3	2,706892	0,902297	0,3590	0,7827
Crioext	/1 1	5,566793	5,566793	2,2140	0,1396
Crioext	/2 1	16,103870	16,103870	6,4050	0,0128
Crioext	/3 1	3,786589	3,786589	1,5060	0,2224
Crioext	/4 1	2,428607	2,428607	0,9660	0,3279
Criooint*Conc	3	5,221376	1,740459	0,6920	0,5586
Conc	/1 3	1,570389	0,523463	0,2080	0,8905
Conc	/2 3	16,197237	5,399079	2,1470	0,0976
Criooint	/1 1	0,334202	0,334202	0,1330	0,7161
Criooint	/2 1	0,038965	0,038965	0,0150	0,9012
Criooint	/3 1	0,618310	0,618310	0,2460	0,6210
Criooint	/4 1	4,279321	4,279321	1,7020	0,1948
Crioext*Criooint*Conc	3	6,620985	2,206995	0,8780	0,4550
erro	110	276,581274	2,514375		

<sup>1</sup> Dentro