



## Importância da indução artificial na reprodução de rãs

*Importance of artificial induction in reproduction of frogs*

M.M. Pereira<sup>1</sup>, O.P. Ribeiro Filho<sup>2</sup>, R.D. Navarro<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Pós-graduação, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Setor de Aquicultura da Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

<sup>4</sup>Correspondência: [navarrounb@gmail.com](mailto:navarrounb@gmail.com)

### Resumo

O aprimoramento do desenvolvimento das técnicas de indução da reprodução de anfíbios anuros vai permitir um aumento da ranicultura mundial, possibilitando, num futuro próximo, a regularidade na produção de rãs. Os conhecimentos da fisiologia da reprodução de anfíbios anuros propiciaram a determinação de manejo adequado que permite a maturação gonadal das rãs em cativeiro, como também gera aumento nos processos de maturação final dos gametas.

**Palavras-chave:** anfíbios, anuros, gametas, hormônios.

### Abstract

*The improvement of the development of techniques to induce breeding of amphibians will allow an increase in frog culture worldwide, enabling the near future regularity in the production of frogs. The knowledge of reproductive physiology of amphibians allowed the determination of appropriate management that allows the gonad maturation of the frogs in captivity, but also causes an increase in the processes of final maturation of gametes.*

**Keywords:** amphibians, anurans, gametes, hormones.

### Introdução

O declínio mundial das populações de anfíbios é observado em diferentes localidades do mundo. As causas são: flutuações naturais das populações (Nyström et al., 2007), mudanças climáticas (Neveu, 2009), aumento da incidência dos raios ultravioleta (Antwis e Browne, 2009) e infecção por fungos ou parasitas (Duffus, 2009), sendo não somente uma causa que determina o fenômeno e sim dois ou mais fatores atuando juntos (Juncá, 2001).

A constante degradação dos ecossistemas naturais é ocasionada pelas ações antrópicas, que implicam alteração ou eliminação completa dos micro-*habitats* específicos explorados por anuros, considerada o principal fator responsável pelo declínio populacional observado em diversas espécies de anfíbios (Young, 2000).

Estudos realizados nas últimas décadas revelaram que a região neotropical abriga a mais rica fauna de anfíbios anuros do mundo (Heyer et al., 1990), sendo a Mata Atlântica o bioma com maior diversidade e taxa de endemismo (Duellman, 1999). Atualmente, esse bioma está ameaçado por grandes concentrações urbanas e, conseqüentemente, estão ameaçadas as populações de anfíbios anuros que lá vivem.

Espécies nativas de rãs não são criadas devido à falta de conhecimento da sua biologia, como fatores relacionados ao seu crescimento (Agostinho et al., 1991), à sua reprodução e alimentação (Lima e Verani, 1988). Segundo os autores, uma solução para repovoamento de espécie em declínio populacional é a sua criação em cativeiro.

A literatura apresenta uma série de informações para permitir a interferência e facilitar o repovoamento das espécies tanto em cativeiro quanto na natureza; dentre elas, uma de grande importância é o conhecimento sobre o sêmen para se usar a criopreservação e assim garantir a existência de gametas para a reprodução e a manutenção de bancos de recursos genéticos de conservação de anfíbios (Kouba e Vance, 2009).

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

A partir do conhecimento da utilização dos hormônios na indução à reprodução de rã-touro (Rugh, 1935), foi possível a coleta do sêmen (Alonso, 1997), a extrusão de ovócitos e a fertilização artificial de rã-touro (Agostinho et al., 2000) e a avaliação da morfologia espermática do sêmen de rã-touro (Pereira et al., 2012a).

A reprodução de sapos, pererecas e rãs é a etapa de maior relevância para programas de repovoamento de anfíbios anuros e para a ranicultura. As pesquisas e a divulgação das informações sobre esse tema são



importantes para atualizar os técnicos e pesquisadores e, com isso, fortalecer a conservação dos anfíbios anuros e a ranicultura. Este trabalho visa abordar a importância da indução artificial na reprodução de rãs.

### **Fatores abióticos influenciando a reprodução de anuros**

As pesquisas com reprodução de rãs têm verificado a influência dos fatores climáticos sobre o número das desovas naturais e enfatizaram a relevância do ambiente na espermiacção (Easley et al., 1979).

A temperatura tem efeitos sobre o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos dos anuros (Figueiredo et al., 2001).

Em regiões tropicais e subtropicais, a temperatura raramente é um fator limitante e a reprodução da maioria das espécies de anuros ocorre em função das chuvas (Salthe e Meham, 1974).

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

Padrões cíclicos estão correlacionados entre si e ajustados a mudanças sazonais, sendo a temperatura o fator mais importante na regulação dos ciclos reprodutivos em rãs (Sasso-Cerri et al., 2004, 2006) e sapos (Roth et al., 2010), mas podem ser citadas ainda: a alimentação (Rodrigues et al., 2007), a luz (Agostinho et al., 2011) e a chuva (Juncá, 2006).

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

Ambiente controlado (luz e temperatura) alterou a concentração de andrógenos circulantes nos machos de uma espécie de anuros, o que foi verificado em diferentes fases do ciclo testicular, embora esses animais possuam potencialmente espermatogênese contínua (Iela et al., 1980).

A atividade gonadotrópica da hipófise, a resposta dos testículos às gonadotrofinas e a resposta de órgãos periféricos alvos do andrógeno não são igualmente sensíveis à temperatura para os anuros (Iela et al., 1980).

As diferenças sazonais observadas no metabolismo de alguns anfíbios representam a transição entre a utilização de energia para a reprodução (nos adultos a energia é dirigida para um esforço reprodutivo, com a produção de ovócitos e esperma) e a preparação de reservas suficientes para que os anuros possam suportar os invernos mais rigorosos (Brattstrom, 1979).

### **Mecanismos neuroendócrinos da reprodução de anuros**

Alterações ambientais, como fotoperíodo, temperatura e umidade, são detectadas por receptores específicos e estes as transmitem para o hipotálamo, modificando a produção e a liberação de hormônios. O hipotálamo localiza-se na base do cérebro e produz o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Os hormônios esteroides e os adeno-hipofisários determinam o desenvolvimento das gônadas; vários caracteres sexuais influenciam a vocalização e o amplexo (Browne e Zippel, 2007).

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

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

### **Espermatogênese de anuros**

Quanto ao ciclo espermatogênico, foram definidos três períodos distintos para anfíbios anuros na região subtropical: dezembro a março, quando há repouso total da atividade gametogênica; abril a setembro, atividade degenerativa; outubro a dezembro, espermatogênese. No último período, ocorre a expulsão de grandes massas de espermatozoides e o maior desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários (Ceí, 1949).

Estudos morfológicos dos estágios de desenvolvimento do aparelho reprodutor de machos de anuros revelaram que, ao longo do seu desenvolvimento, o testículo passa por diferentes fases morfológicas não visíveis macroscopicamente (Costa et al., 1998).

A espermatogênese de anfíbios anuros é dividida em três fases: espermatogônia, meiótica e espermiogênese (Segatelli et al., 2009).

Nas fases finais do processo espermatogênico, os cistos se rompem, liberando os espermatozoides para o lume dos túbulos seminíferos. No interior dos testículos, observou-se ainda um sistema de ductos coletores. Esses ductos parecem originar-se nos túbulos seminíferos e, depois, convergem a ductos coletores comuns que deixam os testículos em direção aos rins, via mesórquio (Costa et al., 1998).



O processo de espermatogênese ocorre continuamente nos indivíduos adultos de anuros e nas espécies que habitam regiões tropicais e subtropicais, cuja temperatura ambiental não apresenta grandes flutuações sazonais, os quais normalmente apresentam produção contínua de espermatozoides durante todo o ciclo reprodutivo anual (Santos e Oliveira, 2006).

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

Cinco estágios de maturação gonadal para machos de rã-touro foram encontrados: juvenil, início da maturação, maturação intermediária, maturação avançada e esgotado (Costa et al., 1998).

### **Hormônios utilizados e a reprodução artificial de rãs**

A adoção da prática de utilizar hormônios para obtenção de gametas de rãs tem duas grandes finalidades, uma por parte dos produtores de rãs e outra por pesquisadores de anfíbios anuros em processo de extinção.

Os produtores de rãs adotam essa prática com alguns objetivos, entre eles: determinar os animais para obtenção dos gametas de acordo com seus interesses e programar as desovas de acordo com a necessidade do ranário (Agostinho et al., 2000).

Programas de pesquisas das espécies de anfíbios anuros em processos de extinção têm desenvolvido protocolos de reprodução com a utilização de hormônios para obtenção de girinos e imagos para repovoamento e estudos em laboratórios (Shishova et al., 2011).

Após a aplicação do hormônio, dois métodos podem ser adotados: um deles consiste em colocar os reprodutores em local apropriado e esperar o amplexo, prática conhecida como acasalamento induzido (Mann et al., 2010); o outro se faz pela coleta dos gametas manual e a fertilização em recipientes adequados (Kouba et al., 2009).

Nos hormônios, os efeitos de análogos do hormônio GnRH sobre a desova e espermiacão de rã-touro foram estudados e concluiu-se que esses análogos sintéticos podem ter aplicações práticas importantes para estimulação da atividade gonadal e aquisição de gametas nessa espécie (Alonso, 1997). Na atualidade o hormônio mais adotado no ranário é o acetato de buserelina, mas as dosagens variam de acordo com os técnicos.

O método de desova induzida utilizando extrato bruto hipofisário de rã-touro (EBH) foi efetivo para obtenção de desovas com qualidade e em quantidade de rã-touro (Ribeiro Filho et al., 1998), mas um dos problemas da utilização do EBH é o desconhecimento da sua concentração de hormônio. Outro hormônio utilizado para promover a espermiacão de rãs foi a gonadotrofina coriônica humana (hCG; Rosemblit et al., 2006).

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

### **Biologia seminal de anuros**

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

O conhecimento da concentração de espermatozoides é importante para sua adequada utilização. O método mais utilizado para determinação da concentração espermática é a contagem direta na câmara de Neubauer (Rosemblit et al., 2006).

A motilidade espermática é uma das principais variáveis utilizadas para avaliar a qualidade do sêmen, e os espermatozoides de anfíbios anuros já são coletados com motilidade (Pereira et al., 2012a, b).

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

Em anuros, o decréscimo da osmolaridade inicia a motilidade espermática, o que enfatiza, inclusive, o emprego de metodologias de coleta de sêmen que evitem a contaminação das amostras seminais com urina e água (Hollinger e Corton, 1980; Kouba et al., 2003).

### **Considerações finais**

É necessário o aprimoramento das técnicas de manipulação da reprodução, por intermédio da identificação do momento propício para a indução hormonal, da definição da dose adequada, bem como da temperatura, do fotoperíodo e demais fatores abióticos, para que se obtenha um aumento na produção de girinos



e imagos de qualidade tanto para ranicultura quanto para programas de repovoamento. Essas informações poderão nortear novos experimentos, melhorar as condições de cultivo, valorizar a atividade no sentido econômico, assim como aumentar o número de girinos destinados à aquicultura.

### Referências

- Agostinho CA, Silva MA, Torres RA, Lima SL.** Curvas de crescimento de rãs-pimenta, *Leptodactylus labyrinthicus* (Spix, 1824). Rev Soc Bras Zootec, v.20, p.47-54, 1991.
- Agostinho CA, Wechsler FS, Castro CS, Agostinho LM, Ribeiro RR, Agostinho SMM.** Time interval from ovulation to extrusion in female bullfrog in different photoperiods. Rev Bras Zootec, v.40, p.1625-1668, 2011.
- Agostinho CA, Wechsler FS, Nicteroy PEO, Pinheiro DF.** Indução à ovulação pelo uso de LHRH análogo e fertilização em rã-touro (*Rana catesbeiana*). Rev Bras Zootec, v.29, p.1261-1265, 2000.
- Alonso M.** Uso de análogos do GnRH para indução de desova e espermiacão em rã-touro, *Rana catesbeiana*, Shaw, 1802. 1997. 136f. Tese (DS) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1997.
- Antwis RE, Browne RK.** Ultraviolet radiation and vitamin D<sub>3</sub> in amphibian health, behavior, diet and conservation. Comp Biochem Physiol Part A, v.154, p.184-190, 2009.
- Brattstrom BH.** Amphibian temperature regulation studies in the field and laboratory. Am Zool, v.19, p.345-356, 1979.
- Browne RK, Zippel K.** Reproduction and larval rearing of amphibians. ILAR J, v.48, p.214, 2007.
- Cei JM.** Factores genético-raciales que diferencian la regulacion hormonal Del ciclo sexual en *Leptodactylus ocellatus* de la Argentina. Acta Zool Lilloana, v.9, p.395-426, 1949.
- Cosson J.** The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. Aquacult Int v.12, p.69-85. 2004.
- Costa CIS, Lima SI, Andrade DR, Agostinho CA.** Caracterização morfológica dos estágios de desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. Rev Bras Zootec, v.27, p.651-657, 1998.
- Duellman WE.** Global distribution of amphibians: Patterns conservation, and future challenges, p.1-31. In: Duellman WE (Ed). Patterns of distribution of amphibians: a global perspective. Baltimore: The John Hopkins University, 1999. 648p.
- Duffus, ALJ.** Chytrid blinders: what other disease risks to amphibians are we missing? EcoHealth, v.6, p.335-339, 2009.
- Easley KA, Culley Jr DD, Horseman ND.** Environmental influences on hormonally induced spermiation of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. J Exp Zool, v.207, p.407-416, 1979.
- Figueiredo MRC, Lima SL, Agostinho CA, Baêta FC.** Efeito da temperatura e do fotoperíodo sobre o desenvolvimento do aparelho reprodutor de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). Rev Bras Zootec, v.30, p.916-923, 2001.
- Fontanello D, Soares HA, Mandelli Jr J, Santos LE, Penteadó LA, Campos BES, Reis JM.** Estação de reprodução da *Rana catesbeiana* Shaw, 1802, criadas em ranário e a influência de fatores climáticos sobre o número de desova. Bol Inst Pesca, v.11, p.123-130, 1984.
- Hafez ESE.** Reprodução animal. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. 513p.
- Heyer WR, Rand AS, Cruz CAG, Peixoto OL, Nelson CE.** Frogs of Boracéia. Arq Zool, v.31, p.231-410, 1990.
- Hollinger TG, Corton GL.** Artificial fertilization of gametes from the South African clawed frog, *Xenopus laevis*. Gamete Res, v.3, p.45-57, 1980.
- Iela L, Pierantoni RE, Rastogi RK.** Effect of temperature and light on the production of androgens in the male *Rana esculenta*. Experientia, v.36, p.256-257, 1980.
- Juncá FA.** Declínio mundial das populações de anfíbios. Sitientibus Sér Ciêncs Biol, v.1, p.84-87, 2001.
- Juncá FA.** Diversidade e uso de hábitat por anfíbios anuros em duas localidades de Mata Atlântica, no norte do estado da Bahia. Biota Neotrop, v.6, p.1-17, 2006.
- Kouba AJ, Vance CK.** Applied reproductive technologies and genetic resource banking for amphibian conservation. Reprod Fertil Dev, v.21, p.719-737, 2009.
- Kouba AJ, Vance CK, Frommeyer MA, Roth TL.** Structural and functional aspects of *Bufo americanus* spermatozoa: effects of inactivation and reactivation. J Exp Zool, v.259, p.172-182, 2003.
- Kouba AJ, Vance CK, Willis EL.** Artificial fertilization for amphibian conservation: current knowledge and future considerations. Theriogenology, v.71, p.214-227, 2009.
- Lima SL, Costa CLS, Agostinho CA, Andrade DR, Pereira Filho HP.** Estimativa do tamanho da primeira maturação sexual da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. Rev Bras Zootec, v.27, p.416-420, 1998.
- Lima SL, Verani JR.** Dinâmica populacional da rã-manteiga, *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758) em Viçosa, MG (Anura, Leptodactylidae). Rev Bras Biol, v.48, p.113-118, 1988.
- Mann RM, Hyne RV, Choung CB.** Hormonal induction of spermiation, courting behavior and spawning in the



- Southern Bell frog, *Litoria raniformis*. *Zoo Biol*, v.29, p.774-782, 2010.
- Morisawa M, Suzuki R, Shimizu H, Morisawa S, Yasuda K.** Effect of osmolarity and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J Exp Biol*, v.187, p.95-103, 1983.
- Neveu A.** Incidence of climate on common frog breeding: long-term and short-term changes. *Acta Oecol*, v.35, p.671-678, 2009.
- Nyström P, Hansson J, Mansson J, Sundstedt M, Reslow C, Broström A.** A documented amphibian decline over 40 years: possible causes and implications for species recovery. *Biol Conserv*, v. 138, p.399-411, 2007.
- Pereira MP, Ribeiro Filho OP, Zanuncio JC, Navarro RD, Seixas Filho JT, Ribeiro CDL.** Evaluation of the semen characteristic after induced spermiation in the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Acta Scient Biol Sci*, 2012a. No prelo.
- Pereira MP, Ribeiro Filho OP, Zanuncio JC, Troni AR, Navarro RD, Takamura AE.** Buserelin acetate-induced spermiation in *Leptodactylus ocellatus* and evaluation of semen characteristics. *Acta Scient Biol Sci*, 2012b. No prelo.
- Ribeiro Filho OP, Lima SL, Andrade DR, Seixas Filho JT.** Estudo da desova de Rã-touro, *Rana catesbeiana*, mediante indução do acasalamento. *Rev Bras Zootec*, v.27, p.216-233, 1998.
- Rodrigues ML, Lima SL, Moura OM, Agostinho CA, Silva JHV, Cruz GRB, Campos VM, Casali AP, Evangelista-Rodrigues A, Mendes RRB.** Efeitos dos níveis de proteína e relação energia/proteína sobre o desempenho da rã-touro. *Arch Zootec*, v.56, p.939-942, 2007.
- Roseblit C, Pozzi AG, Ceballos NR.** Relationship between steroidogenesis and spermiation in *Rana catesbeiana* and *Leptodactylus ocellatus*. *J Comp Physiol B*, v.176, p.559-566, 2006.
- Roth TL, Szymanski DC, Keyster ED.** Effects of age, weight, hormones, and hibernation on breeding success in boreal toad (*Bufo boreas boreas*). *Theriogenology*, v.73, p.501-511, 2010.
- Rugh R.** Pituitary - induced sexual reactions in the anura. *Biol Bull*, v.68, p.74-81, 1935.
- Salthe SN, Mecham JS.** Reproductive and courtship patterns. In: Lofts B (Ed.). *Physiology of the amphibia*, New York: Academic Press, 1974. p.310-521.
- Santos LRS, Oliveira C.** Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Rev Bras Zool*, v.24, p.67-70, 2006.
- Sasso-Cerri E, Cerri OS, Freymüller E, Miraglia SM.** Apoptosis during the seasonal spermatogenic cycle of *Rana catesbeiana*. *J Anat*, v. 209, p.21-29, 2006.
- Sasso-Cerri E, Faria FP, Freymüller E, Miraglia SM.** Testicular morphological changes during seasonal reproductive cycle in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J Exp Zool*, v.301, p.249-260, 2004.
- Segatelli TM, Batlouni SR, França LR.** Duration of spermatogenesis in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Theriogenology*, v.72, 894-901, 2009.
- Shishova NR, Uteshev VK, Kaurova AS, Browne RK, Gakhova EN.** Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species. *Theriogenology*, v.75, p.220-232, 2011.
- Young BE, Lips KR, Reaser JK, Ibañez R, Salas AW, Cedeño JR, Coloma LA, Ron S, Marca E, Meyer JR, Muñoz A, Bolaños E, Chaves G, Romo D.** Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conserv Biol*, v.15, p.1213-1223, 2000.
-