

cal, physiological and behavioral attributes adapted to certain environmental conditions. For use of the artificial fertilization technique, the males and females are kept in facilities with temperature and photoperiod under control. Among the species of anuran amphibians, the most studied is *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802), popularly known as bullfrog. The study was conducted in February 2016 at Research Laboratory in Admiral Paulo Moreira Aquaculture Station of the Fiperj, located in the city of Rio de Janeiro. Eight males and three females were selected, the animals were separated into three groups. For induction to spermiation and ovulation, a product based on busserelin acetate (synthetic GnRH analogue) was used. Bull frog males were given 0.1 mL application in the Peritoneal cavity one hour before semen collection, while the females received two doses of 1 mL with 12-hour interval between one application and another. The management of egg extraction was performed by holding the female by the hind legs and lightly compressing the belly, the eggs were collected in a clean and dry container. The diluted sperm was poured onto the ovules, the mixture being stirred for approximately two minutes. The fertilized eggs were mixed with water until complete hydration. Artificial fertilization is a technique that can be successfully used in amphibian breeding programs, reproduction for restocking, as well as in commercial frog farms.

Key words: *Lithobates catesbeianus*. Artificial fertilization. GnRH. Reproduction

1 INTRODUÇÃO

Como todo animal presente naturalmente em um ambiente, os anfíbios desempenham um papel fundamental no funcionamento do mesmo, e se por alguma eventualidade deixarem de existir, sérias complicações poderão ocorrer. De acordo com as observações de Hayes et al. (2010) os anfíbios estão em declínio no mundo todo, provavelmente por um sinergismo de fatores. A taxa de declínio dos anfíbios é de no mínimo 211 vezes maior do que a predita pelo registro fóssil (MCCALLUM, 2007) e infere-se que a degradação ambiental causada pelo homem é o fator que mais tem incrementado as taxas de declínio e extinção destes animais. Sendo assim, Wake e Vredenburg (2008) ressaltaram que estamos entrando na sexta onda de extinção em massa dos anfíbios. As cinco anteriores foram naturais e esta sexta é, provavelmente, acelerada pelos impactos causados pela sociedade (MCCALLUM, 2007). Declínios catastróficos são ainda mais preocupantes quando ocorrem nas regiões de alta riqueza e

endemismo de espécies do planeta. Este é justamente o caso do Brasil, detentor absoluto do maior número de espécies, abrigando aproximadamente 17% da diversidade global, e o maior número de espécies endêmicas do mundo (FROST, 2010; SBH, 2016). Esta riqueza ainda está em constante ascensão e deve aumentar significativamente nos próximos anos, por meio de descrições de novas espécies e rearranjos taxonômicos (ARAÚJO et al. 2009).

O desaparecimento dos anfíbios pode trazer diversos problemas, como por exemplo, o fato de que os anfíbios se alimentam fundamentalmente de insetos e consomem uma quantidade massiva destes organismos por ano. A remoção dos anfíbios em um ambiente deve, portanto, acarretar em desequilíbrio ecológico, gerando surtos de pragas agrícolas. Esta situação já foi registrada na Índia, gerando a necessidade de uso extensivo de inseticidas, causando prejuízos ao agronegócio e aumentando a poluição ambiental (OZA, 1990).

Um grande número de pessoas vem buscando cada vez mais produtos orgânicos, que somente podem ser produzidos com auxílio de controle biológico e, os anfíbios, participam ativa e diretamente desse controle. Nos corpos d'água a incidência da eutrofização tem aumentado e os anfíbios anuros na fase larval (girinos) se alimentam de algas e a extirpação destas larvas dos ambientes aquáticos, contribuirá para elevar à eutrofização de rios e principalmente de reservatórios de água. Isto pode prejudicar o abastecimento de água potável para a população, além de encarecer o valor do seu tratamento para o consumo humano (TOLEDO et al, 2010). Outra ocorrência esperada é o aumento de patologias, pelo fato dos anfíbios, em muitas situações, corresponderem à maior biomassa de vertebrados terrestres em um ambiente, constituindo a base da dieta de diversos organismos terrestres e aquáticos. Ademais, se alimentam de uma grande quantidade de invertebrados, proporcionando seu controle. Logo, a extinção ou declínio dos anfíbios de um ambiente, deverá acarretar desequilíbrios em diversos níveis tróficos, prejudicando o ecossistema como um todo. Um dos possíveis efeitos é o aumento de epidemias de doenças transmitidas por insetos vetores (RAGHAVENDRA et al. 2008), também poderá acarretar impactos na indústria farmacêutica visto que os anfíbios produzem uma miríade de substâncias por suas glândulas cutâneas, para defesa contra predadores, contra micro-organismos e patógenos, ou mesmo para permitir trocas gasosas adequadas (já que boa parte da respiração é cutânea). Muitos destes compostos químicos estão sendo utilizados para produção de fármacos no Brasil e no mundo (CAMARGO 2005; PUKALA et al. 2006).

2 REPRODUÇÃO DOS ANFÍBIOS ANUROS

As estratégias reprodutivas em anfíbios anuros derivam de uma combinação de atributos morfológicos, fisiológicos e comportamentais, adaptados a certas condições ambientais. Embora muitas espécies de anuros tropicais possam se reproduzir ao longo do ano, a chuva parece ser o fator extrínseco primário no controle dos padrões reprodutivos dessas espécies (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Wells (1977) considerou dois padrões temporais de comportamento reprodutivo em anuros: o explosivo e o prolongado. A reprodução explosiva estende-se por poucos dias, ao passo que a prolongada por várias semanas. Estes dois padrões reprodutivos influenciam as estratégias reprodutivas adotadas pelas populações de anuros.

A diversidade de modos de reprodução nos anuros é uma das maiores observada para os vertebrados (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Os anfíbios anuros possuem a maior diversidade de modos reprodutivos dentre os vertebrados tetrápodes, com 39 modos conhecidos (HADDAD; PRADO, 2005). Nas comunidades de anuros neotropicais, isso se deve à existência de espécies que apresentam modos de reprodução mais generalizados, onde os ovos são depositados diretamente na água, e de espécies que apresentam modos de reprodução mais especializados, inclusive em ambientes terrestres. Entre as diferentes espécies de anuros, é evidente uma tendência a uma menor dependência dos ambientes aquáticos, chegando a ocorrer independência total destes ambientes nos grupos mais especializados (SALTHER; DUELLMAN, 1973; DUELLMAN, TRUEB 1986; DUELLMAN, 1989; HODL, 1990). A alta pluviosidade e a umidade e temperatura elevadas possivelmente influenciaram na diversificação evolutiva de formas de reprodução nas florestas tropicais (HODL, 1990). Além disso, é possível que a predação tenha exercido forte pressão, na evolução de formas menos dependentes da água (MAGNUSSON; HERO, 1991; HADDAD; PRADO, 2005). Geralmente pressupõe-se que, em anuros, a desova aquática é a condição reprodutiva primitiva e as desovas terrestres, com desenvolvimento direto, o modo mais derivado (DUELLMAN; TRUEB, 1986). Alguns modos reprodutivos evoluíram independentemente em diferentes linhagens filogenéticas, ao passo que outros são conhecidos apenas em uma (DUELLMAN, 1989). Uma tendência evolutiva na reprodução dos anuros foi a remoção dos ovos da água. Como os anuros não desenvolveram estruturas eficientes contra a dessecação de suas desovas, ovos não aquáticos destes animais são conhecidos ape-

nas em ambientes úmidos (DUELLMAN, 1989).

Dentre todas as espécies de anfíbios anuros, a espécie abordada mais profundamente é a *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802), popularmente conhecida como rã-touro (Bullfrog), assim denominada porque o macho na época da reprodução emite um som potente, o coaxar, muito parecido com mugido de boi (FERREIRA et al, 2002; IFSC, 2016). Em relação às fêmeas, um aspecto reprodutivo interessante é que quando adultas, permanecem maduras durante o ano todo (COSTA, 1991), todavia, o processo de maturação final e ovulação somente é desencadeado por estímulos ambientais, como as chuvas e o aumento da temperatura logo após o final do inverno (AGOSTINHO et al, 2000), contudo, para que a temperatura tenha efeito sobre a reprodução há necessidade de que as rãs estejam sensíveis, o que depende de um ritmo circadiano endógeno (BEATTIE, 1985). A luz não tem seu papel bem definido para os anuros (SALTHER; MECHAM, 1974), entretanto, sabe-se que os anfíbios mantidos em laboratórios ajustam seus estados fisiológicos às condições de luz oferecidas (EASLEY et al., 1979). A temperatura e o fotoperíodo controlados artificialmente afetam o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos das fêmeas de rã-touro e um fotoperíodo de 12/12 (L/E) evita a regressão dos ovários (FIGUEIREDO et al., 2001).

3 FERTILIZAÇÃO ARTIFICIAL DE ANFÍBIOS ANUROS

Para garantir a reprodução nos sistemas de produção, pesquisas em melhoramento genético e projetos de repovoamento existem técnicas de reprodução artificial ou induzida, esses métodos podem ser realizados em laboratório, onde os reprodutores e matrizes são mantidos em instalações com controle da temperatura e fotoperíodo. Com esse controle, os fatores abióticos se assemelhem ao natural. Os primeiros trabalhos de indução à reprodução de rã-touro pelo uso de hipófises foram realizados por Rugh (1935). Em 1974, o National Academy of Science (NAS, 1974) propôs a utilização de duas hipófises misturadas com 5 mg de progesterona para a indução da ovulação. Ribeiro Filho (1998) trabalhou com várias dosagens de hipófise e obteve os melhores resultados com 5 ou 7 mg/kg aplicados em duas doses (10% do total na primeira e o restante na segunda dose, 12 horas após). As técnicas de indução à ovulação e fertilização artificial têm importante papel na resolução deste problema, pois usam hormônios liberadores de gonadotropina para desencadear o processo reprodutivo e possibili-

de machos em mililitros.

O manejo da extração dos óvulos foi realizado segurando a fêmea pelas patas posteriores e comprimindo levemente o ventre com o auxílio do polegar (figura 2). Os óvulos foram coletados em recipiente seco e limpo. O tempo necessário para o completo esgotamento do ovário foi de aproximadamente um minuto. O esperma foi vertido sobre os óvulos, agitando-se a mistura por, aproximadamente, dois minutos. Os ovos fecundados foram misturados com água até a completa hidratação.

Figura 2: Extrusão dos óvulos de fêmea de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) uma das etapas da reprodução induzida em cativeiro



Fonte: foto de William Nascimento Silva

Uma amostra de ovos hidratados, obtidos de cada grupo, foi coletada em triplicada em um Becker de 40 mL e feita a contagem para se estimar a média de ovos por mL para posterior estimativa do número total de ovos obtidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 a seguir observa-se o peso das fêmeas e dos machos, o peso total dos óvulos obtidos, o volume de sêmen por grupo de machos e o número estimado de ovos por desova.

Tabela 1: Peso das fêmeas, peso médio dos machos e desvio padrão, peso total dos óvulos, volume total de sêmen e número estimado de ovos de cada grupo de animais.

Peso das fêmeas (g)	Peso dos machos (g)	Peso total dos óvulos (g)	Volume total de sêmen (mL)	Número de ovos
Grupo1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 1
819,0	553,0	60	17	10.020
	507,4			
	439,6			
Média	500 ± 57,0			
Grupo2	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 2	Grupo 2
432,6	540,0	19,3	8	2.100
	403,2			
Média	471,6 ± 96,7			
Grupo3	Grupo 3	Grupo 3	Grupo 3	Grupo 3
472,8	447,0	46	15	4.025
	432,0			
	496,0			
Média	458,3 ± 33,5			

Fonte: Tabela elaborada pelos autores

As fêmeas mais pesadas apresentaram desovas maiores e, conseqüentemente, a quantidade de ovos foi maior. Para o grupo 1, devido ao tamanho, a desova foi dividida em dois recipientes, um com seis litros e outro com sete litros. De cada recipiente foram feitas três amostragens de 40 mL para contagem dos ovos. A média obtida foi de 30,83 ovos/ 40mL, então para os 13 litros a quantidade total estimada foi de 10.020 ovos. Para o grupo 2, a quantidade de ovos foi estimada pela contagem de 40 mL de amostra em triplicata, coletada do recipiente de hidratação, a média foi de 12 ovos/ 40mL, como estavam alojados em um recipiente de sete litros, o número total estimado foi de 2.100 ovos. Essa menor quantidade esta relacionada ao peso da fêmea que também era mais jovem. Para o Grupo 3, a estimativa do número de ovos seguiu o mesmo procedimento adotado nos grupo 2 e o total foi de 4.025 ovos.

Em relação ao número de ovos, Agostinho et al. (2000) observaram em desova obtida por indução, no mês de julho, um número de 12.500 ovos, bem próximo da quantidade obtida no presente trabalho. Lima e Agostinho (1992) e Ribeiro Filho et al. (1998) relataram que a capacidade de produção de ovúlos em rã-touro fica entre 2.000 e 25.000. Levando-se em consideração a idade da fêmea (SILVA, 1982) relatou que a primeira desova foi observada com mais freqüência em animais com dois anos de idade, que apresentaram, em média, 1.500 ovos por desova, ressaltando-se que, à medida que há o envelhecimento das fêmeas, sua capacidade reprodutiva vai aumentando até atingir, não raro, 20.000 ovos.

A quantidade média de ovos obtidos em desovas de *Lithobates catesbeianus* é de 5.000, sendo que

monally induced spermiation of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 207, n. 3, p. 407-416, 1979.

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

FIGUEIREDO, M. R. C.; AGOSTINHO, C. A.; BAÊTA, F. C.; LIMA, S. L. Efeito da Temperatura e do Fotoperíodo sobre o Desenvolvimento do Aparelho Reprodutor de Rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 916-923, 2001.

FROST, D. R. **Amphibian**. Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 (8 April, 2010). American Museum of Natural History, New York, USA. 2010. Disponível em < <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>>. Acesso em 06 de dezembro de 2016.

HADDAD, C. F.; PRADO, C. P. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, n. 3, p. 207-217, 2005.

HAYES, T. B.; FALSO, P.; GALLIPEAU, S.; STICE, M. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 921-933, 2010.

HÖDL, W. Reproductive diversity in Amazonian lowland frogs. **Fortschritte der Zoologie**, v. 38, p. 41-60, 1990.

IFSC - Instituto de Física de São Carlos. **Atlas de dissecação dos vertebrados Aula online de Biologia II**. Laboratório de Biologia - IFSC. Universidade de São Paulo. Disponível em <<http://biologia.ifsc.usp.br/bio2/atlas/ra.pdf>>. Acesso em 06 de dezembro de 2016.

KOUBA, Andrew J.; VANCE, Carrie K. Applied reproductive technologies and genetic resource banking for amphibian conservation. **Reproduction, fertility and development**, v. 21, n. 6, p. 719-737, 2009.

LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. **A tecnologia de criação de rãs**. Viçosa: UFV – Imprensa Universitária,

1992. 168p.

LIMA, S. L., AGOSTINHO, C. A. **A criação de rãs**. São Paulo, Globo, 1988. 187p.

MAGNUSSON, W. E.; HERO, J. M. Predation and the evolution of complex oviposition behaviour in Amazon rainforest frogs. **Oecologia**, v. 86, n. 3, p. 310-318, 1991.

MCCALLUM, M. L. Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate. **Journal of Herpetology**, v. 41, n. 3, p. 483-491, 2007.

NASCIMENTO, N. F.; SILVA, R. C.; VALENTIN, F. N.; PAES, M. D. C. F.; De STEFANI, M. V.; NAKAGHI, L. S. O. Efficacy of busserelin acetate combined with a dopamine antagonist for spawning induction in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Aquaculture Research**, v. 46, n. 12, p. 3093-3096, 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Amphibians: Guidelines for the breeding, care and management of laboratory animals**. National Academies Press, 1974.

OLIVEIRA, G. A., MOURA, M.R. Índice de eclosão de desovas de *Rana catesbeiana* Shaw, 1802. In: **ENCONTRO NACIONAL DE RANICULATURA**, 6, Rio de Janeiro, 1988. Anais..., Rio de Janeiro: Associação dos Ranicultores do Rio de Janeiro, 1988. p.121-124.

OZA, G. M. Ecological effects of the frog's legs trade. **Environmentalist**, v. 10, n. 1, p. 39-42, 1990.

PUKALA, T. L. BOWIE, J. H.; MASELLI, V. M.; MUSGRAVE, I. F.; TYLER, M. J. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. **Natural product reports**, v. 23, n. 3, p. 368-393, 2006.

RAGHAVENDRA, K.; SHARMA, P.; DASH, A. P. Biological control of mosquito populations through frogs: opportunities & constrains. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 1, p. 22, 2008.

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 acasa-

