

Caracterização Morfológica dos Estádios de Desenvolvimento do Aparelho Reprodutor Masculino da Rã-Touro, *Rana catesbeiana*, no Sistema Anfigranja de Criação Intensiva¹

Cristina Lúcia Sant'ana Costa², Samuel Lopes Lima³, Dálcio Ricardo Andrade⁴, Cláudio Ângelo Agostinho⁵

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi caracterizar morfológicamente os estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino de rã-touro *Rana catesbeiana*, proveniente do sistema anfigranja de criação extensiva. Durante o período de um ano, 657 machos de rã-touro foram retirados dos setores de recria e reprodução do sistema Anfigranja, para se estudarem os aspectos básicos da reprodução dessa espécie de rã. As coletas foram realizadas mensalmente e, na ocasião, foram registrados os pesos do corpo e dos testículos para cada animal e anotadas as características macroscópicas de suas gônadas. Os testículos de 274 machos foram removidos e histologicamente examinados. A partir da análise conjunta das características macro e microscópicas dos testículos, cinco estádios de maturação gonadal para os machos de *Rana catesbeiana* foram determinados: juvenil, início de maturação, maturação intermediária, maturação avançada e esgotado.

Palavras-chave: cativeiro, estádios, machos, gonadas, rã-touro, reprodução

Morphological Characterization of Development Stages of Male Reproduction Apparel of Bullfrog, *Rana catesbeiana*, in the Intensive Anfigranja System

ABSTRACT - The objective of this work was to characterize the morphological characterization of the development stages of male reproduction apparel of bullfrog *Rana catesbeiana* from intensive Anfigranja system. During the period of one year, 657 bullfrog males were removed from regrowing and reproduction sections in Anfigranja system to study basic aspects of the reproduction of this specie. The collections were realized monthly and, in that occasion, the body and testicles weights for each animal were recorded and their macroscopic gonadal characteristics, registred. Testicles from 274 males were removed and histologically analyzed. From the macro and microscopic gonadal characteristics, analysis set of the testicles, five stages of gonadal maturation for the male of *Rana catesbeiana* were determined: juvenile, beginning of maturation, intermediate maturation, advanced maturation and spent.

Key Words: captivity, stages, males gonads bullfrog, reproduction

Introdução

As informações a respeito do funcionamento geral do aparelho reprodutor masculino da rã-touro são praticamente inexistentes, devendo-se mencionar a publicação de EASLEY et al. (1979), que enfoca as influências ambientais na espermiacção dessa espécie.

Estudos morfológicos, bem como a caracterização dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino da rã-touro, constituem subsídios importantes para o aprimoramento das técnicas de manejo, hoje empregadas nos ranários brasileiros.

Algumas investigações, nesse sentido, já foram efetuadas com outras espécies de rãs, mas em condições naturais, como as publicadas por CEI (1948) para

Leptodactylus ocellatus e HERMOSILLA et al. (1983) para a rã-chilena, *Caudiverbera caudiverbera*. Uma revisão mais detalhada sobre reprodução de anfíbios foi realizada por LOFTS (1974).

Considerando-se a necessidade de se obterem maiores informações sobre a reprodução da rã-touro em cativeiro, efetuou-se o presente trabalho com o objetivo de caracterizar os diferentes estádios de maturação testicular, bem como realizar breve descrição morfológica do aparelho reprodutor dessa espécie de anfíbio.

Material e Métodos

O presente trabalho constitui parte de uma série de investigações sobre a biologia reprodutiva da rã-touro, criada intensivamente no sistema Anfigranja

¹ Trabalho parcialmente financiado FAPEMIG/CNPq.

² Bióloga, MS em Zootecnia, Professor Assistente - UEPG.

³ Doutor, Professor Titular, DBA - UFV. Pesquisador CNPq.

⁴ Doutor, Pesquisador - CCTA - UENF.

⁵ Doutor, Professor Adjunto - UNESP - Botucatu, SP.

(LIMA e AGOSTINHO, 1988, 1992).

Os animais amostrados encontravam-se alojados nos setores de recria (em processo de engorda) e reprodução (em manutenção) do Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa, município de Viçosa, Minas Gerais. As investigações foram realizadas no período de junho de 1989 a julho de 1990.

As coletas foram realizadas, mensalmente, e na mesma ocasião os animais foram medidos e identificados, utilizando-se a codificação proposta por MARTOFF (1953). A cada amostragem anotaram-se os seguintes parâmetros: comprimento do corpo (LC), peso total (WT), características macroscópicas das gônadas (quanto à coloração, ao formato e à posição) e peso das gônadas (WG).

Calculou-se, para cada exemplar, a relação gonadossomática (RGS), obtida mediante a seguinte expressão:

$$RGS = (WG/WT) \times 100$$

em que

WG: peso dos testículos

WT: peso total do animal

Dos 657 machos amostrados, 274 tiveram os seus testículos processados para análise em nível histológico. Para tal, a porção mediana, em corte transversal, de um testículo de cada animal foi fixada em líquido de Bouin e, posteriormente, processada

histologicamente, segundo método descrito por VAZZOLER (1981). Os cortes histológicos foram corados pela Hematoxilina-Eosina e a caracterização das células da linhagem espermatogênica foi realizada levando-se em consideração o aspecto morfológico dos diferentes tipos celulares e a sua afinidade com os corantes utilizados, de acordo com HERMOSILLA et al. (1983) e AGOSTINHO (1988).

A caracterização dos estádios de desenvolvimento testicular foi realizada com base na análise conjunta da proporção dos cistos de células germinativas, em diferentes fases de desenvolvimento no interior dos túbulos seminíferos, e nas variações da relação gonadossomática (RGS) estimada para estes animais.

Resultados e Discussão

O aparelho reprodutor masculino da rã-touro é constituído de dois testículos (Figura 1) geralmente, de forma ovóide, situados ventralmente aos rins, próximos aos quais se conectam à cavidade abdominal por intermédio do mesórquio (LOFTS, 1974).

Como ocorre para fêmeas dessa espécie, em machos também estão presentes os corpos gordurosos ou adiposos (Figura 1), posicionados cranialmente em relação aos testículos, com os quais se relacionam intimamente. Na maioria dos animais amostrados não se observou diferença em tamanho entre os dois testículos, entretanto, alguns apresentavam o testícu-



Figura 1 - Aparado reprodutor de machos de rã-touro, *Rana catesbeiana*, destacando-se os testículos (T), e corpos gordurosos (CG).
 Figure 1 - Male bullfrog, *Rana catesbeiana*, reproductive system, with detailed testicles (T), and fatty body (FB).

lo direito bem menor que o esquerdo.

Microscopicamente, ao longo do seu desenvolvimento, o testículo passa por diferentes fases morfológicas, que não são visíveis macroscopicamente. Em seu interior, estão presentes túbulos seminíferos, estruturas enoveladas e envoltas por tecido conjuntivo, cujo lume varia, em diâmetro, no decorrer de seu desenvolvimento (Figuras 2 a 6).

Os testículos da rã-touro (como dos demais anuros) contêm em seu interior túbulos seminíferos, onde se encontram as células germinativas, em diferentes estádios de desenvolvimento. Estas ocorrem em grupos, no interior de cistos formados pelas células de Sertoli, de modo que em um mesmo cisto

todas as células se encontram no mesmo estágio de desenvolvimento. Nas fases finais do processo espermatogênico, os cistos se rompem liberando as células (espermátides ou espermatozóides) para o lume dos tubulos seminíferos (Figura 5).

As células de Sertoli apresentam citoplasma hialino e núcleo volumoso, medianamente basófilo e sem nucléolos aparentes.

No interior dos testículos, observou-se ainda um sistema de ductos coletores (Figura 2), cuja parede é formada por uma camada única de células cúbicas. Esses ductos parecem originar nos túbulos seminíferos e, depois, convergem a ductos coletores comuns que deixam os testículos em direção aos rins, via mesórquio.

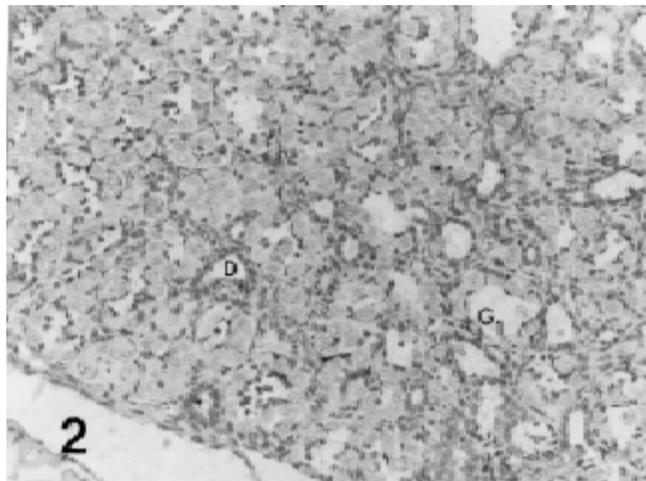


Figura 2 - Corte transversal de testículo no estágio 1 (juvenil). Nota-se a presença de espermatogônias primárias (G1), na parede dos tubulos seminíferos, além do sistema de ductos coletores de espermatozóides (D). Aumento aproximado: 200 x.

Figure 2 - Testicle cross-section in stage 1 (juvenile); the presence of primary spermatogonia (G1) can be seen on the seminiferous tubules well and the sperm collectors ducts system (D). Approximate enlargement: 200 x.

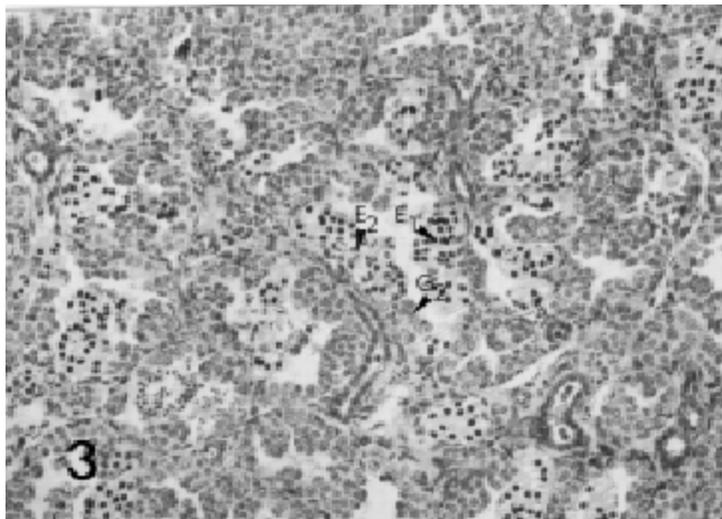


Figura 3 - Corte transversal de testículo no estágio 2 (início de maturação). Destaca-se a presença de cistos de espermatogônias secundárias (G2), espermatócitos primários (E1) e espermatócitos secundários (E2) no interior dos túbulos seminíferos. Aumento aproximado: 300 x.

Figure 3 - Testicle cross-section in stage 2 (beginning of maturation). The presence of secondary spermatogonia cysts (G2), primary spermatocites (E1) and secondary spermatocites (E2) are shown inside the seminiferous tubules. Approximate enlargement: 300 x.

*Células da linhagem espermatogênica**Espermatogônias*

Estas são as primeiras células da linhagem espermatogênica (Figuras 2 a 6). Dois tipos de espermatogônias foram observados nos testículos de rã-touro: as espermatogônias primárias (G1) e as espermatogônias secundárias (G2) (Figura 2 e 3).

As espermatogônias primárias constituem as maiores células da linhagem espermatogênica. Ocorrem sempre isoladas no interior do cisto, distribuindo-se ao longo de todo o túbulo seminífero. Seu núcleo é grande, claro e apresenta em seu interior a cromatina condensada, formando finas granulações uniformemente distribuídas.

Mediante sucessivas divisões mitóticas, a partir das espermatogônias primárias, formam-se as espermatogônias secundárias (LOFTS, 1974). Estas células ocorrem em número de duas ou mais por cisto nos testículos da rã-touro e apresentam tamanho menor em relação às primárias. Seu núcleo é volumoso e basófilo, apresentando a cromatina condensada em grumos uniformemente distribuídos, o que lhe confere aspecto granuloso.

A denominação utilizada no presente trabalho, para as espermatogônias primárias e secundárias, bem como as observações realizadas a respeito de suas características morfológicas, estão de acordo com os relatos de LOFTS (1974).

Já HERMOSILLA et al. (1983) utilizaram o termo “células germinativas primordiais” para definir as espermatogônias primárias. Os mesmos autores separaram as espermatogônias secundárias em dois tipos diferentes, utilizando o termo “espermatogônias primárias” para as pequenas agregações celulares (duas ou mais) e “espermatogônias secundárias” para aquelas células que ocorrem em maior número dentro dos cistos no interior dos túbulos seminíferos.

A partir do momento em que as espermatogônias secundárias entram no processo de divisão meiótica, estas dão origem aos espermatócitos, que serão descritos a seguir.

Espermatócitos primários (E1)

Quanto às características morfológicas, os espermatócitos primários (Figura 3) são menores que as G2 e apresentam núcleo esférico, com muita afinidade pela hematoxilina.

Espermatócitos secundários (E2)

Estas células (Figura 3) são menores que as E1 e apresentam o núcleo com a cromatina condensada em grumos próximos e arranjados em círculo incompleto, deixando uma região central clara, o que lhe confere a forma de “U”.

As descrições realizadas no presente trabalho em relação aos espermatócitos primários e secundários coincidem com as realizadas por LOFTS (1974) e HERMOSILLA et al. (1983), para outras espécies de anfíbios anuros.

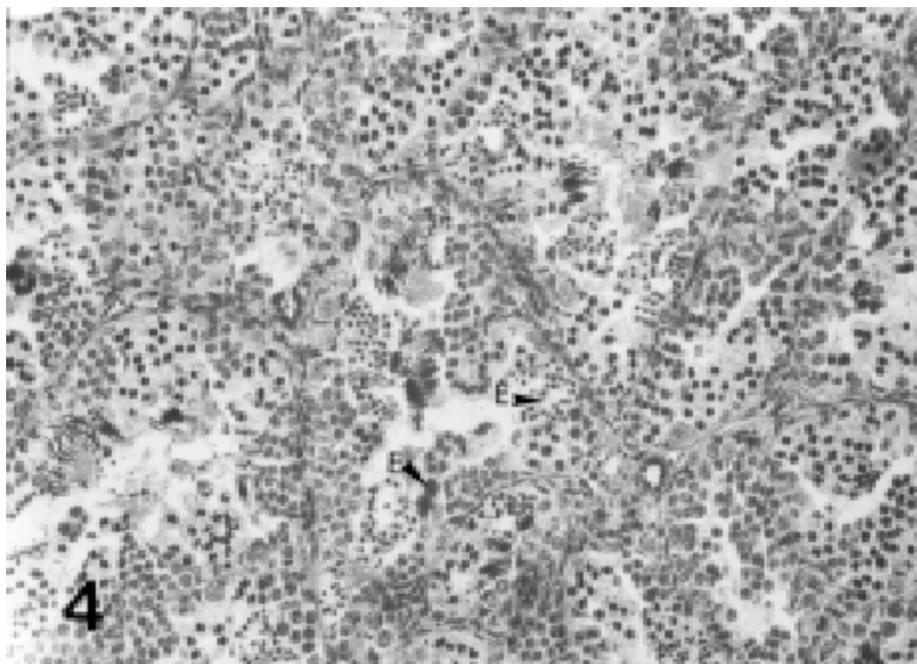


Figura 4 - Corte transversal de testículo no estágio 3 (maturação intermediária). Nota-se além dos tipos celulares citados nas figuras anteriores, a presença de espermatídes (E) no interior dos túbulos seminíferos. Aumento aproximado: 300 x.
 Figure 4 - Testicle cross-section in stage 3 (intermediate maturation). Besides the mentioned cell types for figures above, the presence of spermatides (E) can be seen inside the seminiferous tubules. Approximate enlargement: 300 x.

Constatou-se ainda no presente trabalho a presença de pequenos espaços vazios, semelhantes a “vacúolos” nos cistos de espermatócitos, que gradualmente se tornaram mais evidentes, atingindo grau máximo de ocorrência nos cistos de espermatócitos secundários. De acordo com HERMOSILLA et al. (1983), esta ocorrência é normal em anfíbios anuros. *Espermátides (E) e Espermatozóides (Z)*

Segundo a literatura, os espermatócitos secundários, ao se dividirem, dão origem às espermátides (Figura 4), aqui observadas como pequenas células de núcleo esférico, compacto e fortemente corado pela hematoxilina. Estas células passam por transformações morfológicas, que se expressam na mudança do formato de seu núcleo que se torna alongado.

Os espermatozóides, resultantes do processo de espermiogênese, são visíveis com o núcleo bastante alongado, em forma de bastonete e fortemente basófilo, acumulados no lume dos túbulos seminíferos (Figura 5).

Após liberados no lume dos túbulos seminíferos, os espermatozóides são canalizados para os túbulos coletores (vasos eferentes resultantes da convergência entre diversos túbulos seminíferos), deixando os testículos, em direção aos rins, via mesórquio

(HERMOSILLA et al., 1983). Padrão semelhante foi observado nos testículos de rã-touro.

Foram observados ovócitos 1 e 2 no interior dos testículos de 9,6% do total das lâminas analisadas. CEI e CARUSO (1948) relataram um caso de hermafroditismo em *Leptodactylus ocellatus* e afirmaram que a ocorrência desse fenômeno é rara entre anfíbios anuros. Esses autores citaram também a ocorrência de hermafroditismo em *Rana catabrigensis* e *Rana temporaria*. No presente trabalho a ocorrência de ovócitos no parênquima testicular não foi o suficiente para caracterizar um caso de hermafroditismo.

Estádios do desenvolvimento testicular

Os estádios testiculares da rã-touro (Figuras 2 a 6) foram definidos a partir da avaliação microscópica da proporção dos cistos de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento no interior dos túbulos seminíferos. Estes dados, em conjunto com a observação das variações da relação gonadossomática (RGS), possibilitaram definir, para os testículos, cinco diferentes estádios de desenvolvimento.

Estádio 1 - Juvenil

No decorrer desse estágio (Figura 2), o lume dos túbulos seminíferos apresentou-se pouco aberto e a

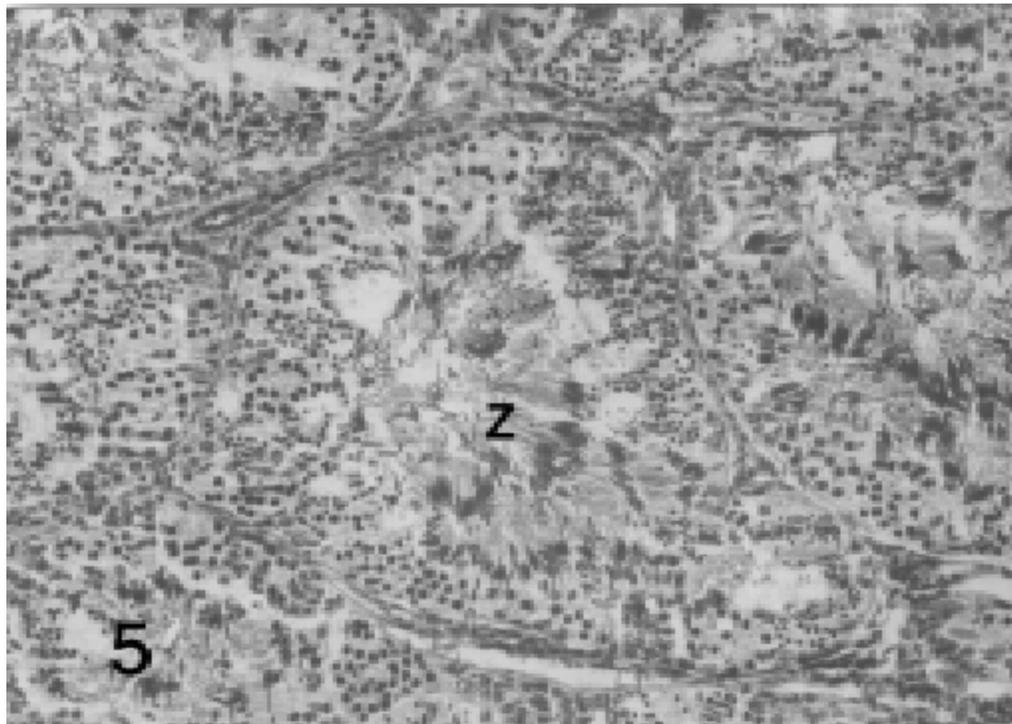


Figura 5 - Corte transversal de testículo no estágio 4 (maturação avançada). Observa-se grande quantidade de espermatozóides (Z) no interior dos túbulos seminíferos. Aumento aproximado: 300 x.

Figure 5 - Testicle cross-section in stage 4 (advanced maturation). A large number of spermatozoides can be seen (Z) inside the seminiferous tubules. Approximate enlargement: 300 x.

parede dos mesmos esteve ocupada por cistos de espermatogônias, principalmente as G1. Os dados médios de RGS, WT e LC para animais nesta fase estiveram em torno de 0,040%; 17,92 g; e 5,74 cm, respectivamente.

Estádio 2 - Início de maturação

Esta fase marca o início da atividade espermatogênica, aparecendo os túbulos seminíferos, agora com o lume mais aberto, apresentando muitos cistos de G2 em suas paredes, além de espermatócitos nas fases 1 e 2 (Figura 3). Os dados médios de RGS, WT e LC médios para os animais nesta fase estiveram em torno de 0,049%; 66,86 g; e 9,32 cm, respectivamente.

Estádio 3 - Maturação intermediária

Nesta fase os testículos apresentam atividade espermatogênica mais acentuada, marcada pelo aumento, em número, dos cistos de espermatócitos secundários (Figura 4). Além destes, ocorreram também cistos de espermatídes, bem como pequena quantidade de espermatozóides livres no interior de alguns túbulos seminíferos, principalmente naqueles com o lume mais evidente. Ainda neste estágio, cistos de espermatogônias, em número bem reduzido, são observados na parede tubular em meio aos demais tipos celulares. Os dados médios de RGS, WT e LC para os animais nesta fase estiveram em torno de

0,008%; 128,30 g; e 11,28 cm, respectivamente.

Estádio 4 - Maturação avançada

Nesta fase (Figura 5), os testículos atingiram o seu grau máximo de desenvolvimento, com os túbulos seminíferos apresentando o lume amplo e repleto de espermatozóides. Nestes túbulos observou-se, também, pequena quantidade de cistos de espermatogônias e de outras células da linhagem espermatogênica.

Observaram-se ainda, com frequência, vários graus de fusão dos túbulos seminíferos, além de ductos coletores, em vários planos, repletos de espermatozóides. Os dados médios de RGS, WT e LC para os animais nesta fase estiveram em torno de 0,12%; 240,42 g; e 13,69 cm, respectivamente.

Na escala de maturação testicular adotada para o presente trabalho, não se utilizou o termo “maduro”, por se entender que a metodologia utilizada não permitiu a visualização do momento exato em que as rãs se encontravam prontas para esgotar suas gônadas.

Estádio 5 - Esgotado

Neste estágio (Figura 6), os túbulos seminíferos encontram-se com o lume amplo e praticamente vazio contendo apenas espermatozóides residuais. Nas paredes internas dos túbulos, observaram-se ainda alguns cistos em várias fases de desenvolvi-

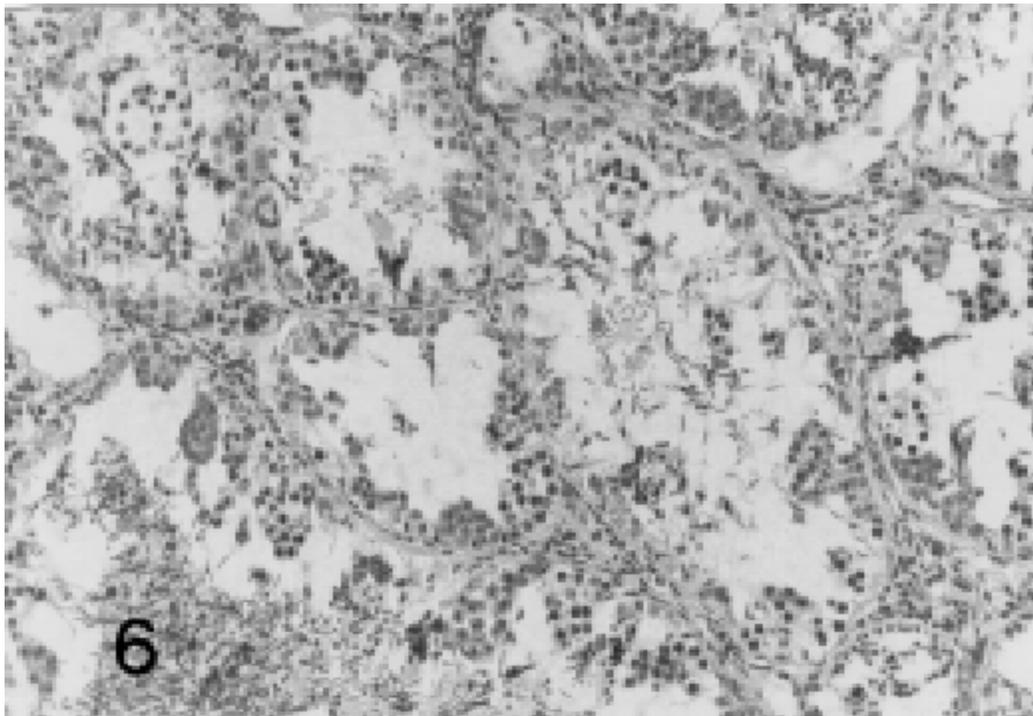


Figura 6 - Corte transversal de testículo no estágio 5 (esgotado). Observa-se espermatozóides residuais no interior do lume ainda bem aberto. Aumento aproximado: 300 x.

Figure 6 - Testicle cross-section in stage 5 (spent). Residual spermatozooids can be seen inside the still wide open lumen. Approximate enlargement: 300 x.

mento. Os dados médios de RGS, WT e LC para os animais nesta fase estiveram muito próximos dos valores estimados para os machos de rã-touro em maturação avançada.

No presente trabalho não se observou o retorno ao estágio de repouso, para os machos, após o estágio de maturação avançada, o que se reforça pela constatação de que todos os machos com peso acima de 240,42 g encontravam-se no estágio de maturação avançada ou esgotados, sugerindo que o processo de espermatogênese ocorra continuamente nos indivíduos adultos.

A suposição supracitada encontra apoio em LOFTS (1974), segundo o qual espécies de anfíbios anuros que habitam regiões tropicais e subtropicais, em que a temperatura ambiental não é sujeita a grandes flutuações sazonais, normalmente apresentam produção contínua de espermatozoides durante todo o ciclo reprodutivo anual.

Conclusões

A estrutura do aparelho reprodutor masculino da rã-touro segue o mesmo padrão descrito para outras espécies de anfíbios anuros, tanto em seus aspectos macroscópicos quanto histológicos.

Para machos de rã-touro a maturação testicular ocorre em cinco estádios: 1 (juvenil), 2 (início de maturação), 3 (maturação intermediária), 4 (maturação avançada) e 5 (esgotado).

Para essa espécie de anfíbio anuro, nas condições experimentais adotadas, o estágio de “repouso” dos testículos não foi diagnosticado, o que sugere que a atividade espermatogênica desses animais seja contínua.

Referências Bibliográficas

- AGOSTINHO, C.A. *Estimativa dos parâmetros genéticos e fenotípicos de características de produção em rã-pimenta, Leptodactylus labyrinthicus (Spix, 1824)*. Viçosa, 1988, 85p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- CEI, J.M., CARUSO, M.A. Um caso característico de hermafroditismo em *L. ocellatus* L. *Acta. Zool. Lilloana*, v.6, p.275 - 80, 1948.
- EASLEY, K.A., CULLEY JR., D.D., HORSEMAN, N.D. et al. Environmental influences on hormonally induced spermiation of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *J. Exp. Zool.*, v.207, n.3, p.407 - 16, 1979.
- LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. *A criação de rãs*. Rio de Janeiro: Globo, 1988, 187 p. (Publicações Globo Rural)
- _____. *A tecnologia de criação de rãs*. Viçosa: UFV, 1992. 157 p.
- LOFTS, B. *Physiology of the amphibia*. New York: Academic Press, 1974. *Reproduction*, v. 2, 592 p.
- HERMOSILLA, I.B., URBINA, A.P., CABRERA, J.C.P. Espermatogenesis en la rana chilena *Caudiverbera caudiverbera* (L., 1758) (*Anuro, Leptodactylidae*). *Bol. Soc. Biol. Concepcion*, v. 54, p.103 - 15, 1983.
- MARTOFF, B.S. Territoriality in the green frog, *Rana clamitans*. *Ecology*, v.34, n.1, p.166 - 74, 1953.
- VAZZOLER, A.E.A.M. *Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes: reprodução e crescimento*. Brasília: CNPq, 1981. 108 p (Programa Nacional de Zoologia).

Recebido em: 26/12/96

Aceito em: 13/03/98