



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 11 • 2022 • art. 4

Revisão sobre a Avaliação da Toxicidade de Contaminantes Ambientais em Linhas Celulares de Anfíbios

Os anfíbios estão a ser severamente afetados pela poluição ambiental. Sendo espécies sensíveis às alterações no ecossistema, fornecem informações vitais sobre as condições ambientais em que se encontram. Contudo, o uso de animais em toxicologia e ecotoxicologia é algo controverso, e tem suscitado um maior esforço no sentido de se cumprir o princípio dos 3 Rs (Redução, Refinamento e Substituição), e assim avaliar o uso de várias técnicas alternativas para reduzir a experimentação animal, nomeadamente o uso de linhas celulares. Este trabalho surge com o objetivo de analisar os estudos científicos no que respeita ao uso de linhas celulares de anfíbios na avaliação da toxicidade de contaminantes ambientais, bem como discutir as lacunas que persistem nesta área de investigação. Foram selecionados 38 estudos científicos que analisam a toxicidade de vários compostos químicos, em 12 linhas celulares ou células de diferentes tecidos de 9 espécies de anfíbios. Verificou-se que os metais constituem o grupo de compostos mais estudados no que diz respeito a ensaios *in vitro* com anfíbios, especialmente o cádmio. São aplicadas diferentes metodologias de acordo com o tipo de linha celular testada, avaliando, assim, diferentes parâmetros toxicológicos. A maioria das linhas celulares mostra um aumento de stress oxidativo, alterações nos processos celulares e no seu desenvolvimento.

Palavras-chave

xenobióticos
ecotoxicologia
anfíbios
linhas celulares

Beatriz Martinho¹

Isabel Lopes²

Sónia D. Coelho^{2*}

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

² CESAM – Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

* sdcoelho@ua.pt

ISSN 1647-323X

Artigo em acesso aberto sob [licença CC-BY](#)

© 2021 Autores

INTRODUÇÃO

Ao longo de várias décadas o uso de animais como modelos experimentais, em diversas áreas de investigação, tornou-se fundamental, suscitando várias pressões éticas, e preocupações políticas e económicas. Deste modo, tornou-se essencial regulamentar estas práticas tendo em conta o bem-estar animal e a qualidade científica das experiências. Assim, surge em 1959, o princípio dos 3 Rs (Redução, Refinamento e Substituição) (Russell & Burch, 1959). Este conceito promove a Substituição, Redução e Refinamento no uso de animais na ciência, partindo do princípio de que todos os procedimentos experimentais devem procurar: reduzir o número de animais utilizados, refinar as metodologias aplicadas com o objetivo de minimizar o sofrimento e substituir o uso de animais sempre que possível, por técnicas alternativas (Beekhuijzen, 2017). Um quarto R, 'Rejeitar' foi proposto, com o objetivo de minimizar os danos aos animais de laboratório, isto é, permite que o Comité Institucional de Cuidado e Uso de Animais (IACUC), que tem como função rever eticamente estudos desenvolvidos com animais, rejeite o projeto proposto quando este não fornece benefício suficiente que compense a dor causada ao animal em estudo (Curzer et al., 2015).

Algumas das medidas dos 3 R's passam por: usar modelos matemáticos e informáticos que fazem a análise de dados para que menos animais sejam utilizados (*in silico*); otimização dos protocolos experimentais de maneira a reduzir o sofrimento; utilizar tecidos vivos, órgãos e linhas celulares em vez do uso de organismos vivos.

Estas novas abordagens trouxeram algumas vantagens, tais como, serem alternativas mais rápidas e de baixo custo, em relação à experimentação animal, no entanto, podem ter associado um grau de incerteza maior no que respeita à obtenção de dados de dose-resposta fidedignos no que diz respeito aos efeitos avaliados (Balls, 2002; Doke & Dhawale, 2015).

Uma vez que a toxicologia e ecotoxicologia são áreas de grande importância, definidas como o estudo dos efeitos adversos de xenobióticos, nos organismos e nos constituintes dos ecossistemas, respetivamente, os investigadores têm apostado em técnicas *in vitro* para substituir o uso de animais nos testes toxicológicos (Rehberger et al., 2018). Parte destas técnicas passam por realizar ensaios em culturas de tecidos e células, nomeadamente linhas celulares contínuas. Esta é uma ferramenta importante para estudar os mecanismos de toxicidade celular (Rehberger et al., 2018). As linhas celulares são de fácil manutenção, manuseamento e fornecem um abastecimento de material quase ilimitado, respeitando as preocupações éticas associadas ao uso animal. Estas revolucionaram a investigação científica e são utilizadas em várias áreas como na produção de vacinas, estudos de metabolismo, produção de anticorpos, estudos genéticos, geração de tecidos artificiais e compostos biológicos, e análise de citotoxicidade (Kaur & Dufour, 2012). As metodologias *in vitro* que utilizam culturas de células apresentam várias vantagens comparativamente aos estudos *in vivo*, como por exemplo, são mais reprodutíveis, produzem menos resíduos tóxicos, os resultados são obtidos mais rapidamente, a interpretação dos resultados é relativamente mais simples por não possuírem a complexidade dos *in vivo* e promovem a redução do uso de animais (Bols et al., 2005).

Dada a sua fisiologia bem caracterizada e tolerância às variações de temperatura e oxigénio, os anfíbios ocupam um papel importante no grupo de vertebrados utilizados como modelos em ecotoxicologia. (Brown, 2004; Ferrell, 1999; Schultz & Dawson, 2003; Burggren & Warburton, 2007). São facilmente afetados pelo

ambiente onde se encontram, sendo por isso bons indicadores da deterioração da qualidade ambiental (Quaranta et al., 2009; Sparling et al., 2010). Para além disso, como dependem de ambos os ambientes aquático e terrestre, qualquer perturbação ambiental num deles afeta o seu bem-estar, e pode interromper ou alterar o seu ciclo de vida e conseqüentemente provocar efeitos a nível das populações (Dunson et al., 1992), reforçando o seu valor como bons marcadores biológicos da saúde do ecossistema (Barinaga, 1990; Vitt et al., 1990).

Muitas são as causas para o declínio, que se verifica a nível mundial, nas populações e espécies de anfíbios, como por exemplo: a modificação e destruição do seu habitat para benefício humano (Becker et al., 2007; Harper et al., 2008), as epidemias de doenças infecciosas (Pechmann et al., 2005; Smith et al., 2009; Eigenbrod et al., 2008), o aquecimento global (Davidson et al., 2002; Davidson et al., 2001), o uso comercial, a introdução de espécies exóticas que são predadores e/ou competem pelo habitat (Collins & Crump, 2009; Pounds et al., 2006), a poluição ambiental, entre outras (Houlahan et al., 2000; Stuart et al., 2004; Sparling et al., 2001).

Dada a preocupação global acerca do declínio das populações de anfíbios, verifica-se um aumento dos estudos de ecotoxicologia com esta classe, nomeadamente ensaios com linhas celulares (Langlois, 2021), no sentido de avaliar a sua exposição a contaminantes ambientais e respetivos efeitos.

O objetivo desta revisão é avaliar o panorama acerca dos trabalhos de investigação desenvolvidos na área de toxicologia e ecotoxicologia através de ensaios com células e linhas celulares de anfíbios. Identificar os contaminantes ambientais mais relevantes, as espécies de anfíbios mais utilizadas, e respetivas linhas celulares, como também destacar as lacunas de informação e salientar as limitações destes tipos de estudos.

METODOLOGIA

Fontes de literatura

A pesquisa e seleção inicial de artigos científicos (18 de novembro de 2020), que descrevem dados de toxicidade de diferentes compostos químicos em linhas celulares de anfíbios, realizou-se através de duas bases de dados disponibilizadas pela Universidade de Aveiro, a *Web of Science* e a *Science Direct*. A combinação de palavras-chave usada nesta fonte primária foi “*Toxicity AND amphibian AND cell line*”, à qual se adicionou os filtros “*research article*” e “*short communications*”. Outros artigos foram obtidos através de uma pesquisa preliminar noutras bases de dados: *Pubmed* e *Dimensions*.

Processo de seleção

De forma a otimizar o processo de seleção dos artigos, utilizou-se a ferramenta *Rayyan QCRI*. Os artigos obtidos foram transferidos para esta plataforma através da qual, dois investigadores, os selecionaram de acordo com os critérios definidos seguindo as seguintes fases: exclusão de artigos duplicados, seleção de artigos de acordo com o critério de elegibilidade através da leitura de título e resumo, e seleção dos artigos de acordo com a leitura completa do documento. Para cada uma das etapas procurou-se consenso entre os dois revisores. Em situações de conflito, um terceiro revisor tomou a decisão de incluir ou excluir o artigo.

Critérios de inclusão

Para a seleção de estudos, definiram-se alguns critérios de inclusão. Um estudo, considerado válido, deve incluir metodologias *in vitro*, onde se avalie a toxicidade de um composto químico em linhas celulares pertencentes a espécies de anfíbios. As linhas celulares podem ser ou não estabelecidas a partir de diferentes tecidos do animal como oócitos, espermatozóides, fibroblastos, eritrócitos, hepatócitos, melanóforos e células hipofisárias. O artigo deve descrever informações sobre os efeitos da exposição ao composto e os parâmetros de toxicidade avaliados. Deste modo os critérios de inclusão foram:

- Selecionaram-se artigos científicos sobre estudos *in vitro* com linhas celulares ou amostras tecidulares de anfíbios. Excluíram-se revisões, cartas, opiniões pessoais, resumos de conferência, relatos de casos e capítulos de livros.
- Selecionaram-se estudos que avaliaram a exposição celular (em anfíbios) a xenobióticos, comparando com controlo ou ausência de exposição.
- Selecionaram-se estudos que reportam parâmetros de toxicidade ou outros indicadores de viabilidade e mortalidade celular.

Processo de recolha de dados

Dos artigos selecionados, recolheram-se os seguintes dados: referência, autor, ano de publicação, espécie de anfíbios estudada, tipo de célula ou tecido e compostos químicos analisados.

RESULTADOS

Da pesquisa obteve-se 2568 artigos no *Science Direct*, 30 no *Web of Science* e 10 nas restantes fontes de pesquisa (Figura 1). Excluíram-se 14 artigos por serem duplicados, sendo 2594 artigos selecionados para análise posterior. Após a leitura do título e resumo, excluíram-se 2555 artigos pelos seguintes motivos: ensaios com anfíbios adultos, embriões ou análises não relacionadas com toxicidade; ensaios em que as células/tecido foram recolhidas após a exposição do animal ao composto não avaliando a exposição direta nas células; e ensaios com linhas celulares humanas ou linhas celulares provenientes de animais de outra classe. Após esta análise, obteve-se 49 artigos elegíveis para leitura completa.

Numa segunda fase de seleção, procedeu-se à leitura completa dos 49 artigos. Assim, excluíram-se 11 artigos, por se tratar de ensaios com linhas celulares humanas ou por não avaliarem a toxicidade. Por fim, resultaram 38 artigos para recolha de dados e análise (Figura 1).

Os estudos incluídos foram publicados entre 1977 e 2020, demonstrando que o uso de linhas celulares de anfíbios é um método utilizado em toxicologia há várias décadas. A sua utilização tem vindo a aumentar ao longo dos anos, uma vez que 21 dos 38 artigos incluídos no presente estudo foram publicados entre 2010 e 2020, 9 artigos entre 2000 e 2009, 6 entre 1990 e 1999 e apenas 3 de 1970 a 1989 (Figura 2).

As publicações analisadas relatam ensaios toxicológicos em linhas celulares e tecidos de diferentes espécies de anfíbios, todas pertencentes à ordem Anura. A espécie *Xenopus laevis* (rã-de-unhas-africana) é a mais comum nestes estudos, tendo sido utilizada em 30 dos trabalhos selecionados. A espécie *Rana pipiens* (rã-leopardo-do-norte) foi utilizada três vezes, e as restantes espécies *Rana catesbeiana* (rã-touro-americana), *Rana ridibunda* (rã-verde), *Rana temporaria* (rã-comum castanha), *Xenopus tropicalis* (rã-de-unhas-tropical), *Bufo arenarum* (sapo-da-areia), *Bufo bufo* (sapo-europeu), *Duttaphrynus melanostictus* (sapo-comum-asiático) foram as menos utilizadas. Os géneros mais utilizados são *Xenopus* (nomeadamente a espécie *X. laevis*) e *Rana* (nomeadamente a espécie *R. pipiens*), enquanto *Duttaphrynus* só foi utilizado num estudo dos selecionados (Figura 3).

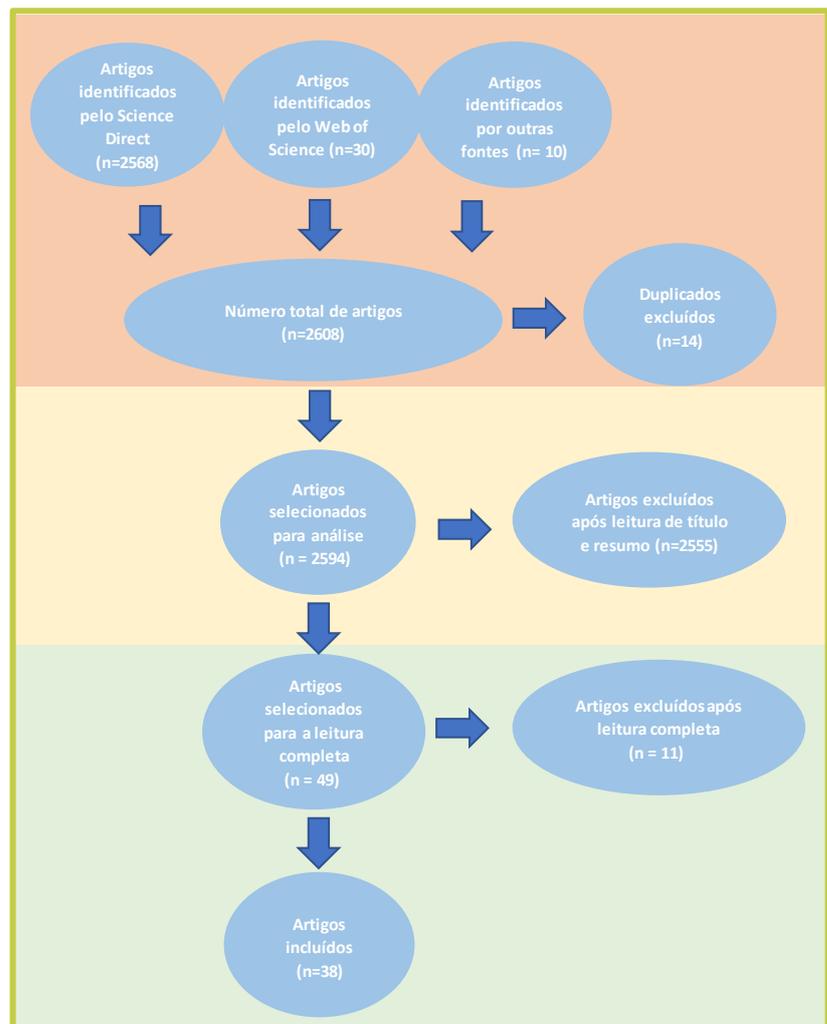


FIGURA 1: Diagrama representativo do progresso das diferentes etapas da revisão da literatura.

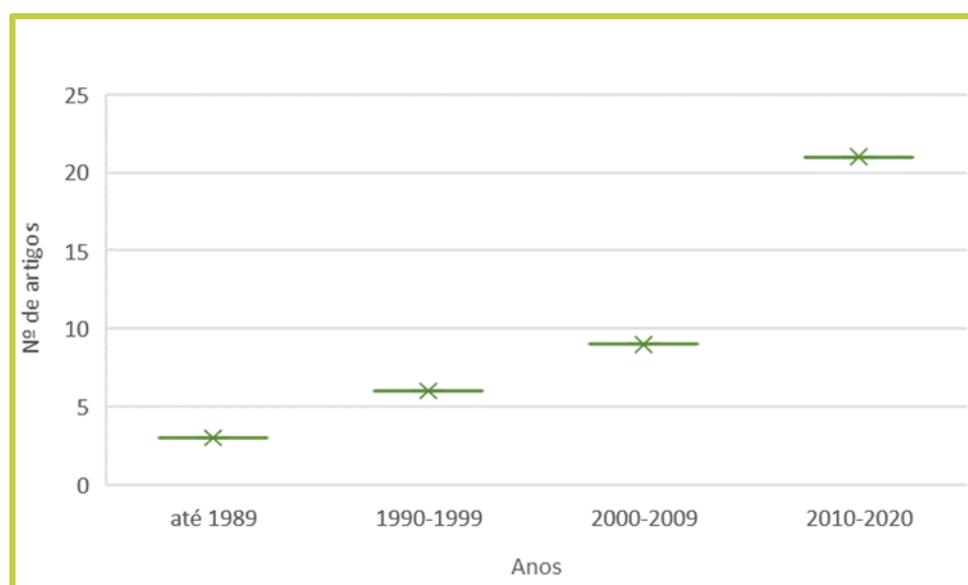


FIGURA 2: Número de artigos desde os anos 70 até à atualidade (1977-2020).

Na Figura 4 estão representadas as linhas celulares e tipos de células utilizadas nos ensaios descritos nos trabalhos analisados.

As células de anfíbios utilizadas nos estudos de toxicologia foram: A6 (linha celular epitelial renal de *X. laevis* adulto, imortalizada espontaneamente), oócito, espermatozóide, melanóforo (cromatóforo - célula tegumentar especializada), XLK-WG (linha celular epitelial renal finita de *X. laevis* adulto), ICR-134 (linha



FIGURA 3: Distribuição de espécies de anfíbios por estudos. Alguns artigos avaliaram mais que uma espécie.

celular epitelial embrionária de *R. pipiens*), XTC-2 (linha celular de fibroblastos que provém de tecido conjuntivo de girinos ou adultos de *X. laevis*, imortalizada espontaneamente), fibroblasto, eritrócito, hepatócito, célula hipofisária e célula SK (*spontaneous killer*). Verificou-se que a linha celular A6 e os oócitos foram os mais comumente utilizados nos trabalhos analisados (Figura 4).

Esta pesquisa também inclui informação acerca dos compostos químicos mais testados com ensaios realizados com linhas celulares de anfíbios. Estes incluem compostos do grupo dos metais, poluentes orgânicos persistentes, pesticidas, fármacos, entre outros (Tabela I). O grupo de compostos mais estudado nos artigos analisados foi o dos metais, em específico o cádmio, seguido pelo grupo dos pesticidas e dioxinas.

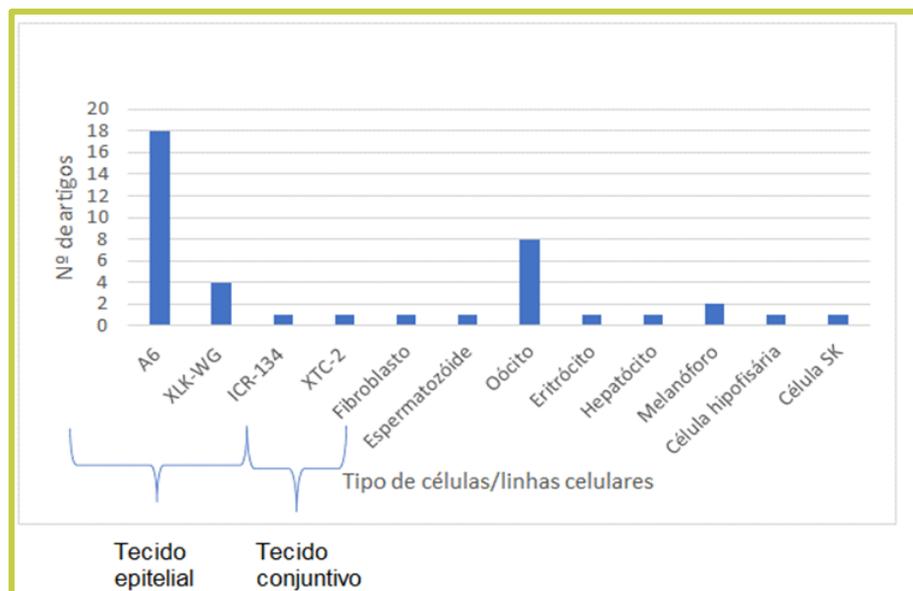


FIGURA 4: Tipos de células/linhas celulares de anfíbios utilizadas em ensaios ecotoxicológicos.

TABELA I: Compostos químicos avaliados nos 38 estudos selecionados. POPs – Poluentes orgânicos persistentes.

Metais	POPs	Pesticidas	Fármacos/Drogas	Outros
Cloretos de metal (cádmio, chumbo, cobalto, zinco, mercúrio) (Music et al., 2014; Marin et al., 2015; Shirriff & Heikkila, 2017; Iuga et al., 2009; Bjerregaard, 1993; Woolfson & Heikkila, 2009; Bjerregaard, 2007; Campbell & Heikkila, 2018; Faurskov & Bjerregaard, 1997)	Dioxinas (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)) (Lavine et al., 2005; Laub et al., 2010; Iwamoto et al., 2012; Taft et al., 2018)	Fungicidas: Carbendazim, Flusilazol (Strong et al., 2016)	Celastrol (Walcott & Heikkila, 2010; Music et al., 2014)	Açúcares (glicose, glicose-6-fosfato (G6P), manose, manose-6-fosfato (M6P), fucose e galactose) (Ghoneum et al., 1987)
Organomercuriais (PHMPS) (Pays et al., 1977)	Compostos semelhantes à dioxina (DLCs) (Taft et al., 2018)	Inseticidas ciclodienicos organoclorados: Dieldrina (De Schroeder & De D'Angelo, 1995)	Cicloheximida, cloroquina e colchicina (Ghoneum et al., 1987)	Isotiocianatos, isotiocianato de benzila (BITC), isotiocianato de fenetil (PEITC) (Khamis & Heikkila, 2018)
Cádmio (Knight & Serrano, 2006; Slaby et al., 2017)	Substâncias poli e perfluoroalquil (PFAS): PFBS, PFOA, PFOS, PFNA, PFHxS, PFHxA.; (Gorrochategui et al., 2016; Hoover et al., 2019)	Herbicida: Roundup (Glifosato, Glifosato-isopropilamina, isopropilamina) (Hedberg & Wallin, 2010)	Cloranfenicol (Shmerling & Skoblina, 1978)	Acrilamida (Lessman & Kessel, 1992)
Cromo (Fernando et al., 2016)	Bisfenol A (BPA) (Kaneko et al., 2008)	Agroquímicos (Pickford et al., 2015)	Cisplatina (Faurskov & Bjerregaard, 1999)	Amônia (Iuga et al., 2009)
Óxido de cobre (CuO NPs) e iões Cu (Thit et al., 2013 e 2015)		Arsenito de sódio (Music et al., 2014; Iuga et al., 2009)	Nicotina (Iuga et al., 2009)	Cianeto (sódio) (Iuga et al., 2009)
Fibra de amianto (Iões de ferro mineral) (Bernareggi et al., 2019)		Agente bactericida, triclosan (3,5,3-Triiodo-l-tironina (T3)) (Veldhoen et al., 2006)	Paracetamol, Ácido acetilsalicílico, Sulfato ferroso, Diazepam,	Fenol e Tolueno (Iuga et al., 2009)
Selênio (Knight & Serrano, 2006)		Aldicarbe (Iuga et al., 2009)	Amitriptilina, Digoxina, Etilenoglicol, Metanol, Etanol, Isopropanol, Fluoreto de Sódio, Ouabain, Dinitrofenol, Cloroquina, Trifluoperazina	Sulfonato de alquilbenzeno linear (LAS) (Bjerregaard et al., 2001)
Iões metálicos (zinco (Zn ²⁺)) (Christensen et al., 2004)	Bifenilos oliclorados (PCBs) (Gillan et al., 1998)	Metamidofós (Iuga et al., 2009)	Peróxido de hidrogênio, Dodecilsulfato de sódio, Hidróxido de sódio, Dimetilsulfóxido, l-butanol	Naftalina, Benzo[g,h,i]perileno, Acenaftileno, Dibenz[a,h]antraceno, Acetafeno, Indeno[1,2,3-cd]pireno, Fluoreno, Benzo[a]pireno, Fenantreno, Benzo[k]fluoranteno, Antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Fluoranteno, Criseno/trifenileno, Pireno, Benz[a]antraceno (Gillan et al., 1998)
Ferrocenil 4-(Imino)-1,4-Diidro-quinolina (Marchand et al., 2020)		Paraquat (dicloreto) (Iuga et al., 2009)	Peróxido de hidrogênio, Dodecilsulfato de sódio, Hidróxido de sódio, Dimetilsulfóxido, l-butanol (Bjerregaard, 1993)	6-formilindolo [3,2-b] carbazol (FICZ) (Laub et al., 2010)
Cobre (Iuga et al., 2009)		Pentaclorofenato (sódio) (Iuga et al., 2009)		Brometo de etídio (Shmerling & Skoblina, 1978)

DISCUSSÃO

Esta revisão fez um levantamento dos estudos científicos publicados que analisam a toxicidade de diferentes químicos através de metodologias *in vitro* desenvolvidas com linhas celulares estabelecidas ou outro tipo de células de anfíbios, como por exemplo, células germinativas. A utilização deste tipo de metodologias tem vindo a aumentar nas últimas décadas, refletindo-se no aumento das publicações em revistas científicas indexadas. Estas publicações e respetivos dados, são fundamentais na área da ecotoxicologia contribuindo para o conhecimento acerca do impacto que grande parte dos contaminantes ambientais tem nos anfíbios e no seu ecossistema. No entanto, após a pesquisa da literatura, usando a combinação das palavras-chave “*Toxicity AND amphibian AND cell line*”, verificou-se que os ensaios toxicológicos *in vitro* com células de anfíbios não são tão frequentes quando comparado com outro tipo de ensaios de exposição, como com testes toxicológicos realizados com embriões e girinos de diferentes espécies de anfíbios (Langlois, 2021). Por exemplo, Patar et al. (2016) avaliou os efeitos tóxicos e genotóxicos do cloreto de cádmio ($CdCl_2$) em girinos de *Rana limnocharis*. Outros estudos analisaram a toxicidade de misturas de herbicidas frequentemente usadas para tratar ervas daninhas resistentes em embriões e girinos de *Rhinella arenarum* (Aronzon et al., 2020), e o efeito de mistura de cobre e nonilfenol no desenvolvimento embrionário na mesma espécie (Melvin et al., 2013). Este maior recurso a ensaios toxicológicos com estágios iniciais da vida de anfíbios, poderá estar relacionado com a disponibilidade, há várias décadas, de diversas diretrizes padronizadas para métodos *in vivo* aplicados na avaliação do impacto de químicos num contexto de regulamentação internacional, ao contrário do que acontece com os estudos *in vitro*. Deste modo, a qualidade e a reprodutibilidade dos ensaios *in vitro*, bem como a comparação de dados entre a comunidade científica, ficam comprometidos. No entanto, em 2018, a OCDE publicou um documento sobre boas práticas de métodos *in vitro* – *Guidance Document on Good In vitro Method Practices*, no sentido de promover a confiança em alternativas *in vitro* para testes em animais (OECD, 2018).

Em ecotoxicologia, os anfíbios ainda são pouco utilizados (Langlois, 2021) comparando com outros modelos animais (e.g. invertebrados: *Daphnia magna*; vertebrados: *Danio rerio*), sendo os peixes (e.g. *D. rerio*, peixe-zebra) o modelo mais comum (Chahardehi et al., 2020). No entanto, os anfíbios reúnem várias características que os tornam um modelo importante, como: são fáceis de obter e de manusear, reproduzem-se através de fecundação externa, as suas posturas têm um elevado número de ovos e a sua pele é permeável tornando-os vulneráveis às condições do seu habitat (Liu et al., 2016). São, por isso, bons indicadores da qualidade do ambiente onde se encontram, tanto aquático como terrestre (Johnson et al., 2017).

A partir dos anos 70, a cultura de células (*in vitro*) tornou-se uma ferramenta fundamental para investigação na área da toxicologia (Tardiff, 1978) reduzindo a experimentação com modelos animais. Os primeiros estudos encontrados com linhas celulares de anfíbios datam por volta dos anos 60 e 70, com o estabelecimento de uma linha celular imortalizada a partir do tecido da língua da rã-touro (*R. catesbeiana*) (Wolf & Quimby, 1964); uma linha fibroblástica (Bor II) estabelecida a partir de embriões da rã *Bombina orientalis* (Ellinger, Sharif, & BeMiller, 1983) e a linha celular XTC-2 que foi estabelecida inicialmente para estudar o crescimento de arbovírus (Pudney et al., 1973). Nesta altura, as espécies *R. pipiens* e *X. laevis* já

eram consideradas as espécies mais utilizadas e várias linhas celulares imortalizadas já se encontravam disponíveis (Ellinger, Sharif, & BeMiller, 1983).

Relativamente às linhas celulares e células utilizadas nos trabalhos selecionados nesta pesquisa, a linha celular A6 (epitelial renal de *X. laevis*) é utilizada com mais frequência. Esta foi originalmente obtida do túbulo urinífero renal de um indivíduo adulto de *X. laevis* (Rafferty e Sherwin, 1969), e tem sido usada maioritariamente para estudos fisiológicos e toxicológicos devido à sua natureza epitelial rígida (Bjerregaard, 1993 e 1995), e às suas propriedades funcionais do epitélio tubular distal (Perkins & Handler, 1981). Observou-se que a maioria dos estudos selecionados para esta revisão, onde se utilizou a linha celular A6, avaliou a toxicidade de metais, especificamente de cádmio.

O segundo tipo de célula mais utilizado nestes estudos foram os oócitos. As células germinativas são muito usadas por serem sensíveis às alterações ambientais, sendo utilizadas em estudos eletrofisiológicos e exames morfológicos (Marin et al., 2015). O oócito de *X. laevis* tem sido muito utilizado para estudar a sinalização do cálcio (Marin, 2012), ciclo celular (Machaca, 2007), e para testar os efeitos diretos de compostos. Marin et al. (2015) demonstrou que os oócitos de *X. laevis* foram afetados quando expostos a $CdCl_2$, inibindo a maturação oocitária induzida pela progesterona. Pelo contrário, o zinco, o cádmio (em menor grau), o cobalto e o chumbo, aumentaram a maturação espontânea do oócito. Também a exposição a cloretos metálicos (chumbo, cádmio) perturbaram a sinalização de cálcio alterando as correntes de cloretos ativadas por cálcio. Por sua vez, Christensen et al. (2004), aplicou um teste toxicológico com espermatozoides para avaliar os efeitos do zinco na mobilidade e trajetória dos espermatozoides de *X. laevis*, e verificou que o aumento da concentração do íon de zinco levou a uma diminuição na motilidade dos espermatozoides, o que sugere que os íons de zinco podem estar a interferir nos processos celulares (respiração celular, troca iónica, flexão flagelar).

A pele do anfíbio também é um bom marcador para monitorizar a toxicidade de diversos contaminantes em ambientes aquáticos. Iuga et al. (2009), avaliou o potencial dos melanóforos como um sensor para detetar a presença de toxinas na água. A exposição de melanóforos a arsénio, cobre, mercúrio, fenol, entre outros produtos químicos, levou a uma dispersão dos melanossomas (organelos intracelulares que sintetizam e armazenam a melanina), resultando no aumento da absorção da luz pelas células (Iuga et al., 2009). Isto indica que estas linhas celulares podem ser úteis na avaliação rápida da toxicidade química em água e apresentam várias vantagens em relação a outras linhas celulares: facilidade de medição de parâmetros, manutenção mínima por um período prolongado e serem espontaneamente imortalizadas (Iuga et al., 2009).

A linha celular XLK-WG foi obtida em 1996 através do cultivo primário de células do tecido epitelial de rins de *X. laevis* adulta fêmea, por Zheng'an Wu e Joseph G. Gall. Alguns estudos indicaram que estas células crescem mais rápido e são mais fáceis de manusear do que a linha celular A6 (Rokaw et al., 1996). A ICR-134 é uma linha celular derivada de tecido de embriões haplóides ginogenéticos de *R. pipiens* (Freed & Mezger-Freed, 1970). Uma das linhas celulares de *Xenopus* sp. que tem vindo a ser muito usada nos últimos anos é a XTC-2, trata-se de fibroblastos que provém de tecido conjuntivo de girinos de *X. laevis*, sendo imortalizada espontaneamente (Pudney et al., 1973). Os fibroblastos são células amplamente utilizadas em cultura de células e são isoladas do botão embrionário, sendo conhecida como linha celular "Speedy" (Hoover et al., 2019).

Num estudo sobre os efeitos letais e subletais de crómio hexavalente em *D. melanostictus*, foram utilizados eritrócitos para ensaios de genotoxicidade através do ensaio do cometa (Fernando et al., 2016).

Os hepatócitos de *B. bufo* também foram utilizados para evidenciar atividade de desregulação endócrina de diferentes agroquímicos (Pickford et al., 2015). Num estudo para observar o efeito do composto bisfenol A, no sistema endócrino (Kaneko et al., 2008), utilizaram-se células hipofisárias anteriores dispersas de *R. catesbeiana*. Ghoneum et al. (1987), observaram que certos compostos como a cloroquina, colchicina e alguns açúcares simples inibiram a lise de células tumorais mediada por células SK (células equivalentes às células *Natural Killer* - assassinas naturais - nos mamíferos, são linfócitos constituintes do sistema imunitário inato).

Verificou-se que as linhas celulares mais recorrentemente usadas nestes ensaios toxicológicos provêm da rã-de-unhas-africana – *X. laevis* (Figura 5). É uma rã alotetraploide clássica, aquática e endêmica de África da família *Pipidae*, e começou inicialmente (entre 1930 e 1960) por ser utilizada nos laboratórios como teste de gravidez (Gurdon & Hopwood 2000). É utilizada, há décadas, por vários cientistas na avaliação de efeitos tóxicos de contaminantes químicos ambientais (Dumpert & Zietz, 1984; Saria et al., 2014). Uma vez que *X. laevis* é uma espécie tropical, esta pode ter uma sensibilidade diferente a alguns contaminantes ambientais quando comparado com espécies de clima temperados, portanto seria importante investir em estudos com espécies autóctones como *Pelophylax perezi* (no caso de estudos Portugueses), bem como investir para estabelecer linhas celulares destas espécies. O estudo das espécies nativas é importante para avaliar os contaminantes ambientais e para fornecer informações sobre estado do habitat e com isto, proteger as espécies de maneira a garantir a sua conservação.



FIGURA 5: *Xenopus laevis* (a) fêmea e (b) macho.

Como referido anteriormente, muitas são as causas comprovadas para o declínio das espécies de anfíbios e, segundo a meta análise feita por Egea-Serrano et al. (2012), o impacto dos poluentes ambientais (como fertilizantes, pesticidas e metais pesados) está fortemente relacionado.

Vários contaminantes foram avaliados nos ensaios toxicológicos com linhas celulares e células descritos nos artigos selecionados, como por exemplo: o pesticida carbendazim, um fungicida benzimidazo (Strong et al., 2016) e inseticidas ciclodiénicos organoclorados (Dieldrina) (de Schroeder & de D'Angelo, 1995); metais como o cádmio (Shirriff & Heikkila, 2017); poluentes orgânicos persistentes como perfluoroalquil (Gorrochategui et al., 2016) e dioxinas (Taft et al., 2018); fármacos como cicloheximida, cloroquina e colchicina (Ghoneum et al., 1987) e outros compostos como sulfonato de alquilbenzeno linear (Bjerregaard et al., 2001) e acrilamida (Lessman & Kessel, R. G., 1992).

A população de anfíbios tem diminuído em parte devido ao uso excessivo de pesticidas que contaminam o ambiente agrícola terrestre e que podem ser transportados para os sistemas aquáticos adjacentes (Islam & Malik, 2018). Por exemplo, resíduos de inseticidas ciclodiénicos organoclorados podem ser encontrados na água e no solo, e têm efeitos tóxicos no sistema nervoso e afetam a reprodução, levando a uma diminuição na aptidão dos oócitos serem fertilizados (de Schroeder & de D'Angelo, 1995). Consequentemente, este impacto na reprodução afeta as populações de anfíbios.

Ao avaliar a exposição de células XTC-2 de *X. laevis* a diferentes concentrações do agente bactericida triclosan, observou-se a expressão alterada de mRNA do recetor da hormona da tiroide, interrompendo a expressão génica associada à hormona, podendo modificar a taxa de desenvolvimento pós-embriónico de anuros mediada pela hormona da tiroide (Veldhoen et al., 2006).

Outros compostos que têm um grande impacto negativo na saúde dos anfíbios são os metais. Um dos metais mais estudado em trabalhos de toxicologia que utilizam exposição de linhas celulares de anfíbios é o cádmio. Este metal é um poluente industrial e ambiental, classificado como carcinogénico para os humanos, afetando vários órgãos (Herber, 1994), acumula-se principalmente no túbulo proximal do rim (Friberg, 1986), fígado e tecidos reprodutivos (Mouchet et al., 2006). A sua exposição pode provocar stress oxidativo, problemas respiratórios, incluindo cancro do pulmão, disfunção renal e distúrbios neurológicos, como a doença de Alzheimer.

Como mencionado anteriormente, a exposição a iões de cádmio (Cd^+) afeta a maturação do oócito de *X. laevis* (Marin et al., 2015; Slaby et al., 2017). Também nas células epiteliais renais A6 de *X. laevis*, o cádmio afeta o transporte ativo transepitelial de iões e diminui a resistência transepitelial devido à rutura de junções estreitas. O aumento de cádmio pode levar à deterioração da integridade celular e à morte celular (Fauriskov & Bjerregaard, 1997) provocando danos nos rins e fígado dos anfíbios, podendo consequentemente contribuir para o declínio de anfíbios a nível populacional. Verificou-se, ainda, que o cádmio afeta a proliferação celular. Ao analisar os efeitos do cádmio na linha celular A6, observou-se alterações no crescimento celular e diferenciação de células individuais em epitélios confluentes afetando a proliferação celular e o ciclo celular na fase G1 (Bjerregaard, 2007).

Além dos compostos mencionados na tabela, há bastantes contaminantes de preocupação emergente que não foram analisados em linhas celulares que são igualmente tóxicos para anfíbios, nomeadamente

plásticos, drogas usadas no tratamento do cancro, nanopartículas e possivelmente outros compostos tóxicos que poluem o habitat dos anfíbios afetando-os negativamente.

A poluição ambiental está a ter um impacto preocupante nos ecossistemas (terrestres e aquáticos), sendo por isso, fundamental controlar estes efeitos. É necessário monitorizar, avaliar e controlar a libertação e propagação de substâncias químicas para o meio ambiente. Neste sentido, e de forma a contribuir para todo o trabalho que tem sido feito para preservar a saúde ambiental, o uso de linhas celulares surgiu como uma ferramenta bastante útil para a realização desses estudos.

Os ensaios *in vitro* apresentam vantagens como: controlo das condições ambientais, custo reduzido, maior rendimento, uso de células bem caracterizadas e imortalizadas (Graudejus et al. 2018) que permitem substituir ou reduzir o uso de modelos de animais (Hubrecht & Carter, 2019). No entanto, estes ensaios apresentam, ainda, grandes limitações, como a dificuldade em extrapolar as concentrações de efeito *in vitro* para o indivíduo e a falta de informação acerca de alternativas *in vitro* para parâmetros *in vivo* complexos (Rehberger et al., 2018). Os testes *in vitro* não permitem replicar as condições que ocorrem num organismo vivo, ou seja, os resultados não refletem inteiramente a resposta num ser vivo, para além disso, é difícil estabelecer sistemas *in vitro* realistas, pois as células primárias diferem do tipo de célula correspondente ao organismo, isto é, o cultivo da célula pode levar à sua alteração (por exemplo, alterações genéticas). Outras limitações dos ensaios *in vitro* passam pela dificuldade em avaliar o metabolismo de xenobióticos, em observar interações entre diferentes tipos de células, em extrapolar doses *in vivo* para *in vitro* e em simular os efeitos de exposições crónicas (Ghallab, 2013). Existe ainda um longo percurso até que estes possam ser usados como uma alternativa adequada.

Para além da sua importância em ecotoxicologia, as linhas celulares de anfíbios têm vindo a ser utilizadas para responder a outros assuntos de elevada importância. Por exemplo, foram utilizadas (nomeadamente a XTC-2) num painel de células para avaliar a suscetibilidade de várias linhagens (provenientes de organismos de diferentes grupos) ao vírus Sars-CoV2, relevante para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e ensaios terapêuticos (Wurtz et al., 2021).

Os procedimentos *in vitro* adequam-se ao princípio dos 3Rs, nomeadamente o uso de linhas celulares, uma vez que possibilitam a substituição ou redução do uso de animais. Embora a sua substituição seja por vezes inviável, as linhas celulares podem ser utilizadas em fases preliminares dos estudos para otimizar o procedimento experimental e selecionar as concentrações a testar, isto permitirá que, ainda que os anfíbios tenham que ser utilizados, se reduza o seu número de indivíduos por ensaio.

Apesar de tudo, o princípio dos 3Rs apresenta algumas limitações, como por exemplo, não haver a consideração especial de algumas espécies, não sendo isentas do uso científico no processo de avaliação ética com o princípio dos 3Rs (Schuppli et al., 2004), como também não sendo possível utilizar linhas celulares ou outras alternativas para estudos específicos, o que podemos inferir que a experimentação animal nunca será totalmente substituída. Procedimentos experimentais mais detalhados, medidas e condições de bem-estar animal ajudarão a melhorar o refinamento e o bem-estar dos animais. A redução pode ser alcançada publicando resultados positivos e negativos, de modo a evitar a repetição de estudos que produziram dados válidos. Compartilhar publicações relacionadas com os 3Rs e aumentar o

financiamento de alternativas de substituição são algumas sugestões de modo a levar ao reconhecimento e importância deste princípio (Bioethics & Hopkins, 2005).

Concluindo, foi possível evidenciar que os contaminantes ambientais têm um impacto na saúde das populações de anfíbios e que os estudos ecotoxicológicos fornecem informação sobre a contaminação ambiental e como esta afeta as populações e respetivos ecossistemas. Demonstrou-se que, embora não haja muitos estudos de toxicidade em linhas celulares de anfíbios, o seu uso tem sido um recurso de sucesso que permite reduzir o uso de espécimes de anfíbios em ensaios de exposição.

Este trabalho realça a importância dos 3Rs na experimentação animal, descreve a influência que alguns contaminantes ambientais podem ter no declínio das populações de anfíbios, e ainda sugere a possibilidade do uso de linhas celulares como uma das principais alternativas ao uso de animais para a análise da toxicidade em anfíbios. No entanto, reforça a importância e o longo percurso científico que ainda é necessário percorrer até que esta substituição seja possível. Até lá, é fundamental focar as práticas laboratoriais na redução e otimização quando esta substituição não é viável. Com esta revisão foi possível obter uma visão geral do desenvolvimento do uso *in vitro* de linhas celulares de anfíbios, identificar os modelos celulares mais utilizados e identificar algumas lacunas de conhecimento.



APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho pretendeu realçar a necessidade de se desenvolver e utilizar metodologias *in vitro* no contexto da caracterização dos efeitos tóxicos de compostos químicos em anfíbios. Nomeadamente, identificou-se a necessidade de se estabelecerem mais linhas celulares de diferentes espécies de anfíbios e vários tecidos, que permitam avaliar diferentes reações metabólicas, bem como, avaliar compostos químicos com modos de ação distintos. Os ensaios *in vitro* com anfíbios não são frequentemente usados em estudos ecotoxicológicos, quando comparados com outros animais. No entanto, são procedimentos importantes e bastante úteis para complementar esta área de estudo tão ampla e complexa. Como os anfíbios estão a ser fortemente afetados pela poluição e aquecimento global, estando em declínio, é importante estudá-los e protegê-los contra estes efeitos. Neste âmbito, é fundamental remeter para a importância da redução da experimentação animal. A monitorização dos contaminantes ambientais e dos respetivos níveis e vias aos quais os anfíbios estão expostos deveria ser reforçada, e pode ser útil em estudos de avaliação de risco à saúde de anfíbios no futuro. Os estudos com base nas linhas celulares, como procedimentos alternativos ou complementares, são bastante importantes para a conservação das espécies, dos seus habitats e ecossistemas, contribuindo para um mundo científico mais ético.

agradecimentos • O presente trabalho desenvolveu-se no âmbito do projeto GOGOFROG (POCI-01-0145-FEDER-030718) financiado pela FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) através do PT2020 e Compete 2020 pelo FEDER (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional). Agradecemos o apoio financeiro ao CESAM por parte da FCT/MCTES (UIDP/50017/2020+UIDB/50017/2020+ LA/P/0094/2020), através de fundos nacionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aronzon CM, Peluso J, Coll CP (2020). Mixture toxicity of copper and nonylphenol on the embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *Environmental Science and Pollution Research* 27 (12), 13985–13994.
- Balls M (2002). Future Improvements: Replacement In Vitro Methods. *ILAR Journal* 43 (Suppl_1), S69–S73.
- Barinaga M (1990). Where Have All the Froggies Gone? *Science* 247 (4946), 1033–1034.
- Becker CG, Fonseca CR, Haddad CFB, Batista RF, Prado PI (2007). Habitat Split and the Global Decline of Amphibians. *Science* 318 (5857), 1775–1777.
- Beekhuijzen M (2017). The era of 3Rs implementation in developmental and reproductive toxicity (DART) testing: Current overview and future perspectives. *Reproductive Toxicology* 72, 86–96.
- Bernareggi A, Conte G, Constanti A, Borelli V, Vita F, Zabucchi G (2019). On the mechanism of the electrophysiological changes and membrane lesions induced by asbestos fiber exposure in *Xenopus laevis* oocytes. *Scientific Reports* 9 (1), 1–14.
- Bioethics NC, & Hopkins MM (2005). The ethics of research involving animals. Nuffield Council on Bioethics.
- Bjerregaard HF (1993). Electrophysiological measurements of a toad renal epithelial cell line (A6) as an assay to evaluate cellular toxicity in vitro. *Toxicology in Vitro* 7 (4), 411–415.
- Bjerregaard HF (1995). Side-specific Toxic Effects on the Membranes of Cultured Renal Epithelial Cells (A6). *Alternatives to laboratory animals* 23 (4), 485–490.
- Bjerregaard HF, Stærmose S, Vang J (2001). Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on ion transport and intracellular calcium in kidney distal epithelial cells (A6). *Toxicology in Vitro* 15 (4–5), 531–537.
- Bjerregaard HF (2007). Effects of Cadmium on Differentiation and Cell Cycle Progression in Cultured *Xenopus* Kidney Distal Epithelial (A6) Cells. *Alternatives to laboratory animals* 35 (3), 343–348.
- Bols NC, Dayeh VR, Lee LEJ, Schirmer K (2005). Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 6 (C), 43–84.
- Brown DD (2004). A tribute to the *Xenopus laevis* oocyte and egg. *Journal of Biological Chemistry* 279 (44)
- Burggren WW, Warburton S (2007). Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *ILAR Journal* 48 (3), 260–269.
- Campbell JH, Heikkilä JJ (2018). Effect of hemin, baicalein and heme oxygenase-1 (HO-1) enzyme activity inhibitors on Cd-induced accumulation of HO-1, HSPs and aggresome-like structures in *Xenopus* kidney epithelial cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 210, 1–17.
- Chahardehi AM, Arsad H, Lim V (2020). Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants* 9 (10), 1–35.
- Christensen JR, Bishop CA, Richardson JS, Pauli B, Elliott J (2004). Validation of an amphibian sperm inhibition toxicological test method using zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23 (12), 2950–2955.
- Collins J, Crump M (2009). Extinction in our times: global amphibian decline. Oxford University Press. Oxford, 273 pp.
- Curzer HJ, Perry G, Wallace MC, Perry D (2015). The Three Rs of Animal Research: What they Mean for the Institutional Animal Care and Use Committee and Why. *Science and Engineering Ethics* 22 (2), 549–565.
- Davidson C, Shaffer HB, Jennings MR (2001). Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat, and pesticides hypotheses. *Ecological Applications* 11 (2), 464–479.
- Davidson C, Shaffer HB, Jennings MR (2002). Spatial Tests of the Pesticide Drift, Habitat Destruction, UV-B, and Climate-Change Hypotheses for California Amphibian Declines. *Conservation Biology* 16 (6), 1588–1601.
- de Schroeder TMF, de D'Angelo AMP (1995). Dieldrin modifies the hydrolysis of PIP₂ and decreases the fertilization rate in *Bufo arenarum* oocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 112 (1), 61–67.
- Doke SK, Dhawale SC (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* 23 (3), 223.
- Dumpert K, Zietz E (1984). Platanna (*Xenopus laevis*) as a test organism for determining the embryotoxic effects of environmental chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 8 (1), 55–74.
- Dunson WA, Wyman RL, Corbett ES (1992). A Symposium on Amphibian Declines and Habitat Acidification. *Journal of Herpetology* 26 (4).
- Egea-Serrano A, Relyea RA, Tejedo M, Torralva M (2012). Understanding of the impact of chemicals on amphibians: a meta-analytic review. *Ecology and Evolution* 2 (7), 1382–1397.
- Eigenbrod F, Hecnar SJ, Fahrig L (2007). Accessible habitat: an improved measure of the effects of habitat loss and roads on wildlife populations. *Landscape Ecology* 23 (2), 159–168.

- Ellinger MS, Sharif S, BeMiller PM (1983). Amphibian cell culture: Established fibroblastic line from embryos of the discoglossid frog, *Bombina orientalis*. *In Vitro* 19 (5), 429–434.
- Faurskov B, Bjerregaard HF (1997). Effect of cadmium on active ion transport and cytotoxicity in cultured renal epithelial cells (A6). *Toxicology in Vitro* 11 (5), 717–722.
- Faurskov B, Bjerregaard HF (1999). Effect of Cisplatin on Transepithelial Resistance and Ion Transport in the A6 Renal Epithelial Cell Line. *Toxicology in Vitro* 13 (4–5), 611–617.
- Fernando VAK, Weerasena J, Lakraj GP, Perera IC, Dangalle CD, Handunnetti S, Premawansa S, Wijesinghe, MR (2016). Lethal and sub-lethal effects on the Asian common toad *Duttaphrynus melanostictus* from exposure to hexavalent chromium. *Aquatic Toxicology* 177, 98–105.
- Ferrell Jr JE (1999). *Xenopus* oocyte maturation: New lessons from a good egg. *BioEssays* 21 (10), 833–842.
- Freed JJ, Mezger-Freed L (1970). Stable Haploid Cultured Cell Lines from frog Embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 65 (2), 337–344.
- Friberg L (1986) Cadmium. In Handbook & the Toxicology of Metals. Editado por Friberg L, Nordberg GF e Vouk VB. pp. 130-184. Elsevier, Amsterdam.
- Ghallab, A. (2013). In vitro test systems and their limitations. *EXCLI Journal*, 12, 1024–1026.
- Ghoneum M, Cooper EL, Smith C (1987). Inhibition of SK cell activity in frogs by certain drugs and sugars. *Developmental & Comparative Immunology* 11 (2), 363–373.
- Gillan KA, Hasspieler BM, Russell RW, Adeli K, Haffner GD (1998). Ecotoxicological Studies in Amphibian Populations of Southern Ontario. *Journal of Great Lakes Research* 24 (1), 45–54.
- Gorochategui E, Lacorte S, Tauler R, Martin FL (2016). Perfluoroalkylated Substance Effects in *Xenopus laevis* A6 Kidney Epithelial Cells Determined by ATR-FTIR Spectroscopy and Chemometric Analysis. *Chemical Research in Toxicology* 29 (5), 924–932.
- Graudejus O, Ponce Wong R, Varghese N, Wagner S, Morrison B (2018). Bridging the gap between in vivo and in vitro research: Reproducing in vitro the mechanical and electrical environment of cells in vivo. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12
- Gurdon JB, Hopwood N (2000). The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *The International Journal of Developmental Biology* 44 (1), 43–50.
- Harper EB, Rittenhouse TAG, Semlitsch RD (2008). Demographic consequences of terrestrial habitat loss for pool-breeding amphibians: predicting extinction risks associated with inadequate size of buffer zones. *Conservation biology* 22 (5), 1205–1215.
- Hayes TB, Falso P, Gallipeau S, Stice M (2010). The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *The Journal of Experimental Biology* 213 (6), 921.
- Hedberg, D., & Wallin, M. (2010). Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicology in Vitro*, 24(3), 795–802. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2009.12.020>
- Herber RFM (1994). Cadmium. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* 15 (C), 321–338.
- Hoover G, Kar S, Guffey S, Leszczynski J, Sepúlveda MS (2019). In vitro and in silico modeling of perfluoroalkyl substances mixture toxicity in an amphibian fibroblast cell line. *Chemosphere* 233, 25–33.
- Houlahan JE, Fiday CS, Schmidt BR, Meyer AH, Kuzmin SL (2000). Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404 (6779), 752–755.
- Hubrecht RC, Carter E (2019). The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. *Animals: An Open Access Journal from MDPI* 9 (10).
- Islam A, Malik MF (2018). Impact of Pesticides on Amphibians: A Review. *Journal of Toxicological Analysis* 1 (2), 3.
- Iuga A, Lerner E, Shedd TR, Schalie WH van der. (2009). Rapid responses of a melanophore cell line to chemical contaminants in water. *Journal of Applied Toxicology* 29 (4), 346–349.
- Iwamoto DV, Kurylo CM, Schorling KM, Powell WH (2012). Induction of cytochrome P450 family 1 mRNAs and activities in a cell line from the frog *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology* 114–115, 165–172.
- Johnson MS, Aubee C, Salice CJ, Leigh KB, Liu E, Pott U, Pillard D (2017). A review of ecological risk assessment methods for amphibians: Comparative assessment of testing methodologies and available data. *Integrated Environmental Assessment and Management* 13 (4), 601–613.
- Kaneko M, Okada R, Yamamoto K, Nakamura M, Mosconi G, Polzonetti-Magni AM, Kikuyama S (2008). Bisphenol A acts differently from and independently of thyroid hormone in suppressing thyrotropin release from the bullfrog pituitary. *General and Comparative Endocrinology* 155 (3), 574–580.
- Kaur G, Dufour JM (2012). Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2 (1), 1.

- Khamis I, Heikkila JJ (2018). Effect of isothiocyanates, BITC and PEITC, on stress protein accumulation, protein aggregation and aggresome-like structure formation in *Xenopus* A6 kidney epithelial cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 204, 1–13.
- Knight VB, Serrano EE (2006). Tissue and species differences in the application of quantum dots as probes for biomolecular targets in the inner ear and kidney. *IEEE Transactions on Nanobioscience* 5 (4), 251–262.
- Langlois VS (2021). Amphibian Toxicology: A Rich But Underappreciated Model for Ecotoxicology Research. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 80 (4), 661–662.
- Laub LB, Jones BD, Powell WH (2010). Responsiveness of a *Xenopus laevis* cell line to the aryl hydrocarbon receptor ligands 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Chemico-Biological Interactions* 183 (1), 202–211.
- Lavine JA, Rowatt AJ, Klimova T, Whittington AJ, Dengler E, Beck C, Powell WH (2005). Aryl Hydrocarbon Receptors in the Frog *Xenopus laevis*: Two AhR1 Paralogs Exhibit Low Affinity for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD). *Toxicological Sciences* 88 (1), 60–72.
- Lessman CA, Kessel RG (1992). Effects of acrylamide on germinal vesicle migration and dissolution in oocytes of the frog, *Rana pipiens*. *Experimental Cell Research* 202 (1), 151–160.
- Liu LS, Zhao LY, Wang SH, Jiang JP (2016). Research proceedings on amphibian model organisms. *Zoological Research* 37 (4), 237–245.
- Machaca K (2007). Ca²⁺ signaling differentiation during oocyte maturation. *Journal of Cellular Physiology* 213 (2), 331–340.
- Marchand G, Wambang N, Pellegrini S, Molinaro C, Martoriati A, Bousquet T, Markey A, Lescuyer-Rousseau A, Bodart JF, Cailliau K, Pelinski L, Marin M (2020). Effects of Ferrocenyl 4-(Imino)-1,4-Dihydro-quinolines on *Xenopus laevis* Prophase I - Arrested Oocytes: Survival and Hormonal-Induced M-Phase Entry. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (9), 3049.
- Marin M (2012). Calcium Signaling in *Xenopus* oocyte. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 740, 1073–1094.
- Marin M, Slaby S, Marchand G, Demuynck S, Friscourt N, Gelaude A, Lemièrre S, Bodart JF (2015). *Xenopus laevis* oocyte maturation is affected by metal chlorides. *Toxicology in Vitro* 29 (5), 1124–1131.
- Mouchet F, Baudrimont M, Gonzalez P, Cuenot Y, Bourdineaud JP, Boudou A, Gauthier L (2006). Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquatic Toxicology* 78 (2), 157–166.
- Music E, Khan S, Khamis I, Heikkila JJ (2014). Accumulation of heme oxygenase-1 (HSP32) in *Xenopus laevis* A6 kidney epithelial cells treated with sodium arsenite, cadmium chloride or proteasomal inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 166, 75–87.
- OECD. (2018). Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP). OECD Publishing, 1(286), 1–264.
- Patar A, Giri A, Boro F, Bhuyan K, Singha U, Giri S (2016). Cadmium pollution and amphibians – Studies in tadpoles of *Rana limnocharis*. *Chemosphere* 144, 1043–1049.
- Pays A, Hubert E, Brachet J (1977). A Comparison between Organomercurial- and Progesterone-Induced Maturation in Amphibian Oocytes. *Differentiation* 8 (1–3), 79–95.
- Pechmann JHK, Scott DE, Semlitsch RD, Caldwell JP, Vitt LJ, Gibbons JW (1991). Declining amphibian populations: The problem of separating human impacts from natural fluctuations. *Science* 253 (5022), 892–895.
- Perkins FM, Handler JS (1981). Transport properties of toad kidney epithelia in culture. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 241 (3), C154-C159.
- Pickford DB, Jones A, Velez-Pelez A, Iguchi T, Mitsui N, Tooi O (2015). Screening breeding sites of the common toad (*Bufo bufo*) in England and Wales for evidence of endocrine disrupting activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 117, 7–19.
- Pounds JA, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, La Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Ron SR, Sánchez-Azofeifa G, Still CJ, Young BE (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 439 (7073), 161–167.
- Pudney M, Varma MGR, Leake CJ (1973). Establishment of a cell line (XTC-2) from the South African clawed toad, *Xenopus laevis*. *Experientia* 29 (4), 466–467.
- Quaranta A, Bellantuono V, Cassano G, Lippe C (2009). Why Amphibians Are More Sensitive than Mammals to Xenobiotics. *PLOS ONE* 4 (11), e7699.
- Rehberger K, Kropf C, Segner H (2018). In vitro or not in vitro: a short journey through a long history. *Environmental Sciences Europe* 30 (1), 1–12.
- Rokaw MD, Sarac E, Lechman E, West M, Angeski J, Johnson JP, Zeidel ML (1996). Chronic regulation of transepithelial Na⁺ transport by the rate of apical Na⁺ entry. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 270 (2), C600-C607.

- Ruiz de Arcaute C, Brodeur JC, Soloneski S, Larramendy ML (2020). Toxicity to *Rhinella arenarum* tadpoles (*Anura*, *Bufo*) of herbicide mixtures commonly used to treat fallow containing resistant weeds: glyphosate–dicamba and glyphosate–flurochloridone. *Chemosphere* 245, 125623.
- Russell WMS, Burch RL (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.
- Sany SBT, Hashim R, Rezayi M, Rahman MA, Razavizadeh BBM, Abouzari-Iotf E, Karlen DJ (2015). Integrated ecological risk assessment of dioxin compounds. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (15), 11193–11208.
- Saria R, Mouchet F, Perrault A, Flahaut E, Laplanche C, Boutonnet JC, Pinelli E, Gauthier L (2014). Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in *Xenopus laevis* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107, 22–29.
- Schultz TW, Dawson DA (2003). Housing and husbandry of *Xenopus* for oocyte production. *Lab Animal*, 32 (2), 34–39.
- Schuppli AC, Fraser D, McDonald M (2004). Expanding the three Rs to meet new challenges in humane animal experimentation. *Alternatives to Laboratory Animals* 32 (5), 525–532.
- Shirriff CS, Heikkilä JJ (2017). Characterization of cadmium chloride-induced BiP accumulation in *Xenopus laevis* A6 kidney epithelial cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 191, 117–128.
- Shmerling ZG, Skoblina MN (1978). The action of ethidium bromide and chloramphenicol on the steroidogenesis induced by gonadotrophic hormones in the ovaries of amphibia and mammals. *General and Comparative Endocrinology* 35 (4), 355–359.
- Slaby S, Hanotel J, Marchand G, Lescuyer A, Bodart JF, Leprêtre A, Lemièrre S, Marin M. (2017). Maturation of *Xenopus laevis* oocytes under cadmium and lead exposures: Cell biology investigations. *Aquatic Toxicology* 193, 105–110.
- Smith JC, Tata JR (1991). Chapter 32 *Xenopus* Cell Lines. *Methods in Cell Biology* 36 (C), 635–654.
- Smith KG, Lips KR, Chase JM (2009). Selecting for extinction: nonrandom disease-associated extinction homogenizes amphibian biotas. *Ecology Letters* 12 (10), 1069–1078.
- Sparling DW, Fellers GM, Mcconnell LL (2001). Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (7), 1591–1595.
- Strong RJ, Halsall CJ, Jones KC, Shore RF, Martin FL (2016). Infrared spectroscopy detects changes in an amphibian cell line induced by fungicides: Comparison of single and mixture effects. *Aquatic Toxicology* 178, 8–18.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW (2004). Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* 306 (5702), 1783–1786.
- Taft JD, Colonna MM, Schafer RE, Plick N, Powell WH (2018). Dioxin Exposure Alters Molecular and Morphological Responses to Thyroid Hormone in *Xenopus laevis* Cultured Cells and Prometamorphic Tadpoles. *Toxicological Sciences* 161 (1), 196–206.
- Tardiff RG (1978). In vitro methods of toxicity evaluation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 18, 357–369.
- Thit A, Selck H, Bjerregaard HF (2013). Toxicity of CuO nanoparticles and Cu ions to tight epithelial cells from *Xenopus laevis* (A6): Effects on proliferation, cell cycle progression and cell death. *Toxicology in Vitro* 27 (5), 1596–1601.
- Thit A, Selck H, Bjerregaard HF (2015). Toxic mechanisms of copper oxide nanoparticles in epithelial kidney cells. *Toxicology in Vitro* 29 (5), 1053–1059.
- Veldhoen N, Skirrow RC, Osachoff H, Wigmore H, Clapson DJ, Gunderson MP, Van Aggelen C, Helbing CC (2006). The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology* 80 (3), 217–227.
- Vitt LJ, Caldwell JP, Wilbur HM, Smith DC (1990). Amphibians as harbingers of decay. *BioScience* 40 (6), 418–418.
- Walcott SE, Heikkilä JJ (2010). Celastrol can inhibit proteasome activity and upregulate the expression of heat shock protein genes, hsp30 and hsp70, in *Xenopus laevis* A6 cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 156 (2), 285–293.
- Wolf K, Quimby MC (1964). Amphibian cell culture: Permanent cell line from the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Science* 144 (3626), 1578–1580.
- Woolfson JP, Heikkilä JJ (2009). Examination of cadmium-induced expression of the small heat shock protein gene, hsp30, in *Xenopus laevis* A6 kidney epithelial cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 152 (1), 91–99.
- Wurtz N, Penant G, Jardot P, Duclos N, La Scola B (2021). Culture of SARS-CoV-2 in a panel of laboratory cell lines, permissivity, and differences in growth profile. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 40 (3), 477–484.
- Zhang X, Giesy JP, Hecker M (2013). Cell Lines in Aquatic Toxicology. In: Féraud JF, Blaise C (eds) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht.