

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL DO *CAMPUS* SOROCABA

Mariana Tábata Oschvat Valala

**MÉTODOS ALTERNATIVOS E MENOS INVASIVOS PARA O
BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL: REVISÃO SISTEMÁTICA E
ADAPTAÇÃO DE GLICOSÍMETROS PORTÁTEIS PARA ESTUDOS COM
ANFÍBIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e
Monitoramento Ambiental para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia e
Monitoramento Ambiental

Orientação: Prof. Dra. Raquel Fernanda
Salla

Financiamento: CAPES/CNPq

Sorocaba

2023

(verso da folha de rosto)

Oschvat Valala, Mariana Tábata

Métodos alternativos e menos invasivos para o biomonitoramento ambiental: revisão sistemática e adaptação de glicosímetros portáteis para estudos com anfíbios / Mariana Tábata Oschvat Valala -- 2023. 47f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Raquel Fernanda Salla Jacob
Banca Examinadora: Eliane Pintor de Arruda Moraes, Cristiane Ronchi de Oliveira
Bibliografia

1. Métodos alternativos. 2. Anfíbios. 3. Biomonitoramento. I. Oschvat Valala, Mariana Tábata. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano - CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Mariana Tábata Oschvat Valala, realizada em 15/09/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Raquel Fernanda Salla Jacob (UFSCar)



Documento assinado digitalmente
RAQUEL FERNANDA SALLA JACOB
Data: 22/09/2023 22:29:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Eliane Pintor de Arruda Moraes (UFSCar)



Documento assinado digitalmente
ELIANE PINTOR DE ARRUDA MORAES
Data: 23/09/2023 15:45:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Cristiane Ronchi de Oliveira (UNIANCHIETA)



Documento assinado digitalmente
CRISTIANE RONCHI DE OLIVEIRA
Data: 26/09/2023 11:21:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Maurício e Vera, à minha irmã, Leila e
a mim, por todos os anos de esforço e
dedicação colocados no mundo
acadêmico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maurício e Vera, por todos os anos de acompanhamento, apoio e incentivo;

À minha irmã, Leila, pelo apoio e incentivo;

Ao meu amigo, Ivan Almeida, pela parceria e apoio;

À minha amiga, Mariana Richieri, pela parceria e apoio;

Ao meu amigo, Leonel Silva, pela parceria e apoio;

Aos meus amigos de academia, pelas horas de diversão e treino, que foram importantes para aliviar o estresse;

Aos meus parentes e amigos que torceram por mim;

À Profa. Dra. Mônica Jones Costa, pelo apoio;

À minha incrível orientadora, Profa. Dra. Raquel Fernanda Salla, por todo seu carinho, acompanhamento, ajuda e incentivo; sem ela, não teria sido possível a elaboração desta tese.

À CAPES, pela bolsa concedida durante esse período;

À UFSCar, por todos esses anos de aprendizado e oportunidade de formação acadêmica, visando sempre a mais realizações.

RESUMO

OSCHVAT VALALA, M.T. Métodos Alternativos e Menos Invasivos para o Biomonitoramento Ambiental: Revisão Sistemática e Adaptação de Glicosímetros Portáteis para Estudos com Anfíbios. 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental em Programa de Biotecnologia e Monitoramento Ambiental– Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2023.

Os anfíbios são um grupo de vertebrados que tem sofrido grande declínio nos últimos anos devido à grande interferência antrópica no ambiente, causando perda de habitat, inclusão de espécies invasoras e a propagação de doenças. Esses fatores têm contribuído para a extinção de espécies e diminuição de diferentes populações. Tendo esses problemas em vista, cada vez mais há a preocupação em se fazer pesquisas minimamente invasivas, conservando ao máximo a integridade e o bem estar dos espécimes, proporcionando uma pesquisa de qualidade e com resultados confiáveis. Sendo assim, para esta dissertação de mestrado, foi realizada uma revisão sistemática acrescida de uma análise cientométrica de artigos científicos sobre métodos alternativos menos invasivos (os quais totalizaram 61 artigos). Além disso, foi feita uma análise de como aparelhos glicosímetros portáteis podem ser adaptados aos estudos com anfíbios como um método menos invasivo para a coleta de dados de glicemia como um potencial biomarcador indicativo de estresse. A revisão sistemática revelou diversas áreas de pesquisa nas quais os métodos alternativos e menos invasivos vêm sendo aplicados em estudos com anfíbios, incluindo desde análises moleculares, medidas morfométricas, análises moleculares, e de marcação de indivíduos, exames de imagem, até mesmo a reutilização de carcaças de animais que foram atropelados em estradas para a obtenção de amostras biológicas. Apesar da relevância da aplicação destes métodos, urge a necessidade de incentivos para que os cientistas ampliem a adaptação dessas metodologias em seus estudos, em especial nas áreas de monitoramento ambiental e ecotoxicologia, nas quais o uso de modelos animais é frequente. No segundo capítulo da dissertação, a comparação entre os valores de glicemia entre machos e fêmeas de *R. ictérica* mostrou que não houve diferença significativa entre os sexos para os valores obtidos através do glicosímetro portátil ($F = 1,15$; $p = 0,63$), tampouco para o método analítico bioquímico ($F = 1,047$; $p = 0,66$), indicando valores glicêmicos homogêneos. Ao agrupar os dados de cada como independentes, os valores médios de glicemia foram similares ($F = 1.050$; $p = 0.4819$), o que não ocorreu quando dependentes, apresentando diferenças significativas ($p < 0.0001$; $r = 0.979$). Dessa forma, ficou mostrado que o glicosímetro é eficiente, mas tende a superestimar níveis glicêmicos.

Palavras – chave: anuros; extinção; biomarcadores alternativos; métodos não-destrutivos; revisão sistemática.

ABSTRACT

Amphibians are a group of vertebrates that have had a great decline in recent years due to the great anthropic interference in the environment, causing loss of habitat, inclusion of invasive species and the manifestation of diseases. These factors contributed to the extension of species and the decrease of different individuals. With these problems in mind, there is an increasing concern to conduct minimally invasive research, preserving the integrity and well-being of the specimens as much as possible, and providing quality research with satisfactory results. Therefore, for this master's thesis, a systematic review was carried out plus a scientometric analysis of scientific articles on alternative less invasive methods (which totaled 61 articles). In addition, an analysis was made of how portable glucometers can be adapted to studies with amphibians as a less invasive method for collecting blood glucose data as a potential biomarker indicative of stress. The systemic review revealed several areas of research in which alternative and less invasive methods have been applied in studies with amphibians, including molecular analyses, morphometric measurements, molecular analyses, and marking of individuals, imaging exams, even the reuse of carcasses of animals that were run over on roads to obtain biological certification. Despite the application of these methods, there is an urgent need for incentives for scientists to expand the adaptation of these methodologies in their studies, especially in the areas of environmental monitoring and ecotoxicology, in which the use of animal models is frequent. In the second chapter of the dissertation, the comparison between the blood glucose values between males and females of *R. ictérica* showed that there was no significant difference between the sexes for the values obtained through the portable glucometer ($F = 1.15$; $p = 0.63$), followed by the biochemical analytical method ($F = 1.047$; $p = 0.66$), indicating homogeneous glyceic values. When grouping the data of each as independent, the mean blood glucose values were similar ($F = 1.050$; $p = 0.4819$), which did not occur when dependent, showing difference in incidence ($p < 0.0001$; $r = 0.979$). Thus, it was shown that the glucometer is efficient, but tends to overestimate the glyceic levels.

Keywords: frogs; extinction; alternative biomarkers; non-destructive methods; systematic review.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1 – Distribuição temporal dos artigos	24
Figura 2 – Distribuição geográfica dos artigos	25
Figura 3 – Representação gráfica do estágio de desenvolvimento	26
Figura 4 – Representação gráfica do número de machos e fêmeas	27
Figura 5 - Representação gráfica do número de ordens	28
Figura 6 - Representação gráfica do número de gêneros	28
Figura 7: Representação gráfica do número de artigos publicados	29
Figura 8: Representação gráfica das revistas	30

ARTIGO 2

Figura 1 – Concentrações plasmáticas de glicemia	73
Figura 2 – Concentrações glicêmicas e distribuição pareada	74

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.2 Fundamentação Teórica	12
1.2.1 Os anfíbios como bioindicadores	12
1.2.2 A ciência em busca dos “3Rs”: destacando os métodos alternativos na experimentação com anfíbios	15
2. OBJETIVOS	17
3. ARTIGO 1	19
3.1 Introdução	21
3.2 Materiais e Métodos	22
3.2.1 Levantamento bibliográfico para a revisão sistemática	22
3.3 Resultados e Discussão	23
3.3.1 Análise cientométrica dos dados	23
3.3.2 Descrição narrativa dos dados	30
3.3.2.1 Métodos de captura e marcação de anfíbios para identificação	30
3.3.2.2 Métodos alternativos para biomarcadores endócrinos	34
3.3.2.3 Métodos menos invasivos para biomarcadores moleculares	36
3.3.2.4 Métodos de exames por imagem	38
3.3.2.5 Métodos morfométricos	40
3.3.2.6 Métodos alternativos temperatura	42
3.3.2.7 Outros métodos	43
3.4 Conclusões	45
REFERÊNCIAS	46
4. ARTIGO 2	67
4.1 Introdução	69
4.2 Materiais e Métodos	72
4.3 Resultados e Discussão	73
4.4 Conclusões	76

REFERÊNCIAS	76
5. REFERÊNCIAS GERAIS	84
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS	91

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os anfíbios (que incluem os animais conhecidos como sapos, rãs, pererecas, salamandras, cecílias e tritões) (Wells, 2007) são organismos considerados indicadores ambientais (bioindicadores) de grande importância em termos de conservação, equilíbrio do ecossistema e qualidade do ambiente (Hopkins, 2007, Sewell; Griffiths, 2009). No entanto, apesar da sua importância ecológica, suas populações têm sofrido um drástico declínio nos últimos 30 anos por causa de diversas ações antrópicas, as quais vêm contribuindo com esses declínios (Grant *et al.*, 2020). Dentre as principais ameaças, destacam-se a destruição de seus habitats como consequência do desmatamento, do avanço da fronteira agrícola, da mineração, das queimadas e do avanço da urbanização (Collins; Storfer, 2003). Além disso, diversas outras ações antropogênicas vêm sendo elencadas como potenciais contribuintes para o declínio dos anfíbios, incluindo os contaminantes aquáticos, como os agrotóxicos (Hayes *et al.*, 2006), introdução de espécies exóticas (Collins, 2010), alterações climáticas como a elevação da temperatura, fenômenos climáticos e aumento da radiação ultravioleta (Blaustein *et al.*, 2003), além do aumento das doenças emergentes como a quitridiomicose (Fisher ; Garner, 2020) e a ranavirose (Price *et al.*, 2014).

Por possuírem um ciclo de vida bifásico (fases aquática e terrestre), bem como uma pele altamente permeável e vascularizada, os anfíbios são considerados organismos altamente sensíveis às alterações ambientais, podendo facilmente absorver diversos contaminantes (Llewelyn *et al.*, 2019). Portanto, esse grupo de vertebrados vem se destacando entre as pesquisas ambientais e fisiológicas (Burggren ; Warburton, 2007; Hopkins, 2007), utilizando-se como base de estudo os biomarcadores de qualidade ambiental (Calderon *et al.*, 2022).

Biomarcadores são alterações biológicas (a nível bioquímico, celular, fisiológico ou comportamental) que podem ser mensuradas através da análise de tecidos, fluidos corpóreos ou até mesmo através de avaliações do organismo como um todo, as quais fornecem evidência de uma exposição e/ou dos efeitos causados por uma alteração ambiental ou por agentes poluentes (Depledge, 1994; Ali *et al.*, 2021). No ramo da herpetologia, diversos biomarcadores têm se mostrado úteis em estudos de monitoramento ambiental, incluindo análises cardíacas (Dal - Medico *et al.*, 2014, Salla *et al.*, 2020), hematológicas (Oliveira *et al.*, 2018), morfológicas (Vidal, 2019), bioquímicas (Carvalho *et al.*, 2020), entre outras.

No entanto, apesar da ampla utilidade dos biomarcadores para o monitoramento ambiental, muitas dessas análises podem depender de procedimentos invasivos,

envolvendo desde a simples coleta e manipulação dos anfíbios (Salla *et al.*, 2020; De Lacerda Valverde *et al.*, 2022), procedimentos cirúrgicos com uso de anestésicos (Silva *et al.*, 2020; Corno *et al.*, 2022), ou até mesmo a morte dos animais para a coleta de amostras biológicas (Salla *et al.*, 2020; Álvarez - Vergara *et al.*, 2022; Van Meter *et al.*, 2022). Além disso, em países como o Brasil, que frequentemente enfrenta limitações econômicas e escassez de investimento em pesquisa científica, os cientistas acabam passando por grandes dificuldades para a obtenção de recursos tecnológicos, equipamentos e reagentes químicos para as análises (Galvão - Castro *et al.*, 2022), o que acaba limitando a possibilidade de os pesquisadores investirem em técnicas alternativas. Além disso, se considerarmos a grande quantidade de espécies de anfíbios que estão em declínio por todo o mundo (IUCN, 2021), a utilização de procedimentos invasivos pode limitar a obtenção de um número amostral adequado, a fim de evitar um desequilíbrio das populações naturais, o que pode inviabilizar a realização de diversas pesquisas com essas espécies.

Portanto, tendo em vista a necessidade de mais pesquisas que auxiliem na conservação dos anfíbios, bem como viabilizem a adaptação de métodos alternativos e menos invasivos na experimentação animal, a presente dissertação de mestrado objetivou compilar dados bibliográficos acerca dos métodos alternativos não destrutivos que vem sendo aplicados em estudos com anfíbios. Para tanto, realizou-se o levantamento bibliográfico de artigos científicos para a elaboração de uma revisão sistemática sobre esse tema. Além disso, foi analisada também a viabilidade e eficiência da adaptação de aparelhos glicosímetros portáteis humanos para a obtenção do índice glicêmico dos anfíbios como um indicador indireto de estresse fisiológico, visando à utilização em estudos de monitoramento ambiental.

O presente estudo tem caráter inovador ao contemplar a primeira revisão sistemática destacando a utilidade de diversos métodos alternativos menos invasivos como potenciais ferramentas para estudos de biomonitoramento ambiental com anfíbios, os quais também poderão ser futuramente adaptados e extrapolados para outras espécies e grupos animais. Ademais, a proposição de métodos alternativos para a experimentação científica não somente promove uma atuação mais responsável quanto ao bem - estar animal, mas também pode viabilizar e ampliar os estudos nas áreas de ecologia, fisiologia e monitoramento ambiental.

1.2. Fundamentação Teórica

1.2.1. Os anfíbios como bioindicadores

Os anfíbios contemplam um grupo de organismos que podem ser subdivididos em três ordens: anura (comumente conhecidos como sapos, rãs e pererecas), caudata (salamandras e tritões) e apoda ou Gymnophiona (cobras-cegas) (Frost, 2011). Atualmente, os anfíbios pertencentes à ordem Anura são os mais numerosos, correspondendo a 7.259 espécies de um total de 8.234 espécies de anfíbios. O Brasil é considerado o país detentor da maior riqueza de espécies de anfíbios do mundo, totalizando em 1.039 espécies de anuros (Jared; Antoniazzi, 2009; SBH, 2016). As salamandras compreendem a segunda maior ordem de anfíbios com 762 espécies, e a ordem das cecílias, menos numerosa, contempla 213 espécies (ASW, 2022; Frost, 2011).

Esses animais são ectotérmicos e possuem um ciclo de vida aquático (fase larval) e terrestre (na fase adulta), porém, ainda são dependentes da água para a reprodução (Vences; Köhler, 2008). Um aspecto bastante característico e que une essas três ordens é o fato de possuírem uma pele delgada e permeável com a presença de glândulas mucosas e granulares (glândulas de veneno) (Haslam *et al.*, 2014; Lillywhite, 2006).

Apesar de sua ampla diversidade, os anfíbios vêm sofrendo graves declínios em suas populações a nível mundial (Grant; Miller; Muths, 2020) e atualmente representam o grupo mais ameaçado dentre os vertebrados (Cordier *et al.*, 2020). As taxas de extinções atuais são tão expressivas que as comunidades científicas já consideram que estamos atravessando a “Sexta Grande Extinção em Massa” de espécies no planeta (Ceballos; Ehrlich; Raven, 2020): estima-se que mais de 70% das espécies de anfíbios estejam em declínio (Hayes *et al.*, 2010) e cerca de 40% estão ameaçadas de extinção (IUCN, 2020).

Apesar de não haver uma causa única para a extinção global dos anfíbios, três níveis hierárquicos têm sido propostos para explicar esse fenômeno (Hayes *et al.*, 2010). No primeiro nível, as causas imediatas do declínio das populações de anfíbios têm sido atribuídas à alta mortalidade dos indivíduos (Hayes *et al.*, 2010). No segundo nível, existem causas imediatas que contribuem para as mortes individuais e para o declínio das populações, como a predação, a superexploração humana, a diminuição da nutrição, eventos catastróficos que levam a mortes acidentais, patógenos e parasitas (Hayes *et al.*, 2010). Finalmente, as últimas causas (terceiro nível) consistem nas mudanças globais, como a poluição ambiental, a modificação do habitat e a introdução de espécies exóticas (May, 2010; Hayes *et al.*, 2010). Essas últimas causas estão intimamente ligadas ao processo de mudança global e podem afetar profundamente os efeitos patogênicos dos parasitas em populações de anfíbios. Os fatores que impulsionam as mudanças globais podem ter vastos efeitos na transmissão de parasitas transmitidos por vetores a humanos, rebanhos e animais silvestres (Daszak *et al.*, 2000; Sutherst, 2004). Além disso, um aumento na temperatura pode levar ao desenvolvimento mais rápido dos patógenos e da

mortalidade dos hospedeiros. Aliado a esses fatores, a constante liberação de poluentes químicos como agrotóxicos e desreguladores endócrinos nos corpos aquáticos pode afetar as comunidades biológicas desses habitats, também prejudicando o sistema imunológico desses organismos, e conseqüentemente tornando as populações ainda mais vulneráveis a infecções por patógenos (Sutherst *et al.*, 2004).

No que concerne à alteração da paisagem pelo homem, a fragmentação dos habitats naturais pode levar ao isolamento demográfico e genético das populações de anfíbios (Marsh; Trenham, 2001). Esses fatores podem estar ligados à perda de heterozigidade nas populações, e conseqüentemente, também ao aumento de infecções e da susceptibilidade a patógenos (Altizer *et al.*, 2003). Novos patógenos introduzidos por espécies exóticas são também um fator importante para o declínio de populações nativas de anfíbios (Kupferberg *et al.*, 2009). Como exemplo disso podemos citar a introdução da espécie *Xenopus laevis*, a qual foi uma das grandes responsáveis pela disseminação do fungo quitrídio *Batrachochytrium dendrobatidis*, que gerou o surto da doença conhecida como quitridiomicose (Weldon *et al.*, 2004; Schloegel *et al.*, 2009).

Diante destes declínios e da urgência em reforçar a conservação desses grupos, é importante destacar que os anfíbios são organismos de grande relevância em termos de serviços ecossistêmicos providos à humanidade (Valencia - Aguilar; Cortés - Gómez; Ruiz - Aguedo, 2013; West, 2018). Na esfera econômica os anfíbios nos provêm serviços de provisionamento, sendo criados na ranicultura para a comercialização de carne de rã (Hocking; Babbitt, 2014). No entanto, sua utilidade econômica não é a única nem a mais importante razão pela qual devemos conservar a biodiversidade desses organismos: todos os seres contribuem direta ou indiretamente com a humanidade, através de diversos outros serviços ecossistêmicos (Collins; Crump; Lovejoy, 2009). Na esfera ambiental, os anfíbios também possuem uma vasta relevância ecológica ao participar do fluxo de energia e de nutrientes dos ecossistemas aquáticos e terrestres, além de auxiliar no controle e equilíbrio de pestes agrícolas (Valencia - Aguiar; Cortés - Gómez; Ruiz - Aguedo, 2013). Diversas espécies de anfíbios também são predadoras naturais de larvas e mosquitos adultos que eventualmente são transmissores de doenças tropicais humanas (como a própria dengue, leishmaniose, etc) (Hocking; Babbitt, 2014). Culturalmente, os anfíbios também estão presentes em diversas lendas e conhecimentos tradicionais, (Salla; Costa; Fernandes, 2017), além de serem utilizados em rituais e no tratamento de doenças por diversas tribos indígenas (Valencia - Aguiar; Cortés - Gomez, Ruiz - Aguedo, 2013).

Na área farmacêutica, diversos compostos já foram identificados e isolados da pele e/ou de toxinas de anfíbios e puderam ser aplicados no desenvolvimento de produtos de ação medicinal, como agentes antimicrobianos (Azevedo *et al.*, 2011), vasodilatadores

(Daly *et al.*, 1992) e até mesmo analgésicos (Elguero; Campillo; Páez, 1996). Ainda dentro do ramo científico, os anfíbios têm uma longa história de utilização como modelos de pesquisa, sendo extensamente empregados em estudos de desenvolvimento embrionário, regeneração e funções fisiológicas (Burggren ; Warburton, 2007; Hopkins, 2007). Até mesmo na medicina os anfíbios são frequentemente utilizados como modelos de estudos fisiológicos para a compreensão de mecanismos regenerativos, devido à ampla capacidade de regeneração tecidual (especialmente de membros e cauda) de algumas espécies (Tseng *et al.*, 2010). Esses estudos vêm auxiliando os pesquisadores a compreender quais mecanismos celulares podem estar envolvidos nos processos de regeneração celular desses organismos para posteriormente aplicar esse conhecimento em avanços medicinais humanos, como o tratamento de doenças degenerativas e enxertos em casos de acidentes ou queimaduras graves (Tseng *et al.*, 2010).

Para as pesquisas de monitoramento ambiental, os anfíbios são considerados organismos extremamente sensíveis a alterações ambientais, de modo que podem ser utilizados como organismos sentinelas e bioindicadores da qualidade ambiental (Calderon *et al.*, 2022). Dessa forma, a presença de alterações biológicas observáveis nos anfíbios, bem como o próprio declínio de suas populações, atua como indicativos de problemas ambientais mais amplos e com potenciais implicações sistêmicas (Hocking; Babbitt, 2014). A própria área da ecotoxicologia vem destacando o emprego dos anfíbios como modelos animais alternativos às pesquisas toxicológicas clássicas, como demonstrado pela grande quantidade de pesquisas de avaliação da ecotoxicidade de contaminantes sobre espécies anfíbias (Linder; Lehman; Bidwell, 2010).

Compreender e valorizar a contribuição dos anfíbios para o ecossistema e a humanidade pode auxiliar a priorizar e a angariar o suporte das instituições por medidas de conservação mais eficientes. Além disso, o conhecimento científico gerado a partir dos estudos com anfíbios podem nos ajudar a prever alterações bióticas e abióticas associadas ao declínio de diversas outras populações naturais (Sekercioglu *et al.*, 2004).

1.2.2. A Ciência em busca dos “3Rs”: destacando os métodos alternativos na experimentação com anfíbios.

Não somente o grupo dos anfíbios, mas diversos outros grupos de organismos vêm sofrendo alarmantes declínios e extinções pelo mundo (Turvey; Creeds, 2019). Tal situação extremamente crítica levou os cientistas de diversas convenções internacionais a levantar a necessidade de se criar medidas de caráter mais conservacionista, o que culminou na proposição dos famosos “Princípios dos 3 Rs” (Hocking; Babbitt, 2014). Propostos primeiramente por Russel e Burch há mais de 60 anos, os princípios dos “3Rs”

tinham como objetivo a implementação de métodos não - invasivos nas pesquisas com animais, as quais deveriam ser baseadas nos princípios de “substituição”, “redução” e “refinamento” (do inglês: *replace, reduce, refine*) (Russell; Burch, 1959). Brevemente, segundo tais princípios, os pesquisadores devem, sempre que possível, buscar substituir o uso de animais por métodos alternativos equivalentes, como técnicas *in vitro*, análises *in silico* ou simulações computacionais. Segundo o Conselho Europeu de Pesquisa, caso não haja a possibilidade de substituir o uso de animais, recomenda-se a substituição de vertebrados por outros animais mais basais que apresentem um menor potencial para a percepção de dor (Council of Europe, 1986). Adicionalmente, deve-se reduzir o número de animais de sua amostra experimental ao mínimo necessário para se obter dados estatisticamente relevantes. Por fim, deve-se refinar ou limitar quaisquer estímulos que possam gerar dor ou incômodos ao animal experimental (Russel; Burch, 1959).

Desde a sua proposição até os dias atuais, esses princípios se tornaram parte da legislação e de diretrizes institucionais que regulam a experimentação animal em diversos países pelo mundo (Sneddon *et al.*, 2017). Ao longo do tempo, a comunidade científica foi buscando se adequar aos princípios através do desenvolvimento de guias e protocolos padronizados para fins científicos (Buchanan *et al.*, 2015; Kilkenny *et al.*, 2010). No caso dos anfíbios especificamente, algumas instituições protocolaram guias com sessões herpetológicas que são reconhecidas internacionalmente, como por exemplo, a American Society of Ichthyologists and Herpetologists - ASIH (Beaupre *et al.*, 2004), a American Veterinary Medical Association - AVMA (Underwood; Anthony, 2020), e o AMPHITOX (Herkovits; Perez - Coll, 2003).

Embora os princípios dos “3Rs” tenham sido originalmente criados com base em animais modelos, suas diretrizes também devem ser aplicadas em pesquisas *in situ* ou que utilizam espécies nativas como organismos experimentais (Hocking; Babbitt, 2014). Infelizmente, a incorporação de métodos minimamente invasivos em pesquisas com anfíbios ainda é bastante limitada. Embora grande parte dos estudos com anfíbios priorize a utilização de espécies-modelo como *Aquarana catesbeiana* ou *Xenopus laevis*, a utilização de espécies nativas e neotropicais ainda permanece escassa (Verdade *et al.*, 2012), provavelmente devido às inúmeras limitações e variações que os estudos *in situ* proporcionam. De fato, pesquisas com populações naturais frequentemente enfrentam conflitos ao tentar buscar a manutenção do bem - estar individual dos organismos e a estabilidade da população e do ecossistema estudado. Dessa forma, compreender as especificidades das espécies nativas é de extrema importância, especialmente considerando sua ecologia particular, características filogenéticas e respostas ambientais que representem padrões mais realísticos (Guimarães *et al.*, 2011). Nesse sentido, a busca por métodos alternativos que sejam menos invasivos pode viabilizar a realização de

diversos estudos, ao proporcionar um ambiente de pesquisa que não gere danos nem desequilibre as populações naturais de anfíbios.

Além disso, diversas especificidades inerentes às diferentes espécies de anfíbios, bem como às condições de manutenção em biotérios ainda requerem melhorias quanto à legislação e regulamentação bioética. Conhecer as necessidades fisiológicas e as variações de comportamento social (como fotoperíodo, territorialidade e dominâncias hierárquicas) tem grande importância uma vez que estes fatores podem influenciar na alimentação e reprodução dos anfíbios (Pough, 2004; 2007; e.g. Gabor; Jaeger, 1995; Jaeger; Schwartz, 1991; Jaeger *et al.*, 1995; Murray; Jenkins, 1999; Simons *et al.*, 1997). Nesse sentido, as diretrizes determinadas para a experimentação com anfíbios ainda necessitam de grande evolução.

Apesar da grande relevância das pesquisas de caráter ambiental, a utilização de modelos biológicos vivos como amostras representativas de uma população natural frequentemente envolve procedimentos estressantes e invasivos que podem incluir a perseguição e captura dos animais na natureza (Salla *et al.*, 2020; De Lacerda Valverde *et al.*, 2022), clipagem ou amputações de dedos ou da cauda para marcação e reconhecimento de indivíduos (Clarke; Phillips; Shine, 2019; Donnelly *et al.*, 1994), punção para coleta de sangue (Davis; Maerz, 2022; Salinas *et al.*, 2017), ou até a própria eutanásia para obtenção de amostras de tecidos biológicos (Salla *et al.*, 2020; Alvarez - Vergara *et al.*, 2022; Van - Meter *et al.*, 2022). É importante considerar que os impactos desses procedimentos sobre o bem - estar dos organismos experimentais também podem implicar na própria confiabilidade dos resultados dos estudos, uma vez que diversos parâmetros comportamentais e fisiológicos podem ser influenciados por estímulos como dor e/ou estresse gerados nos animais (Brodeur *et al.*, 2020). Portanto, a busca por métodos alternativos e menos invasivos na pesquisa científica, seja ela com anfíbios ou outros organismos modelos, além de proporcionar uma conduta de pesquisa mais ética e responsável perante os organismos testes, também garante um maior refinamento da própria pesquisa. Nesse sentido, a realização da presente revisão sistemática tem como finalidade reunir os conhecimentos acerca da utilização de métodos menos invasivos e alternativos na pesquisa científica com os anfíbios. Espera-se que ao destacarmos estes métodos, possamos incentivar ainda mais cientistas a implementá-los em suas pesquisas.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista os pressupostos acima detalhados, a presente dissertação de mestrado objetivou:

- Realizar um levantamento bibliográfico de forma sistemática acerca dos métodos

menos invasivos que vem sendo aplicados em pesquisas com anfíbios;

- Testar a aplicação de aparelhos glicosímetros humanos em pesquisas com anfíbios como uma proposta de método alternativo.

3. ARTIGO 1

Métodos alternativos menos invasivos para o estudo de biomarcadores em anfíbios: revisão sistemática, tendências e lacunas na ciência

Resumo

Nos últimos anos tem se observado uma grande mudança climática, o que tem causado interferências nos ecossistemas e nas comunidades que vivem nele. Essa mudança tem sido causada pela interferência antrópica, que tem modificado as condições naturais de habitats de várias espécies, dentre eles os anfíbios. Por causa de sua alta sensibilidade a essas modificações, os anfíbios têm sofrido graves declínios em suas populações. Deste modo, cientistas de várias áreas têm procurado utilizar métodos menos invasivos de coleta de dados para garantir uma maior integridade e bem-estar dos organismos experimentais, possibilitando estudos de caráter menos destrutivo e que seguem princípios alinhados com os “3 Rs”: visando a “substituição”, a “redução” e o “refinamento” na experimentação científica. Neste artigo apresentamos uma revisão sistemática acerca dos métodos alternativos menos invasivos que vêm sendo empregados em pesquisas científicas com anfíbios. Para tanto, os artigos foram levantados nas bases de dados “Scopus”, “Web of Science”, “Pubmed” e ScienceDirect, resultando na seleção final de 61 artigos de diversas áreas, os quais foram descritos através de uma análise cientométrica e da descrição narrativa detalhada dos métodos alternativos utilizados nos estudos. Embora esta área esteja crescendo na ciência atual, a utilização destes métodos ainda permanece bastante limitada dentro da herpetologia como um todo, sendo ainda mais escassa nas áreas de ecotoxicologia e monitoramento ambiental. Ao destacarmos estes métodos, visamos incentivar ainda mais cientistas a implementá-los em suas pesquisas, bem como enfatizamos a importância de se priorizarem suas aplicações na experimentação animal como um todo.

Palavras – chave: anuros, extinções, não-destrutivos, revisão bibliográfica

Abstract

In recent years, great climate changes have been observed, which has interfered in the ecosystems and its communities. These changes have been caused by anthropic interference, which has modified the natural habitat of several species, including amphibians. Considering their high sensitivity to these changes, amphibians have suffered serious declines in their populations worldwide. Therefore, scientists from various areas have sought for less invasive methods of data collection to ensure greater integrity and the well-being of experimental organisms, enabling studies of destructive nature that follow principles aligned with the “3 Rs”: “replacement”, “reduction” and “refinement” in scientific experimentation. In this paper, we present a systematic review of the less invasive alternative methods that have been used in scientific research with amphibians. For that, the articles were searched in the databases "Scopus", "Web of Science", "Pubmed", and ScienceDirect, resulting in the final selection of 61 articles from different areas, which were described through a scientometric analysis and through a detailed narrative description of the alternative methods used in the selected studies. Although this area is growing in current science, the use of less invasive methods still remains quite limited within herpetology as a whole, being even more scarce in the areas of ecotoxicology and environmental monitoring. By highlighting these methods, we aim to encourage even more scientists to implement them in research, as well as emphasizing the importance of prioritizing their applications in animal experimentation as a whole.

Keywords: anurans, extinctions, non-destructive, literature review.

3.1 Introdução

Observações e projeções científicas têm mostrado que os ecossistemas e a biodiversidade são altamente sensíveis às mudanças das condições climáticas. (Li *et al.*, 2013; Settele *et al.*, 2015; Pecl *et al.*, 2017). Uma ampla variedade de estressores relacionada a tais mudanças globais têm impulsionado a extinção dos vertebrados (Barnosky *et al.*, 2011), com um destaque maior para o grupo dos anfíbios, os quais atualmente apresentam cerca de 41% das espécies sob ameaça de extinção (IUCN, 2019). Esses dados levantam cada vez maiores preocupações na comunidade científica, considerando a grande relevância ecológica desses animais, além de sua aplicação como bons bioindicadores para o monitoramento da saúde ambiental. (Cohen, 1997; Collins; Storer, 2003; Cohen, 1997; Stebbins; Cohen, 1997; Kiesecker, 2011).

Diversos fatores são reconhecidos como potenciais contribuintes para o declínio das populações de anfíbios pelo mundo, dentre eles: a fragmentação e redução de habitats, a poluição dos ecossistemas aquáticos (Agostini *et al.*, 2020; Kenko, 2022), as mudanças climáticas (Green *et al.*, 2020), e o surgimento de doenças emergentes (Longcore *et al.*, 1999; Fisher; Garner, 2020), sendo esta última considerada a principal causa do declínio de populações na Austrália, América do Sul e Central. (Scheele *et al.*, 2019; Fisher; Garner, 2020).

Nesse sentido, cada vez mais se requer um maior conhecimento sobre a sensibilidade das espécies, a fim de se estabelecer prioridades de conservação e melhores métodos na pesquisa científica (Hofmann; Todgham, 2010). Nos últimos anos, diversos ramos da ciência têm chamado a atenção para a necessidade de se considerar o conceito dos “3Rs” na ética experimental, numa tentativa de garantir uma maior responsabilidade bioética pelo bem-estar animal (Curzer *et al.*, 2016). O próprio aumento da utilização dos anfíbios como organismos experimentais também impulsionou a necessidade de se propor condutas específicas que se adequem ao bem-estar requerido pelos distintos grupos de anfíbios (Brod *et al.*, 2019).

Alguns grupos de pesquisa já vêm utilizando métodos alternativos e menos invasivos para a avaliação de biomarcadores de diversos níveis biológicos em anfíbios. Alguns exemplos desses estudos contemplam a utilização de amostras de fácil aquisição como urina e fezes (Germano *et al.*, 2009; Baugh *et al.*, 2021) para a realização de análises hormonais. Na biologia molecular, o uso minimamente invasivo de swabs cutâneos (Woodhams *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2020), bucais (Broquet *et al.*, 2007) e cloacais (Gray *et al.*, 2012) permitiu a coleta de material genético sem a necessidade de se anestésiar os animais (Müller *et al.*, 2013). As tecnologias mais recentes também permitiram adaptar a utilização de exames convencionalmente humanos para os

anfíbios, como ultrassonografia (Krause *et al.*, 2013), eletrocardiograma (Aubret *et al.*, 2013) e tomografia (Broeckhoven *et al.*, 2017). Tais exemplos demonstram que é possível adequar a experimentação animal de modo a torná-la mais responsável segundo as leis da bioética e ao bem-estar dos organismos experimentais.

Portanto, tendo em vista a conservação de espécies e a grande sensibilidade dos anfíbios em detectar mudanças ambientais, este artigo de revisão sistemática teve como objetivo mostrar alguns dos métodos menos invasivos de coleta de dados que têm sido utilizados em pesquisas herpetológicas, identificando as lacunas de conhecimento, e as potenciais aplicações desses métodos para o monitoramento ambiental.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1. Levantamento bibliográfico para a revisão sistemática

Para a realização da primeira etapa deste projeto de mestrado foi realizado um levantamento bibliográfico sistemático, realizando-se buscas por artigos científicos através dos seguintes bancos de dados: “Scopus”, “Web of Science”, “Pubmed” e ScienceDirect”. As buscas foram baseadas na combinação das palavras-chaves “métodos” OU “metodologias” OU “protocolos” ou “procedimentos” OU “técnicas” E “não-invasivos” OU “menos invasivos” OU “pouco invasivos” OU “alternativos” E “anfíbios” OU “anuros” OU “sapos” ou “rãs” ou “Amphibia” (considerando-se suas formas no singular e no plural e em Inglês e Português). Brevemente, a revisão sistemática consiste em um manuscrito baseado em um levantamento bibliográfico que é realizado de forma sistematizada em bases de dados científicas indexadas (Pollock; Berge, 2018). Para que este levantamento bibliográfico seja considerado como “sistemático”, a busca pelos artigos deve ser previamente definida segundo critérios de inclusão e exclusão dos artigos (como por exemplo o período de anos das publicações, o tipo do artigo, a base de dados, , as combinações de palavras-chaves utilizadas para as buscas, etc) (Pollock; Berge, 2018).

Inicialmente, as buscas retornaram um total de 238 artigos científicos, os quais foram triados e selecionados quanto aos objetivos da revisão sistemática. Dessa forma, foram incluídos somente os artigos que se relacionavam à descrição e utilização de métodos considerados alternativos e menos invasivos em estudos com anfíbios. Além disso, os critérios de exclusão consistiram em artigos escritos em línguas distintas do Inglês, artigos de revisão e relatórios técnicos, protocolos não publicados, documentos duplicados e demais manuscritos considerados parte da “literatura cinza” (ou seja, resumos, trabalhos de anais e eventos, ou artigos publicados em revistas não indexadas). A

triagem final resultou em 61 artigos científicos, os quais foram integrados à revisão sistemática.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Análise cientométrica dos dados

As buscas nas bases de dados científicos resultaram em um total de 238 artigos, os quais foram triados segundo os critérios de elegibilidade, a fim de selecionar apenas os manuscritos que fossem relacionados ao uso ou implementação de métodos alternativos menos invasivos, ou não destrutivos, aplicados em estudos com anfíbios. A seleção final resultou em um total de 61 artigos científicos, os quais foram utilizados para compor o presente artigo de revisão sistemática.

A distribuição cronológica das publicações demonstrou que o primeiro artigo encontrado relacionado a técnicas alternativas com anfíbios, data de 1995, e a tendência de publicações ao longo dos próximos anos permaneceu relativamente baixa, com cerca de somente 1 ou 2 artigos sendo publicados a cada ano, até 2012. Em 2013 houve um pico de publicações (alcançando 8 artigos), destacando-se os trabalhos de alguns grupos de pesquisa australianos que focaram em estudos nessa área de pesquisa durante este período. De 2014 a 2017 as publicações voltaram aos limites baixos, com uma média de somente 2 artigos por ano, se elevando novamente a partir de 2018 (Figura 1). Essa tendência no aumento de publicações sobre os métodos alternativos com anfíbios a partir de 2018 parece ter acompanhado os assuntos que estavam em alta durante este período, já que o tema de "ética e experimentação animal" foi bastante discutido e destacado entre as comunidades científicas neste período (Clark, 2018; Khabib *et al.*, 2022), em especial devido à urgente necessidade de novos testes para o combate da Pandemia da COVID-19 (Wibawa, 2021).

No entanto, apesar desse aumento relativo das publicações nos últimos anos, de um modo geral, os estudos que se dedicaram a estudar ou implementar novos métodos alternativos menos invasivos à experimentação com anfíbios ainda é muito escasso. Essa baixa aderência dos pesquisadores nessa área reitera a necessidade de que as comunidades científicas estimulem os grupos de pesquisa a buscarem métodos mais refinados. Além disso, é imprescindível que os financiamentos de pesquisa nessas áreas sejam priorizados, especialmente em países como o Brasil, onde o investimento em pesquisa sofre constantes limitações econômicas e governamentais (Goldenberg; Rodrigues; Savino, 2022).



Figura 1: representação gráfica da distribuição temporal dos artigos científicos sobre métodos alternativos menos invasivos aplicados em estudos com anfíbios. No eixo X constam os anos de publicação dos artigos e no eixo Y, a quantidade absoluta de artigos publicados nesses anos.

A distribuição geográfica destes estudos evidencia uma predominância de grupos de pesquisa norte-americanos, com um destaque para os Estados Unidos, o qual ocupa o topo da lista com 22 artigos publicados na área dos métodos alternativos e menos invasivos aplicados aos anfíbios. Essa predominância dos Estados Unidos na quantidade de produções científicas já foi observada por Houlihan *et al.* (2000) na área de conservação de anfíbios. A hegemonia dos Estados Unidos em dominar grande parte das publicações científicas não se limita à herpetologia, e pode ser explicada pela alta disponibilidade de recursos financeiros que são destinados à pesquisa científica e ao desenvolvimento de tecnologias no país, os quais são garantidos tanto por instituições privadas como pelo próprio governo (Erkaeva; Shukurov, 2022). Além disso, por produzirem uma massiva quantidade de conhecimento científico, estes países desenvolvidos acabam se tornando “vitrines” que também atraem o investimento internacional (Erkaeva; Shukurov, 2022). Nesse sentido, a criação de políticas públicas e planos de governos que priorizem a capacitação de recursos humanos para o meio científico, bem como o investimento em pesquisa e tecnologias são de extrema relevância para que países em desenvolvimento possam ampliar suas capacidades e também atrair investidores externos. A criação de políticas governamentais que ofereçam benefícios fiscais também é essencial para estimular a iniciativa privada a investir no desenvolvimento científico e tecnológico do país (Walsh; Murphy, Horan, 2020). Apesar do Brasil abrigar a maior riqueza de espécies de anfíbios no mundo (Jared, Antoniazzi, 2009; SBH, 2016), a contribuição dos pesquisadores locais com o conhecimento sobre os métodos menos invasivos para os anfíbios representa apenas 7,5% das publicações. Isso

muitas espécies de anfíbios, os estágios adultos costumam apresentar tamanhos corpóreos maiores, o que também pode favorecer eventuais ajustes de equipamentos para a medição de parâmetros, bem como facilitar o próprio manuseio do animal (Rothermel, 2004).



Figura 3: representação gráfica do estágio de desenvolvimento dos anfíbios utilizados nos estudos dos artigos levantados para análise cientométrica. Os números dentro do gráfico representam a quantidade de artigos em que cada categoria apareceu.

Outro fator de grande relevância que pode influenciar os resultados de uma pesquisa é o sexo dos animais. Machos e fêmeas de anfíbios podem apresentar dimorfismos sexuais morfológicos e fisiológicos, como por exemplo, o tamanho corpóreo (as fêmeas de muitas espécies costumam ser maiores do que os machos) (Peng; Zhang; Lu, 2022), a taxa metabólica (Ducret *et al.*, 2020), pigmentação corpórea (Vieira *et al.*, 2022), entre outros. Nesse sentido, mais da metade dos artigos levantados não mencionou o sexo dos organismos experimentais (63,9%), o que poderia influenciar diversas variações nos resultados desses estudos. Cerca de 26,2% dos estudos utilizaram machos e fêmeas em seus estudos, o que representa uma condição mais ideal de comparação entre os resultados, conferindo maior confiabilidade, já que o dimorfismo sexual, hormônios sexuais ou outras características que variam de acordo com o sexo, foram especificadas e levadas em consideração. Somente 3,2% dos estudos utilizaram somente fêmeas em suas pesquisas, enquanto 6,5% utilizaram somente machos (figura 4). Essa maior proporção de estudos utilizando indivíduos machos provavelmente deve-se ao fato de que os machos dos anfíbios apresentam maior atividade nos períodos noturnos e também vocalizam

(somente os machos vocalizam para atrair as fêmeas), o que facilita a sua captura e identificação na natureza (Moresco; Oliveira, 2009).

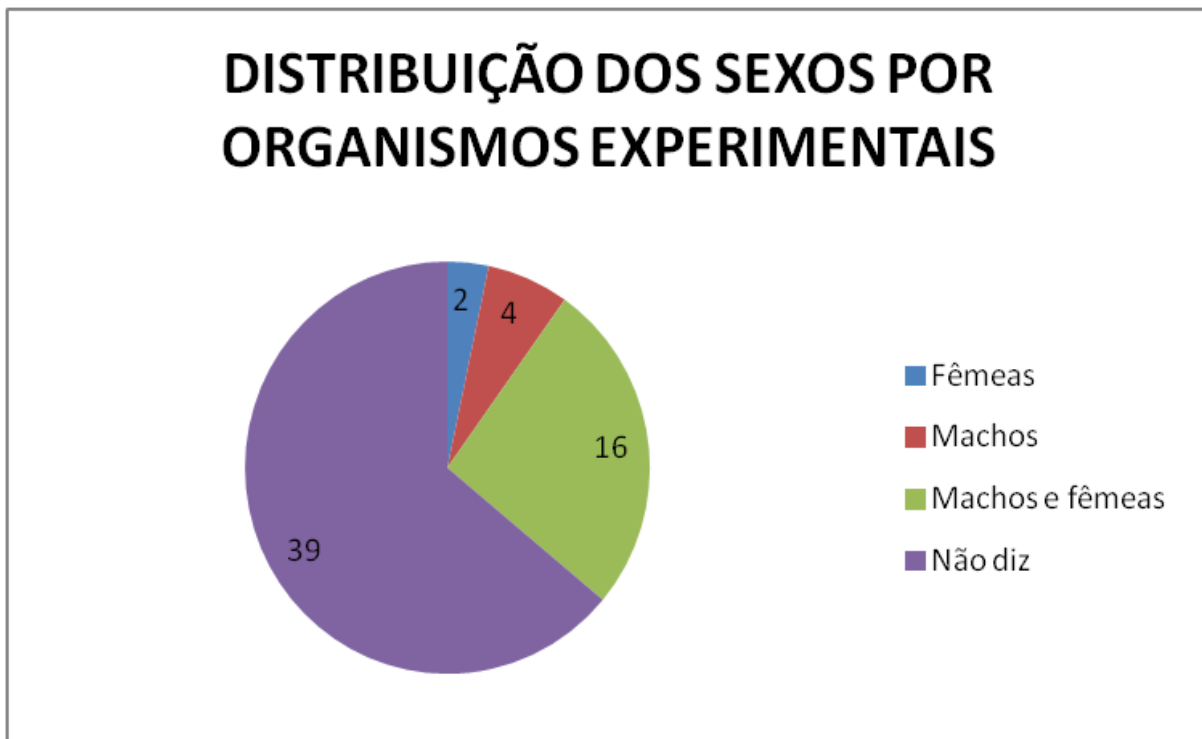


Figura 4: representação gráfica do número de machos e fêmeas usados nos estudos dos artigos levantados para a análise cientométrica. Os números dentro do gráfico representam a quantidade de artigos em que cada categoria apareceu.

Com relação às ordens dos anfíbios utilizados nas pesquisas, a maior parte dos estudos empregou espécimes pertencentes aos anuros em seus experimentos, o que pode ser explicado devido à maior diversidade de espécies que essa ordem contempla mundialmente (aproximadamente 88% das espécies de anfíbios do mundo são anuros), seguido da segunda maior utilização dos caudatas (que correspondem a aproximadamente 9% do total de espécies do mundo) e finalizando com a utilização da ordem gymnophiona (que correspondem a aproximadamente 3%) (Frost, 2011). Somente um estudo utilizou espécimes das três ordens de acordo com o objetivo da pesquisa (Figura 5).

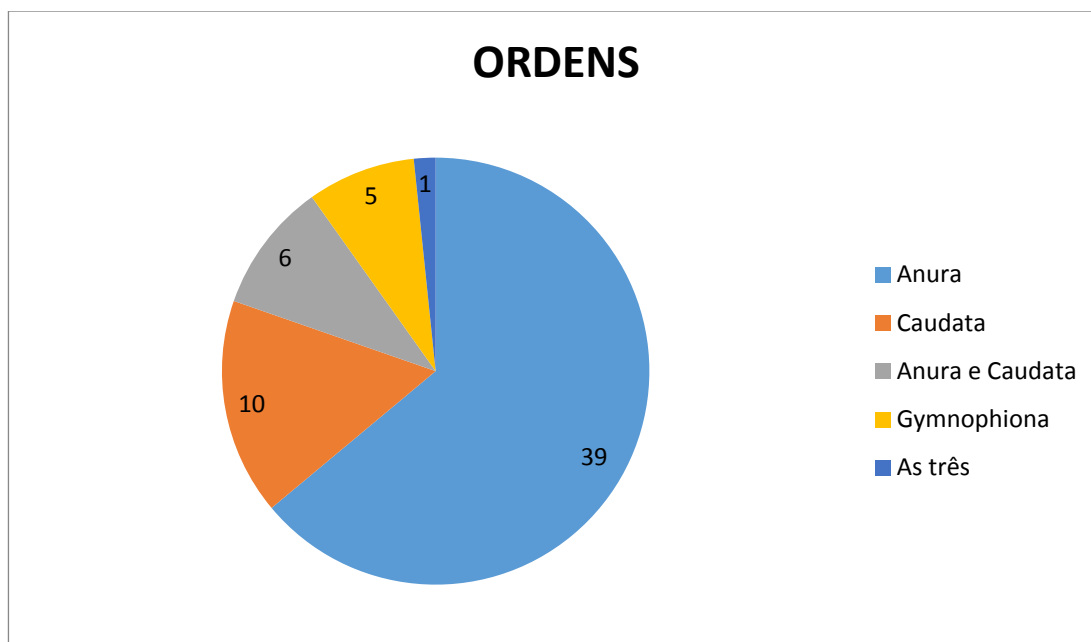


Figura 5: representação gráfica do número de ordens de anfíbios empregados nos artigos levantados para a análise cientométrica. Os números dentro do gráfico representam a quantidade de artigos em que cada ordem apareceu.

Dentre os grupos taxonômicos mais estudados, houve um destaque para os gêneros *Bufo/Rhinella* e *Xenopus*. A grande quantidade de estudos que utilizaram o gênero *Xenopus* deve-se ao fato de serem reconhecidos como organismos modelos em várias áreas científicas, incluindo a herpetologia, a ecotoxicologia e até mesmo a medicina (Beck; Slack, 2001; Lu-sha *et al.*, 2016). O gênero *Rhinella* é geralmente representado por indivíduos de morfologia bastante robusta, de tamanho relativamente grande (Cabrera - Guzmán *et al.*, 2013), e fácil identificação e captura (Yeager *et al.*, 2014), o que também pode explicar a preferência na utilização desses espécimes nos experimentos (figura 6).

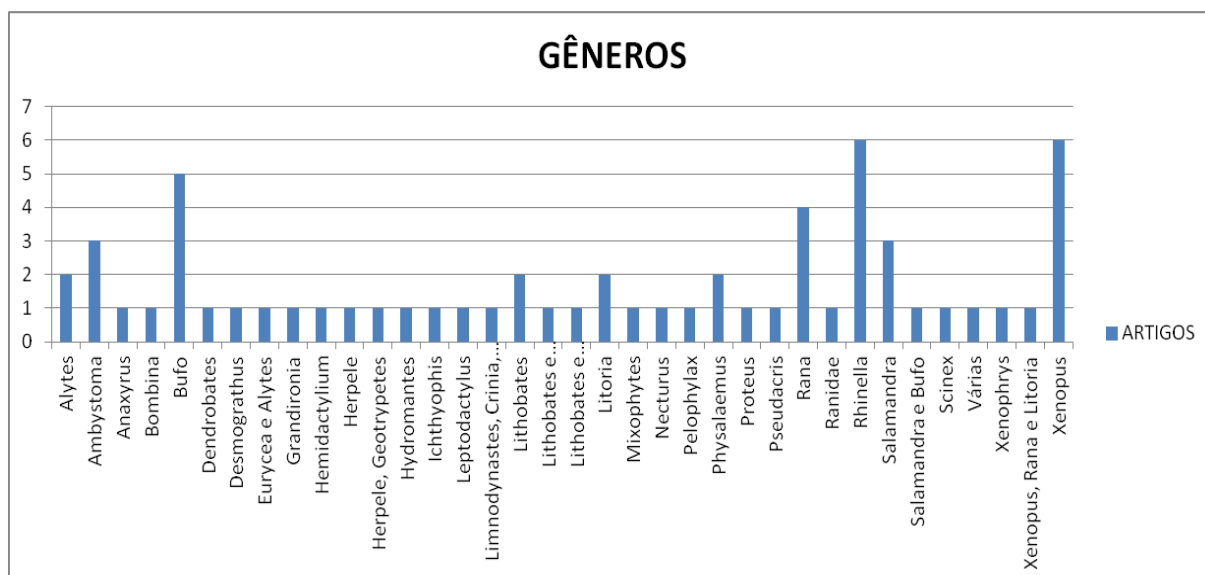


Figura 6: representação gráfica do número de gêneros dos anfíbios que foram empregados nos estudos dos artigos levantados para a análise cientométrica. O eixo X representa a diversidade de gêneros e o eixo Y, a quantidade de artigos em que cada gênero apareceu.

Com relação aos biomarcadores encontrados durante o levantamento dos artigos para a análise cientométrica, pôde observar-se a predominância de artigos relacionados aos métodos moleculares, seguido por aqueles que falam sobre identificação e captura, e estresse. Essa predominância de estudos com biomarcadores moleculares pode estar relacionada à ampla utilização dos métodos moleculares em estudos de caráter evolutivo (Torres - Sanchez *et al.*, 2019) e conservacionista (Amaral *et al.*, 2019), ou até mesmo para a identificação de patógenos em anfíbios (Billet *et al.*, 2020). Diferentes métodos de captura e identificação de anfíbios também são empregados em estudos com o objetivo de monitoramento e conservação das espécies locais (Bailey; Muths, 2019) (figura 7).

O biomarcador bioacústico ainda permanece sub-representado nesses estudos, juntamente com as análises hormonais e morfométricas. A identificação dessas lacunas pode auxiliar trabalhos futuros a identificarem prioridades em suas pesquisas.

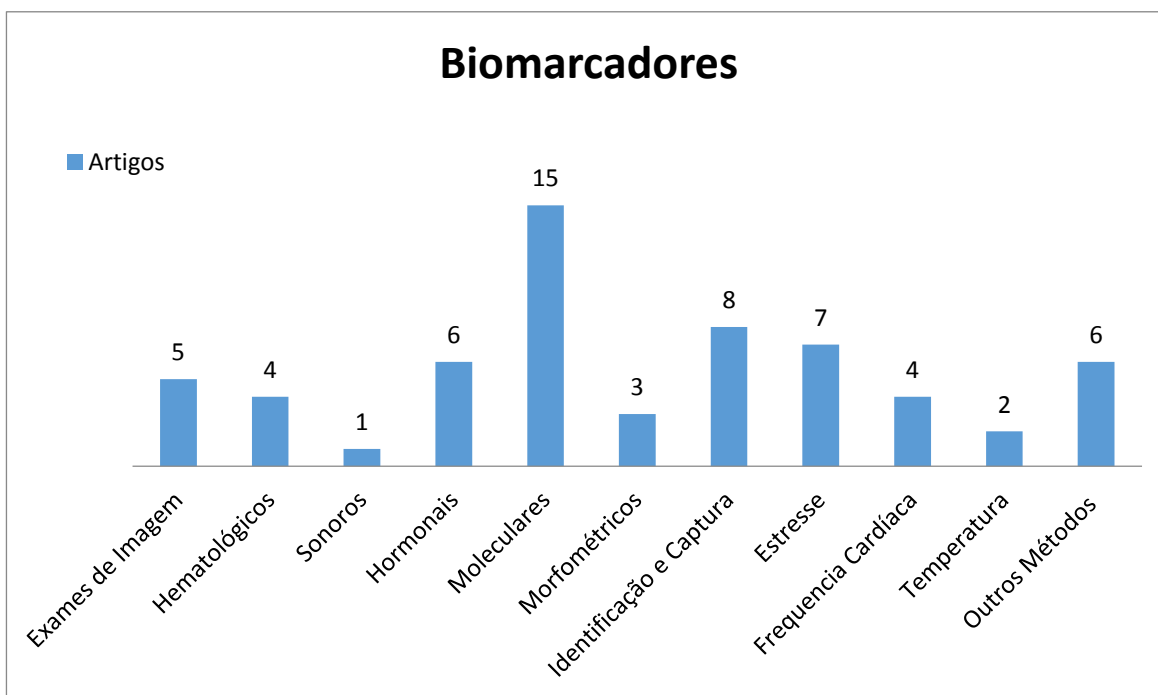


Figura 7: representação gráfica do número de artigos publicados com cada biomarcador classificados de acordo com o levantamento bibliográfico.

Com relação às revistas em que os estudos foram publicados, houve uma grande variedade, com uma maior frequência nas áreas de conservação e herpetologia. Tais tendências indicam o caráter interdisciplinar que a aplicação dos métodos alternativos na experimentação animal permite dentro das mais diversas áreas de pesquisa científica. Por outro lado, a baixa frequência de publicações utilizando métodos alternativos na área de

constantes de troca de pele, e os ciclos de vida bastante complexos, a marcação corporal dos anfíbios costuma ser dificultada (e.g., Heemeyer *et al.*, 2007; Ferner 2010; Bainbridge *et al.*, 2015). Muitas vezes a captura pode ocasionar danos físicos como arranhões, cortes ou outras lesões locais nos animais (Smith, 2016). Em especial, se considerarmos espécies nativas que não estão habituadas a interações humanas, a captura e o manuseio podem vir a causar grande estresse aos animais (Zemanova, 2020). De fato, estudos realizados com o anuro australiano, *Litoria ewingii* (Coddington; Cree, 1995), e a salamandra pintada, *Ambystoma maculatum* (Homan *et al.*, 2006), demonstraram que as concentrações plasmáticas de corticosterona se elevaram em resposta à captura e manuseio dos animais, indicando uma resposta de estresse. O estresse causado pelos altos níveis de corticosterona podem afetar diversas outras funções fisiológicas dos anfíbios, como a frequência cardíaca, a pressão arterial, e até mesmo o comportamento (Gagliano; McCormick, 2009), possivelmente afetando outros parâmetros que poderiam ser avaliados nos experimentos.

Para contornar esses problemas, um refinamento que vem sendo proposto consiste em manusear os animais de forma mais gentil e por um tempo máximo de 5 minutos (a contenção do animal nas mãos do pesquisador não deve ultrapassar esse limite de tempo). Embora este refinamento não isente o animal completamente do estresse, a produção de corticosterona costuma ser reduzida, o que permite a determinação de níveis basais de estresse que possuem menor interferência na fisiologia dos anfíbios experimentais (Narayan; Cockrem; Hero, 2011a).

Além da captura, alguns estudos *in situ* podem requerer a marcação dos animais para seu posterior reconhecimento para obter dados de comportamento, sobrevivência, reprodução, tamanho corpóreo, padrões de migração, monitorar espécies ameaçadas etc (Aevansson *et al.*, 2022; Perry *et al.*, 2011), ou até mesmo obter amostras de DNA para diagnóstico de doenças como a ranavirose (St - Amour; Lesbarre´res, 2007). O método de marcação mais comumente empregado para os anfíbios consiste no recorte de uma das falanges de um dedo do animal (no inglês conhecido como *toe clipping*) (Perry *et al.*, 2011). Embora esse método tenha sido seja considerado como “aceitável” por alguns autores (Phillott *et al.*, 2007), outros estudos demonstraram que esse procedimento de mutilação pode afetar o desempenho locomotor dos anfíbios (Perry *et al.*, 2011), além de aumentar os níveis de estresse do animal (Narayan *et al.*, 2011b). Nesse sentido, já existem meios alternativos de se monitorar os anfíbios com base em outras formas de marcação individual. Os estudos de Andis (2018) detalharam um método de marcação baseado em calceína, um corante fluorescente que é capaz de se ligar a ossos e outros tecidos calcificados. A calceína se mostrou eficiente ao marcar girinos da espécie *Rana sylvatica* (atualmente, *Lithobates sylvatica*), e não apresentou sinais de toxicidades, como

demonstrado pela ausência de mortalidade e de quaisquer danos ao crescimento dos organismos (Andis, 2018).

Tapley *et al.* (2019) também utilizaram marcadores fluorescentes em suas pesquisas, através da aplicação de Implantes Visíveis de Elastômero (VIE) em cecílias da espécie *Herpele squalostoma*. O VIE é um polímero líquido, biocompatível e fluorescente (sob luz UVA), que pode ser injetado na pele com o auxílio de seringas hipodérmicas. Uma vez injetado, esse material solidifica, formando uma estrutura que pode ser visualizada a olho nu para posterior identificação dos indivíduos nos momentos de recaptura. Apesar de sua eficiência na marcação dos indivíduos, os autores destacaram que a persistência média das marcações solidificadas era relativamente baixa (~191 dias), o que pode ser uma limitação para estudos a longo prazo. Além disso, embora o uso das agulhas hipodérmicas não cause injúrias significativas nos animais, esse método requer que os organismos sejam previamente anestesiados, o que aumenta as influências e distúrbios sobre outras funções biológicas dos animais capturados, reduzindo o refinamento desse método como uma alternativa menos invasiva (Tapley *et al.*, 2019).

Outro método de marcação que vem se destacando consiste no reconhecimento individual (CRM), o qual fornece dados de interesse como abundância, densidade, uso de hábitat e dispersão, dentre outros (Seber, 1973; Pradel, 1996; Beirinckx *et al.*, 2006; Mazerolle *et al.*, 2007). O estudo de CMR não necessita de manuseio dos organismos, e conta com a suposição de que o método de marcação identifica inequivocamente cada indivíduo durante o período de estudo (Wilians *et al.*, 2002; Mazerolle *et al.*, 2007). Essa abordagem é baseada na identificação de características individuais e permanentes de certa região do corpo, como coloração e cicatrizes, que são pouco variáveis durante o período de estudo.

Métodos de identificação fotográfica também podem auxiliar na marcação de anfíbios, através da utilização de câmeras digitais, softwares e algoritmos para a comparação de fotografias, como o Wild – ID e o APHIS. (Van Tienhoven *et al.*, 2007; Morrison *et al.*, 2011; Town *et al.*, 2013; Carter *et al.*, 2014;. Bolger *et al.*, 2012). Um exemplo de aplicação fotográfica para a identificação de anfíbios foi relatado em Cove e Spíndola (2013), os quais aplicaram um método de captura e recaptura para estimar parâmetros demográficos de uma população de *Dendrobates auratus* (*Anura: Dendrobatidae*) de um habitat alterado na Costa Rica. Neste estudo, os animais capturados eram fotografados individualmente, e as variações morfológicas externas eram posteriormente identificadas para cada organismo. De modo semelhante, Sukalo *et al.* (2013) aplicaram um método de captura, fotografia e recaptura a 159 indivíduos de duas populações de *Salamandra salamandra*. Nesse método, um único código alfanumérico era

gerado para cada indivíduo, baseando-se na quantidade de poros presentes nas glândulas cutâneas de toxinas, localizadas nas regiões de pigmentação amarela do corpo.

Além da identificação de padrões morfológicos, o uso de softwares e algoritmos pode auxiliar na identificação dos padrões, e na individualização dos organismos. Nos estudos de Aevarsson *et al.* (2022), um software de identificação fotográfica foi utilizado para distinguir indivíduos adultos e juvenis da espécie *Xenopus longipes*. Partindo desta mesma ideia de método fotográfico, Marco Sannolo *et al.*, (2016) utilizaram o software I:S Pattern em um estudo de longo período com o tritão italiano *Triturus carnifex*. Esse método se mostrou uma boa alternativa devido ao padrão irregular de pontos ventrais e manchas largas que são únicas aos indivíduos e estáveis ao longo do tempo (Arntzen; Wallis, 1999). Embora os métodos de CRM ainda possuam limitações, o reconhecimento de padrões morfológicos únicos em cada espécime é bastante adaptável aos diferentes tipos de anfíbios e pode fornecer uma classificação de imagens com alta confiabilidade (Sannolo *et al.*, 2016). Além disso, por possuir em seu algoritmo uma aplicação que permite a variabilidade dos padrões de imagens (conhecido como “SURF”), esse método também poderia ser aplicado ao monitoramento de espécies que apresentam um padrão complexo e irregular, como é o caso de muitas espécies de Bufonidae, Ranidae, Salamandridae e Ambystomatidae, que exibem padrões que não são facilmente identificáveis somente pelo olho humano (Vitt; Caldwell, 2013). Dentre as limitações que esses métodos podem oferecer, vale destacar alguns erros que podem decorrer devido a falhas nos atributos do algoritmos, como por exemplo, o erro de “falsa aceitação (FA)”, que consiste em designar a mesma identificação a dois indivíduos diferentes; ou ainda a “falsa rejeição (FR)”, que consiste na falha do software em corresponder duas fotos do mesmo indivíduo (Jain, 2007). Erros como estes podem induzir um viés na avaliação de parâmetros demográficos (Yoshizaki *et al.*, 2009; Morrison *et al.*, 2011). Um estudo sobre estes erros foi relatado em Renet *et al.* (2019), o qual avaliou a viabilidade de dois softwares, utilizando como fator de identificação a coloração das salamandras *Hydromantes strinatii*. Um dos softwares era totalmente automatizado (Wild-ID) e o outro, semi-automatizado (APHIS). Como resultados, o software Wild-ID foi igualmente eficiente quanto à identificação de fotos de cloaca e peitoral dos animais, enquanto o software APHIS apresentou mais erros no algoritmo, sendo mais eficiente com fotos de peitoral do que de cloaca. Apesar dessas limitações, uma vez identificadas, tais falhas podem ser facilmente evitadas através de adaptações no algoritmo. A identificação de anfíbios através de softwares como estes pode representar uma forma alternativa inovadora, eficiente e não-invasiva de se obter informações sobre densidade e dispersão das espécies de anfíbios, auxiliando em estudos de conservação e monitoramento ambiental.

Para estudos cujo objetivo consiste somente na identificação das espécies locais, uma outra alternativa para evitar a marcação física dos espécimes poderia ser a utilização de características como a individualidade vocal dos organismos (Zemanova, 2020). Para algumas espécies, diferentes indivíduos podem ser distinguidos através de padrões únicos e característicos na vocalização (Terry; Peake; Mcgregor, 2005). No caso dos anfíbios, a utilização de individualidade vocal já foi identificada para a espécie *Odorrana tormota* em um estudo onde demonstraram que os machos dessa espécie eram capazes de diferenciar os indivíduos “conhecidos e locais” de outros “estranhos e concorrentes” do bando (Feng *et al.*, 2009). No entanto, esse método ainda não foi utilizado como um método alternativo à captura e marcação de anfíbios em campo, e a individualidade vocal ainda necessita ser verificada em outras espécies de anfíbios a fim de garantir se a aplicação desse método seria viável para uma amplitude maior de estudos.

3.3.2.2. Métodos alternativos para biomarcadores endócrinos

A aplicação de métodos menos invasivos para se estimar concentrações de hormônios em modelos experimentais animais permite realizar medidas repetidas, e acompanhar parâmetros comportamentais das espécies, bem como concentrações hormonais, além de minimizar possíveis interferências que a amostragem por captura poderia causar (Baugh *et al.*, 2018). Um exemplo de adaptação menos invasiva nesse sentido é a utilização de amostras de água (do habitat dos organismos) para determinação de hormônios que são liberados pelo animal através das excretas (Gabor *et al.*, 2013). Em um estudo realizado com a salamandra *Eurycea nana* e o anfíbio *Alytes obstetricans*, os pesquisadores validaram a utilização de amostras de água para a determinação de corticosterona liberada através das excretas dos animais (Gabor *et al.*, 2013). Em outro estudo, realizado com fêmeas da espécie *Physalaemus pustulosus*, amostras de água foram submetidas à extração de fase-sólida acoplada a imunoenaios, e posteriormente analisadas sob um espectrômetro de massa de alta performance, gerando resultados sobre as concentrações de corticosterona, estrógeno e progesterona que foram liberados pelos organismos (Baugh *et al.*, 2018). Esse tipo de amostragem através da água também se mostrou eficiente em estudos com girinos de *Rana berlandieri*, permitindo a detecção de glicocorticoides, corticosterona, e cortisol, como relatado por Forsburg *et al.* (2019). Dessa forma, diversos hormônios podem ser monitorados sem a necessidade de causar estresse devido à captura e manuseio do animal para coleta de sangue, como costumeiramente ocorre nos estudos endócrinos com anfíbios (Gavel *et al.*, 2019).

Não somente amostras de água, mas amostras de fezes também podem ser utilizadas como método alternativo e não invasivo para a determinação de hormônios

sexuais em anfíbios. Baugh e Gray-Gaillard (2021) demonstraram que é possível determinar níveis de testosterona através das excretas de machos e fêmeas de *Physalaemus pustulosus*. De modo semelhante, a urina também pode ser utilizada como amostra para detecção de níveis de estrógenos, testosterona e progesterona, através de imunoenaios, como já demonstrado em um estudo com a espécie *Litoria raniformis* (Germano *et al.*, 2009). O monitoramento dos hormônios permite mensurar níveis de estresse fisiológico, além de identificar peculiaridades nos modos reprodutivos e possíveis variações na sazonalidade reprodutiva dos anfíbios (Kupfer; Nabhitabhata; Himstedt, 2004; Narayan, 2013).

O estudo de hormônios como os glicocorticosteroides podem fornecer dados importantes sobre o impacto fisiológico de diversos estressores, facilitando o entendimento de como as mudanças ambientais e doenças afetam os anfíbios. Estudos vêm mostrando a importância de se considerar variáveis ambientais e individuais no momento de explicar a relação entre esses hormônios e os indivíduos (Jaatinen *et al.*, 2013; Vitousek *et al.*, 2018). Nesse sentido, um método que vem se destacando é a utilização de saliva como amostra para se obter os níveis de glicocorticoide. Além de ser um método menos invasivo do que o método clássico de coleta de plasma sanguíneo, as amostras de saliva frequentemente não requerem preparação prévia ou extração da amostra para sua análise, diferentemente das amostras plasmáticas e fecais que necessitam dessa etapa prévia (Vining *et al.*, 1986). Além disso, diferentemente das amostras de fezes e urina, que levam dias ou horas para revelar suas respostas, a saliva as fornece em questão de minutos (Sheriff *et al.*, 2011). Experimentos analíticos já foram conduzidos com amostras de saliva e refletiram de forma confiável os níveis de GC em três espécies de anfíbios: *Rana catesbeiana*, *Rana clamitans* e *Rana pipiens* (Hammond *et al.*, 2018).

Na área da conservação, os programas de reprodução em cativeiro necessitam induzir e aumentar a reprodução dos anfíbios, e essa indução frequentemente é realizada através da administração intraperitoneal de injeções de estimulantes para a liberação de espermatozoides pelos machos, ou a liberação das desovas pelas fêmeas (Rowson; Obringer; Roth, 2001). No entanto, a administração intraperitoneal pode estar associada a complicações (Rowson; Obringer; Roth, 2001), como a injúria de órgãos internos ou infecções, além do estresse local causado pela própria perfuração. Nessa perspectiva, estudos realizados com o anuro *Anaxyrus americanus* já relataram a aplicação tópica (absorção diretamente pela epiderme) de estimulantes de hormônios luteinizantes na região abdominal dos anfíbios como uma forma eficiente e alternativa às injeções intraperitoneais (Rowson; Obringer; Roth, 2001). Nessa mesma linha de raciocínio, estudos fisiológicos sobre variação do estresse e das taxas metabólicas dos anfíbios também vêm substituindo a administração intraperitoneal de corticosterona pela

aplicação de adesivos dérmicos, como demonstrado para as salamandras *Plethodon shermani*, *Desmognathus ocoee*, e *Desmognathus ochrophaeus*, e também para os sapos Coqui, *Eleutherodactylus coqui* (Wack *et al.*, 2010).

A avaliação de biomarcadores hormonais tem grande relevância para estudos de conservação dos anfíbios (para acompanhamento do status reprodutivo dos animais), mas também pode ser útil na área da ecotoxicologia, ao auxiliar na compreensão de modos de ação de diversos contaminantes que atuam como desreguladores endócrinos (Kloas; Lutz, 2006). Entretanto, a aplicação de métodos menos invasivos para a coleta de amostras hormonais dos anfíbios ainda é muito limitada, e precisa ser estimulada a fim de ampliar as pesquisas, tanto em âmbito laboratorial como em populações naturais. Tais adequações, além de minimizar as influências do experimentador sobre o animal, também podem aprimorar a estimativa de covariâncias individuais e demais complexidades que as variações hormonais dos anfíbios podem apresentar.

3.3.2.3. Métodos menos invasivos para a avaliação de biomarcadores moleculares em anfíbios

O desenvolvimento e aplicação das técnicas de marcação molecular induziram transformações consideráveis em vários ramos da biologia, incluindo a genética quantitativa, o melhoramento genético, estudos de epigenética, além de aplicações em áreas medicinais e toxicológicas (Najimi *et al.*, 2003). No ramo dos anfíbios, a biologia molecular tem se destacado entre os estudos taxonômicos (Khatiwada *et al.*, 2021; Liedtke, 2019), em programas de conservação (Borzée *et al.*, 2021), na descrição de genomas para o monitoramento de populações ameaçadas (Burger *et al.*, 2021), na compreensão de diversos mecanismos evolutivos (Wang; Han, 2020), e no monitoramento de doenças patogênicas (Zamudio; Mcdonald; Belasen, 2020).

A obtenção de amostras de tecidos para a realização de análises moleculares frequentemente baseia-se no corte de um dos dedos do animal adulto (Du Preez, 2019), ou de um corte na cauda, como ocorre em girinos (Othman *et al.*, 2020) ou em salamandras (Czypionka *et al.*, 2015). No entanto, a injúria nesses tecidos pode oferecer riscos de infecções e diminuição da mobilidade desses animais (Mccarthy; Parris, 2004). Então, a fim de tentar substituir esse método, estudos vêm destacando o uso de swabs bucais como um método menos invasivo e não-letal para a obtenção de amostras de material genético (Adamson *et al.*, 2016; Broquet *et al.*, 2007; Maddock *et al.*, 2014; Muller; Lenhardt, Theissinger, 2013; Poschadel; Möller, 2004). Além da facilidade de transporte e armazenamento dos swabs (Poschadel; Möller, 2004), por ser um método

menos invasivo, esta opção permite até mesmo a realização de amostragens de espécies ameaçadas, por não configurar nenhuma injúria física ao animal.

Além dos swabs bucais, a amostragem de swabs cutâneos também vem se mostrando eficiente para diversas análises moleculares com anfíbios (Balázs *et al.*, 2020), sendo amplamente empregado em estudos de patologias (Boyle *et al.*, 2004). Na ecologia de doenças, análises de PCR em tempo real têm sido empregadas para diagnosticar e quantificar as infecções causadas pelo fungo quitrídio, *Batrachochytrium dendrobatidis*, o causador da doença pandêmica dos anfíbios conhecida como quitridiomiose (Boyle *et al.*, 2004). Outra doença que também tem sido diagnosticada com a utilização de swabs cutâneos é a ranavirose. Nessa patologia, os vírus causadores da ranavirose ficam alojados no fígado, e os métodos convencionais de detecção empregam a eutanásia do animal para coleta de tecido hepático podem ser subestimados devido aos falsos positivos e falsos negativos que esse método pode gerar (Gray *et al.*, 2012). Um estudo comparativo entre o método letal de coleta de amostras do fígado e o uso de swabs cutâneos para o diagnóstico da ranavirose demonstrou que as técnicas de amostragem por swabs foram efetivas, no entanto também ressaltaram que os dados de prevalência da infecção podem ser subestimados devido aos falsos positivos e falsos negativos que esse método pode gerar (Gray *et al.*, 2012). Por outro lado, por ser menos invasiva, essa abordagem pode ser empregada até mesmo em estudos de monitoramento de populações enfermas e sensibilizadas pela doença, sem causar grandes distúrbios aos animais.

A amostragem não invasiva de indivíduos vivos não é uma tarefa fácil, especialmente em ambientes de difícil acesso (como por exemplo, as cavernas), e a utilização de organismos sensíveis limita a remoção dos indivíduos da água, mesmo que temporária, a fim de não afetá-los (Balázs *et al.*, 2020). Nesse caso, o uso de swabs cutâneos se também foi validado para que seja amostrado até mesmo de forma submersa, sem a necessidade de retirar o animal da água (Balázs *et al.*, 2020).

Ainda considerando-se os swabs cutâneos, é possível realizar análises até mesmo da secreção produzida pela pele dos anfíbios, a qual é constituída de diversas moléculas e peptídeos de ação protetiva (Chen *et al.*, 2003), além do microbioma que habita essas secreções (uma comunidade de bactérias e fungos que naturalmente coexistem nas secreções cutâneas dos anfíbios) (Woodhams *et al.*, 2014). Não somente através da pele, mas o microbioma intestinal dos anfíbios também pode ser estudado através de amostras de fezes para a extração de DNA e posterior sequenciamento gênico (Song *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2020). Além disso, para espécies consideradas venenosas, até mesmo o próprio veneno pode ser utilizado como amostra para estudos moleculares com anfíbios (Kwok *et al.*, 2008).

Levando em consideração o grande destaque que essas técnicas têm recebido, Müller *et al* (2013) estudaram a possibilidade de extrair amostras de DNA através de swabs bucais e cutâneos, mas também da cloaca de indivíduos de *Rana temporaria*. A análise comparada de viabilidade dos métodos demonstrou que os swabs cloacais também foram capazes de prover amostras de boa qualidade genética. Contudo, os pesquisadores ressaltaram que os swabs cloacais podem apresentar algumas limitações dependendo da espécie de anfíbio utilizada nos estudos, levando-se em consideração os diferentes hábitos e habitats dos organismos; de modo que a contaminação cruzada de DNA poderia levar a uma distorção genotípica, influenciando os resultados obtidos. Contaminações cruzadas podem ocorrer, por exemplo, durante o período de acasalamento, quando os indivíduos de *R. temporaria* estariam mais suscetíveis a interagir com outros indivíduos, possivelmente causando mistura de material genético (Müller; Lenhardt; Theissinger, 2013). Apesar disso, a utilização dos swabs cloacais permanece sendo considerada uma boa alternativa para a coleta de amostras para análises moleculares.

Embora o uso dos swabs tenha refinado bastante a experimentação animal, o método não-invasivo que possui o menor nível de distúrbio para a coleta de amostras de material genético é baseado na obtenção de DNA ambiental (eDNA - do inglês: *environmental DNA*). Neste método, amostras são obtidas diretamente do ambiente (ex: água, solo, ar) ao invés dos próprios indivíduos, permitindo a identificação da presença de uma dada espécie em uma região, o acesso a dados de biodiversidade (Cristescu; Hebert, 2018; Kaganer *et al.*, 2022; Mckee *et al.*, 2015), ou até mesmo auxiliando na detecção de patógenos como o fungo quitrídio (Brannelly *et al.*, 2020; Kaganer *et al.*, 2022). Estes métodos alternativos demonstram diversas possibilidades plausíveis como substitutos para os métodos letais de obtenção de amostras de material genético para os anfíbios.

3.3.2.4. Métodos de exames por imagem adaptados para estudos com anfíbios

As tecnologias de imagem utilizadas em exames na medicina e na veterinária surgiram com o objetivo de permitir uma análise da forma, estrutura e tamanho dos diferentes órgãos internos, bem como identificar patologias e lesões em organismos vivos, com propósitos clínicos e de investigação científica (Hildebrandt; Saragusty, 2015; Yitbarek; Dagnaw, 2022). Essas tecnologias foram posteriormente adaptadas às pesquisas científicas para outros organismos não-domesticados e selvagens, como por exemplo os anfíbios (Hildebrandt; Saragusty, 2015). As tecnologias de imagem podem nos fornecer dados fisiológicos importantes sobre os organismos de forma minimamente invasiva, sem necessitar da coleta de amostras e tecidos biológicos (Hildebrandt; Saragusty, 2015).

Nesse contexto, um dos primeiros registros da utilização de exames de imagem em pesquisas com anfíbios data de 1997, cujo artigo relatou a adaptação da técnica de tomografia de coerência óptica (do inglês, OCT - “*optical coherence tomography*”) a fim de permitir uma avaliação de alta resolução da estrutura e função do sistema cardiovascular do anuro *Xenopus laevis* (Boppart *et al.*, 1997). Essa técnica se baseia na medição da luz infravermelha retroespalhada, o que permite a visualização de estruturas internas não-transparentes em escala de microns, além de possuir um design portátil que permitiria o seu transporte para estações de pesquisa em campo (contanto que o local possua acesso à rede elétrica) (Boppart *et al.*, 1997). Mais recentemente, estudos também relataram a aplicação de micro-tomografias computadorizadas em diferentes anfíbios (Broeckhoven; Du Plessis, 2018), destacando sua efetividade em estudos sobre a morfologia esquelética de adultos (Broeckhoven *et al.*, 2017) e de girinos (Shu *et al.*, 2020), ou até mesmo para o diagnóstico de lipidose hepática (condição patológica onde o fígado acumula lipídios e pode sofrer degeneração), como relatado para salamandras da espécie *Ambystoma tigrinum* (Colon; Gumpenberger, 2020). Nestes estudos os autores destacam a utilidade desse método como uma alternativa aos estudos convencionais que se baseiam em biópsias e análises histopatológicas de tecidos para a detecção de patologias nos anfíbios (Colon; Gumpenberger, 2020).

Além da tomografia, outro método de imagem que já foi empregado em estudos de monitoramento ambiental consistiu na ressonância de giro de elétron (do inglês, ESR - *Electron Spin Resonance*), também conhecida como ressonância magnética. Neste estudo, a técnica de ESR foi usada para comparar quantidades de espécies reativas de oxigênio presentes na pele de machos do anuro *Pelophylax bergeri*, os quais foram coletados em áreas poluídas e áreas não poluídas do rio Sarno na Itália (D’errico *et al.*, 2018). Como esperado, os anfíbios das áreas poluídas apresentaram maior quantidade de espécies reativas de oxigênio, demonstrando o potencial dessas técnicas para estudos dentro da ecotoxicologia para o monitoramento de áreas contaminadas (D’errico *et al.*, 2018).

Uma técnica mais simples, mas também eficiente, que já foi empregada em estudos com anfíbios, consiste no uso da ultrassonografia, também conhecida como ecografia (Hildebrandt; Saragusty, 2015). Para a realização deste método, utiliza-se uma pequena sonda (transdutor), a qual emite ondas sonoras de alta frequência. Essas ondas são transmitidas por um gel até os tecidos que estão sendo analisados, e posteriormente são refletidas e captadas novamente pelo transdutor. Esse sinal é então transmitido para um software de imagem onde as medidas morfométricas podem ser realizadas (Gibbs; Cole, Sassano, 2011).

Nas pesquisas com anfíbios, as principais aplicações da ultrassonografia se concentraram em estudos sobre a função reprodutiva (Kouba; Vance, 2009), a função

cardíaca (Coucelo; Coucelo; Azevedo, 1996), bem como estudos de patologia e anatomia (Slater *et al.*, 2021; Stetter, 1995). Em Slater *et al.*, 2021, uma fêmea de *Xenopus laevis* foi submetida às técnicas de radiografia e ultrassom após ter apresentado letargia e anorexia por uma semana. As análises ultrassonográficas revelaram uma redução no volume arejado da periferia do pulmão esquerdo e uma suave redução do aspecto cranial do pulmão direito (Slater *et al.*, 2019). Dentre as possíveis causas para essas alterações, foi considerada a possibilidade de uma infecção ou processo inflamatório, ou ainda devido a uma efusão da cavidade celômica (Tarigo *et al.*, 2006). Neste caso, o uso desta técnica teve como objetivo o diagnóstico e a identificação de disfunções fisiológicas dos anfíbios do estudo em questão.

Em estudos reprodutivos, métodos de ultrassonografia já foram adaptados para realizar a determinação sexual de algumas espécies de anfíbios, incluindo *Kaloula pulchra* e *Xenopus laevis* (de Ruiz - Fernandez *et al.*, 2020), e *Lithobates sevosa* (Graham *et al.*, 2016). Além disso, a ultrassonografia também já foi empregada para identificar os estágios larvais durante a gestação em *Salamandra salamandra* (espécie que apresenta desenvolvimento direto) em estudos de monitoramento de anfíbios (Krause *et al.*, 2013).

No entanto, apesar de sua alta eficiência, o uso de métodos como estes costuma ficar restrito a pesquisas de países desenvolvidos, enquanto países menos desenvolvidos e áreas de pesquisa que possuem menos acesso aos financiamentos ainda não conseguem arcar com o alto investimento que esses equipamentos requerem, além dos custos de manutenção, e da necessidade de profissionais especializados capazes de fazer a leitura e interpretação técnica dos resultados obtidos (Yitbarek; Dagnaw, 2022). De fato, a aplicação das tecnologias de imagem ainda permanece bastante limitada nas áreas de estudo dos anfíbios, o que reforça a necessidade de que os grupos de pesquisa recebam maior atenção de suas nações para que o financiamento das pesquisas possa suprir as muitas lacunas de conhecimento científico ainda existentes.

O uso das tecnologias de imagem são métodos menos invasivos que permitem que diversas doenças e respostas a fatores estressantes sejam monitoradas de forma temporal e espacial, garantindo a geração de grande quantidade de conhecimento através de um pequeno número amostral, o que representa um refinamento ético para a pesquisa com anfíbios. Além disso, com o tempo, avanços nas técnicas ultrassonográficas também vêm tornando esses métodos mais portáteis e acessíveis, permitindo que os estudos de espécies selvagens também possam considerar a aplicação desses exames de imagem em suas pesquisas (Hildebrandt; Saragusty, 2015).

3.3.2.5. Métodos Morfométricos

A geometria morfométrica (GM) é uma ferramenta poderosa para o estudo das formas e suas covariações, testando hipóteses sobre suas causas, explorando variações morfológicas entre e dentro espécies, e descobrindo a importância biológica das especificidades de cada organismo (Zelditch *et al.*, 2004). Desde a sua introdução há mais de 20 anos (Corti, 1993; Rohlfand; Marcus, 1993), diversos campos da biologia têm se beneficiado das múltiplas aplicações da geometria morfológica na ciência (Rohlf, 2002; Slice, 2005; Adams *et al.*, 2004, 2013; Lawing; Polly, 2010; Klingenberg, 2010). Entretanto, estes métodos ainda são pouco empregados em estudos com anfíbios como um método alternativo e menos invasivo.

O grande potencial deste método baseia-se na habilidade de preservar as propriedades geométricas das estruturas (Adams *et al.*, 2013), estabelecendo uma descrição precisa de todos os aspectos através de medidas lineares (Zelditch *et al.*, 2004). Além disso, devido ao grande número de variáveis que podem ser avaliadas, até mesmo a detecção de pequenas diferenças se torna possível (Collyer *et al.*, 2015).

Alarcón-Rios *et al.* (2017) apresentaram um procedimento não invasivo de morfometria geométrica para explorar variações morfológicas na vista externa dorso-ventral das cabeças de duas populações de *Salamandra salamandra*. Através dessa técnica, foi possível detectar diferenças no formato da cabeça entre as populações e sexos, com uma relação alométrica entre o tamanho e a forma, o que indica possíveis adaptações evolutivas da espécie para performance e adaptabilidade aos seus habitats.

Uma proposta semelhante foi descrita em Davis *et al.* (2008), onde os autores descreveram uma forma de avaliar o crescimento de girinos de anuros (*Rana sylvatica*), correlacionando os valores das massas corpóreas, e requerendo o mínimo de remoção da água para sua condução. Para tanto, as análises morfométricas foram realizadas através de imagens fotográficas dos indivíduos (Davis *et al.* 2004; Davis *et al.* 2007; Davis; Grayson 2007; Davis; Maerz, 2007). Além de permitir a obtenção de medidas repetidas, esse método permite a avaliação de múltiplos girinos ao mesmo tempo, o que acaba refinando experimentos com grandes tamanhos amostrais (Davis *et al.*, 2008). Variações dessa técnica também têm sido empregadas por herpetologistas em estudos com girinos (Relyea 2004, 2005; Relyea; Hoverman, 2003; Van Buskirk, 2002; Wilson *et al.*, 2005).

Projetos de conservação de anfíbios que mantêm populações monitoradas em cativeiro necessitam de técnicas para avaliar a viabilidade reprodutiva dos organismos. Para tanto, métodos menos invasivos foram desenvolvidos a fim de monitorar o desenvolvimento ovariano e a saúde desses organismos, buscando reduzir ao máximo os distúrbios que essas análises poderiam causar a eles. Entre estes métodos, destacam-se a observação comportamental dos anfíbios, a inspeção visual e palpação abdominal (para avaliação das desovas), e em especial as medidas morfométricas, as quais serão utilizadas

para o cálculo de índices de condição corpórea (Calatayud *et al.*, 2019). Ainda no campo da biologia reprodutiva, os métodos morfométricos também podem ser aplicados ao estudo de espécies selvagens de anfíbios. Nesse caso, as medidas morfométricas corporais são correlacionadas ao tamanho e à massa corpórea, gerando índices que podem ser utilizados para a determinação dos sexos dos indivíduos (Mikhail; Vasily, 2018). Embora a morfometria e o cálculo de índices corpóreos constituam métodos de fácil aplicação, baixo custo e ampla adaptabilidade às diferentes espécies de anfíbios, essas técnicas ainda são pouco empregadas como biomarcadores indicativos de alterações ambientais.

3.3.2.6. Métodos alternativos para se aferir a temperatura de anfíbios

A temperatura do meio ambiente consiste em um dos principais fatores de seleção dos limites fisiológicos que afetam a distribuição dos organismos no planeta (Tomanek, 2008; Wiens, 2011). A adaptação às temperaturas do meio pode afetar diversos aspectos biológicos, dentre os quais destacam-se: as reações bioquímicas (Hochachka; Somero, 2002; Hutchison; Dupré, 1992; Rome *et al.*, 1992), a fenologia (Parmesan, 2007, 2006; Root *et al.*, 2003), as interações ecológicas (Post, 2013), o comportamento (Abram *et al.*, 2017; Kearney; Porter, 2009; Tuomainen; Candolin, 2011; Wells, 2007), o crescimento (Angilletta *et al.*, 2004; Atkinson, 1995), a reprodução (Grazer; Martin, 2012), a dispersão dos organismos (Berg *et al.*, 2010; Travis *et al.*, 2011) e as dinâmicas das populações (Kearney; Porter, 2009).

Nesse sentido, avaliar os efeitos das variações climáticas através da variação na temperatura ambiental tem sido um dos grandes desafios das pesquisas com animais ectotérmicos. Diversas pesquisas já evidenciaram os possíveis efeitos das variações térmicas em populações de anfíbios, relatando desde danos em órgãos reprodutivos (Paniagua; Fraile; Saez, 1990), redução da imunidade (Raffel *et al.*, 2006), consequências em patologias (Muths *et al.*, 2020; Turner *et al.*, 2021), danos genéticos (Morison *et al.*, 2020), e até mesmo casos de reversão sexual (Ruiz-García; Roco; Bullejos, 2021). Entretanto, a aplicação de métodos menos invasivos para a execução desses estudos ainda permanece relativamente escassa.

Um exemplo de estudo que utilizou protocolos menos invasivos foi descrito em Meza-Parral *et al.* (2019), no qual etogramas foram realizados com base em observações comportamentais e estudos anteriores descrevendo comportamentos associados à tolerância termal de insetos e anfíbios (Gallego *et al.*, 2016; Hutchison, 1961; Lutterschmidt; Hutchison, 1997a, 1997b; Zweifel, 1957); para tal, o comportamento dos indivíduos foi filmado durante 33 horas. As temperaturas foram determinadas através de termômetros portáteis, os quais mediam as temperaturas do ambiente em que os

indivíduos eram coletados, (Kestrel® 4500, ± 0.1 °C) e as temperaturas dos habitats em que determinada espécie era encontrada (Sper Scientific ® 800103; ± 0.1 °C). Como objetos de estudo, foram escolhidas uma espécie de salamandra (*Aquiloerycea cafetalera*) e em outras três espécies de anuros (*Craugastor rhodopis*, *Lithobates berlandieri* e *Rheohyla miotympanum*) oriundos da floresta de Veracruz (México) para estimar a tolerância relativa dos anfíbios ao aumento de temperatura. Esse método pode ser aplicado tanto em ambientes laboratoriais quanto selvagens, e é replicável em organismos pós metamórficos ou também àqueles que apresentam desenvolvimento direto (Meza-Parral *et al.*, 2019). Rowley e Alford (2007), por sua vez, avaliaram a viabilidade de termômetros de infravermelho (que não necessitam de contato), quanto à sua aplicação em estudos para aferir a temperatura corporal (pele e cloaca) de *Litoria lesueuri*. Os termômetros de IR apresentaram resultados efetivos, e as medições foram semelhantes para ambas as temperaturas de pele e cloaca. Além do baixo custo, esses equipamentos apresentam alta portabilidade, tamanho pequeno e facilidade em registrar rapidamente a temperatura (mesmo em tamanhos amostrais mais numerosos) (Rowley; Alford, 2007).

3.3.2.7. Outros métodos alternativos e menos invasivos para estudos com anfíbios

A bioacústica de anfíbios é uma área da herpetologia de grande relevância, sendo aplicada em estudos de taxonomia para a identificação de novas espécies (Kohler *et al.*, 2021), em pesquisas sobre a história natural das espécies (Calderón *et al.*, 2022), e na avaliação dos efeitos de ruídos antropogênicos (Zaffaroni-Caorsi *et al.*, 2022). ou de doenças (Kelleher *et al.*, 2021), sobre a vocalização dos anfíbios. A biotelemetria, ou “técnica instrumental”, é um método da bioacústica capaz de transmitir informações de um organismo vivo e seu habitat para um pesquisador, o qual pode trabalhar de forma remota (Slater, 1965). Esse método foi ganhando popularidade entre os pesquisadores de vida selvagem, e a biotelemetria se tornou uma ferramenta bastante versátil aos biólogos, conservacionistas e gerenciadores de vida selvagem (Mcgowan *et al.*, 2017). No entanto, a aplicação dessas técnicas em pesquisas com anfíbios ainda é escassa. A telemetria pode ser realizada através de rádios (VHF, de frequência alta; e a UHF, de ultra alta frequência) para obter dados de vocalização dos organismos, utilizando baterias para a emissão de sinais. Esse método requer que um pesquisador rastreie o sinal de rádio com um receptor ou uma antena (Mascanzoni ; Wallin 1986). Um exemplo de aplicação desses métodos em pesquisas com anfíbios consiste no reconhecimento de vocalizações de diferentes espécies, como relatado em Linke *et al.* (2020). Outros métodos de gravação podem ser baseados em câmeras de vídeo, para acompanhamento da movimentação e migração dos

organismos. Um exemplo de aplicação desses vídeos foi relatado em estudos sobre estruturas que conectam fragmentos de áreas de vegetação (pontes para organismos selvagens), onde a migração dos anfíbios foi monitorada através de câmaras a fim de compreender os padrões de movimentação e a habilidade de restabelecer uma conexão entre as áreas fragmentadas (Pagnucco; Paszkowski; Scrimgeor, 2011), demonstrando outra possibilidade de aplicação desses métodos na ecologia de paisagem.

Em estudos das áreas de conservação e história natural de anfíbios, uma questão que vem levantando muitas preocupações em escala global é a incidência de morte dos anfíbios em estradas (Beebee, 2013). Ao se movimentarem entre fragmentos de vegetação que são atravessados por estradas e rodovias, os anfíbios frequentemente são atropelados por veículos (REF). E as consequências dessas mortes vêm sendo estudadas quanto a sua contribuição para os declínios das populações de anfíbios. No entanto, esses estudos não se limitam às questões de mortalidade. As carcaças de anfíbios encontradas nas estradas podem ser utilizadas como amostras (*post mortem*) para estudar características como a distribuição de espécies, as preferências de habitat ou até mesmo a fenologia (Orłowski; Nowak, 2007; Sutherland *et al.*, 2010). O uso de carcaças de anfíbios também pode ser uma alternativa não invasiva para se obter material para pesquisas futuras, incluindo análises genéticas (Balkenhol; Waits, 2009), amostras para a detecção de doenças (Martel *et al.*, 2012), amostras para rastreamento de elementos nos ossos (Simon *et al.*, 2012), ou estudo da estrutura etária e histológica (Kaczmarek *et al.*, 2016). Kolenda *et al.* (2022) também relataram o uso de amostras de falanges de anfíbios (*Bufo bufo*) que foram mortos em estradas para a determinação da idade desses organismos por esqueletocronologia. Dessa forma, este método não invasivo permite que estudos demográficos sejam realizados em populações locais de anfíbios, evitando a mutilação desnecessária de espécimes vivos.

Em estudos que necessitam de identificação sexual de anfíbios, o dicromatismo (diferenças de cor entre os dois sexos) (Lifshitz; St Clair, 2016) pode ser utilizado como fator de diferenciação para algumas espécies. Em muitas espécies de anfíbios, os machos adultos são mais brilhantemente coloridos do que as fêmeas (Bell; Zamudio, 2012). Ujhegyi e Bókony (2020) validaram este método para a espécie *Bufo bufo*, demonstrando um dicromatismo sexual significativo onde os machos apresentavam coloração amarelo-esverdeada (menos vermelhos) e mais brilhantes do que as fêmeas.

Na busca por condições que confirmem maior bem-estar aos animais, muitos zoológicos e aquários modernos monitoram e aprimoram as condições dos habitats usando uma abordagem científica. Nesse sentido, um método proposto para essa abordagem consiste em um modelo de domínios, que indica como a alteração de domínios de nutrição, meio ambiente, saúde ou comportamento podem levar a impactos negativos,

positivos ou neutros no estado de bem-estar do animal (Mellor; Beausoleil, 2015). Woody *et al.* (2021) relataram experimentos nos quais a observação dos comportamentos da espécie de anuro (*Anaxyrus americanus*), que exibe longos períodos de comportamento sedentário, permitiu explorar detalhes sutis de quais características ambientais poderiam servir como indicadores de bem-estar. Com base nessas análises, os autores criaram um índice da postura dos animais sob o ângulo dos membros anteriores, da visibilidade das regiões ventrais e da distribuição do peso corporal. Além disso, como um indicador de excitação, taxas aproximadas de respiração foram avaliadas com base na expansão da garganta dos sapos. Análises subsequentes revelaram que as posturas mais baixas foram associadas com taxas menores de expansão de garganta, enquanto posturas mais eretas foram associadas a taxas mais rápidas de expansão de garganta. Essas observações sugerem que a postura pode ser uma maneira não invasiva, promissora, e rápida para se estudar o estado de excitação dos sapos. Esse estudo estabelece bases importantes para a avaliação do bem-estar em anfíbios, no entanto a sua aplicação nas pesquisas ainda é rara.

3.4. Conclusões

O desenvolvimento de métodos de amostragem não invasivos ou minimamente invasivos possui grande importância na experimentação científica, e tem como finalidade a busca por um maior refinamento dos procedimentos e a garantia do bem-estar animal. Esses refinamentos podem ser realizados através de ajustes no tamanho amostral e no método de coleta das amostras, os quais devem ser suficientes para permitir uma inferência ecológica robusta, evitando também os impactos negativos sobre as populações naturais, especialmente aquelas consideradas pequenas, instáveis e/ou ameaçadas.

Nas diversas áreas da Herpetologia, a aplicação de métodos menos invasivos em estudos com anfíbios ainda é relativamente limitada, no entanto, aos poucos as múltiplas áreas de conhecimento vão incrementando a aplicabilidade desses métodos alternativos. Nesse sentido, a revisão bibliográfica sistemática nos permitiu reunir as principais tendências e características dos estudos com anfíbios, demonstrando uma baixa quantidade de artigos publicados ao longo dos anos (somente cerca de 1 a 2 artigos foram publicados por ano, na maior parte do período cronológico). Como já esperado, os Estados Unidos dominaram a maioria dessas publicações, devido ao grande investimento em pesquisa científica que é comum nos países mais desenvolvidos. Quanto às variáveis mais empregadas, a maior parte dos estudos foram conduzidos com anfíbios da ordem Anura (notadamente os gêneros *Xenopus* e *Rhinella*, devido aos benefícios que esses gêneros apresentam, como a característica de espécie-modelo amplamente estudada e tamanhos

corpóreos adequados, respectivamente), no estágio adulto, não informando o sexo empregado. Esses dados revelam lacunas de grande importância, como a necessidade de se conduzir mais estudos na área para ampliar a utilização dessas múltiplas variáveis. Com relação às principais áreas de aplicação destes métodos, destacaram-se: os métodos menos invasivos para a captura e marcação de indivíduos, métodos morfométricos, métodos de gravação, técnicas moleculares, métodos para aferição de temperatura e monitoramento da anatomia interna (com o uso de tecnologias ou exames de imagem), entre outros.

O levantamento desses dados permitiu analisar a situação atual acerca do conhecimento sobre os métodos alternativos em estudos com anfíbios a fim de compilar esses dados, destacando suas possíveis aplicações, bem como seus benefícios e limitações. Com base nesse conhecimento, espera-se que os pesquisadores possam buscar um equilíbrio para suas pesquisas, utilizando métodos antigos e novos, e moderando fatores como a importância das informações que serão obtidas através das investigações, a viabilidade e custo dos métodos, e as implicações que os experimentos podem gerar sobre o bem-estar dos organismos experimentais. Espera-se que a compilação desses resultados possa incentivar os pesquisadores e lhes fornecer novas ideias para ampliar a aplicação de métodos menos invasivos nas pesquisas com anfíbios, e também com outros modelos experimentais, para que as pesquisas científicas apresentem maior responsabilidade ética na experimentação com organismos vivos.

REFERÊNCIAS

ABRAM, P.K.; BOIVIN, G.; MOIROUX, J.; BRODEUR, J.,. Behavioral effects of temperature on ectothermic animals: unifying thermal physiology and behavioral plasticity. *Biol. Rev.* 92, 1859–1876, 2017

ADAMS, D.C. Character displacement via aggressive interference in appalachian salamanders. *Ecology* 85:2664–2670, 2004

ADAMSON, E ; SAHA, A ; MADDOCK, SI ; NUSSBAUM, R ; GOWER, D ; STREICHER, J. Microsatellite discovery in an insular amphibian (*Grandisonia alternans*) with comments on cross-species utility and the accuracy of locus identification from unassembled Illumina data:. *Conservation Genetics Resources*, 2016.

AEVARSSON, U ; GRAVES, A ; CARTER, K ; DOHERTY-BONE, T ; KANE, D ; SERVINI, F ; TAPLEY, B ; MICHAELS, C. Individual identification of the Lake Oku clawed frog (*Xenopus longipes*) using a photographic identification technique. *Herpetological Conservation and Biology*. 17. 67-75, 2022.

AGOSTINI, M. G.; ROESLER, I.; BONETTO, C.; RONCO, A. E.; BILENCA, D. Pesticides in the real world: The consequences of GMO-based intensive agriculture on native amphibians. **Biological Conservation**, v. 241, 108355, 2020.

ALARCÓN-RÍOS, L ; VELO-ANTÓN, G ; KALIONTZOPOULOU, A. A non-invasive geometric morphometrics method for exploring variation in dorsal head shape in urodeles: sexual dimorphism and geographic variation in *Salamandra salamandra*: GEOMETRIC MORPHOMETRICS IN URODELES' HEAD. *Journal of Morphology*, 2017.

AMARAL, C. R.; CHAVES, A. C.; BORGES JUNIOR, V. N.; PEREIRA, F.; SILVA, B. M.; SILVA, D. A.; ROCHA, C. F. Amphibians on the hotspot: Molecular biology and conservation in the South American Atlantic Rainforest. *PLoS One*, 14(10), e0224320, 2019.

ANDIS, A.A.Z. A new, noninvasive method of batch-marking amphibians across developmental stages. *Herpetological Conservation and Biology*. 13. 423-432, 2018.

ARNTZEN, J.W., WALLIS, G.P. Geographic variation and taxonomy of crested newts (*Triturus cristatus* superspecies): morphological and mitochondrial DNA data. *Contrib. Zool.* 68: 181-203, 1999.

AUBRET, F.; TORT, M.; BLANVILLAIN, G. A non-invasive method of measuring heart rates in small reptiles and amphibians. *Herpetological Review*, 44(3), 421-423, 2013.

BAILEY, L. L.; MUTHS, E. Integrating amphibian movement studies across scales better informs conservation decisions. *Biological Conservation*, 236, 261-268, 2019.

BAINBRIDGE, L.; STOCKWELL, M.; VALDEZ, J.; KLOP-TOKER, K.; CLULOW, S.; CLULOW, J.; MAHONY, M. Tagging tadpoles: retention rates and impacts of visible implant elastomer (VIE) tags from the larval to adult amphibian stages. *Herpetological Journal*, v. 33, p. 133-140, 2015

BALÁZS, G ; VÖRÖS, J ; LEWARNE, B ; HERCZEG, G. A new non-invasive in situ underwater DNA sampling method for estimating genetic diversity. *Evolutionary Ecology*, 2020.

BALKENHOL N; WAITS LP Molecular road ecology: exploring the potential of genetics for investigating transportation impacts on wildlife. *Mol Ecol* 18:4151–4164, 2009.

- BARNOSKY, A. D. *et al.* Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471, 51–57, 2011.
- BAUGH, A.T.; BASTIEN, B.; STILL, M.B.; STOWELL, N. Validation of water-borne steroid hormones in a tropical frog (*Physalaemus pustulosus*). *Gen Comp Endocrinol*, 2018
- BAUGH, A.T.; GRAY-GAILLARD, S.L. Excreted testosterone and male sexual proceptivity: A hormone validation and proof-of-concept experiment in túngara frogs. *Gen Comp Endocrinol*, 2021.
- BECK, C. W.; SLACK, J. M. An amphibian with ambition: a new role for *Xenopus* in the 21st century. *Genome biology*, 2, 1-5, 2001.
- BEEBEE, T. J. C Effects of road mortality and mitigation measures on amphibian populations. *Conserv Biol* 27:657–668, 2013.
- BEIRINCKX, K., VAN GOSSUM, H., LAJEUNESSE, M.J. and FORBES, M.R. Sex biases in dispersal and philopatry: insights from a meta-analysis based on capture-mark-recapture studies of damselflies. *Oikos* **113**: 539-547, 2006.
- BELL, R.C.; ZAMUDIO, K.R. Sexual dichromatism in frogs: Natural selection, sexual selection and unexpected diversity. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 4687–4693, 2012.
- BILLET, L. S.; WUERHNER, V. P.; HUA, J.; RELYEA, R. A.; HOVERMAN, J. T. Timing and order of exposure to two echinostome species affect patterns of infection in larval amphibians. *Parasitology*, 147(13), 1515-1523, 2020.
- BOLGER, D.T., MORRISON, T.A., VANCE, B., LEE, D., FARID, H. A computer-assisted system for photographic mark–recapture analysis. *Methods Ecol. Evol.* 3: 813-822, 2012.
- BOPPART, S.A.; TEARNEY, G.J.; BOUMA, B.E.; SOUTHERN, J.F.; BREZINSKI, M.E.; FUJIMOTO, J.G. Noninvasive assessment of the developing *Xenopus* cardiovascular system using optical coherence tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;94(9):4256-61, 1997.
- BORZÉE, A., LITVINCHUK, S. N., RI, K., ANDERSEN, D., NAM, T. Y., JON, G. H.; JANG, Y. Update on distribution and conservation status of amphibians in the Democratic People's Republic of Korea: Conclusions based on field surveys, environmental modelling, molecular analyses and call properties. *Animals*, 11(7), 2057, 2021.

BOYLE, D. G., BOYLE, D. B., OLSEN, V., MORGAN, J. A. T.; HYATT, A. D. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of aquatic organisms*, 60(2), 141-148, 2004.

BRANNELLY, L ; WETZEL, D ; OHMER, M ; ZIMMERMAN, L ; SAENZ, V ; RICHARDS ZAWACKI, C. Evaluating environmental DNA as a tool for detecting an amphibian pathogen using an optimized extraction method. *Oecologia*. 194. 1-15, 2020.

BROD, S.; BROOKES, L.; GARNER, T. W. Discussing the future of amphibians in research. *Lab Animal*, 48(1), 16-18, 2019

BROECKHOVEN, C., DU PLESSIS, A., LE ROUX, S. G., MOUTON, P. L. F. N.; HUI, C. Beauty is more than skin deep: a non- invasive protocol for in vivo anatomical study using micro- CT. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(3), 358-369, 2017.

BROECKHOVEN, C.; DU PLESSIS, A. X-ray microtomography in herpetological research: a review. *Amphibia-Reptilia*, 39(4), 377-401, 2018.

BROQUET, T., BERSET-BRAENDLI, L., EMARESI, G., ; FUMAGALLI, L. Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics*, 8(2), 509-511, 2007.

BROQUET, T., BERSET-BRAENDLI, L., EMARESI, G., ; FUMAGALLI, L. Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians. *Conservation Genetics*, 8(2), 509-511, 2007.

BURGER, M.L.; CRUZ, A.M.; CROSSLAND, G.E.; GAGLIA, G.; RITCH, C.C.; BLATT, S.E; BHUTKAR, A.; CANNER, D.; KIENKA, T.; TAVANA, S.Z.,; BARANDIARAN, A.L.; GARMILLA, A.; SCHENKEL, J.M.; HILLMAN, M.; DE OS RIOS KOBARA, I.; LI, A.,; JAEGER, A.M.; HWANG, W.L.; WESTCOTT, P.M.K.; ANOS, M.P.; HOLOVATSKA, M.M.; HODI, F.S.; REGEV, A.; SANTAGATA, S.; JACKS, T. Antigen dominance hierarchies shape TCF1⁺ progenitor CD8 T cell phenotypes in tumors. *Cell*. 16;184(19):4996-5014.e26, 2021.

BURGGREN, W. W.; WARBURTON, S. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *ILAR journal*, 48(3), 260-269, 2007.

CABRERA-GUZMÁN, E.; CROSSLAND, M. R.; BROWN, G. P.; SHINE, R. Larger body size at metamorphosis enhances survival, growth and performance of young cane toads (*Rhinella marina*). *PloS one*, 8(7), e70121, 2013.

CALATAYUD, N. E., CHAI, N., GARDNER, N. R., CURTIS, M. J.; STOOPS, M. A. Reproductive techniques for ovarian monitoring and control in amphibians. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (147), e58675, 2019.

CALDERÓN, F. S. Á., HENRÍQUEZ, V., POCASANGRE-ORELLANA, X., RIVERA, J. G. A.; ARGUETA, E. A. C. Bioacoustics characterization and habitat use of glass frogs in El Salvador. *UNED Research Journal*, 14(2), e4008-e4008, 2022.

CARTER, S.J.B., BELL, I.P., MILLER, J.J., GASH, P.P. Auto-mated marine turtle photograph identification using artificial neural networks, with application to green turtles. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 452: 105–110, 2014.

CHAO, A. Estimating population size for sparse data in capture-recapture experiments. *Biometrics* 45, 427–438, 1989.

CHEN T, FARRAGHER S, BJOURSON AJ, ORR DF, RAO P, SHAW C. Granular gland transcriptomes in stimulated amphibian skin secretions. *Biochem J.* 1;371(Pt 1):125-30, 2003.

CLARK, J. M.. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *British Journal of Nutrition*, 120(s1), S1-S7, 2018.

CODDINGTON, E.J.; CREE, A. Effect of acute captivity stress on plasma concentrations of corticosterone and sex steroids in female whistling frogs, *Litoria ewingi*. *Gen Comp Endocrinol* 100: 33–38, 1995.

COHEN, N.W.; STEBBING, R.C. *A Natural History of Amphibians*, 1997.

COLLINS, J. P.; STORFER, A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and distributions*, 9(2), 89-98, 2003.

COLLYER ML, SEKORA D, ADAMS DC. A method for analysis of phenotypic change for phenotypes described by high dimensional data. *Heredity* 115:357–365, 2015.

COLON, V.; GUMPENBERGER, M. Diagnosis of hepatic lipidosis in a tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) by computed tomography, *Journal of Exotic Pet Medicine*, Volume 33, P. 18-22, 2020.

CORTI, M. Geometric morphometrics: An extension of the revolution. *Trends Ecol Evol* 8:302–303, 1993.

COUCELO J, COUCELO J, AZEVEDO J: Ultrasonography characterization of heart morphology and blood flow of lower vertebrates. *J Exp Zool* 275(2–3):73–82, 1996.

COVE, M.; SPÍNOLA, R. Pairing Noninvasive Surveys with Capture-Recapture Analysis to Estimate Demographic Parameters for *Dendrobates auratus* (Anura: Dendrobatidae) from an Altered Habitat in Costa Rica. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 2013.

CRISTESCU, M.E.; HEBERT, P.D.N. Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. *Ann Rev Ecol Syst* 49:209–230, 2018.

CURZER, H. J., PERRY, G., WALLACE, M. C.; PERRY, D. 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, 2016.

CZYPIONKA, T., KRUGMAN, T., ALTMÜLLER, J., BLAUSTEIN, L., STEINFARTZ, S., TEMPLETON, A. R.; NOLTE, A. W. Ecological transcriptomics—a non-lethal sampling approach for endangered fire salamanders. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(12), 1417-1425, 2015.

DAVIS, A ; CONNELL, L ; GROSSE, A ; MAERZ, J. A fast, non-invasive method of measuring growth in tadpoles using image analysis. *Herpetological Review*. 39. 56-58, 2008.

DAVIS, A. K.; MAERZ, J. C. Assessing Leukocyte Profiles of Salamanders and Other Amphibians: A Herpetologists' Guide. In *Salamanders: Methods and Protocols* (pp. 443-458). New York, NY: Springer US, 2022.

DAVIS, A. K., N. COPE, A. SMITH, AND M. J. SOLENSKY. Wing color predicts future mating success in male monarch butterflies. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 100:339–344, 2007.

DAVIS, A.K.N.; K. L. GRAYSON. Improving natural history research with image analysis: the relationship between skin color, sex, size and stage in adult red-spotted newts (*Notophthalmus viridescens viridescens*). *Herpetol. Cons. Biol.* 2:67–72, 2007.

DAVIS, A.K.N.; B. FARREY, AND S. ALTIZER. Quantifying monarch butterfly larval pigmentation using digital image analysis. *Entomol. Exp. Appl.* 113:145–147, 2004.

D'ERRICO G, VITIELLO G, DE TOMMASO G, ABDEL-GAWAD FK, BRUNDO MV, FERRANTE M, DE MAIO A, TROCCHIA S, BIANCHI AR, CIARCIA G, GUERRIERO G. Electron Spin Resonance (ESR) for the study of Reactive Oxygen

Species (ROS) on the isolated frog skin (*Pelophylax bergeri*): A non-invasive method for environmental monitoring. *Environ Res.* Aug;165:11-18, 2018.

DU PREEZ, N. P. Development of DNA-based assays for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in environmental samples and amphibians (Doctoral dissertation, North-West University (South Africa), 2019.

DUCRET, V., VIDELIER, M., MOUREAUX, C., BONNEAUD, C., & HERREL, A. Do female frogs have higher resting metabolic rates than males? A case study with *Xenopus allofraseri*. *Journal of Zoology*, 312(4), 221-226, 2020.

ELDITCH, M.; SWIDERSKI, D.L.; SHEETS, H.D.; FINK, W.L. *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. New York: Elsevier, 2004.

ERKAEVA, G. P.; SHUKUROV, U. S. EXPERIENCE OF FOREIGN COUNTRIES IN INCREASING THE INVESTMENT ATTRACTIVENESS OF THE REGIONS. *Gospodarka i Innowacje.*, 24, 234-238, 2022.

FENG, A.S.; ARCH, V.S.; YU, Z.; YU, X-J.; XU, Z-M.; SHEN, J-X. Neighbor–stranger discrimination in concave-eared torrent frogs, *Odorrana tormota*. *Ethology* 115, 851-856, 2009.

FERNER, J.W. Measuring and marking post-metamorphic amphibians. In: C.K. Dodd, (ed.). *Amphibian Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques*. Oxford University Press. Oxford, p. 123 – 141, 2010.

FISHER M.C.; GARNER T.W.J. Chytrid fungi and global amphibian declines. *Nat Ver Microbiol* 18:332–334, 2020.

FORSBURG, Z.R.; GOFF, C.B.; PERKINS, H.R.; ROBICHEAUX, J.A.; ALMOND, G.F.; GABOR, C.R. Validation of water-borne cortisol and corticosterone in tadpoles: Recovery rate from an acute stressor, repeatability, and evaluating rearing methods. *Gen Comp Endocrinol.* 15;281:145-152, 2019.

FROST, D.R. *Amphibian species of the world: An online reference*. Version 4. Electronic database available (<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>). New York: American Museum of Natural History, 2011.

GABOR, C.R.; BOSCH, J.; FRIES, J.N.; DAVIS, D.R. A non-invasive waterborne hormone assay for amphibians. *Amphibia-Reptilia* 34(2): 151–162, 2013.

- GAGLIANO, M.; MCCORMICK, M. I. Hormonally mediated maternal effects shape offspring survival potential in stressful environments. *Oecologia*, 160, 657-665, 2009.
- GALLEGRO, B., VERDÚ, J., CARRASCAL, L., LOBO, J.. A protocol for analysing thermal stress in insects using infrared thermography. *J. Therm. Biol.* 56, 113–121, 2016
- GAVEL, M. J., RICHARDSON, S. D., DALTON, R. L., SOOS, C., ASHBY, B., MCPHEE, L.; ROBINSON, S. A. Effects of 2 neonicotinoid insecticides on blood cell profiles and corticosterone concentrations of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*). *Environmental toxicology and chemistry*, 38(6), 1273-1284, 2019.
- GERMANO, J. M., MOLINIA, F. C.; BISHOP, P. J.; CREE, A. Urinary hormone analysis assists reproductive monitoring and sex identification of bell frogs (*Litoria raniformis*). *Theriogenology*, 72(5), 663-671, 2009.
- GIBBS, V., COLE, D.; SASSANO, A. Ultrasound physics and technology: how, why and when. Elsevier Health Sciences, 2011.
- GOLDENBERG, S., RODRIGUES, M. L.; SAVINO, W. Brazilian science: towards extinction?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 116, 2022.
- GRAHAM, C.H. Latitude, elevational climatic zonation and speciation in New World vertebrates. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 523 194–201, 2011.
- GRAY, M. J., MILLER, D. L., ; HOVERMAN, J. T. Reliability of non-lethal surveillance methods for detecting ranavirus infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 99(1), 1-6, 2012.
- GREEN, D. M.; LANNOO, M. J.; LESBARRÈRES, D.; MUTHS, E. Amphibian population declines: 30 years of progress in confronting a complex problem. ***Herpetologica***, v. 76, n. 2, p. 97-100, 2020.
- GRIFFITHS, R. A., FOSTER, J., WILKINSON, J.W.; SEWELL, D. Science, statistics and surveys: a herpetological perspective. *Journal of Applied Ecology* 52, 1413–1417, 2015
- HAMMOND, T.T.; AU, Z.A.; HARTMAN, A.C.; RICHARDS-ZAWACKI, C.L. Assay validation and interspecific comparison of salivary glucocorticoids in three amphibian species. *Conserv Physiol.* 27;6(1):coy055, 2018.

HEEMEYER, J. L., HOMYACK, J. A. ;HAAS, C. A. Retention and readability of visible implant elastomer marks in the eastern Red-Backed salamanders *Plethodon cinereus*. *Herpetological Review* 38 (4): 425-428, 2007.

HILDEBRANDT, T. B.; SARAGUSTY, J. Use of ultrasonography in wildlife species. *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*; Elsevier BV: Amsterdam, The Netherlands, 8, 714-723, 2015.

HOCHACHKA, P.W., SOMERO, G.N. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*, Oxford University Press. Oxford, UK, 2002.

HOFMANN G.E.; TODGHAM A.E. Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annu Rev Physiol* 72: 127–145, 2010.

HOMAN, R.N.; REGOSIN, J.V.; RODRIGUES, D.M.; REED, J.M.; WINDMILLER, B.S.; ROMERO, L.M. Impacts of varying habitat quality on the physiological stress of spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *Animal Conservation*, v. 6, p. 11-18, 2006.

HOULAHAN, J.E.; FINDLAY, C.S.; SCHMIDT, B.R.; MYER, A.H.; KUZMIN, S.L. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404:752–755, 2000.

HUTCHISON VH, DUPRÉ RK. Thermoregulation. In: Feder ME, Burggren WK, eds. *Environmental Physiology of the Amphibians*. Chicago: University of Chicago Press. p 206-249, 1992.

HUTCHISON, V.H. Critical Thermal Maxima in Salamanders. *Physiol. Zool.* 34, 92–125, 1961.

IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-3. <http://www.iucnredlist.org>, 2019.

JAATINEN, K.; SELTMANN, M.W.; HOLLMÉN, T.; ATKINSON, S.; MASHBURN, K.; ÖST, M. Context dependency of baseline glucocorticoids as indicators of individual quality in a capital breeder. *Gen Comp Endocrinol* 191: 231–238, 2013.

JAIN, A.K. Biometric recognition. *Nature* 449, 38–40, 2007.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M.M. Anfíbios: biologia e seus venenos. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M., HADDAD, J.V. *Animais*

peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier, 2009.

KACZMARSKI M; KOLENDA K; ROZENBLUT-KOŚCISTY B; SOŚNICKA W. Phalangeal bone anomalies in the European common toad *Bufo bufo* from polluted environments. *Environ Sci Pollut Res* 23:21940–21946, 2016.

KAGANER, A ; STAPLETON, G. ; BUNTING, E ; HARE, M. Aquatic eDNA can advance monitoring of a small- bodied terrestrial salamander and amphibian pathogen. *Environmental DNA*. 4. 10.1002/edn3.316, 2022.

KARLSSON, O.; SVANHOLM, S.; ERIKSSON, A.; CHIDIAC, J.; ERIKSSON, J.; JERNERÉN, F.; BERG, C. Pesticide – induced multigeneration effects on amphibian reproduction and metabolism. *Science of the Total Environment*, 775, 145771, 2021.

KEARNEY, M., PORTER, W. Mechanistic niche modeling: Combining physiological and spatial data to predict species' ranges. *Ecol. Lett.* 12, 334–50, 2009.

KELLEHER, S. R., SCHEELE, B. C., SILLA, A. J., KEOGH, J. S., HUNTER, D. A., ENDLER, J. A.; BYRNE, P. G. Disease influences male advertisement and mating outcomes in a critically endangered amphibian. *Animal Behaviour*, 173, 145-157, 2021.

KENKO, D. B. N. Effects of Pesticides on Amphibians and Tentative Solutions: Review. **J. Asian Sci. Res.**, v. 12, p. 218–236, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.55493/5003.v12i4.4647>. Acesso em: 2022.

KHABIB, M. N. H., SIVASANKU, Y., LEE, H. B., KUMAR, S.; KUE, C. S. Alternative animal models in predictive toxicology. *Toxicology*, 465, 153053, 2022.

KHATIWADA, J. R., B. WANG, T. ZHAO, F. XIE.; J.-P. JIANG. An integrative taxonomy of amphibians of Nepal: An updated status and distribution. *Asian Herpetological Research* 12: 1–35, 2021.

KIESECKER, J. M. Global stressors and the global decline of amphibians: tipping the stress immunocompetency axis. *Ecol. Res.* 26, 897–908, 2011.

KLINGENBERG CP. Evolution and development of shape: Integrating quantitative approaches. *Nat Rev Genet* 11:623 - 635, 2010.

KLOAS, W.; LUTZ, I. Amphibians as model to study endocrine disrupters. *J Chromatogr A*. 1130(1):16-27, 2006.

KÖHLER, G., ZWITZERS, B., THAN, N. L., GUPTA, D. K., JANKE, A., PAULS, S. U.; THAMMACHOTI, P. Bioacoustics Reveal Hidden Diversity in Frogs: Two New Species of the Genus *Limnometes* from Myanmar (Amphibia, Anura, Dicroglossidae). *Diversity*, 13(9), 399, 2021.

KOLENDA, K.; KACZMARSKI, M.; NAJBAR, A.; ROZENBLUT-KOŚCISTY, B.; CHMIELEWSKA, M.; NAJBAR, B. Road-killed toads as a non-invasive source to study age structure of spring migrating population. *European Journal of Wildlife Research*. 65. 10.1007/s10344-018-1240-8, 2018.

KOUBA AJ, VANCE CK: Applied reproductive technologies and genetic resource banking for amphibian conservation. *Reprod Fertil Dev* 21(6):719–737, 2009.

KRAUSE, E. T., VON ENGELHARDT, N., STEINFARTZ, S., TROSIEN, R.; CASPERS, B. A. Ultrasonography as a minimally invasive method to assess pregnancy in the fire salamanders (*Salamandra salamandra*). *Salamandra*, 49, 211-214, 2013.

KUPFER, A ; NABHITABHATA, J ; HIMSTEDT, W. Reproductive ecology of female caecilian amphibians (genus *Ichthyophis*): A baseline study. *Biological Journal of the Linnean Society*. 83. 207 - 217, 2004.

KWOK, H.F.; CHEN, T.; IVANYI, C.; SHAW, C. DNA in Amphibian and Reptile Venom Permits Access to Genomes without Specimen Sacrifice. *Genomics Insights*, 2008.

LAWING A, POLLY P. Geometric morphometrics: Recent applications to the study of evolution and development. *J Zool* 280:1–7, 2010.

LEFORT, M.C., CRUICKSHANK, R. H., DESCOVICH, K., ADAMS, N. J., BARUN, A., EMAMI-KHOYI, A.; BOYER, S. Blood, sweat and tears: a review of non-invasive DNA sampling. *Peer Community Journal*, 2, 2022.

LI, Y., COHEN, J. M.; ROHR, J. R. Review and synthesis of the effects of climate change on amphibians. *Integr. Zool*. 8, 145–161, 2013.

LIEDTKE, H. C. AmphiNom: an amphibian systematics tool. *Systematics and Biodiversity*. 17. 1-6. 10.1080/14772000.2018.1518935, 2019.

LIFSHITZ, N., ST CLAIR, C.C., Coloured ornamental traits could be effective and non-invasive indicators of pollution exposure for wildlife. *Conserv. Physiol*. 4, 1–16, 2016.

LINKE, S ; TEIXEIRA, D ; TURLINGTON, K. Optimising call recognisers and evaluating watering response for amphibians in the Koondrook-Perricoota Forest, 2020.

- LONGCORE, J.E., PESSIER, A.P.; NICHOLS, D.K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219–227, 1999.
- LU-SHA, L. I. U.; LAN-YING, Z. H. A. O.; SHOU-HONG, W. A. N. G.; JIANG, J. P. Research proceedings on amphibian model organisms. *Zoological Research*, 37(4), 23, 2016
- LUTTERSCHMIDT, W.I., HUTCHISON, V.H. The critical thermal maximum: history and critique. *Can. J. Zool.* 75, 1561–1574, 1997a.
- LUTTERSCHMIDT, W.I., HUTCHISON, V.H. The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. *Can. J. Zool.* 75, 1553–1560, 1997b
- MADDOCK, S ; LEWIS, C ; WILKINSON, M ; DAY, J ; MOREL, CHARLES ; KOUETE, M ; GOWER, D. Non-lethal DNA sampling for caecilian amphibians. *The Herpetological Journal*, 2014.
- MARTEL A; FARD MS; VAN ROOIJ P; JOORIS R; BOONE F; HAESBROUCK F; VAN ROOIJ D; PASMANS F. Road-killed common toads (*Bufo bufo*) in Flanders (Belgium) reveal low prevalence of ranaviruses and *Batrachochytrium dendrobatidis*. *J Wildl Dis* 48:835–839, 2012.
- MASCANZONI D. ; WALLIN H. The harmonic radar: a new method of tracing insects in the field. *Ecol. Entomol.* 11, 387–90, 1986.
- MAZEROLLE, M.J., BAILEY, L.L., KENDALL, W.L., ROYLE, J.A., CONVERSE, S.J.; NICHOLS, J.D. Making great leaps forward: accounting for detectability in herpetological field studies. *J. Herpetol.* **41**: 672-689, 2007.
- MCCREA, R.S.; MORGAN, B.J.T. *Analysis of Capture-Recapture Data*. Chapman and Hall/CRC Press, Florida, USA, 2014.
- MCDIARMID, R.W.; ALTIG, R. *Tadpoles: the biology of anuran larvae*. Chicago: The University of Chicago Press, 1999.
- MCGOWAN J., BEGER M., LEWISON R. L. *et al.* Integrating research using animal-borne telemetry with the needs of conservation management. *J. Appl. Ecol.* 54, 423–9, 2017.

MCKEE, A ; CALHOUN, D ; BARICHIVICH, W ; SPEAR, S ; GOLDBERG, C ; GLENN, T. Assessment of Environmental DNA for Detecting Presence of Imperiled Aquatic Amphibian Species in Isolated Wetlands. *Journal of Fish and Wildlife Management*, 2015.

MELLOR, D.J.; BEAUSOLEIL, N.J. Extending the “Five Domains” Model for Animal Welfare Assessment to Incorporate Positive Welfare States. *Anim. Welf.*, 24, 241–253, 2015.

MEZA-PARRAL, Y., GARCÍA-ROBLEDO, C., PINEDA, E., ESCOBAR, F., DONNELLY, M.A., Standardized ethograms and a device for assessing amphibian thermal responses in a warming world, *Journal of Thermal Biology*, 2020.

MIKHAIL, Y.; VASILY, T. Morphometric characteristics of *Bombina bombina* (Discoglossidae, Anura) in the Medveditsa river valley (Saratov Region) and noninvasive sex diagnostics by size and weight traits, 2018.

MORESCO, R. M.; DE OLIVEIRA, C. A comparative study of the extracutaneous pigmentary system in three anuran amphibian species evaluated during the breeding season. *South American Journal of Herpetology*, 4(1), 1-8, 2009.

MORISON, S. A., CRAMP, R. L., ALTON, L. A.; FRANKLIN, C. E. Cooler temperatures slow the repair of DNA damage in tadpoles exposed to ultraviolet radiation: implications for amphibian declines at high altitude. *Global change biology*, 26(3), 1225-1234, 2020.

MORRISON, T.A., YOSHIKAZI, J., NICHOLS, J.D.; BOLGER, D.T. Estimating survival in photographic capture–recapture studies: overcoming misidentification error. *Methods in Ecology and Evolution* 2, 454–463, 2011.

MÜLLER, A.S., LENHARDT, P.P.; THEISSINGER, K. Pros and cons of external swabbing of amphibians for genetic analyses. *Eur J Wildl Res* **59**, 609–612, 2013

MUTHS, E., HOSSACK, B. R., CAMPBELL GRANT, E. H., PILLIOD, D. S.; MOSHER, B. A. Effects of snowpack, temperature, and disease on demography in a wild population of amphibians. *Herpetologica*, 76(2), 132-143, 2020.

NAJIMI, B. *et al.* Applications des marqueurs moléculaires dans l’amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, v.7, n.1, p.17-35, 2003.

NARAYAN, E. J., MOLINIA, F. C., KINDERMANN, C., COCKREM, J. F.; HERO, J. M. Urinary corticosterone responses to capture and toe-clipping in the cane toad (*Rhinella marina*) indicate that toe-clipping is a stressor for amphibians. *General and comparative endocrinology*, 174(2), 238-245, 2011b

NARAYAN, E.J. Non-invasive reproductive and stress endocrinology in amphibian conservation physiology. *Conserv Physiol*, 2013.

NARAYAN, E.J.; COCKREM, J.F.; HERO, J-M. Urinary corticosterone metabolite responses to capture and captivity in the cane toad (*Rhinella marina*). *Gen Comp Endocrinol* 173: 371–377, 2011a

NICHOLS, J.D. Capture-recapture models. *BioScience* 42, 94–102, 1992.

OTHMAN, S. N., CHUANG, M. F., KANG, H., BAE, Y., KIM, A., JANG, Y., & BORZÉE, A. Methodological guidelines for minimally invasive tail-clipping: a case study on *Rana huanrenensis* tadpoles. *Asian Journal of Biological Conservation*, 9(2), 188-195, 2020.

PAGNUCCO, K. S., PASZKOWSKI, C. A.; SCRIMGEOUR, G. J. Using cameras to monitor tunnel use by long-toed salamanders (*Ambystoma macrodactylum*): an informative, cost-efficient technique. *Herpetological Conservation and Biology*, 6(2), 277-286, 2011.

PANIAGUA, R., FRAILE, B.; SAEZ, F. J. Effects of photoperiod and temperature on testicular function in amphibians. *Histology and Histopathology*, 1990.

PARMESAN, C. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 37, 637–669, 2018.

PARMESAN, C.. Influences of species, latitudes and methodologies on estimates of phenological response to global warming. *Glob. Chang. Biol.* 13, 1860–1872, 2007.

PECL, G. T. *et al.* Biodiversity redistribution under climate change: impacts on ecosystems and human well-being. *Science* 355, 2017.

PENG, Z., ZHANG, L., ; LU, X. Global gaps in age data based on skeletochronology for amphibians. *Integrative Zoology*, 17(5), 752-763, 2022.

PERRY, G., WALLACE, M. C., PERRY, D., CURZER, H., ; MUHLBERGER, P. Toe clipping of amphibians and reptiles: science, ethics, and the law¹. *Journal of Herpetology*, 45(4),547-555, 2011.

PHILLOTT, A. D., L. F. SKERRATT, K. R. MCDONALD, F. L. LEMCKERT, H. B. HINES, J. M. CLARKE, R. A. ALFORD, AND R. SPEARE. Toe-clipping as an acceptable method of identifying individual anurans in mark recapture studies. *Herpetological Review* 38:305–308, 2007.

POSCHADEL, J.; MÖLLER, D A versatile field method for tissue sampling on small reptiles and amphibians, applied to pond turtles, newts, frogs and toads. *Conserv Genet* 00:1–3, 2004.

POST, E. *Ecology of Climate Change: The Importance of Biotic Interactions*. Princeton University Press, United States of America, 2013.

PRADEL, R. Utilization of capture-mark-recapture for the study of recruitment and population growth rate. *Biometrics* **52**: 703-709, 1996.

RAFFEL, T. R., ROHR, J. R., KIESECKER, J. M.; HUDSON, P. J. Negative effects of changing temperature on amphibian immunity under field conditions. *Functional Ecology*, 819-828, 2006.

RELYEA, R. A. Fine-tuned phenotypes: tadpole plasticity under 16 combinations of predators and competitors. *Ecology* 85:172–179, 2004.

RELYEA, R.A.; J. T. HOVERMAN. The impact of larval predators and competitors on the morphology and fitness of juvenile treefrogs. *Oecologia* 134:596–604, 2003.

RELYEA, R.A. The heritability of inducible defences in tadpoles. *J. Evol. Biol.* 18:856–866, 2005.

RENET, J.; LEPRÊTRE, L.; CHAMPAGNON, J.; LAMBRET, P. Monitoring amphibian species with complex chromatophore patterns: a non- invasive approach with an evaluation of software effectiveness and reliability. *Herpetological Journal*, 29, p.13 – 22, 2019.

ROHLF, F.J.. Geometric morphometrics in systematics In: MacLeón N, Forey PL, editors. *Morphology, Shape and Phylogeny*. London: Taylor ; Francia. pp 175–193, 2002.

ROHLF, F.J.; MARCUS, L.F. A revolution in morphometrics. *Trends Ecol Evol* 8:129–132, 1993.

ROME, L.C., STEVENS, E.D., JHON-ALDER, H.B. The influence of temperature and thermal acclimation on physiological function, in: Feder, M.E., Burggren, W.W. (Eds.), *Environmental Physiology of Amphibians*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 183–205, 1992.

ROOT, T.L., PRICE, J.T., HALL, K.R., SCHNEIDER, S.H., CYNTHIA, R., POUNDS, J.A., Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Lett. to Nat.* 57–60, 2003.

ROTHERMEL, B.B. Migratory success of juveniles: a potential constraint on connectivity for pond-breeding amphibians. *Ecol. Appl.* 14: 1535-1546, 2004.

ROWLEY J. J. L., ALFORD R. A., Techniques for tracking amphibians: the effects of tag attachment, and harmonic direction finding versus radio telemetry. *Amphibia Reptilia* 28, 367–76, 2007.

ROWLEY, J ; ALFORD, R. Non-contact infrared thermometers can accurately measure amphibian body temperatures. *Herpetological Review*. 38. 308-311, 2007.

ROWSON, A. D., OBRINGER, A. R.; ROTH, T. L. Non- invasive treatments of luteinizing hormone- releasing hormone for inducing spermiation in American (*Bufo americanus*) and Gulf Coast (*Bufo valliceps*) toads. *Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, 20(2), 63-74, 2001

RUIZ-FERNÁNDEZ MJ, JIMÉNEZ S, FERNÁNDEZ-VALLE E, GARCÍA-REAL MI, CASTEJÓN D, MORENO N, ARDIACA M, MONTESINOS A, ARIZA S, GONZÁLEZ-SORIANO J. Sex Determination in Two Species of Anuran Amphibians by Magnetic Resonance Imaging and Ultrasound Techniques. *Animals (Basel)*. 10(11):2142, 2020.

RUIZ-GARCÍA, A., ROCO, Á. S.; BULLEJOS, M. Sex differentiation in amphibians: Effect of temperature and its influence on sex reversal. *Sexual Development*, 15(1-3), 157-167, 2021

SANNOLO, M.; GATTI, F.; MANGIACOTTI, M.; SCALI, S.; SACCHI, R. Photo-identification in amphibian studies: A test of I3S Pattern. *Acta Herpetologica*. 11. 63-68. 10.13128/Acta_Herpetol-17198, 2016.

SBH. **Lista de espécies de anfíbios do Brasil**. Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2016.

SCHEELE, B.C., PASMANS, F., SKERRATT, L.F. *et al* (2019) Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science* 363:1459–1463, 2019.

SEBER, G.A. Estimating animal abundance and related parameters. New York, Hafner, 1973.

SETTELE, J. *et al.* in *Climate Change 2014 Impacts, Adaptation and Vulnerability: Part A: Global and Sectoral Aspects*, 2015.

SHERIFF, M.J.; DANTZER, B.; DELEHANTY, B.; PALME, R.; BOONSTRA, R. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 166(4): 869–887, 2011.

SHU, G ; XIONG, S ; ZHANG, W ; JIANG, J ; LI, C ; XIE, F. A Rapid, Non-invasive Method for Anatomical Observations of Tadpole vertebrae in Vivo. *Asian Herpetological Research*, 2018.

SIMON E; PUKY M; BRAUN M; TÓTHMÉRÉSZ B. Assessment of the effects of urbanization on trace elements of toe bones. *Environ Monit Assess* 184:5749–5754, 2012.

SLATER L. E. Introduction. *Bioscience* 15, 81–2, 1965.

SLATER, R.T; HANNA, A.; FINCH, N.; PESSIER, A.P.; LOGSDON, M. Radiographic and ultrasonographic appearance of pneumonia in a frog. *Vet Radiol Ultrasound*. Jul;62(4):e35-e39, 2021.

SLICE DE. Modern morphometrics. In: Slice DE, editor. *Modern Morphometrics in Physical Anthropology*. New York: Springer. pp 1–45, 2005.

SMITH, K.F.; SAX, D.F.; LAFFERTY, K.D. Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conservation Biology*, v.20-5, p.1349-1957, 2006.

SONG, X ; SONG, J ; SONG, H ; ZENG, Q ; SHI, K. (2018). A Robust Noninvasive Approach to Study Gut Microbiota Structures of Amphibian Tadpoles by Feces. *Asian Herpetological Research*, 2018.

ST-AMOUR, V.; LESBARRÈRES, D. Genetic evidence of Ranavirus in toe clips: an alternative to lethal sampling methods. *Conservation Genetics*, 8, 1247-1250, 2007.

- STEBBINS, R. C.; COHEN, N. W. A Natural History of Amphibians (Princeton University Press, 1997).
- STETTER, M. Non-infectious medical disorders of amphibians. *Semin Avian Exot Pet.* 4(1):49-55, 1995.
- ŠUKALO, G., ĐORĐEVIĆ, S., GOLUB, D., DMITROVIĆ, D.; TOMOVIĆ, L. Novel, non-invasive method for distinguishing the individuals of the fire salamander (*Salamandra salamandra*) in capture-mark-recapture studies. *Acta Herpetologica*, 8(1), 41–45, 2013.
- SUTHERLAND RW; DUNNING PR; BAKER WM. Amphibian encounter rates on roads with different amounts of traffic and urbanization. *Conserv Biol* 24:1626–1635, 2010.
- TAPLEY, B ; MICHAELS, C ; WILKINSON, M. The use of visible implant elastomer to permanently identify caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Herpetological Bulletin*, 2019.
- TARIGO LINDER, K.; NEEL, J, *et al.* Reluctant to dive: Coelomic effusion in a frog. *Vet Clin Path.*35(3):341-344, 2006.
- TERRY, A.M.; PEAKE, T.M.; MCGREGOR, P.K. The role of vocal individuality in conservation. *Front Zool.* 16;2(1):10, 2005.
- TOMANEK, L., The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat-shock response. *Physiol. Biochem. Zool.* 81, 709–717, 2008.
- TORRES – SÁNCHEZ, M.; GOWER, D. J.; ALVAREZ – PONCE, D.; CREEVEY, C. J.; WILKINSON, M.; SAN MAURO, D. What lies beneath? Molecular evolution during the radiation of caecilian amphibians. *BMC genomics*, 20, 1-13, 2019
- TOWN, C., MARSHALL, A., SETHASATHIEN, N. Manta Matcher: automated photographic identification of manta rays using keypoint features. *Ecol. Evol.* 3: 1902-1914, 2013.
- TURNER, A., WASSENS, S., HEARD, G.; PETERS, A. Temperature as a driver of the pathogenicity and virulence of amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*: A systematic review. *Journal of Wildlife Diseases*, 57(3), 477-494, 2021.

UJHEGYI, N.; BOKONY, V. Skin coloration as a possible non-invasive marker for skewed sex ratios and gonadal abnormalities in immature common toads (*Bufo bufo*). *Ecological Indicators*. 113. 10.1016/j.ecolind.2020.106175, 2020.

VAN BUSKIRK, J. Phenotypic lability and the evolution of predator induced plasticity in tadpoles. *Evolution* 56:361–370, 2002.

VAN TIENHOVEN, A.M., DEN HARTOG, J.E., REIJNS, R.A.; PEDDEMORS, V.M. A computer-aided program for pattern-matching of natural marks on the spotted raggedtooth shark *Carcharias taurus*. *J. Appl. Ecol.* **44**: 273-280, 2007.

VIEIRA, K. S., OLIVEIRA, E. K. S., VIEIRA, W. L. S.; ALVES, R. R. N. Polymorphism in a Neotropical toad species: ontogenetic, populational and geographic approaches to chromatic variation in *Proceratophrys cristiceps* (Müller, 1883)(Amphibia, Anura, Odontophrynidae). *PeerJ*, 10, e12879, 2022.

VINING, R.F.; MCGINLEY, R.A.; MAKSVYTIS, J.J.; HO, K.Y Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem* 20(6): 329–335, 1983.

VITOUSEK, M.N.; TAFF, C.C.; HALLINGER, K.H.; ZIMMER, C.; WINKLER, D.W Hormones and fitness: evidence for trade-offs in glucocorticoid regulation across contexts. *Front Ecol Evol* 6: 42, 2018.

VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. 3rd Edition., Academic Press, 2013.

WACK, C.L.; LOVERN, M.B.; WOODLEY, S.K. Transdermal delivery of corticosterone in terrestrial amphibians. *Gen Comp Endocrinol* 169: 269–275, 2010.

WALSH, P. P., MURPHY, E., ; HORAN, D. The role of science, technology and innovation in the UN 2030 agenda. *Technological Forecasting and Social Change*, 154, 119957, 2020.

WANG, J.; HAN, G. Z. Frequent retroviral gene co-option during the evolution of vertebrates. *Molecular Biology and Evolution*, 37(11), 3232-3242, 2020.

WIBAWA, T. COVID- 19 vaccine research and development: ethical issues. *Tropical Medicine ; International Health*, 26(1), 14-19, 2021.

WIENS, J.J. The niche, biogeography and species interactions. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 366, 2336–2350, 2011.

WILSON, R. S., P. G. KRAFT, AND R. VAN DAMME. Predator-specific changes in the morphology and swimming performance of larval *Rana lessonae*. *Funct. Ecol.* 19:238–244, 2005.

WOODHAMS, D. C., BRANDT, H., BAUMGARTNER, S., KIELGAST, J., KÜPFER, E., TOBLER, U.; MCKENZIE, V. Interacting symbionts and immunity in the amphibian skin mucosome predict disease risk and probiotic effectiveness. *PloS one*, 9(4), e96375. 2014.

WOODY, S.M.; SANTYMIRE, R.M.; CRONIN, K.A. Posture as a Non-Invasive Indicator of Arousal in American Toads (*Anaxyrus americanus*). *J. Zool. Bot. Gard.* 2, 1-9, 2021.

YEAGER, A.; COMMITO, J.; WILSON, A.; BOWER, D.; SCHWARZKOPF, L. Sex, light, and sound: location and combination of multiple attractants affect probability of cane toad (*Rhinella marina*) capture. *Journal of Pest Science*, 87, 323-329, 2014.

YITBAREK, D.; DAGNAW, G. G. Application of Advanced Imaging Modalities in Veterinary Medicine: A Review. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 117-130, 2022.

YOSHIZAKI, J., POLLOCK, K.H., BROWNIE, C.; WEBSTER, R.A. Modeling misidentification errors in capture-recapture studies using photographic identification of evolving marks. *Ecology* 90, 3–9, 2009.

ZAMUDIO, K. R., MCDONALD, C. A.; BELASEN, A. M. High variability in infection mechanisms and host responses: A review of functional genomic studies of amphibian chytridiomycosis. *Herpetologica*, 76(2), 189-200, 2020.

ZELDITCH, M.L.; SWIDERSKI, D.L.; SHEETS, H.D.; FINK, W.L. *Geometric Morphometrics for Biologists*. 456p. 2004.

ZEMANOVA, M. A. Towards more compassionate wildlife research through the 3Rs principles: moving from invasive to non- invasive methods. *Wildlife Biology*, 2020(1), 1-17, 2020.

ZHOU, J., NELSON, T. M., RODRIGUEZ LOPEZ, C., SARMA, R. R., ZHOU, S. J., ;
ROLLINS, L. A. A comparison of nonlethal sampling methods for amphibian gut
microbiome analyses. *Molecular ecology resources*, 20(4), 844-855, 2020.

ZWEIFEL, R.G. Studies on the Critical Thermal Maxima of Salamanders. *Ecology* 38,64–
69, 1957.

4. ARTIGO 2

Adaptação de glicosímetros portáteis humanos como um método alternativo para a análise de glicose sanguínea em anfíbios

Resumo

Há anos os cientistas vêm estudando as principais causas do alarmante declínio dos anfíbios pelo mundo. Dentre os fatores reconhecidos como contribuintes para estes declínios destacam-se diversos poluentes aquáticos e doenças emergentes. Para compreender os efeitos desses fatores agravantes, a ecotoxicologia faz uso de biomarcadores para a avaliação da saúde dos anfíbios. Dentre esses biomarcadores, o monitoramento dos níveis glicêmicos plasmáticos pode ser usado como um indicador de estresse, no entanto, os métodos tradicionais frequentemente são invasivos e dependem de equipamentos laboratoriais, o que limita a sua aplicação em diversos estudos. A fim de solucionar essas limitações e visando tornar a experimentação com anfíbios mais ética e refinada, o presente estudo avaliou a efetividade dos glicosímetros portáteis, analisando os níveis glicêmicos de machos e fêmeas do anuro *Rhinella icterica*, e comparando os valores obtidos com o método analítico bioquímico convencional. A comparação entre machos e fêmeas não revelou diferenças significativa, o que indica que para *R. icterica* o sexo é uma variável que não interfere dos níveis de glicemia, permitindo a realização de amostragens mistas que incluam ambos os sexos. Os glicosímetros portáteis foram equivalentemente eficientes ao método bioquímico tradicional quanto às determinações de níveis glicêmicos médios para *R. icterica*. No entanto, as medidas individuais obtidas através do glicosímetro apresentam-se menos precisas e ligeiramente superestimadas (incremento médio de 1.094 mg/dL) quando comparadas de forma pareada com as medidas obtidas pelo método bioquímico. Portanto, através destes resultados, corroboramos que os glicosímetros portáteis representam uma ferramenta alternativa, eficiente, e potencialmente menos invasiva para a determinação de concentrações glicêmicas dos anfíbios, o que pode flexibilizar o estudo de biomarcadores de estresse nas diversas áreas da herpetologia, tornando a experimentação animal mais ética e refinada.

Palavras-chaves: amphibia, marcadores de estresse, monitoramento ambiental, glicemia, métodos alternativos

Abstract

For years, scientists have been studying the main causes of the alarming decline of amphibians around the world. Among the factors recognized as contributing to these declines, several aquatic pollutants and emerging diseases stand out. To understand the effects of these aggravating factors, ecotoxicology uses biomarkers to assess the health of amphibians. Among these biomarkers, the monitoring of plasma glucose levels can be used as an indicator of stress, however, traditional methods are often invasive and depend on laboratory equipment, which limits their application in several studies. In order to solve these limitations and with a view to making experimentation with amphibians more ethical and refined, the present study evaluated the effectiveness of portable glucometers, analyzing the glycemic levels of males and females of the frog *Rhinella icterica*, and comparing the values obtained with the analytical method conventional biochemist. Comparison between males and females did not reveal significant differences, which indicates that for *R. icterica* sex is a variable that does not interfere with blood glucose levels, allowing mixed samplings that include both sexes. Portable glucometers were equivalent to the traditional biochemical method for determining mean glycemic levels for *R. icterica*. However, the individual measurements obtained using the glucometer are less accurate and slightly overestimated (mean increment of 1,094 mg/dL) when compared in pairs with the measurements obtained using the biochemical method. Therefore, through these results, we corroborate that portable glucometers represent an alternative, efficient, and potentially less invasive tool for the determination of glycemic concentrations in amphibians, which can make the study of stress biomarkers more flexible in the different areas of herpetology, making experimentation more flexible. more ethical and refined animal.

Keywords: amphibians, stress markers, environmental monitoring, glycemia, alternative methods

4.1 Introdução

Cientistas vêm chamando a atenção para o fato de que estamos passando pela “Sexta Extinção de Espécies em Massa” da história do nosso planeta (Barnosky, *et al.*, 2011; Ceballos *et al.*, 2020). Dentre as muitas espécies que se encontram em risco, os anfíbios representam o grupo de vertebrados com as maiores taxas, atualmente contando com 41 % das espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2022).

Por se tratarem de organismos altamente sensíveis às alterações ambientais (Calderon *et al.*, 2022), os anfíbios vêm se destacando entre as pesquisas das áreas de conservação (Bailey; Muths, 2019; Della Togna *et al.*, 2020), mas também no monitoramento ambiental, como um bom organismo modelo e bioindicador da saúde e qualidade dos ecossistemas (Langlois, 2021; Calderon *et al.*, 2022).

Nas pesquisas de ecotoxicologia os anfíbios são usados como sentinelas para compreender os efeitos de diversos poluentes ambientais, incluindo agrotóxicos (Langlois, 2021), fármacos (Peltzer *et al.*, 2019), metais (Peixoto *et al.*, 2022), microplásticos (Burgos-Aceves *et al.*, 2022), nanomateriais (Amaral *et al.*, 2019), entre outros resíduos de origem antropogênica (Hintz; Relyea, 2019; Chavoshani *et al.*, 2020). Além disso, os anfíbios também atuam como bioindicadores no estudo de diversas doenças emergentes, como a quitridiomiose (Fisher *et al.*, 2021; Grogan *et al.*, 2023), a ranavirose (Ash, 2022) e outros parasitas (La'Toya; Klaphake, 2020). Estes estudos são realizados através da aplicação de biomarcadores, ou seja, da análise e identificação de alterações biológicas, as quais podem ocorrer desde o nível bioquímico, celular, fisiológico ou comportamental. Essas alterações podem ser mensuradas através da análise de amostras como células ou tecidos, fluídos (como o sangue, o plasma, a urina, etc), ou até mesmo através da análise do comportamento dos indivíduos (Depledge, 1994; Ali *et al.*, 2021). Em um estudo de ecotoxicologia, por exemplo, esses biomarcadores demonstram alterações do estado de saúde dos organismos frente à exposição a um contaminante ou resíduo ambiental, indicando sua toxicidade (Depledge, 1994).

Diversos biomarcadores tem se mostrado bastante sensíveis e úteis em estudos ecotoxicológicos com anfíbios, destacando-se as análises de função cardíaca (Jones - Costa *et al.*, 2018; Peltzer *et al.*, 2022), análises hematológicas (De Gregorio *et al.*, 2021; Robinson *et al.*, 2021; Davis *et al.*, 2023), análises da função reprodutiva (Slaby *et al.*, 2019), hepáticas (Salla *et al.*, 2020), entre outras.

Entretanto, um biomarcador ainda pouco explorado nos estudos com anfíbios é o monitoramento dos níveis de glicose sanguínea, os quais podem ser indicadores indiretos

de estresse fisiológico. Quando submetido a situações de estresse, o organismo sofre elevações nos níveis de glicocorticóides, induzindo a gliconeogênese, e conseqüentemente elevando as concentrações plasmáticas de glicose nos anfíbios (Isehunwa *et al.*, 2017; Romero; Beattie, 2022). Essas alterações na glicose plasmática também podem afetar momentaneamente a disponibilidade energética para os tecidos corpóreos, o que pode repercutir na saúde do animal (Romero; Beattie, 2022). Concentrações elevadas de glicose sanguínea também podem indicar alterações metabólicas, as quais podem estar relacionadas a um aumento na gliconeogênese ou a danos na função pancreática (Olufunmilayo *et al.*, 2023). Dessa forma, além da sua utilidade como marcadores indiretos de estresse fisiológico, as medidas de glicose plasmáticas também podem indicar a energia que se encontra disponível para os tecidos corpóreos de um organismo (Kepas *et al.*, 2023), ou ainda, possíveis alterações nos processos metabólicos de gliconeogênese (Isehunwa *et al.*, 2017; Olufunmilayo *et al.*, 2023).

Na área ambiental, um estudo avaliando a exposição do anuro *Bufo regularis* a diferentes metais pesados revelou um aumento nas concentrações plasmáticas de glicose, indicando o estresse causado pela exposição e a potencial toxicidade dos metais à função pancreática dos anuros (Olufunmilayo *et al.*, 2023). Indivíduos das espécies *Rana balcanica* e *Rana lessonae* coletados de habitats poluídos (próximos a fontes antrópicas de poluição urbana e agroquímica) também apresentaram níveis elevados de glicose plasmática como uma resposta de estresse fisiológico (Valbona *et al.*, 2012). Análises glicêmicas já se mostraram eficientes até mesmo em estudos transgeracionais, como demonstrado em uma exposição de diferentes gerações de *Xenopus tropicalis* ao pesticida linuron, o qual causou uma redução dos níveis de glicose sanguínea nas proles dos organismos expostos, indicando uma toxicidade metabólica transgeneracional (Karlsson *et al.*, 2021).

Estudos na área da fisiologia comparada já utilizaram análises de glicemia e revelaram que condições de estresse por hipóxia também induzem hiperglicemia em espécimes de *Aquarana catesbeianus* (Rocha; Branco, 1998). Variações de temperatura também podem alterar a glicemia plasmática dos anfíbios, devido aos ajustes metabólicos do organismo, como demonstrado para salamandras da espécie *Batrachupems tibetanus* (Xia; Li, 2010). Embora a utilização dos biomarcadores glicêmicos ainda seja escassa na patologia de anfíbios, o estudo de Young *et al.* (2014) descreve um aumento na glicemia plasmática em indivíduos de *Litoria infrafrenata* submetidos a uma exposição crônica ao fundo quitrídio, causador da quitridiomiose (Young *et al.*, 2014), indicando uma reação de estresse frente à infecção. Em suma, estes relatos reiteram a eficiência dos biomarcadores glicêmicos em diversas áreas de pesquisa, integrando aplicações desde a ecotoxicologia, a fisiologia comparada, e a patologia de anfíbios.

Entretanto, esses estudos basearam-se em métodos convencionais para a análise das concentrações plasmáticas de glicose (Rocha; Branco, 1998; Valbona *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2014; Karlsson *et al.*, 2021; Olufunmilayo *et al.*, 2023), as quais dependem do processamento das amostras em laboratório, através de kits bioquímicos e aparelhos como uma centrífuga (para separar o plasma), e o espectrofotômetro e demais equipamentos analíticos. Além disso, esses estudos frequentemente realizam a eutanásia dos animais para a obtenção das amostras sanguíneas, gerando restrições amostrais devido às questões éticas experimentais.

Nesse sentido, visando tornar a experimentação animal mais alinhada com os princípios dos 3Rs, rumo à “substituição”, “redução” e “refinamento” (do inglês: *replace, reduce, refine*) (Russell; Burch, 1959), neste trabalho foi enfatizada a importância de buscar alternativas para refinar a pesquisa na herpetologia. Para tanto, a utilização de aparelhos glicosímetros portáteis pode representar uma alternativa interessante a ser testada e validada nos estudos com anfíbios.

Os glicosímetros são dispositivos portáteis desenvolvidos para indicar a medida aproximada da concentração de glicose no sangue humano. Para tanto, uma pequena amostra de sangue, geralmente obtida da ponta do dedo, é colocada em um biossensor (fitas bio-sensíveis), as quais contêm oxidases cuja ação sobre a glicose gera uma corrente no eletrodo, a qual é transduzida por um sensor e interpretada como índice de glicemia (Clarke; Foster, 2012). Os aparelhos glicosímetros humanos são amplamente utilizados na medicina, na área esportiva, bem como no uso pessoal caseiro, para fins de diagnóstico e monitoramento de estados de hipo/hiperglicemia (Tonyushkina; Nichols, 2009; Clarke; Foster, 2012; Gerber; Freeman, 2016). Durante os últimos anos, muitos glicosímetros portáteis foram desenvolvidos no mercado, sendo facilmente adquiridos em farmácias e mercados, apresentando baixo custo, e fornecendo resultados imediatos com pequenas quantidades de sangue (Summa *et al.*, 2014; Mustapha *et al.*, 2021).

Embora a adaptação dos glicosímetros já tenha sido relatada para estudos com outros vertebrados, incluindo furões (Summa *et al.*, 2014), pombos (Mohsenzadeh, 2015), lagartos (Kepas *et al.*, 2023), serpentes (Kelley *et al.*, 2021), e tartarugas (Perrault *et al.*, 2021), as pesquisas com anfíbios ainda são ausentes. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar a viabilidade de glicosímetros portáteis (tipo AccuCheck) para a determinação de concentrações plasmáticas de glicose em indivíduos adultos do anuro *Rhinella icterica*, bem como comparar a sua acurácia com o método bioquímico de determinação tradicional de glicemia plasmática. A adaptação e utilização dos glicosímetros portáteis pode contribuir amplamente para o refinamento de estudos com anfíbios, possibilitando seu uso no laboratório ou em campo, reduzindo a eutanásia uma vez que permite a soltura dos

animais após a coleta de pequenas quantidades de amostra, além de possuir baixo custo e obtenção instantânea dos dados.

4.2 Materiais e Métodos

Coleta dos animais

Foram coletados 20 exemplares de *Rhinella icterica* (10 machos e 10 fêmeas) na fazenda Salinas, Tapiraí, São Paulo (DMS: -23.918155, -120 47.470454; Autorização SISBIO 61551-2) e transportados para o Laboratório de Fisiologia da Conservação (DBio - UFSCar – campus Sorocaba). Os animais permaneceram em caixas plásticas (37 x 27 x 32 cm/ 1 animal por container) contendo 50 ml de água decolorinada durante 15 dias para a recuperação do estresse do transporte e aclimação às condições laboratoriais. Durante todo este período as caixas permaneceram levemente inclinadas (em 15°) a fim de criar um ambiente que permitia ao animal transitar entre uma área úmida e uma área onde o abdômen permanecia submerso.

Obtenção das amostras de sangue

As amostras de sangue (total = 700 uL) foram coletadas através de punção da veia facial (maxilar) músculo-cutânea (utilizando agulhas heparinizadas de 27G) (Forzán *et al.*, 2012). A partir dessa amostra, uma alíquota de 200 uL foi utilizada para a leitura instantânea dos níveis glicêmicos através das fitas biossensoras e glicosímetro portátil (modelo Accu-Chek Performa), realizada em duplicata. O restante da alíquota de sangue (500 uL) foi centrifugado para separação do plasma (4500 rpm, por 10 minutos), e as concentrações de glicose plasmáticas foram obtidas segundo o método analítico enzimático clássico de óxido-redutase, através de um analisador bioquímico automático (Hitachi modelo 7170).

Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados como valores médios \pm 1 E.P.M (erro padrão médio). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade das amostras. Uma vez que os conjuntos de dados apresentaram distribuição normal, utilizamos o teste T-Student não - pareado para comparar os valores de glicemia obtidos para os diferentes sexos. Para avaliar a eficiência dos métodos, primeiramente aplicamos o teste T-Student não-pareado. Em seguida, para avaliar a precisão e similaridade dos métodos, aplicamos o teste T-Student pareado (comparando as medidas feitas para um mesmo indivíduo através de cada método distinto).

4.3 Resultados e Discussão

A comparação entre os valores de glicemia determinados para machos ou para fêmeas de *R. icterica* revelou que não houve diferença significativa entre os sexos para os valores obtidos através do glicosímetro portátil ($F = 1,15$; $p = 0,63$), tampouco para o método analítico bioquímico ($F = 1,047$; $p = 0,66$), o que indica que para essa espécie os valores glicêmicos podem ser homogêneos em uma amostragem que inclua ambos os sexos para essa espécie (Figura 1).

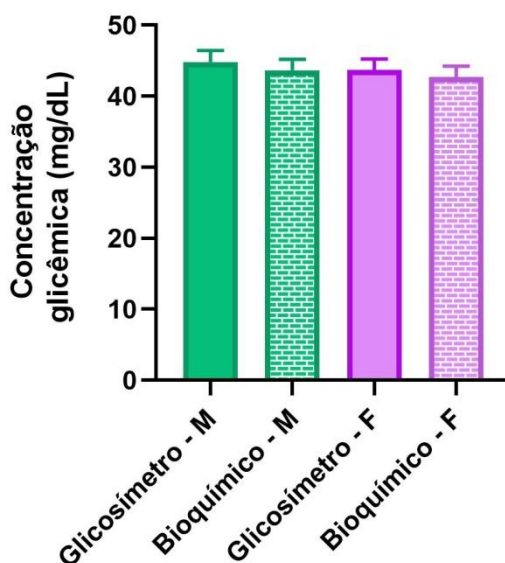


Figura 1: Representação gráfica da média das concentrações plasmáticas de glicemia obtidas para machos (M) e fêmeas (F) de *Rhinella icterica* através de glicosímetro portátil, ou através de método analítico bioquímico.

Outros estudos que avaliaram a glicemia plasmática através de métodos bioquímicos, utilizando machos e fêmeas adultas de *A. catesbeinus* e *Bufo paracnemis*, também demonstraram uma baixa variância entre os valores, corroborando que o sexo pode não interferir no nível glicêmico de alguns anfíbios (Steiner *et al.*, 2000). Entretanto, estudos com lambaris da espécie *Astyanax altiparanae* já observaram diferenças entre os sexos, de modo que os machos apresentaram valores maiores do que as fêmeas (Pereira da Silva e Oliveira, 2017), o que demonstra que, dependendo da espécie, o sexo pode, de fato, ser uma variável importante a se considerar. Dessa forma, devido ao limitado número de estudos que consideraram o efeito do sexo sobre as concentrações plasmáticas de glicemia nas diferentes espécies de anfíbios, mais estudos ainda são necessários a fim de corroborar, de fato, se o "sexo" não consiste em uma variável que interfere na glicemia dos anfíbios como um todo. Ademais, os valores médios de glicemia plasmática para os

adultos de *R. icterica* deste estudo foram similares aos valores relatados em outros estudos para *A. catesbeiana* (Rocha; Branco, 1998; Steiner *et al.*, 2000), o que revela similaridade no metabolismo dessas espécies e também consistência na obtenção dos dados.

Ao agrupar os dados de glicemia dos machos e fêmeas determinados através de cada método, os conjuntos de dados foram considerados independentes e foram comparadas as médias dos valores (aplicando o teste T não-pareado): os testes revelaram que ambos os métodos apresentaram valores médios de glicemia similares ($F = 1.050$; $p = 0.4819$; Figura 2A). Dessa forma, podemos inferir que a utilização dos glicosímetros portáteis para determinação dos níveis glicêmicos médios em *R. icterica* foi significativamente equivalente aos valores obtidos pelo método analítico bioquímico. Por outro lado, ao realizar uma comparação pareada entre os valores obtidos pelos dois métodos de determinação glicêmica para cada um dos indivíduos, os resultados indicaram diferenças significativas ($p < 0.0001$; $r = 0.979$; Figura 2B).

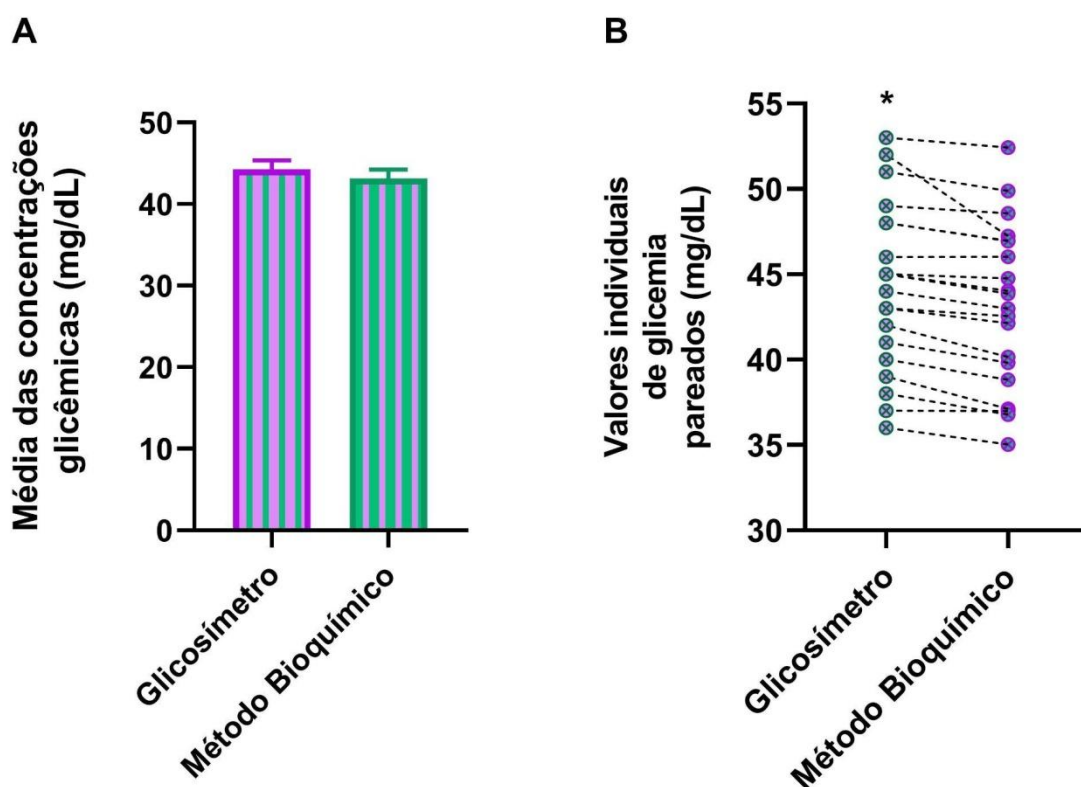


Figura 2: A- Gráfico das médias das concentrações glicêmicas de *R. icterica* (machos e fêmeas) obtidas através de glicosímetro ou através de método bioquímico. B- Distribuição pareada dos valores de glicemia obtidos para cada indivíduo de *R. icterica* (machos e fêmeas) através de glicosímetro ou através de método bioquímico. O asterisco “*” no gráfico “B” indica diferença significativa entre os grupos.

Essa diferença deve-se ao fato de que, ao parear individualmente as medidas de um mesmo indivíduo feitas através de cada um dos métodos, foi possível observar uma tendência do glicosímetro portátil em apresentar valores ligeiramente superestimados,

apresentando uma diferença média de 1.094 mg/dL acima dos valores obtidos através do método analítico bioquímico. Resultados semelhantes foram relatados por Perrault *et al.* (2021), os quais confirmaram a eficiência dos glicosímetros portáteis, porém também observaram valores superestimados (em aproximadamente 1.4 mmol/L) na determinação de glicose plasmática de tartarugas marinhas (*Lepidochelys kempii*), quando comparados aos valores obtidos através de análise bioquímica. A própria Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária (ASVCP - American Society for Veterinary Clinical Pathology) já publicou em seus guias veterinários informativos sobre a eficiência de glicosímetros em pesquisas com animais, enfatizando a necessidade de se considerar que esses dispositivos não possuem alta precisão e que os dados costumam ser superestimados como um padrão de segurança pré-definido para evitar falsos negativos (Gerber; Freeman, 2016). Em suma, o glicosímetro portátil se mostrou tão eficiente quanto o método bioquímico para avaliar valores médios, ou seja, um panorama geral dos valores glicêmicos para a espécie *R. icterica*. Porém, caso o pesquisador necessite avaliar variações individuais de glicemia de forma mais precisa, o método bioquímico seria mais adequado, uma vez que os glicosímetros tendem a superestimar ligeiramente os valores de glicemia. Obviamente, é relevante considerar as especificidades de cada método, ponderando a necessidade de se obter valores mais ou menos precisos, a depender dos objetivos de cada pesquisa. Não obstante, a aplicação do glicosímetro portátil se mostrou eficiente para a obtenção de concentrações plasmáticas de glicemia representativas e que podem ser utilizadas como biomarcadores de estresse nos anfíbios.

Por fim, é importante ressaltar que o próprio manuseio dos animais durante a coleta do sangue pode interferir diretamente no estresse do animal e, conseqüentemente, incrementar seus valores de glicemia (Narayan *et al.*, 2012; Pereira da Silva e Oliveira, 2017). Portanto, é imprescindível que o pesquisador padronize o tempo de manipulação dos animais, bem como o método de coleta da amostra sanguínea, para que o efeito do estresse, embora seja inevitável, possa ser homogêneo em toda a amostragem.

Embora o presente estudo tenha corroborado a eficiência dos glicosímetros portáteis para a obtenção dos níveis glicêmicos de *R. icterica*, estudos com outras espécies ainda são necessários a fim de garantir sua utilização considerando-se as possíveis variações interespecíficas que podem existir para os anfíbios. A utilização destes dispositivos portáteis pode facilitar a obtenção de biomarcadores de estresse em diversos estudos com anfíbios, viabilizando coletas *in situ* e gerando dados instantâneos. Adicionalmente, esse método alternativo pode facilitar o monitoramento da saúde de anfíbios em programas de conservação, permitindo medidas sucessivas ao longo tempo de forma minimamente invasiva. Através deste estudo visamos contribuir fornecendo

alternativas menos invasivas para a experimentação com anfíbios, direcionando as pesquisas para um maior refinamento ético e respeitoso com os organismos sencientes.

4.4 Conclusões

O estudo corroborou a eficiência dos glicosímetros portáteis para a obtenção das concentrações plasmáticas médias de glicemia do anfíbio *R. icterica*, no entanto, é importante considerar que esse método tende a superestimar os níveis glicêmicos, sendo necessário considerar essa variável nos estudos onde for aplicado. Embora o método analítico bioquímico ainda seja a opção mais precisa, o uso dos glicosímetros pode ser uma boa alternativa para reduzir a invasividade e refinar diversas pesquisas com os anfíbios.

5. REFERÊNCIAS

AGÜERO, R. ; MARSA, S. ; MORENO, L. ; VASQUEZ GOMEZ, MIRIAM ESTER. Peripheral Blood Lymphocyte Culture of *Rhinella arenarum*. OALib, 2017.

ALI, A., MUDASIR, S., GANIE, S. A., MIR, M. U. R., BILAL, S., HAMADANI, H.; MAJID, S. Biomonitoring and Bioindicators. In *Freshwater Pollution and Aquatic Ecosystems* (pp. 185-204). Apple Academic Press, 2021.

AMARAL, D. F.; GUERRA, V.; MOTTA, A. G. C.; E SILVA, D. D. M.; ROCHA, T. L. Ecotoxicity of nanomaterials in amphibians: a critical review. *Science of the total environment*, 686, 332-344, 2019.

ASH, L. V. The effect of amphibian host ecology and evolution on the pathogen dynamics of Ranavirus. The University of Vermont and State Agricultural College, 2022.

BAILEY, L. L.; MUTHS, E. Integrating amphibian movement studies across scales better informs conservation decisions. *Biological Conservation*, 236, 261-268, 2019.

BARNOSKY, A. D. *et al.* Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471, 51-57, 2011.

BRIGGLER, J.T. ; MCKEAGE, B.L. ; GIRONDO, N.M. ; PITTS, P.R. Evaluation of traps to capture eastern hellbenders (*Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis*) in deep water habitat. *Herpetological Review*. 44. 423-428, 2013.

BROWN, G ; SHILTON, C ; SHINE, R. Measuring amphibian immunocompetence: Validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, *Rhinella marina*. *Methods in Ecology and Evolution*, 2011.

BULTÉ, G., C. VERLY, AND G. BLOUIN-DEMERS. An improved blood sampling technique for hatchling emydid turtles. *Herpetological Review* 37: 318–319, 2006.

BURGOS-ACEVES, M. A.; FAGGIO, C.; BETANCOURT-LOZANO, M.; GONZÁLEZ-MILLE, D. J.; ILIZALITURRI-HERNÁNDEZ, C. A. Ecotoxicological perspectives of microplastic pollution in amphibians. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 25(8), 405-421, 2022.

CALDERON, M. R., GONZÁLEZ, S. P., PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; JOFRÉ, M. B. Anthropogenic impacts on rivers: use of multiple indicators to assess environmental quality status. *Hydrobiologia*, 1-19, 2022.

CAMACHO-GARZON, J.; BURBANO, C. Technique for the In Vitro Culture of Fish Lymphocytes. *Dahlia-Revista de la asociación colombiana de ictiólogos*, 369-79, 1999.

CEBALLOS, G., EHRLICH, P. R.; RAVEN, P. H. Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(24), 13596-13602, 2020.

CHAVOSHANI, A.; HASHEMI, M.; AMIN, M. M.; AMETA, S. C. Personal care products as an endocrine disrupting compound in the aquatic environment. *Micropollutants and Challenges*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 91-144, 2020.

CHEN S. Advanced diagnostic approaches and current medical management of insulinomas and adrenocortical disease in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*;13:439–452, 2010.

CLARKE, S. F.; FOSTER, J. R. A history of blood glucose meters and their role in self-monitoring of diabetes mellitus. *British journal of biomedical science*, 69(2), 83-93, 2012.

DAVIS, A.K; MAERZ, J.C. Assessing Leukocyte Profiles of Salamanders and Other Amphibians: A Herpetologists' Guide. *Methods Mol Biol*. 2562:443-458, 2023.

DE GREGORIO, L. S.; FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. Leukocyte profile of tadpoles and juveniles of *Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802 (Anura) and the effects of nonylphenol and cyproterone acetate. *South American Journal of Herpetology*, 20(1), 75-83, 2021.

DELLA TOGNA, G.; HOWELL, L. G.; CLULOW, J.; LANGHORNE, C. J.; MARCEC-GREAVES, R.; CALATAYUD, N. E. Evaluating amphibian biobanking and reproduction for captive breeding programs according to the Amphibian Conservation Action Plan objectives. *Theriogenology*, 150, 412-431, 2020.

DEPLEDGE, M.H. The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological tools. In: Fossi, M.C. and Leonzio, C., Eds., *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, Lewis Publisher, Boca Raton, 271-295, 1994.

DESSER, S. S. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. *Journal of Parasitology* 87: 152–160, 2001.

EVANS, H.J., NEARY, G.J.; WILLIAMSON, F.S., The Relative Biological Efficiency of Single Doses of Fast Neutrons and γ -Rays on *Vicia faba* Roots and the Effects of Oxygen. II. Chromosome Damage: The Production of Micronuclei, *Int. J. Radiat. Biol.*, v. 3, p. 216–229, 1959.

FISHER, M. C.; PASMANS, F.; MARTEL, A. Virulence and pathogenicity of chytrid fungi causing amphibian extinctions. *Annual Review of Microbiology*, 75, 673-693, 2021.

FORZAN, M ; VANDERSTICHEL, R ; OGBUAH, C ; BARTA, JOHN ; SMITH, T. Blood Collection from the Facial (Maxillary)/Musculo-Cutaneous Vein in True Frogs (Family Ranidae). *Journal of wildlife diseases*, 2012.

FOSSI, M.C.; LEONZIO, C. (eds) *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1993

GARNERO, A.V., BOCCELLI, M., OLIVEIRA, J.C.P., LEDESMA, M.A., MONTALTI, D., CORIA, N. AND GUNSKI, R.J. Chromosomal Characterization of Four Antarctic Procellariiformes. *Marine Ornithology*,

GERBER, K. L.; FREEMAN, K. P. ASVCP guidelines: quality assurance for portable blood glucose meter (glucometer) use in veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(1), p.10-27, 2016.

GROGAN, L. F.; MANGAN, M. J.; MCCALLUM, H. I. Amphibian infection tolerance to chytridiomycosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 378(1882), 20220133, 2023.

HINTZ, W. D.; RELYEA, R. A. A review of the species, community, and ecosystem impacts of road salt salinisation in fresh waters. *Freshwater biology*, 64(6), 1081-1097, 2019.

IL'INSKIKH, N.N., NOVITSKII, V.V., VANCHUGOVA, N.N.; IL'INSKIKH, I.N., Mikroyadernyi analiz i tsitogeneticheskaya nestabil'nost' (Micronucleus Test and Cytogenetic Instability), Tomsk: Izd-vo Tom. un-ta, 1992.

ISEHUNWA, G. O., OLADUN, O. T., AKPAN, J. E.; ALADA, A. R. A. Effect of Cortisol on Plasma Lactate Levels following Cortisolinduced Hyperglycaemia in Common African Toad, *Bufo regularis*. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 32(1), 21-25, 2017.

IUCN. 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>.

JONES-COSTA, M.; FRANCO-BELUSSI, L.; VIDAL, F. A. P.; GONGORA, N. P.; CASTANHO, L. M.; DOS SANTOS CARVALHO, C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; ABDALLA, F. C.; DUARTE, I. C. S.; OLIVEIRA, C.; DE OLIVEIRA, C. R.; SALLA, R. F. Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 151, p. 184-190, 2018

JUNIOR, R. C. Glicosímetro de Pulso. Tese de doutorado, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2010.

KARLSSON, O., SVANHOLM, S., ERIKSSON, A., CHIDIAC, J., ERIKSSON, J., JERNERÉN, F.; BERG, C. Pesticide-induced multigenerational effects on amphibian reproduction and metabolism. *Science of the Total Environment*, 775, 145771, 2021.

KELLEY, S., FARRELL, T. M.; LIND, C. M. Validating the use of a quick-read glucometer to assess the glycemic response to short-term capture stress in two species of snake, *Nerodia sipedon* and *Sistrurus miliarius*. *Ichthyology & Herpetology*, 109(2), 436-442, 2021.

KEPAS, M. E., SERMERSHEIM, L. O., HUDSON, S. B., LEHMICKE, A. J. J., FRENCH, S. S.; AUBRY, L. M. Behavior, stress and metabolism of a parthenogenic lizard in response to flyover noise. *Frontiers in Amphibian and Reptile Science*, 1, 1129253, 2023.

KUNZE, P.E, *et al.* Pre-analytical factors affecting whole blood and plasma glucose concentrations in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). PLoS One, 2020

LA'TOYA, V. L.; KLAPHAKE, E. Selected emerging infectious diseases of amphibians. Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice, 23(2), 397-412, 2020.

LANGLOIS, V. S. Amphibian Toxicology: A Rich But Underappreciated Model for Ecotoxicology Research. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 80, n. 4, p. 661-662, 2021.

LEWINGTON, J.H. Endocrine diseases. In: Lewington JH, ed. Ferret Husbandry, Medicine and Surgery. 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders Elsevier,;346–379, 2007.

MARNILA, P., A. TIISKA, K. LAGERSPETZ, AND E. M. LILIUS. Phagocyte activity in the frog *Rana temporaria*: whole blood chemiluminescence method and the effects of temperature and thermal acclimation. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology 111: 609–614. 1995.

MOHSENZADEH, M.S.; ZAEEMI, M.; RAZMYAR, J.; AZIZZADEH, M. COMPARISON OF A POINT-OF-CARE Glucometer and a Laboratory Autoanalyzer for Measurement of Blood Glucose Concentrations in Domestic Pigeons (*Columba livia domestica*). J Avian Med Surg, 2015

MOORHEAD, P., NOWELL, P., MELLMAN, W., BATTIPS, D. AND HUNGERFORD, D. (1960) Chromosome Preparations of Leukocytes Cultures from Human Peripheral Blood. Experimental Cell Research, 20, 613-616, 1960.

MUSTAFINA, Z.H.G.; KRAMARENKO, YU.S.; KOBTSEVA, V.YU. Integrated hematological indicators in the assessment of immunological reactivity in patients with ophthalmic pathology, Klin. Lab. Diagn., no. 5, pp. 47–48, 1999

MUSTAPHA, M. T., OZSAHIN, D. U.; OZSAHIN, I. Comparative evaluation of point-of-care glucometer devices in the management of diabetes mellitus. In Applications of Multi-Criteria Decision-Making Theories in Healthcare and Biomedical Engineering. Academic Press, p. 117 – 136, 2021.

NARAYAN, E. J., COCKREM, J. F.; HERO, J. M. Effects of temperature on urinary corticosterone metabolite responses to short-term capture and handling stress in the cane

toad (*Rhinella marina*). *General and Comparative Endocrinology*, 178(2), p. 301-305, 2012.

OLUFUNMILAYO, I. G., HELEN, A. A., AGHOJA, E.; AIMEN, O. I. Evaluation of Acute Toxicity of Lead Acetate, Mercury Chloride, and Their Effects on Fasting Blood Glucose Level in the Common African Toad (*Bufo regularis*). *American Journal of Chemical and Biochemical Engineering*, 7(1), 15-19, 2023.

ORŁOWSKI, G.; NOWAK, L. The importance of marginal habitats for the conservation of old trees in agricultural landscapes. *Landscape and Urban Planning*. v.79, p. 77-83, 2007.

PEAKALL, D.B.; SHUGART, L.R. (eds) *Biomarkers. Research and Application in the Assessment of Environmental Health*. Berlin: Springer, 1993.

PEIXOTO, S.; SANTOS, B.; LOPES, G.; DIAS-PEREIRA, P.; LOPES, I. Differential sensitivity of aquatic life stages of *Pelophylax perezi* to an acidic metal-contaminated effluent. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(60), 90259-90271, 2022.

PELTZER, P. M., LAJMANOVICH, R. C., MARTINUZZI, C., ATTADEMO, A. M., CURI, L. M.; SANDOVAL, M. T. Biototoxicity of diclofenac on two larval amphibians: Assessment of development, growth, cardiac function and rhythm, behavior and antioxidant system. *Science of the Total Environment*, 683, 624-637, 2019.

PELTZER, P. M.; CUZZIOL BOCCIONI, A. P.; ATTADEMO, A. M.; MARTINUZZI, C. S.; COLUSSI, C. L.; LAJMANOVICH, R. C. Risk of chlorine dioxide as an emerging contaminant during SARS-CoV-2 pandemic: enzyme, cardiac, and behavior effects on amphibian tadpoles. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 1-11, 2022.

PEREIRA-DA-SILVA, E.; OLIVEIRA, R. Portable point-of-care device as alternative tool for monitoring blood glucose in lambari *Astyanax altiparanae*: Stress and sex-specific effects. *Boletim do Instituto de Pesca*. 43. 557-568. 10.20950/1678-2305.2017v43n4p557, 2017.

PERRAULT, J. R., ARENDT, M. D., SCHWENTER, J. A., BYRD, J. L., TUXBURY, K. A.; STACY, N. I. Comparison of 2 glucose analytical methodologies in immature Kemp's ridley sea turtles: dry chemistry of plasma versus point-of-care glucometer analysis of whole blood. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 33(3), p. 595-599, 2021.

PERRAULT, J.R., *et al.* Comparison of whole blood and plasma glucose concentrations in green turtles (*Chelonia mydas*) determined using a glucometer and a dry chemistry analyzer. *J Wildl Dis* 54:196–199, 2018.

PETRITZ, O.A.; ANTINOFF, N.; CHEN, S.; KASS, P.H.; PAUL-MURPHY, J.R. Evaluation of portable blood glucose meters for measurement of blood glucose concentration in ferrets (*Mustela putorius furo*). *J Am Vet Med Assoc* 242:350–354, 2013.

RAMOS, M.G., DESCAILLEAUX, J.L., VELÁSQUEZ, M.R., HUANCA, W.L., IANNUZZI, L. AND PERUCATTI, A. Adaptation of the Alpacas and Flame Lymphocyte Culture Technique for the Exchange Analysis of Sister Chromatids. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25, 461-

ROBINSON, S. A.; CHLEBAK, R. J.; YOUNG, S. D.; DALTON, R. L.; GAVEL, M. J.; PROSSER, R. S.; BARTLETT, A. J.; DE SOLLA, S. R. Clothianidin alters leukocyte profiles and elevates measures of oxidative stress in tadpoles of the amphibian, *Rana pipiens*. *Environmental Pollution*, v. 284, 117149, 2021.

ROCHA, P. L.; BRANCO, L. G. Seasonal changes in the cardiovascular, respiratory and metabolic responses to temperature and hypoxia in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Journal of Experimental Biology*, 201(5), 761-768, 1998.

ROMERO, L. M.; BEATTIE, U. K. Common myths of glucocorticoid function in ecology and conservation. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 337(1), 7-14, 2022.

ROSENTHAL, K.L.; WYRE, N.R. Endocrine diseases. In: Quesenberry KE, Carpenter JW, eds. *Ferrets, Rabbits, and Rodents Clinical Medicine and Surgery*. 3rd ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 86–102, 2012.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. *The principles of humane experimental technique*. – Methuen, London, 1959.

SALLA, R. F. *et al.* Differential liver histopathological responses to amphibian chytrid infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 142, p. 177–187, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3354/dao03541>. Acesso em: 27 jun. 2023.

SILVA, T.L., SILVA, M.I.A., VENANCIO, L.P.R., ZAGO, C.E.S., MOSCHETA, V.A.G., LIMA, A.V.B., VIZOTTO, L.D., SANTOS, J.R., BONINI-DOMINGOS, C.R.;

- AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Simple Method for Culture of Peripheral Blood Lymphocytes of Testudinidae. *Genetics and Molecular Research*, 10, p.3020-3025, 2011
- SLABY, S.; MARIN, M.; MARCHAND, G.; LEMIERE, S. Exposures to chemical contaminants: What can we learn from reproduction and development endpoints in the amphibian toxicology literature? *Environmental Pollution*, v. 248, p. 478-495, 2019.
- STEINER, A. A.; PETENUSCI, S. O.; BRENTEGANI, L. G.; BRANCO, L. G. D. S. The importance of glucose for the freezing tolerance/intolerance of the anuran amphibians *Rana catesbeiana* and *Bufo paracnemis*. *Revista Brasileira de Biologia*, 60, p. 321-328, 2000.
- SUMMA, N. M., ESHAR, D., LEE-CHOW, B., LARRAT, S.; BROWN, D. C. Comparison of a human portable glucometer and an automated chemistry analyzer for measurement of blood glucose concentration in pet ferrets (*Mustela putorius furo*). *The Canadian Veterinary Journal*, 55(9), 865, 2014.
- TAPLEY, B ; ACOSTA-GALVIS, A ; LOPEZ, J. A field method for sampling blood of male anurans with hypertrophied limbs. *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*, 2011.
- TKACHENKO, YE.A.; DERKHO, M.A. Leukocyte indices in mice after experimental cadmium poisoning, *Izv. Orenburg. Gos. Agr. Univ. no. 3*, pp. 81–83, 2014.
- TONYUSHKINA, K.; NICHOLS, J. H. Glucose meters: a review of technical challenges to obtaining accurate results. *Journal of diabetes science and technology*, 3(4), 971-980, 2009.
- VALBONA, A., ADIOLA, B., ELDORES, S.; ALKETA, G. Effects of pollution on amphibian blood parameters (*Ranidae: Rana balcanica* & *Rana lessonae*) from the Albania's coastal zone. In Conference: International conference MarCoastEcos, v. 1, p. 207-213, 2012.
- WALKER, K. A. *et al.* Behavioural responses of juvenile Steller sea lions to hot-iron branding. – *Appl. Anim. Behav. Sci.* 122: 58–62, 2010
- WÓJCIK, E. AND SMALEC, E. Description of the Mallard Duck (*Anas platyrhynchos*) Karyotype. *Folia Biologica (Kraków)*, 55, 3-4, 2007.
- XIA, J., LI, X. Effect of temperature on blood parameters of the salamander *Batrachupems tibetanus* (Schmidt, 1925) (*Amphibia: Hynobiidae*). *Russ J Ecol* 41, 102–106, 2010.

YOUNG, S., WHITEHORN, P., BERGER, L., SKERRATT, L. F., SPEARE, R., GARLAND, S.; WEBB, R. Defects in host immune function in tree frogs with chronic chytridiomycosis. *PLoS One*, 9(9), e107284, 2014.

ZHULEVA, L.YU.; DUBININ, N.P., Using Micronucleus for Assessment of Ecological Status in Regions of Astrahan District, *Genetika*, vol. 30, no. 7, pp. 999-1004, 1994.

5. REFERÊNCIAS GERAIS

ALI, A., MUDASIR, S., GANIE, S. A., MIR, M. U. R., BILAL, S., HAMADANI, H.; MAJID, S. Biomonitoring and Bioindicators. In *Freshwater Pollution and Aquatic Ecosystems* (pp. 185-204). Apple Academic Press, 2021.

ALTIZER, S., HARVELL, D., ; FRIEDLE, E. Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology ; Evolution*, 18(11), 589-596, 2003.

ÁLVAREZ-VERGARA, F., SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C., ; SABAT, P. Biochemical and osmoregulatory responses of the African clawed frog experimentally exposed to salt and pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology ; Pharmacology*, 109367, 2022.

ASW. Amphibian Species of the World. . Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. 2023.

AZEVEDO CALDERON, L.D.; SILVA, A.D.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R.G. Antimicrobial peptides from Phyllomedusa frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications. *Amino acids*, 2011

BEAUPRE, S. J.; JACOBSON, E. R.; LILLYWHITE, H. B.; ZAMUDIO, K. Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research, 2004.

BLAUSTEIN, A. R., ROMANSIC, J. M., KIESECKER, J. M., ; HATCH, A. C. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and distributions*, 9(2), 123-140, 2003.

BRODEUR, J. C., BAHL, M. F., NATALE, G. S.; POLISERPI, M. B. Biomarker and hematological fieldwork with amphibians: is it necessary to sample all night?. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 17152-17161, 2020.

BUCHANAN, K. *et al.* Guidelines for the treatment of animals in behavioral research and teaching. – *Anim. Behav.* 99: I–IX, 2015.

BURGGREN, W. W.; WARBURTON, S. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *ILAR journal*, 48(3), 260-269, 2007.

CALDERON, M. R., GONZÁLEZ, S. P., PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; JOFRÉ, M. B. Anthropogenic impacts on rivers: use of multiple indicators to assess environmental quality status. *Hydrobiologia*, 1-19. 2022.

CARVALHO, C.S; MORAES U.; HEIDI S. ; PASQUOTO-STIGLIANI, T. ; COSTA, M.J.; FERNANDES, M.N. **Biomarkers of the oxidative stress and neurotoxicity in tissues of the bullfrog, *Lithobates catesbeianus* to assess exposure to metals.** ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY. v. 196, p. 110560, 2020.

CEBALLOS, G., EHRLICH, P. R.; RAVEN, P. H. Vertebrates on the brink as indicators of biological annihilation and the sixth mass extinction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(24), 13596-13602, 2020.

CLARKE, G. S., PHILLIPS, B. L.; SHINE, R. Clipping the tail fin enables cohort identification of small anuran tadpoles. *Copeia*, 107(1), 71-77, 2019.

COLLINS, J. P. Amphibian decline and extinction: what we know and what we need to learn. *Diseases of aquatic organisms*, 92(2-3), 93-99, 2010.

COLLINS, J. P.; STORFER, A. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and distributions*, 9(2), 89-98, 2003.

COLLINS, J.P.; CRUMP, M.L.; LOVEJOY III, T.E. Extinction in our times: global amphibian decline. Oxford University Press, 2009

CORDIER, J. M., AGUILAR, R., LESCANO, J. N., LEYNAUD, G. C., BONINO, A., MILOCH, D., ; NORI, J. A global assessment of amphibian and reptile responses to land-use changes. *Biological conservation*, 253, 2021.

CORNO, A. F., FLORES, N. E., LI, W., GOMEZ, T. H., ; SALAZAR, J. D. Anesthesia for echocardiography and magnetic resonance imaging in the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Comparative Medicine*, 72(4), 243-247, 2022

COUNCIL OF EUROPE. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, 1986.

DAL-MEDICO, S.E.; RISSOLI, R.Z.; GAMERO, F.U.; VICTÓRIO, J.A.; SALLA, F.C.; ABDALLA, E.C.M.; SILVA-ZACARIN, C.S.; CARVALHO, COSTA, M.J. Negative

impact of a cadmium concentration considered environmentally safe in Brazil on the cardiac performance of bullfrog tadpoles, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, V. 104, p. 168-174, 2014.

DALY, J.W., CACERES, J., MONI, R.W., GUSOVSKY, F., MOOS JR, M., SEAMON, K.B., MILTON, K. AND MYERS, C.W. Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(22), pp.10960-10963, 1992.

DASZAK, P., CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Wildlife ecology - emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. *Science*, 287, 443-449, 2000.

DAVIS, A. K., ; MAERZ, J. C. Assessing Leukocyte Profiles of Salamanders and Other Amphibians: A Herpetologists' Guide. In *Salamanders: Methods and Protocols* (pp. 443-458). New York, NY: Springer US, 2022.

DE LACERDA VALVERDE, B. S., UTSUNOMIYA, H. S. M., DOS SANTOS CARVALHO, C., FRANCO-BELUSSI, L.; DE OLIVEIRA, C. Response of hepatic biomarkers in *Physalaemus nattereri* (Anura) to different benzo (α) pyrene exposure routes. *Ecotoxicology*, 31(3), 516-523, 2022.

DEPLEDGE, M.H. The Rational Basis for the Use of Biomarkers as Ecotoxicological tools. In: Fossi, M.C. and Leonzio, C., Eds., *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*, Lewis Publisher, Boca Raton, 271-295, 1994.

DONNELLY, M. A., GUYER, C., JUTERBOCK, E. J., ; ALFORD, R. A. Techniques for marking amphibians. *Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for amphibians*, 1994.

ELGUERO J, CAMPILLO N, PÁEZ JA. Analgésicos no convencionales: Epibatidina, un potente analgésico nicotínico. In *Anales de la Real Academia de Farmacia*. Vol. 62, No. 3, pp. 303-321, 1996.

FISHER, M. C.; GARNER, T. W. Chytrid fungi and global amphibian declines. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 332-343, 2020.

FROST, D.R. Amphibian species of the world: An online reference. Version 4. Electronic database available (<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>). New York: American Museum of Natural History, 2011.

GABOR, C.R.; JAEGER, R.G. Resource quality affects the agonistic behaviour of territorial salamanders. *Anim Behav* 49:71-79, 1995.

GALVÃO-CASTRO, B., CORDEIRO, R. S. B.; GOLDENBERG, S. Brazilian science under continuous attack. *The Lancet*, 399(10319), 23-24, 2022.

GRANT, C.; MILLER, H.; MILLER, D. A.; MUTHS, E. A synthesis of evidence of drivers of amphibian declines. *Herpetologica*, 76(2), 101-107, 2020.

GUIMARÃES, T.C.; DE FIGUEIREDO, G. B.; MESQUITA, D. O.; VASCONCELLOS, M. M. Ecology of *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae) in a Neotropical savanna. *Journal of Herpetology*, 45(2), 244-250, 2011.

HASLAM, I. S., ROUBOS, E. W., MANGONI, M. L., YOSHIKATO, K., VAUDRY, H., KLOPPER, J. E. ; PAUS, R. From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skin biology. *Biological Reviews*, 89(3), 618-655, 2014.

HAYES, T. B., CASE, P., CHUI, S., CHUNG, D., HAEFFELE, C.; HASTON, K.; TSUI, M. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. *Environmental health perspectives*, 114(Suppl 1), 40-50, 2006.

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

HERKOVITS, J.; PEREZ-COLL, C. S. AMPHITOX: a customized set of toxicity tests employing amphibian embryos. *ASTM SPECIAL TECHNICAL PUBLICATION*, 1443, 46-62, 2003.

HOCKING, D. J.; BABBITT, K. J. Amphibian contributions to ecosystem services. *Herpetological conservation and biology*, 2014

HOPKINS, W. A. Amphibians as models for studying environmental change. *ILAR journal*, 48(3), 270-277, 2007.

IUCN. 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>.

IUCN. Red list of threatened species. 2021. Available in: <https://www.iucnredlist.org/>.

JAEGER, R.G.; SCHWARZ, J.K. Gradational threat postures by the red backed salamander. *J Herpetol* 25:112-114, 1991.

JAEGER, R.G.; WICKNICK, J.A.; GRIFFIS, M.R.; ANTHONY, C.D. Socioecology of a terrestrial salamander: Juveniles enter adult territories during stressful foraging periods. *Ecology* 76:533-543, 1995.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M.M. Anfíbios: biologia e seus venenos. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M., HADDAD, J.V. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier, 2009.

KILKENNY, C. *et al.* Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. – *PLoS Biol.* 8: e1000412, 2010

KUPFERBERG, S.J., CATENAZZI, A., LUNDE, K., LIND, A. J., ; PALEN, W. J. Parasitic copepod (*Lernaea cyprinacea*) outbreaks in Foothill Yellow-legged Frogs (*Rana boylei*) linked to unusually warm summers and amphibian malformations in Northern California. *Copeia*, 529-537, 2009.

LILLYWHITE, H. B. Water relations of tetrapod integument. *Journal of Experimental Biology*, 209(2), 202-226, 2006.

LINDER, G. *et al.* Physiological ecology of amphibians and reptiles: In: SPARLING, D.W.; *et al.* *Ecotoxicology of Amphibians And Reptiles*. 2 ed. Florida. USA: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). p. 105, 2010.

LLEWELYN, V. K., BERGER, L.; GLASS, B. D. Effects of skin region and relative lipophilicity on percutaneous absorption in the toad *Rhinella marina*. *Environmental toxicology and chemistry*, 38(2), 361-367, 2019.

MARSH, D.M.; TRENHAM, P.C. Metapopulation dynamics and amphibian conservation. *Conservation Biology*, 15, 40-49, 2001.

MAY, R. M. Ecological science and tomorrow's world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1537), 41-47, 2010.

MURRAY, D.L.; JENKINS, C.L. Perceived predation risk as a function of predator dietary cues in terrestrial salamanders. *Anim Behav* 57:33-39, 1999.

OLIVEIRA, C. R., GARCIA, T. D., FRANCO-BELUSSI, L. I. L. I. A. N., SALLA, R. F., COSTA, M. J., FRACETO, L. F., ; ZACARIN, E. C. M. D. S. 376-efeitos hematológicos em girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) expostos ao extrato de piretro carregados em nanopartículas. *1ª. edição*, 628, 2018.

POUGH, F.H. Amphibian Biology and Husbandry, *ILAR Journal*, Volume 48, Issue 3,p. 203–213, 2007.

POUGH, F.H.; ANDREWS, R.M.; CADLE, J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITZKY, A.H.; WELLS, K.D. Herpetology. 3rd ed. Saddle River NJ: Prentice Hall, 2004.

PRICE, S. J., GARNER, T. W., NICHOLS, R. A., BALLOUX, F., AYRES, C., DE ALBA, A. M. C., ; BOSCH, J. Collapse of amphibian communities due to an introduced Ranavirus. *Current Biology*, 24(21), 2586-2591, 2014.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. Methuen, London, 1959.

SALINAS, Z. A., BARAQUET, M., GRENAT, P. R., MARTINO, A. L., ; SALAS, N. E. Morphology and size of blood cells of *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) as environmental health assessment in disturbed aquatic ecosystem from central Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 24907-24915, 2017.

SALLA RF, JONES-COSTA M, ABDALLA FC, VIDAL FAP, BOEING GANS, OLIVEIRA CR, SILVA-ZACARIN ECM, FRANCO-BELUSSI L, RIZZI-POSSIGNOLO GM, LAMBERTINI C, TOLEDO LF. Differential liver histopathological responses to amphibian chytrid infection. *Dis Aquat Organ*.17;142:177-187, 2020.

SALLA, R. F., COSTA, M. J., ; FERNANDES, H. L. Influência do sistema afetivo-emocional no aprendizado: valores culturais e mitificação dos anfíbios anuros. *Revista de Ensino de Biologia da SBEnBio*, 87-105, 2017.

SBH. **Lista de espécies de anfíbios do Brasil**. Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2009.

SCHLOEGEL, L. M.; PICCO, A. M.; KILPATRICK, A. M.; DAVIES, A. J., HYATT, A. D.; DASZAK, P. Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biological Conservation*, 142(7), 1420-1426, 2009.

SEKERCIOGLU, C.H.; DAILY, G.C.; EHRLICH, P.R. (Ecosystem consequences of bird declines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101, 18042–18047, 2004.

SEWELL, D. ; GRIFFITHS, R. A. Can a single amphibian species be a good biodiversity indicator?. *Diversity*, 1(2), 102-117, 2009.

SILVA, M. B. D., FRAGA, R. E., NISHIYAMA, P. B., SILVA, I. S. S. D., COSTA, N. L. B., DE OLIVEIRA, L.A.A.; JUNCÁ F. A. Leukocyte profiles in *Odontophrynus carvalhoi* (Amphibia: Odontophrynidae) tadpoles exposed to organophosphate chlorpyrifos pesticides. *Water, Air, ; Soil Pollution*, 231(7), 1-11, 2020.

SIMONS, R.R.; JAEGER, R.G.; FELGENHAUR, B.E. Competitor assessment and area defense by territorial salamanders. *Copeia* 1997:70-76, 1997.

SNEDDON, L. U. *et al.* Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. – *J. Exp. Biol.* 220: 3007–3016, 2017.

SUTHERST, R. W. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 136-173, 2004.

TSENG, A., W.S. BEANE, J.M. LEMIRE, A. MASI, AND M. LEVIN. Induction of vertebrate regeneration by a transient sodium current. *The Journal of Neuroscience* 30:13192–13200, 2010.

TURVEY, S. T.; CREEDS, J. J. Extinction in the Anthropocene. *Current Biology*, 29(19), R982-R986, 2019.

UNDERWOOD, W.; ANTHONY, R. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. *Retrieved on March, 2013*(30), 2020-1, 2020.

VALENCIA-AGUILAR, A., CORTÉS-GÓMEZ, A. M., ; RUIZ-AGUDELO, C. A. (2013). Ecosystem services provided by amphibians and reptiles in Neotropical ecosystems. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services ; Management*, 9(3), 257-272, 2013.

VAN METER, R. J., GLINSKI, D. A., PURUCKER, S. T., ; HENDERSON, W. M. Induced Hepatic Glutathione and Metabolomic Alterations Following Mixed Pesticide and Fertilizer Exposures in Juvenile Leopard Frogs (*Lithobates sphenoccephala*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(1), 122-133, 2022.

VENCES, M.; KÖHLER, J. Global diversity of amphibians (Amphibia) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*, 569-580, 2008.

VERDADE, V. K., VALDUJO, P. H., CARNAVAL, A. C., SCHIESARI, L., TOLEDO, L. F., MOTT, T. ; SILVANO, D. L. A leap further: the Brazilian amphibian conservation action plan. *Alytes*, 29(1-4), 28-43, 2012.

VIDAL, F. A. P. Os efeitos do contaminante emergente lítio e da suplementação com selênio sobre a metamorfose de girinos de rãs-touro, *Lithobates catesbeianus*, 2019.

WELDON, C., DU PREEZ, L. H., HYATT, A. D., MULLER, R., ; SPEARE, R. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2100, 2004.

WELLS, K. D. The ecology and behavior of amphibians. Chicago: The University of Chicago Press, 1400p, 2007.

WEST, J. Importance of amphibians: A synthesis of their environmental functions, benefits to humans, and need for conservation, 2018.

ZEMANOVA, M. A. Towards more compassionate wildlife research through the 3Rs principles: moving from invasive to non- invasive methods. *Wildlife Biology*, 2020(1), 1-17, 2020.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os métodos alternativos se mostraram muito eficientes na coleta de amostras para análises de dados em estudos com anfíbios, mostrando que muitos deles podem ser usados diversas áreas de monitoramento ambiental, por exemplo, com a utilização de diversos biomarcadores. Dessa forma, mostra-se que muitos métodos que resultam na eutanásia do animal podem ser substituídos por outros que não prejudicam os animais, sem perder a qualidade do experimento e possibilitando a análise de dados confiáveis. O segundo artigo mostra de forma inédita que um desses métodos (glicosímetro), é tão eficiente quanto o método bioquímico, reduzindo custos de pesquisa e sem a necessidade de transporte dos animais para laboratório, diminuindo o estresse e, portanto, sua interferência nos resultados, aumentando a credibilidade.

Futuramente, o objetivo é levar esses conhecimentos sobre esses métodos às mais diversas áreas de pesquisa, proporcionando equilíbrio ao ecossistema e até mesmo pesquisas com espécies ameaçadas de extinção. Com o aprimoramento da tecnologia e do conhecimento sobre os métodos alternativos (que foram exemplificados e descritos no artigo um), a tendência da utilização deles tende a aumentar; em um cenário mais otimista,

até mesmo países de terceiro mundo terão acesso às tecnologias que possibilitam a menor invasividade, reduzindo assim o impacto ambiental que a eutanásia de indivíduos pode ter no planeta. A realidade é que é preciso mudar a postura humana em relação ao ecossistema de várias formas e urgentemente, uma vez que a degradação de habitats está levando às extinções de diversas espécies e às mudanças ambientais. Portanto, dar o exemplo de como pesquisas podem ser feitas com a conservação de espécies é um passo importante para a conscientização da importância que o planeta como um todo tem para a sobrevivência de todas as espécies que nele habitam.