



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA
INDOAMÉRICA**

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS
GENÉTICOS**

TEMA:

**EVOLUCIÓN DE MECANISMOS GENÉTICOS DE RESISTENCIA A
TOXINAS DE RANAS VENENOSAS POR PARTE DE SERPIENTES OJOS
DE GATO (*LEPTODEIRA* SPP.).**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero en Biodiversidad y
Recursos Genéticos

Autor (a)

Rivera Albuja Jordi David

Tutor (a)

Salazar Valenzuela Christian David, PhD

QUITO – ECUADOR

2021

**AUTORIZACIÓN POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA,
REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL, Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL
TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Jordi David Rivera Albuja, declaro ser autor del Trabajo de Investigación con el nombre “Evolución de mecanismos de resistencia a toxinas de ranas venenosas por parte de serpientes ojos de gato (*Leptodeira* spp.)”, como requisito para optar al grado de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos y autorizo al Sistema de Bibliotecas de la Universidad Tecnológica Indoamérica, para que con fines netamente académicos divulgue esta obra a través del Repositorio Digital Institucional (RDI-UTI).

Los usuarios del RDI-UTI podrán consultar el contenido de este trabajo en las redes de información del país y del exterior, con las cuales la Universidad tenga convenios. La Universidad Tecnológica Indoamérica no se hace responsable por el plagio o copia del contenido parcial o total de este trabajo.

Del mismo modo, acepto que los Derechos de Autor, Morales y Patrimoniales, sobre esta obra, serán compartidos entre mi persona y la Universidad Tecnológica Indoamérica, y que no tramitaré la publicación de esta obra en ningún otro medio, sin autorización expresa de la misma. En caso de que exista el potencial de generación de beneficios económicos o patentes, producto de este trabajo, acepto que se deberán firmar convenios específicos adicionales, donde se acuerden los términos de adjudicación de dichos beneficios.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Quito, a los 5 días del mes de febrero del 2021, firmo conforme:

Autor: Jordi Rivera

Firma:



Número de Cédula: 1720100765

Correo electrónico: jordi.riveraa17@gmail.com

Teléfono: 0995004694

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Titulación “EVOLUCIÓN DE MECANISMOS GENÉTICOS DE RESISTENCIA A TOXINAS DE RANAS VENENOSAS POR PARTE DE SERPIENTES OJOS DE GATO (*Leptodeira* spp.).” presentado por Jordi David Rivera Albuja, para optar por el Título de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos,

CERTIFICO

Que dicho trabajo de investigación ha sido revisado en todas sus partes y considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

Quito, 8 de febrero de 2021



.....

Christian David Salazar Valenzuela, PhD.

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Quien suscribe, declaro que los contenidos y los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, como requerimiento previo para la obtención del Título de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos, son absolutamente originales, auténticos y personales y de exclusiva responsabilidad legal y académica del autor.

Quito, 8 de febrero del 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jordi David Rivera Albuja', with a stylized flourish extending to the right.

Jordi David Rivera Albuja
1720100765

APROBACIÓN TRIBUNAL

El trabajo de Integración Curricular ha sido revisado, aprobado y autorizada su impresión y empastado, sobre el Tema: EVOLUCIÓN DE MECANISMOS GENÉTICOS DE RESISTENCIA A TOXINAS DE RANAS VENENOSAS POR PARTE DE SERPIENTES OJOS DE GATO (*LEPTODEIRA* SPP.), previo a la obtención del Título de Ingeniero en Biodiversidad y Recursos Genéticos, reúne los requisitos de fondo y forma para que el estudiante pueda presentarse a la sustentación del trabajo de titulación.

Quito, 8 de febrero de 2021

PhD. Mónica Páez



.....

Lector 1

PhD. Nora Oleas



.....

Lector 2

DEDICATORIA

Para mi enorme familia, mis triunfos son sus triunfos.

AGRADECIMIENTOS

Dicen que madre hay una sola y yo agradezco por formar parte de tu creación. Desde los ríos que cruzan las ciudades hasta las inhóspitas selvas tropicales, siempre te defenderé de aquel que quiere derrumbarte en nombre del desarrollo.

A mis padres, por su enorme esfuerzo y sacrificio para darme la posibilidad de cumplir con mis metas. Su confianza depositada en mí siempre será la razón por la cual luchar.

A mi enorme familia que siempre está presente, estoy seguro que cada uno de los momentos compartidos son la nafta de mi viaje. A mis hermanos, por darme mucho de cada uno. Y a Iosu, por regalarme toda la ternura de este mundo y llenarme de orgullo con cada uno de sus triunfos.

A mi compañera, Belén, por su enorme corazón. Tus ánimos, consejos y experiencias (aunque conoces de sobra que soy necio) fueron vitales para culminar este proceso. Que nunca me apaguen la luz para poder ver tus ojos.

Agradezco a aquellos profesores que mediante su experiencia y calidad humana supieron transmitirme algunos de los secretos que esconde la vida. Las charlas y sus enseñanzas serán algo que perdurará en mi carrera profesional.

A David, por darme la oportunidad de desarrollar este tema; estoy seguro que será un gran desafío realizar el proyecto, pero los resultados serán magníficos.

A mis compañeros, les agradezco por todos los buenos momentos que compartimos dentro y fuera de las aulas y cada una de las experiencias en el campo. Desde las caídas hasta los compañeros olvidados en las estaciones, cada recuerdo y risa serán el recuerdo de esta linda etapa. A Pamelita, por ser una amistad incondicional y buscar paciencia de donde no hay para soportarme en las aulas y el campo.

“Reptiles and amphibians are sometimes thought of as primitive, dull and dimwitted. In fact, of course, they can be lethally fast, spectacularly beautiful, surprisingly affectionate and very sophisticated.”

-Sir David Attenborough

ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADA.....	i
AUTORIZACIÓN DEL AUTOR.....	ii
APROBACIÓN DEL TUTOR	iii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iv
APROBACIÓN TRIBUNAL	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LAS INTERACCIONES PRESA-DEPREDADOR COMO FUENTE DE DIVERSIDAD BIOLÓGICA.....	1
1.2. RELACIONES TRÓFICAS ENTRE ANFIBIOS Y SERPIENTES.....	2
1.3. ANFIBIOS TÓXICOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA EN SERPIENTES.....	3
1.3.1. <i>Toxinas de anfibios</i>	3
1.3.2. <i>Resistencia a toxinas de anfibios por parte de serpientes</i>	5
1.4. RESISTENCIA A TOXINAS DE ANFIBIOS EN SERPIENTES NEOTROPICALES....	11
1.5. SERPIENTES OJOS DE GATO (GÉNERO <i>LEPTODEIRA</i>) COMO DEPREDADORAS DE RANAS VENENOSAS	14
1.6. OBJETIVO GENERAL.....	17
1.6.1. <i>Objetivos específicos</i>	17
2. METODOLOGÍA.....	19
2.1. TRANSCRIPTÓMICA.....	21
2.1.1. <i>Recolección y preservación de muestras</i>	21
2.1.2. <i>Preparación de la librería y secuenciación</i>	22
2.1.3. <i>Mapeo y anotación de lecturas</i>	23
2.1.4. <i>Captura de secuencias</i>	24
2.2. COMPARACIONES INTER E INTRAGENÉRICAS DE SUSTITUCIONES DE AMINOÁCIDOS	26
2.2.1. <i>Análisis de sustitución de aminoácidos</i>	26

2.2.2. <i>Filogenia</i>	26
2.2.3. <i>Reconstrucción del estado ancestral</i>	27
2.2.4. <i>Selección positiva de aminoácidos</i>	27
2.3. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES	28
2.3.1. <i>Diseño experimental</i>	28
2.3.2. <i>Expresión de genes de resistencia a toxinas</i>	30
2.3.3. <i>Análisis de expresión de genes</i>	31
2.3.4. <i>Análisis estadísticos</i>	31
3. RESULTADOS ESPERADOS	32
4. CONCLUSIONES	34
5. CRONOGRAMA	36
6. PRESUPUESTO	45
7. REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Sustituciones de aminoácidos (AA) encontradas en canales iónicos de sodio voltaje-dependientes (Nav.) que provocan una alteración de receptores objetivo de la tetrodotoxina.....	10
Fig. 2. Sustituciones de aminoácidos (AA) encontradas en canales iónicos bomba sodio-potasio (ATPa).....	16
Fig. 3. Resumen de los métodos propuestos para el trabajo de investigación.....	20
Fig. 4. Ubicación de poblaciones ecuatorianas de <i>Leptodeira</i> spp. establecidas para el proyecto.....	22
Fig. 5. Diseño experimental.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de serpientes con resistencia a anfibios venenosos mediante alteración de receptores en distintas proteínas de canales de iones objetivo de toxinas	7
Tabla 2. Genes relacionados con la resistencia a toxinas presentes en anfibios venenosos por parte de serpientes	25
Tabla 3. Genes relacionados con la resistencia a la epibatidina	25

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS

**TEMA: EVOLUCIÓN DE MECANISMOS GENÉTICOS DE RESISTENCIA A
TOXINAS DE RANAS VENENOSAS POR PARTE DE SERPIENTES OJOS DE GATO
(*Leptodeira* spp.)**

AUTOR: Jordi David Rivera Albuja

TUTOR: Christian David Salazar Valenzuela, PhD.

RESUMEN EJECUTIVO

Los mecanismos de resistencia de serpientes a anfibios venenosos están determinados por adaptaciones moleculares como sustituciones de aminoácidos (AA) en genes codificantes y modificaciones en zonas que regulan los patrones de expresión genética. Esta evolución de adaptaciones moleculares ha sido estudiada en culebras resistentes a anfibios con potentes toxinas que actúan sobre receptores moleculares específicos. Individuos de ranas venenosas de la familia Dendrobatidae pueden acarrear más de 16 compuestos diferentes en su piel que pueden alterar el funcionamiento de varios receptores. No obstante, los mecanismos de resistencia en serpientes neotropicales que consumen ranas con adaptaciones tóxicas complejas y variadas carecen de estudios científicos suficientes. Debido a esto, esta propuesta busca identificar mecanismos genéticos de resistencia a toxinas de ranas venenosas de la familia Dendrobatidae por parte de serpientes ojos de gato (*Leptodeira* spp.). Para ello, utilizaremos técnicas transcriptómicas que nos permitan realizar: i) reconstrucciones ancestrales de dieta y sustituciones de AA, ii) análisis de selección positiva en codones, genes y ramas del árbol filogenético de serpientes y iii) experimentos que determinen patrones de expresión genética en *Leptodeira ornata* ante el consumo de ranas venenosas. A través de este estudio se espera: i) encontrar sustituciones de aminoácidos relacionados con la incursión de ranas venenosas en la dieta de serpientes, ii) identificar codones y genes con selección positiva en las poblaciones ecuatorianas de *Leptodeira* sp. para encontrar posibles sustituciones de AA o genes candidatos en la resistencia a dendrobátidos y iii) determinar los patrones de expresión genética en la desintoxicación de *Leptodeira* sp. ante ranas venenosas. Este trabajo es relevante porque permitirá entender los mecanismos genéticos de resistencia a dendrobátidos por parte de serpientes ojos de gato. Además, proporcionará información útil para ampliar el conocimiento de la coevolución de toxicidad y resistencia entre anfibios venenosos y serpientes.

Palabras clave: adaptación, Dendrobatidae, receptores moleculares, serpientes, sustituciones, toxinas.

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA INDOAMÉRICA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MEDIO AMBIENTE
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS

**THEME: EVOLUTION OF GENETIC MECHANISMS OF TOXIN RESISTANCE IN
POISONOUS FROGS BY CAT-EYED SNAKES (*Leptodeira* spp.)**

AUTHOR: Jordi David Rivera Albuja

TUTOR: Christian David Salazar Valenzuela, PhD.

ABSTRACT

Snake resistance mechanisms to poisonous amphibians are determined by molecular adaptations such as amino acid (AA) substitutions in coding genes and modifications in areas that regulate gene expression patterns. This evolution of molecular adaptations has been studied in amphibian-resistant snakes with powerful toxins acting on specific molecular receptors. Individuals of poisonous frogs of the family Dendrobatidae can carry more than 16 different compounds on their skin that can modify the function of various receptors. Nevertheless, the resistance mechanisms in neotropical snakes that consume frogs with complex toxic adaptations lack scientific studies. For this reason, this proposal aims to identify genetic mechanisms of resistance to poisonous frogs' toxins of the Dendrobatidae family by cat-eyed snakes (*Leptodeira* spp.). For this purpose, transcriptomic techniques will be used that allow us to perform: i) ancestral reconstructions of diet and AA substitutions, ii) positive selection analysis on codons, genes, and branches of the phylogenetic tree of snakes and iii) experiments that determine patterns of gene expression in *Leptodeira ornata* to poisonous frogs. By this study we expect to: i) find AA substitutions related to the incursion of poisonous frogs in the snake diet, ii) identify codons and genes with positive selection in Ecuadorian populations of *Leptodeira* sp. to find possible AA substitutions or candidate genes in the resistance to dendrobatids and iii) determine the patterns of gene expression in the detoxification of *Leptodeira* sp. to poisonous frogs. The relevance of this work lies in understanding the genetic mechanisms of resistance to dendrobatids by cat-eyed snakes. In addition, it will provide relevant information to expand the knowledge of the coevolution of toxicity and resistance among poisonous amphibians and snakes

Keywords: adaptation, Dendrobatidae, molecular receptors, substitutions, snakes, toxins.



Reviewed by: Mgs. Rocío Patiño F.

22 – 02 – 2021

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INTERACCIONES PRESA-DEPREDADOR COMO FUENTE DE DIVERSIDAD BIOLÓGICA

Las constantes interacciones entre especies pueden llegar a ser determinantes en la generación de dinámicas coevolutivas, como aquellas que ocurren cuando una especie evoluciona y genera presiones selectivas en otra especie (Clayton et al., 2015). Esta compleja red de relaciones interespecíficas compone la estructura y la funcionalidad de cualquier comunidad ecológica (Thompson, 1994). Es así como las relaciones antagonistas son consideradas, en gran medida, la mayor fuerza motriz de la coadaptación, debido a la frecuencia con la que ocurren en las comunidades biológicas (e.g., presa-depredador; hospedero-patógeno) y sus notables consecuencias en la aptitud evolutiva de los participantes (Vermeji, 1994). En las relaciones antagónicas existen fuerzas selectivas positivas para la adquisición de adaptaciones que permitan a las especies sobrevivir frente a las posibilidades del contrario (Arbuckle et al., 2017). Entre las relaciones antagonistas las interacciones entre presa y depredador suelen ser las más comunes.

La interacción entre presa y depredador puede ser percibida como una relación entre víctima y explotador debido a que los efectos producidos como fuerza, modo y uniformidad de selección difieren notablemente entre las especies que participan en este proceso evolutivo (Dawkins y Krebs, 1979). Por ejemplo, el costo que representa para una presa perder ante su depredador es alto: su vida. Por el contrario, un depredador que deja escapar una presa probablemente solo deba esperar unos días antes de tener otra oportunidad. Debido a esta diferencia, los depredadores son fuerzas selectivas importantes para las poblaciones de sus presas y tienen un efecto notable en su adquisición de mecanismos de defensa fisiológicos (e.g., toxinas; Raaymakers et al., 2017), morfológicos (e.g., mimetismo; Janzen et al., 2010; Hossie y Sherratt, 2013) y comportamentales (e.g., tanatosis; Humphreys y Ruxton, 2018). Un extremo en los patrones de selección asimétrica de los sistemas presa-depredador se da cuando las presas presentan defensas químicas; es decir, cuando las presas se vuelven peligrosas y comprometen la vida para sus depredadores (Broddie III y Brodie Jr, 1999).

Un tipo de defensa química son las toxinas, moléculas que van desde pequeños grupo amino a largas proteínas que producen un perjuicio fisiopatológico en un organismo susceptible a ellas (Brodie, 2009; Mebs, 2001; Nelsen et al., 2014). Las toxinas están presentes a lo largo del árbol filogenético de la vida en el planeta, incluyendo animales, plantas, hongos y microorganismos. Estas adaptaciones, contrario a otros tipos de defensa presentes en distintas presas (e.g., camuflaje), generan una fuerte presión selectiva en las poblaciones de depredadores. Además, son una adaptación conveniente en los contextos ecológicos y evolutivos de una relación antagonista, ya sea como mecanismo de protección o medio eficaz para la depredación (Arbuckle, 2017). De este modo, ante la presencia de presas provistas de un arsenal químico de defensa, los depredadores tienen dos opciones: 1) adquirir mecanismos comportamentales y/o moleculares que les permitan tolerar las toxinas y acceder al alimento o 2) identificar y evitar presas potencialmente peligrosas (Glendinning, 2007; Skelhorn et al., 2016). Cuando los depredadores cuentan con la resistencia se produce un proceso escalonado y recíproco de fuerzas selectivas conocido como carrera armamentista (Brodie III y Brodie Jr, 1999).

1.2. RELACIONES TRÓFICAS ENTRE ANFIBIOS Y SERPIENTES

Uno de los sistemas naturales de carrera evolutiva armamentista mejor estudiado es el de anfibios tóxicos y sus serpientes depredadoras (e.g. Brodie et al., 2005; Feldman et al., 2009; Feldman et al., 2012; Feldman et al., 2016; Hague et al., 2018; Hutchinson et al., 2007; Hutchinson et al., 2012; Geffeney et al., 2002; Motychak et al., 1999). Los anfibios y serpientes son piezas clave en las comunidades ecológicas y el flujo de energía que existen en los ecosistemas acuáticos y terrestres (Cortés-Gómez et al., 2015). A menudo ambos grupos animales se encuentran inmersos en una interacción presa-depredador, siendo común los reportes de depredación de anfibios a cargo de varias especies de ofidios (Muscat y Moroti, 2018; Toledo et al., 2007; Vargas-Salinas y Aponte-Gutierrez, 2013; Wells, 2010).

Varios linajes de serpientes han adquirido adaptaciones morfológicas, fisiológicas y comportamentales para poder aprovechar estas presas (Feldman et al., 2012; Kojima y Mori, 2015; Phillips y Shine, 2007; Mohammadi et al., 2013). La preferencia de ciertos ofidios por este tipo de presa puede deberse a la ausencia de estructuras anatómicas difíciles de digerir (e.g., garras, pelaje, escamas), la relativa facilidad de encontrar estas presas en agregaciones numerosas cercanas a cuerpos de agua durante su época reproductiva y el valor nutricional que estas presas aportan (Boyd y Goodyear 1971; Costa y Trevelin, 2020; Wells, 2010). No obstante, esto no quiere decir que los anfibios sean presas fáciles ya que cuentan con una variedad de mecanismos de defensa para evadir a sus depredadores (Ferreira et al., 2019). Uno de los mecanismos más importantes es el que está presente en la piel de varios grupos de anfibios, la cual contiene una diversidad de compuestos químicos como aminos y péptidos que son útiles en la protección ante especies antagonistas (Brizzi, y Corti, 2007; Ferreira et al., 2019; König et al., 2014; Santos et al., 2016). Este fenómeno natural resulta particularmente trascendente para las serpientes debido a que estas mayoritariamente engullen completamente a su presa sin conseguir separar las partes tóxicas (Bringsoe et al., 2020). Por lo tanto, las adaptaciones químicas a menudo provocan eventos intentos fallidos de depredación por parte de serpientes (Choi et al., 1999; Costa y Trevelin, 2020; Ferreira et al., 2019; Vargas-Salinas y Aponte-Gutierrez, 2013), la inducción de la regurgitación de la presa ilesa (König et al., 2014; Myers et al., 1978) e incluso graves perjuicios (Evans y Brodie, 1994). Todo lo anterior sugiere que las defensas químicas presentes en anfibios presentan una fuerte presión selectiva en la aptitud de las serpientes que consumen estos animales.

1.3. ANFIBIOS TÓXICOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA EN SERPIENTES

1.3.1. *Toxinas de anfibios*

La utilización de distintos grupos aminos o péptidos como toxinas ante posibles depredadores es una adaptación presente en gran parte de anfibios, principalmente anuros (i.e., ranas y sapos) (König et al., 2014; Lüddecke et al., 2018; Raaymakers et al., 2017). Los anfibios obtienen sus toxinas mediante la codificación de biomoléculas, dieta especializada o relaciones

simbióticas con bacterias (Darst et al., 2005; Hanifin, 2010; König et al., 2014; Lüddecke et al., 2018; Santos et al., 2016). Las defensas químicas de los anfibios son efectivas debido a que actúan sobre procesos fisiológicos clave en sus depredadores. Estas toxinas suelen juntarse a proteínas encargadas del transporte de iones a través de la membrana celular (e.g., **canales iónicos**: bomba sodio-potasio). Dichas toxinas pueden actuar inhibiendo o incrementando el paso de iones, lo que produce el cambio del potencial de acción que controla impulsos nerviosos en el corazón, músculos esqueléticos y sistema nervioso (Flier et al., 1980).

Las toxinas que mayormente se han estudiado en la interacción entre anfibios tóxicos y serpientes pueden clasificarse en dos de acuerdo con sus efectos: neurotoxinas paralizadoras y cardiotoxinas (Weinstein y White, 2018). En cuanto a las primeras, la tetrodotoxina (TTX) es una potente neurotoxina que se encuentra en un amplio rango de animales, incluidos los anfibios (Lorentz et al., 2016). La TTX se caracteriza por juntarse a los poros exteriores de los receptores encontrados en canales iónicos de sodio dependientes de voltaje (Nav), inhibiendo el intercambio de iones entre el interior y exterior de la célula (Hanifin, 2010). La ausencia de este paso de iones paraliza el potencial de acción que controla los impulsos nerviosos entre el sistema nervioso y los músculos. Esta interrupción provocada por la TTX puede implicar pérdida de la movilidad, problemas respiratorios y, a menudo, la muerte (Noguchi y Ebesu, 2001). Por otro lado, las cardiotoxinas se presentan en anfibios tóxicos como los sapos de la familia Bufonidae, los cuales secretan, a través de sus glándulas paratoides, glucósidos cardiacos conocidos como bufadienólidos (**BDs**; Mohammadi et al., 2016a). Estas son toxinas que se unen a la subunidad $\alpha 3$ de la proteína ATPa o bomba sodio-potasio y bloquean el intercambio de iones de sodio y potasio entre el interior y exterior de la célula respectivamente. Esta inhibición de la bomba sodio-potasio afecta la contracción muscular, función neuronal y el potencial de la membrana celular (Flier et al., 1980).

1.3.2. Resistencia a toxinas de anfibios por parte de serpientes

La resistencia de serpientes a toxinas de anfibios venenosos se encuentra en varias especies (Feldman et al., 2009; Feldman et al., 2012; Feldman et al., 2016; McGlothlin et al., 2016; Ujvari et al., 2015). Los mecanismos que subyacen esta adaptación están determinados por procesos genéticos como cambios en las secuencias codificantes y regulación en la expresión de genes (Herrera-Álvarez et al., 2015; Reimchi, 2020). Justamente, un mecanismo ampliamente estudiado en la tolerancia de serpientes a anfibios venenosos es la alteración de receptores (Geffeney et al., 2005; McGlothlin et al., 2016; Mohammadi et al., 2016a). Esta adaptación está determinada por sustituciones puntuales de aminoácidos (AA) en genes que codifican proteínas objetivo de toxinas (Arbuckle et al., 2017). En otras palabras, estas mutaciones ocurren en sitios importantes para la unión de la toxina evitando sus efectos adversos (Geffeney et al., 2005; Feldman et al., 2009; Mohammadi et al., 2016a). Las proteínas que muestran resistencia contra toxinas en serpientes son: los canales iónicos de sodio dependientes de voltaje (**Nav**; McGlothlin et al., 2016) y la bomba sodio-potasio (**ATPa**; Mohammadi et al. 2016a).

Simultáneamente, las regiones reguladoras de genes desempeñan un papel importante en la evolución adaptativa de fenotipos resistentes a toxinas (Reimche, 2020). Esto debido a la flexibilidad de cambios que pueden ocurrir en estas regiones del ADN comparado a las regiones codificantes (Carroll, 2008). Si bien estos mecanismos son menos conocidos en la resistencia de serpientes a anfibios venenosos, algunos estudios han obtenido resultados preliminares sobre su actuación (Herrera-Álvarez et al., 2015; Mohammadi et al., 2017a; Mohammadi et al., 2018; Reimche et al., 2020). En estos trabajos se determinó que existe una sobreexpresión de genes de proteínas resistentes a toxinas (i.e. alteración de receptor por sustituciones de AA) en tejidos susceptibles a intoxicación a BDs como el corazón (Mohammadi et al., 2017a; Mohammadi et al., 2018). Además, otro estudio demostró una sobrerregulación de la proteína ATPa1 en el estómago de serpientes que comen sapos de la familia Bufonidae comparado con especies que no ingieren BDs a través de su dieta (Herrera-Álvarez et al., 2015).

Entre las serpientes resistentes a toxinas, la familia Colubridae destaca por la gran cantidad de especies que han evolucionado resistencia genética contra las toxinas presentes en anfibios (Tabla 1). Uno de los géneros de culebras mejor estudiado es *Thamnophis*, las cuales habitan en la costa occidental de Norteamérica y mantienen un evento escalonado y recíproco de selección con poblaciones de salamandras venenosas del género *Taricha* que cuentan con TTX (Brodie et al., 2005; Feldman et al., 2012; Reimche et al., 2020b). En cuanto a la evolución de resistencia a la tetrodotoxina (TTX), la evidencia apunta a que algunas preadaptaciones ocurridas a lo largo de la historia evolutiva de las serpientes, aún antes de la aparición de la TTX en salamandras (Haffin, 2010), permitieron que puedan consumirlas en la actualidad (McGlothlin et al., 2016). Las serpientes del género *Thamnophis* tienen nueve proteínas parálogas de canales de iones de sodio dependientes del voltaje (**Nav**; Zakon et al., 2011). En estas especies se ha demostrado que la resistencia a la TTX está caracterizada por sustituciones de AA en tres proteínas (Figura 1), Nav 1.6 y Nav 1.7 presentes en el sistema nervioso periférico (McGlothlin et al., 2014; McGlothlin et al., 2016) y Nav 1.4 en el músculo esquelético (Geffeney et al., 2005).

Tabla 1. Especies de serpientes con resistencia a anfibios venenosos mediante alteración de receptores en distintas proteínas de canales de iones objetivo de toxinas.

Familia (Subfamilia)	Especie	RECEPTOR								Referencias	
		Canales de sodio dependientes del voltaje						Bomba sodio-potasio			
		Nav 1.4	Nav 1.5	Nav 1.6	Nav 1.7	Nav 1.8	Nav 1.9	ATP1a1	ATP1a3		
Colubridae (Dipsadinae)	<i>Atractus flammigerus</i>									Mohammadi et al. (2016)	
	<i>Clelia clelia</i>									Mohammadi et al. (2016)	
	<i>Conophis vittatus</i>									Mohammadi et al. (2016)	
	<i>Dipsas catesbyi</i>									Mohammadi et al. (2016)	
	<i>Erythrolamprus epinephelus</i>	x		x	x					Feldman et al. (2012); McGlothlin et al. (2016)	
	<i>Erythrolamprus mimus</i>								x	Mohammadi et al. (2016)	
	<i>Erythrolamprus miliaris</i>			x	x					McGlothlin et al. (2016)	
	<i>Heterodon nasicus</i>								x	Mohammadi et al. (2016)	
	<i>Heterodon platirhinos</i>			x	x				x	McGlothlin et al. (2016)	
	<i>Heterodon simus</i>								x	Mohammadi et al. (2016)	
	<i>Hydrodynastes gigas</i>								x	Mohammadi et al. (2016); Ujvari et al. (2015)	
	<i>Hypsiglena torquata</i>								x	Mohammadi et al. (2016)	
	<i>Leptodeira annulata</i>								x	Herrera et al. (2017)	
	<i>Leptodeira septentrionalis</i>								x	x	Herrera et al. (2017); Mohammadi et al. (2016)
	<i>Lygophis anomalus</i>				x				x	McGlothlin et al. (2016)	
	<i>Oxyrhopus formosus</i>								x	Mohammadi et al. (2016)	
	<i>Philodryas olfersii</i>								x	Mohammadi et al. (2016)	
	<i>Xenodon merremi</i>								x	Mohammadi et al. (2016)	
<i>Xenodon newwiedii</i>								x	Mohammadi et al. (2016)		
<i>Xenodon rabdocephalus</i>			x	x				x	x	Herrera et al. (2017); McGlothlin et al. (2016)	
<i>Xenodon semicinctus</i>									x	Mohammadi et al. (2016)	

Colubridae (Natricinae)	<i>Afronatrix anoscopus</i>				x			McGlothlin et al. (2016)
	<i>Hebius priyeri</i>	x			x		x	Feldman et al. (2009); Feldman et al. (2012); McGlothlin et al. (2016)
	<i>Hebius vibakari</i>				x		x	McGlothlin et al. (2016)
	<i>Macropisthodon rudis</i>							x Mohammadi et al. (2016)
	<i>Natrix natrix</i>							x Mohammadi et al. (2016)
	<i>Natrix tessellata</i>							x Mohammadi et al. (2016); Ujvari et al. (2015)
	<i>Nerodia clarkii</i>							x Ujvari et al. (2015)
	<i>Nerodia fasciata</i>							x Mohammadi et al. (2016)
	<i>Nerodia rhombifera</i>							x Ujvari et al. (2015)
	<i>Nerodia sipedon</i>				x		x	x McGlothlin et al. (2016)
	<i>Rhabdophis leonardi</i>							x Ujvari et al. (2015)
	<i>Rhabdophis tigrinus</i>							x Mohammadi et al. (2016)
	<i>Rhabdophis subminiatus</i>							x Mohammadi et al. (2016); Ujvari et al. (2015)
	<i>Thamnophis atratus</i>	x			x		x	x McGlothlin et al. (2016)
	<i>Thamnophis brachystoma</i>							x Ujvari et al. (2015)
	<i>Thamnophis butleri</i>							x Mohammadi et al. (2016)
	<i>Thamnophis couchii</i>	x			x		x	x Feldman et al. (2009); Feldman et al. (2012); McGlothlin et al. (2016)
	<i>Thamnophis cyrtopsis</i>							x Mohammadi et al. (2016)
	<i>Thamnophis elegans</i>				x		x	x McGlothlin et al. (2016)
	<i>Thamnophis marciamus</i>							x Mohammadi et al. (2016)
	<i>Thamnophis melanogaster</i>							x Ujvari et al. (2015)
	<i>Thamnophis ordinoides</i>				x		x	x McGlothlin et al. (2016)
	<i>Thamnophis proximus</i>				x		x	x McGlothlin et al. (2016)
	<i>Thamnophis radix</i>							x Mohammadi et al. (2016)
	<i>Thamnophis sauritus</i>							x Mohammadi et al. (2016); Ujvari et al. (2015)
	<i>Thamnophis sirtalis</i>	x	x		x	x	x	x Feldman et al. (2009); Feldman et al. (2012); Geffeney et al. (2005); McGlothlin et al. (2014); McGlothlin et al. (2016); Perry et al. (2018)
	<i>Xenochrophis piscator</i>							x Mohammadi et al. (2016); Ujvari et al. (2015)

Elapidae	<i>Elapsoidea nigra</i>	x	x	McGlothlin et al. (2016)
	<i>Hemachatus haemachatus</i>			x Mohammadi et al. (2016)
	<i>Laticauda colubrina</i>		x	McGlothlin et al. (2016)
	<i>Micrurus fulvius</i>	x	x	McGlothlin et al. (2016)
	<i>Naja atra</i>			x Mohammadi et al. (2016)
	<i>Naja melanoleuca</i>			x Mohammadi et al. (2016); Ujvari et al. (2015)
	<i>Naja naja</i>			x Mohammadi et al. (2016); Ujvari et al. (2015)
	<i>Naja nigricollis</i>			x Mohammadi et al. (2016)
	<i>Ophiophagus hannah</i>	x		x McGlothlin et al. (2016)
Psammophidae	<i>Psammophis condanarus</i>		x	McGlothlin et al. (2016)
Viperidae	<i>Agkistrodon contortrix</i>	x	x	McGlothlin et al. (2016)
	<i>Bitis arietans</i>			x Mohammadi et al. (2016); Ujvari et al. (2015)
	<i>Bitis nasicornis</i>			x Mohammadi et al. (2016); Ujvari et al. (2015)
	<i>Causus maculatus</i>			x Mohammadi et al. (2016)
	<i>Crotalus scutulatus</i>	x	x	McGlothlin et al. (2016)
	<i>Protobothrops flavoviridis</i>		x	McGlothlin et al. (2016)
	<i>Vipera berus</i>	x		Vornanen et al. (2011)

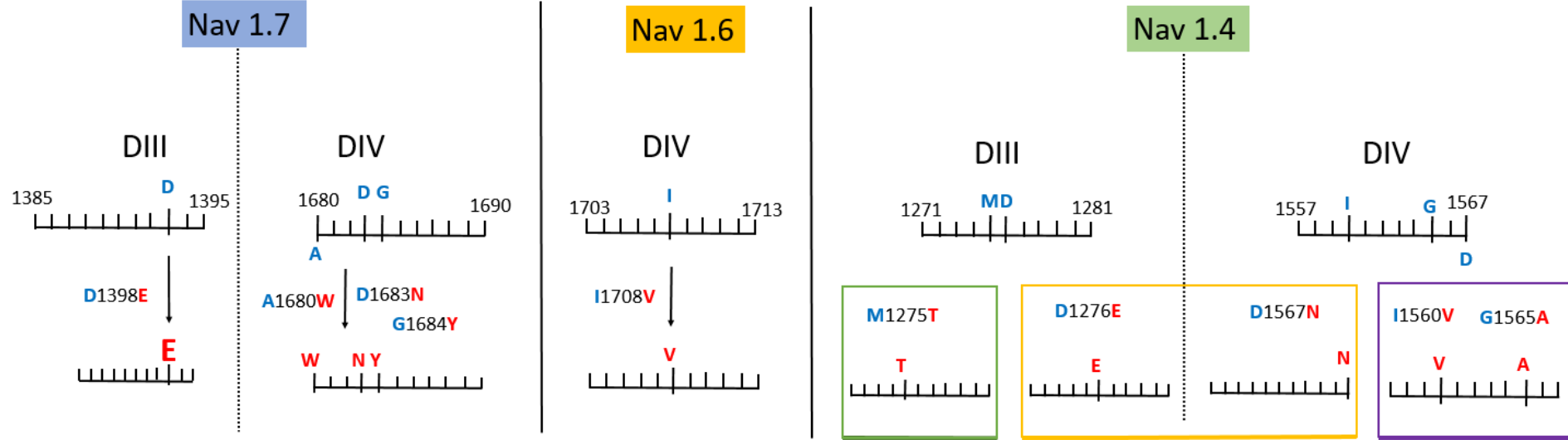


Figura 1. Sustituciones de aminoácidos (AA) encontradas en canales iónicos de sodio voltaje-dependientes (Nav.) que provocan una alteración de receptores objetivo de la tetrodotoxina. La primera sustitución se presentó en el ancestro común a todos los reptiles hace 278 millones de años (m.a.) en el dominio transmembranal DIII de la proteína Nav 1.7. El segundo evento de contingencia evolutiva ocurrió mediante tres sustituciones de AA en el DIV de la misma proteína hace 170 m.a. Sustitución presente en el dominio transmembranal DIV de la Oyproteína Nav 1.6 ocurrió hace 36 m.a. en diversos grupos de serpientes que se alimentan de anfibios. Por último, sustituciones de AA encontradas en tres serpientes del género *Thamnophis* que mantienen procesos coevolutivos con salamandras del género *Taricha*. (McGlothlin et al., 2016). Marco verde: Sustituciones presentes en *Thamnophis couchii* (McGlothlin et al., 2016). Marco amarillo: Sustituciones presentes en *Thamnophis atratus*. Marco morado: Sustituciones presentes en *Thamnophis sirtalis*. Letras en azul: AA conservados en distintos grupos animales. Letras en rojo: sustitución de AA. Números: posición en la cadena de AA.

Adicionalmente, varios estudios han indagado los factores que permiten que distintas especies de la familia Colubridae se alimenten de sapos bufónidos, los cuales presentan una alta toxicidad (Flier et al., 1980). En estos casos, la alteración de receptores es una adaptación importante para la resistencia contra toxinas de estos anuros. Dos cambios en la secuencia de AA del gen en la proteína ATPa3 permiten a dichas serpientes soportar dosis 20 veces más altas de BDs comparado con serpientes que carecen de adaptaciones genéticas (Mohammadi et al., 2016b). No obstante, entre el grupo de serpientes que cuentan con las sustituciones de AA que confiere resistencia contra los BDs existen algunas especies que no depredan sapos venenosos (Mohammadi et al., 2016a). Esto podría deberse a que una dieta compuesta por estos anuros tiene costos importantes en la aptitud de los depredadores (Mohammadi et al., 2017b). Es así como, en este sistema, la alteración de receptores está acompañada con la regulación de la expresión de las proteínas objetivo de los BDs entre diferentes tejidos (Herrera-Álvarez et al., 2015; Mohammadi et al., 2016b; Mohammadi et al., 2017b).

1.4. RESISTENCIA A TOXINAS DE ANFIBIOS EN SERPIENTES NEOTROPICALES

Las serpientes neotropicales tienen una estrecha relación con anuros; un hecho que resalta esto es la disminución de ciertas poblaciones de serpientes en respuesta a la extinción masiva de anuros suscitada en las últimas décadas (Zipkin et al., 2020). En el Neotrópico, las serpientes coexisten con la mayor diversidad biológica de anfibios del planeta (Dullman, 1988), incluidos linajes venenosos entre los cuales destacan anuros de la familia Bufonidae y Dendrobatidae (Santos et al., 2016). Esta riqueza de especies también se traduce en una mayor diversidad de compuestos químicos de defensa. Algunos trabajos a gran escala han encontrado sustituciones de AA en serpientes con distribución neotropical (Tabla 1; e.g., *Erythrolamprus epinephelus*, *Oxyrhopus formosus*, *Xenodon rabdocephalus*). No obstante, contrario a las serpientes de la región temperada de Norteamérica del género *Thamnophis* y la culebra asiática *Rhabdophis tigrinus*, los procesos ecológicos y evolutivos que enmarcan la resistencia de serpientes a anfibios venenosos son en gran medida desconocidos (Herrera-Álvarez et al., 2015; Rodríguez et al., 2020).

Como se ha mencionado, los bufónidos son anfibios con una potente toxicidad (Flier et al., 1980). Las culebras neotropicales interactúan con bufónidos con BDs en el caso de *Rhinella margaritifera* (Sinhorin et al., 2020) o sapos del género *Atelopus* que contienen TTX y toxinas análogas que no están presentes en otros anfibios con tetrodotoxina (Mebs et al., 2020). Por otro lado, las ranas venenosas de la familia Dendrobatidae, endémicas del Neotrópico, cuentan con más de 300 especies descritas en 12 géneros distintos. Su distribución es mayormente de tierras bajas hasta los 2000 msnm (Santos et al., 2016). La mayor parte de las especies de este grupo son consideradas como no tóxicas o de baja toxicidad (Santos et al., 2003), mientras que seis géneros dentro de la familia contienen especies que presentan coloración aposemática asociada a malos sabores o toxicidad considerable: *Ameerega*, *Colostethus*, *Dendrobates*, *Epipedobates*, *Hyloxalus* y *Phyllobates* (Santos et al., 2003; Santos y Cantella, 2011). Entre las toxinas que se presentan en esta familia están: histrionicotoxinas, pumilotoxinas, epibatidina y batracotoxinas (Santos et al., 2016).

Las adaptaciones tóxicas de defensa de la familia Dendrobatidae son complejas y están determinadas por: 1) la cantidad y diversidad de moléculas que se encuentran en su piel y 2) su capacidad de actuar sobre distintos receptores objetivos (Daly et al., 2005; Santos et al., 2016). Los dendrobátidos presentan una diversidad mayor a 800 compuestos químicos pertenecientes a 20 clases diferentes de moléculas (Daly et al., 2005; Santos et al., 2016). Por ejemplo, un individuo de *Oophaga sylvatica* de la localidad Palenque, Ecuador, puede estar resguardado por más de 16 compuestos diferentes en su piel (Daly et al. 1986). A pesar de ello, esto no implica que las especies de esa familia estén exoneradas de formar parte de la dieta de algunas serpientes. Los reportes de algunas culebras alimentándose de estos animales (Lenger et al., 2014; Pašukonis, y Loretto, 2020; Sellmeijer y van den Burg, 2020; Santos y Cannatella, 2011; Toledo et al., 2007), sugieren que las serpientes podrían contar con diferentes mecanismos de resistencia a la gran variedad de toxinas presentes en dendrobátidos.

Hasta el momento, el conocimiento que existe respecto a la resistencia de serpientes cuando existen varios tipos de toxinas en sus presas es mínimo. La mayoría de sistemas anfibio tóxico-serpiente depredadora mejor estudiados y descritos anteriormente se encuentran en zonas templadas del planeta y usualmente involucran una o pocos tipos de toxinas. De los taxa estudiados, solamente se ha determinado que dos especies cuentan con alteración de receptores para diferentes toxinas secretadas por distintos anfibios (Tabla 1: *Thamnophis atratus* y *T. couchii*). Sin embargo, podemos suponer que, si estas adaptaciones no tienen costos evolutivos, la selección debería favorecer todos los mecanismos necesarios para minimizar los efectos de las diferentes toxinas (Speed et al., 2015). Esto implica que las serpientes pueden contar con la alteración de receptores a dos o más toxinas distintas que les permitan acceder a un rango mayor de anfibios venenosos simpátricos. De tal modo, la resistencia a toxinas de anfibios por parte de serpientes son adaptaciones complejas determinadas por mecanismos poligénicos y envuelven cambios estructurales como sustituciones de aminoácidos (AA) en genes codificantes y modificaciones en zonas que regulan los patrones de expresión genética (Reimche, 2020).

Para entender la evolución de fenotipos resistentes en serpientes y ranas venenosas es relevante entender ambos lados de la interacción. Si bien las toxinas de ranas venenosas de la familia Dendrobatidae y sus mecanismos de acción se vienen estudiando por décadas, los mecanismos de resistencia en serpientes neotropicales carecen de estudios suficientes. Dentro de las serpientes neotropicales que depredan anuros venenosos, quizás, el ejemplo más conocido es la culebra *Erythrolamprus epinephelus*. Esta serpiente ha mostrado una resistencia casi absoluta a las toxinas de dendrobátidos. En un experimento publicado a finales de los 70 se evidenció que *E. epinephelus* es capaz de engullir a *Phyllobates terribilis* sin ninguna señal de intoxicación (Myers et al., 1978). No obstante, pese a esta observación, 40 años después los mecanismos de resistencia presentes en esta y otras culebras neotropicales no han sido explorados a fondo. Justamente por ello, un reciente estudio ha analizado secuencias de aminoácidos genes que codifican canales iónicos de potasio voltaje-dependientes (**Kv**; Rodríguez et al. 2020) en serpientes del género *Erythrolamprus*. De los 17 genes analizados en el estudio, se encontraron cinco sustituciones que ocurrieron en conjunto con la incursión de dieta en ranas venenosas por parte de serpientes, las cuales pueden ser importantes para inhibir los efectos de las histrionicotoxinas. Justamente,

estudios como el citado, son el primer paso para identificar los mecanismos de resistencia a toxinas de dendrobátidos por parte de serpientes neotropicales.

1.5.SERPIENTES OJOS DE GATO (GÉNERO *LEPTODEIRA*) COMO DEPRADADORAS DE RANAS VENENOSAS

Las serpientes ojos de gato (género *Leptodeira*, familia Colubridae, subfamilia Dipsadinae) son un linaje distribuido ampliamente en el continente americano, tanto en el Neotrópico como el Neoártico (Barrio-Amorós, 2019). Este género, hasta la fecha, se encuentra representado por 13 especies (Uetz y Hošek, 2020), de las cuales tres se han registrado en Ecuador: dos especies politípicas de amplia distribución (*L. annulata* Linné, 1758 y *L. ornata* Kennicott, 1859) y una especie recientemente descrita (*L. misinawui*; Torres-Carvajal et al., 2020). Según datos morfológicos (Dullman, 1958) y moleculares (Mulcahy, 2007), *L. annulata* contiene cinco subespecies, siendo *L. a. annulata* la única que se encuentra en el país (Almendariz et al., 2014). Esta subespecie se distribuye en las estribaciones orientales de los Andes, en provincias amazónicas del país con un rango altitudinal entre los 200 y 1850 msnm y habita ecosistemas húmedos como Bosque Montano Oriental, Bosque Piemontano Oriental, Bosque Húmedo Tropical Amazónico (Pazmiño-Otamendi et al., 2019a). Por otro lado, un estudio reciente determinó que *L. ornata* es la única subespecie que se encuentra distribuida a lo largo del occidente tanto al sur como al norte del país (Torres-Carvajal et al., 2020) siendo registrada en los ecosistemas Matorral Seco de la Costa, Bosque Deciduo de la Costa, Bosque Húmedo Tropical del Chocó, Bosque Piemontano Occidental (Pazmiño-Otamendi et al., 2019b). La tercera especie, *L. misinawui*, es una serpiente que se encuentra restringida a los valles interandinos del sur del Ecuador. De hecho, se conoce únicamente dos poblaciones en la cuenca alta del río Jubones (Torres-Carvajal et al., 2020a).

El género *Leptodeira* ha sido considerado como serpientes que mantienen una dieta constituida principalmente por anuros, huevos de ranas y, en menor medida, pequeñas lagartijas (Aguilar- López, 2019; Santos-Silva et al., 2014; Savage, 2002). Incluso, existen registros de

ofidiofagia en estas especies, lo que demuestra que acceden a un amplio rango de presas (Cantor y Pizzatto, 2008; McKelvy et al., 2013). Una revisión bibliográfica de 108 registros de dieta contenidos en 68 artículos sobre dieta de las serpientes ojos de gato *L. annulata* y *L. ornata* se pudo determinar que aproximadamente el 89% de los registros corresponden a observaciones relacionadas con anuros (Espinoza, 2020). En ambas especies, existe una mayor cantidad de registros de anuros de las familias Hylidae, Leptodactylidae y Bufonidae, en ese orden, de mayor a menor (Cantor y Pizzatto, 2008; Espinoza, 2020; Falkenberg et al., 2013; Vrcibradic et al.; 2007). Esta preferencia de las serpientes ojos de gato (*Leptodeira* spp.) por estas presas puede ser corroborada por sus hábitos nocturnos (Pough et al., 2007). Para *L. misinawui* no hay estudios enfocados en sus datos alimenticios debido a su reciente descripción; sin embargo, probablemente su dieta no difiera de los patrones encontrados en las otras serpientes ojos de gato presentes en el país.

La representatividad de anuros venenosos (Hylidae, Leptodactylidae y Bufonidae) en la dieta de *Leptodeira*, nos hace pensar que estas culebras son capaces de enfrentar diversas adaptaciones tóxicas de sus presas. De hecho, estudios realizados en las secuencias de aminoácidos de *L. septentrionalis* han encontrado que existe una alteración de receptor de los BDs presentes en bufónidos (Figura 2: Mohammadi et al., 2016). Estos cambios ocurren en el loop extracelular H1-H2, que comprende una porción importante para la unión de las BDs con la proteína ATPa3. En la posición 111, encontramos la sustitución Q111 L y en la posición 120, ocurre la sustitución G120R. Además, *L. annulata* y *L. ornata* presentan cambios de aminoácidos y adaptaciones moleculares reguladoras de genes para soportar la toxicidad de sus presas en la proteína ATPa1 (Figura 2; Herrera et al., 2015). Al igual que, *L. septentrionalis*, estas dos especies de serpientes presentes en el país cuentan con dos cambios de aminoácidos en el loop H1-H2. Sin embargo, la sustitución P118A no tiene efecto en la resistencia contra las BDs, mientras la sustitución N122H genera distintos efectos individuales de resistencia (Herrera-Álvarez et al., 2015). Esto demuestra que el fenotipo resistente de *Leptodeira* spp. contra sapos venenosos está determinado por cambios estructurales y de regulación genética, lo cuales podrían presentarse, de igual manera, en la resistencia contra dendrobátidos.

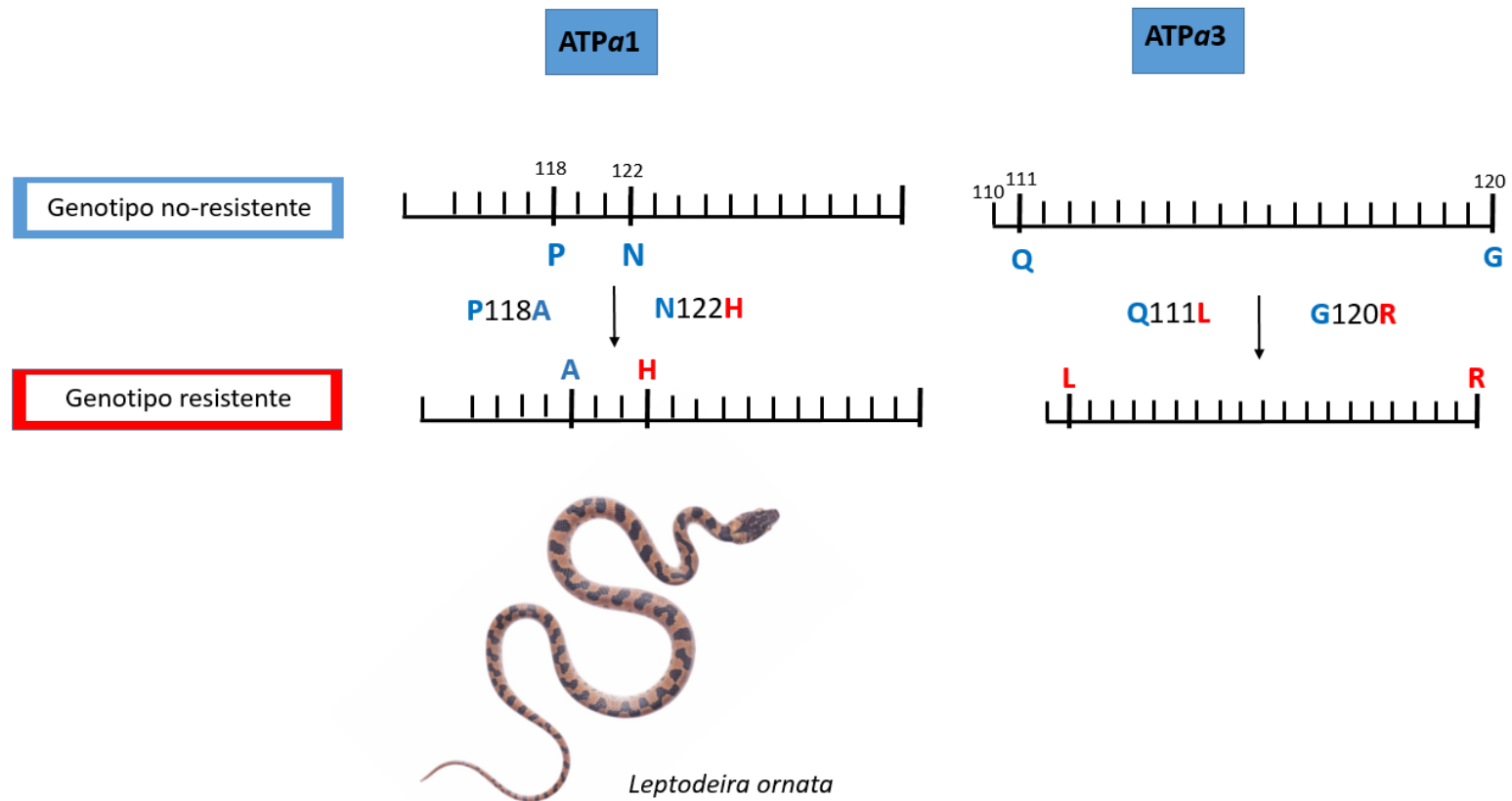


Figura 2. Sustituciones de aminoácidos (AA) encontradas en canales iónicos bomba sodio-potasio (ATPa). Las mutaciones presentes en el parólogo ATPa1 provocan una alteración de receptores de bufadienólidos (BDs) presentes en *Leptodeira ornata*, *Leptodeira annulata* y otras especies de serpientes (Herrera-Álvarez et al., 2015). Sustituciones en proteína ATPa3 presentes en *L. septentrionalis* (Mohammadi et al., 2016a). Letras en azul: AA conservados en distintos grupos animales sin resistencia a toxinas. Letras en rojo: sustitución de AA. Números: posición en la cadena de AA. Fotografía: Diego Quirola.

Observaciones de *Leptodeira* depredando anuros de la familia Dendrobatidae son escasas (Stynoski et al., 2014). Trabajo de campo en Zapotillo, Ecuador reveló eventos regulares de depredación de *Leptodeira ornata* sobre *Epipedobates anthonyi*. Las ranas venenosas de este género se caracterizan por presentar una elevada toxicidad; sus defensas químicas suelen presentar toxinas como pumiliotoxinas (PTX-251D) y epibatidina, así como otros componentes menos nocivos para vertebrados como histrionicotoxinas, pirrolidinas y quinolizidina (Daly, 2005; Santos et al., 2016). Las serpientes fueron capturadas y observadas durante algunas semanas en las cuales no se pudo constatar ningún síntoma de intoxicación. Experimentos posteriores, realizados en cautiverio, demostraron que la mayoría de individuos de *Leptodeira* atacan a ranas venenosas y sus reacciones pueden ir desde una total repulsión a una preferencia (David Salazar-Valenzuela, comentario personal). En el presente documento proponemos establecer los mecanismos genéticos de resistencia a toxinas de ranas venenosas por parte de serpientes ojos de gato (*Leptodeira* spp.).

1.6. OBJETIVO GENERAL

Identificar los mecanismos genéticos de resistencia a toxinas de ranas venenosas de la familia Dendrobatidae por parte de serpientes ojos de gato (*Leptodeira* spp.), para entender la evolución de fenotipos resistentes a adaptaciones tóxicas complejas.

1.6.1. Objetivos específicos

Oe1: Realizar una reconstrucción ancestral de las sustituciones de aminoácidos presentes en secuencias de genes vinculados con la resistencia a toxinas en el género *Leptodeira*, para relacionar estas mutaciones con la incursión de ranas venenosas en su dieta.

Oe2: Determinar la existencia de tasas de evolución positiva para ramas de árbol filogenético de serpientes, alineamientos completos de genes y posiciones particulares de aminoácidos en genes

relacionados con la resistencia a toxinas, presentes en distintas poblaciones de Ecuador de serpientes ojos de gato.

Oe3: Establecer expresión diferencial de genes relacionados con la resistencia y desintoxicación de toxinas de ranas venenosas entre distintos tejidos de serpientes ojos de gato, para comprobar si existen mecanismos de regulación genética y fisiológica.

2. METODOLOGÍA

En la actualidad, los análisis de la expresión génica en una célula o tejido, sin ninguna referencia genómica previa, son posibles gracias a la tecnología conocida como RNA-Seq (Wang et al., 2009). Esta técnica permite tener una cobertura completa de los transcritos de ARN, lo que genera información sobre la regulación de genes, como también de la estructura de genes y posibles eventos de splicing (Lister et al., 2009). Estas técnicas transcriptómicas han sido utilizadas en distintos estudios de resistencia a toxinas enfocados tanto en la regulación de genes (Mohammadi et al., 2017; Herrera-Álvarez et al., 2015), como la estructura genética de receptores resistentes a toxinas (Tarvin et al., 2016; Tarvin et al., 2017). Por esta razón, nuestra metodología utiliza estas técnicas para indagar cuáles mecanismos genéticos están actuando en la resistencia de las serpientes ojos de gato (*Leptodeira* spp.) a las toxinas de ranas venenosas. Hemos resumido el flujo de trabajo que nos permitirá obtener los datos genéticos para analizar la estructura y regulación de genes en la figura 3. La metodología está elaborada con base en el trabajo realizado por el laboratorio de Juan Carlos Santos en St. John's University, Nueva York, Estados Unidos.

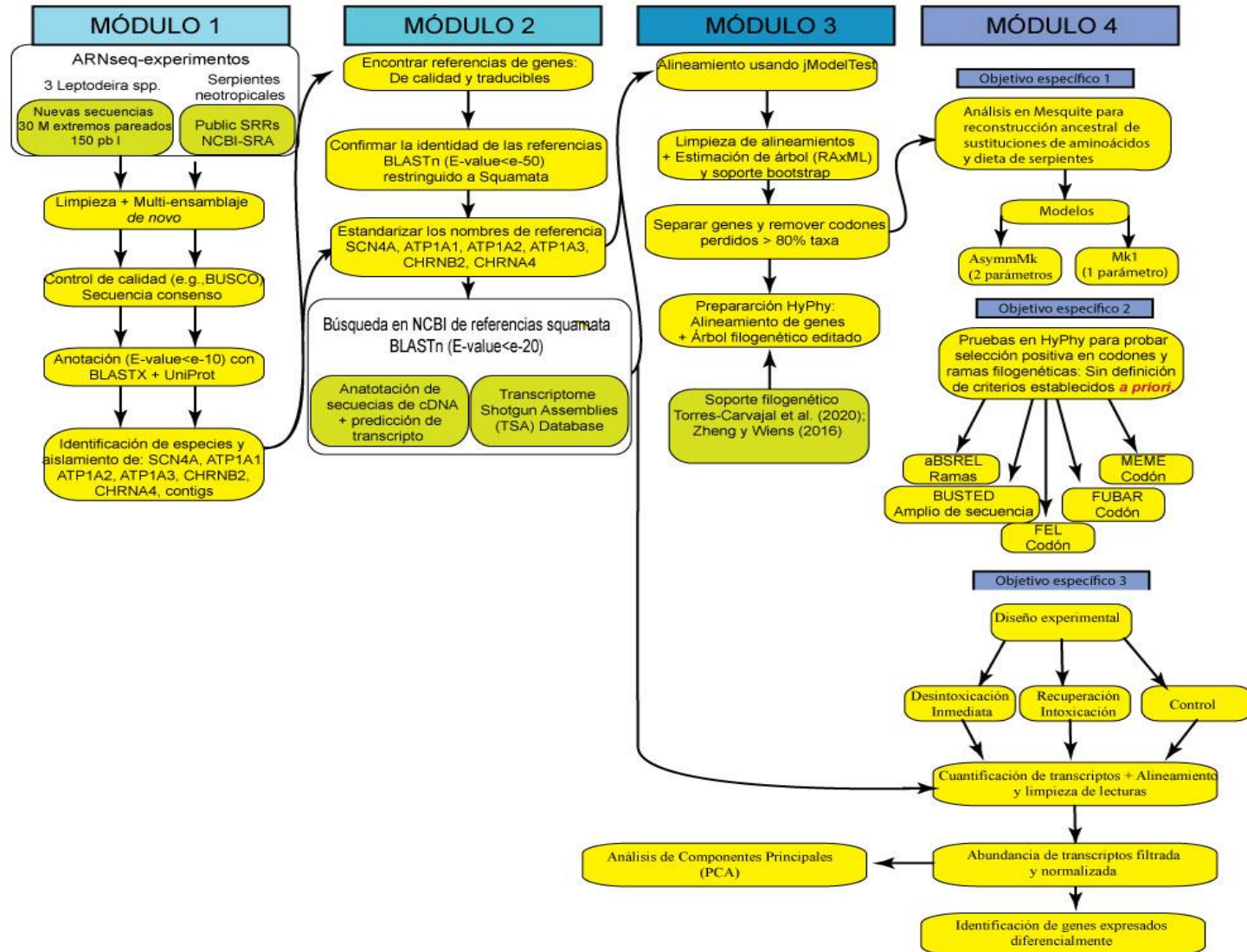


Figura 3. Resumen del flujo de trabajo en los métodos propuestos para el presente trabajo de investigación.

2.1. TRANSCRIPTÓMICA

2.1.1. *Recolección y preservación de muestras*

Realizaremos salidas de campo durante enero-marzo en seis provincias del Ecuador: Azuay, Esmeraldas, Guayas, Loja, Orellana y Zamora Chinchipe. Los meses escogidos son propicios para los muestreos, debido a que en la mayoría de estas provincias es entonces cuando se encuentra una mayor abundancia de individuos relacionada a mayores niveles de pluviosidad (Dullman, 1988). En campo, realizaremos búsquedas intensivas con un esfuerzo de muestreo de 2-4 horas en el día y 4-6 horas durante la noche. Las búsquedas estarán enfocadas en bosques de ribera, quebradas y zonas asociadas a fuentes de agua debido a la preferencia de individuos de *Leptodeira* por estos sitios (Martins y Oliveira, 1998).

Trabajaremos con tres individuos de dos poblaciones del país de las especies *L. annulata*, *L. misinawi* y *L. ornata* presentes en las localidades de Yasuní/Podocarpus, Santa Isabel/Poetate, y Bilsa/Cerro Blanco, respectivamente (Figura 4). De estos individuos obtendremos muestras de hígado. Posteriormente, utilizaremos 11 individuos de la población de *L. ornata* presente en Zapotillo para realizar experimentos de desintoxicación versus controles (ver sección 2.3.1). De estos últimos individuos de *L. ornata*, obtendremos una muestra de músculo e hígado. Los tejidos serán preservados en RNAlater® (Life Technologies, Carlsbad, CA) a -20°C para construir un transcriptoma de referencia de genes involucrados en la resistencia a toxinas.

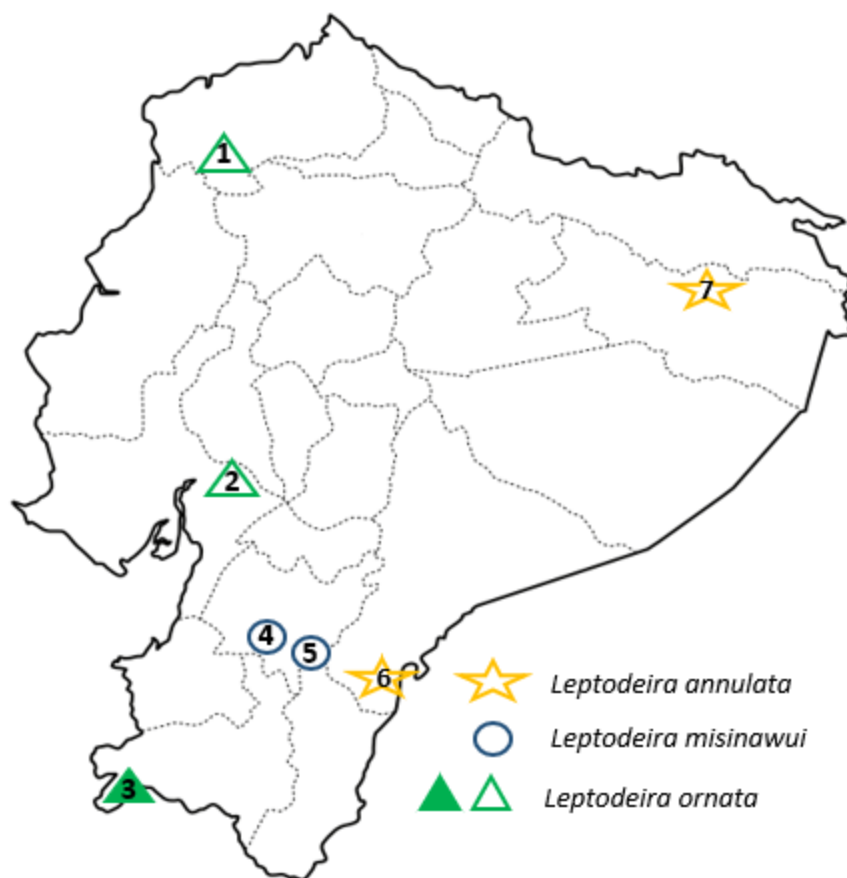


Figura 4. Ubicación de poblaciones ecuatorianas de *Leptodeira* spp. establecidas para el proyecto: 1) Bilsa, 2) Cerro Blanco, 3) Zapotillo, 4) Santa Isabel, 5) Poetate, 6) Podocarpus y 7) Yasuní. El triángulo relleno representa la localidad de la población de *L. ornata* que participará en el experimento.

2.1.2. Preparación de la librería y secuenciación

Extraeremos el ARN total de las muestras de tejidos usando Trizol. De estas muestras, obtendremos el ARN mensajero (ARNm) mediante la captura de ARN poliadenilado usando el kit Poly (A) Purist (Life Technologies, Carlsbad, CA), así como Bioanalyzer 2500 (Agilent Technologies, CA) para comprobar la pureza e integridad del ARNm aislado. Para la preparación de la librería y la secuenciación, usaremos el protocolo establecido por Tarvin et al. (2016). La librería será preparada con ARNm con una integridad numérica ≤ 8.0 y el kit comercial NEXTFlex RNA-Seq dUTP (Bioo Scientific, Austin, TX). Posteriormente, ligaremos códigos de barras en las librerías de cadenas complementarias (ADNc) y las amplificaremos mediante un PCR (10-18

ciclos). Examinaremos la cantidad y calidad del material obtenido usando Bioanalyzer 2500 (Agilent Technologies, CA) y purificaremos las secuencias a un tamaño promedio de 300 pares de bases (pb) usando AMPure XP beads (Beckman Coulter, Inc). Una vez concluido este proceso, utilizaremos un equipo Illumina Nova-Seq para secuenciar 150 pb en extremos pareados de los fragmentos de ADNc o lecturas.

2.1.3. Mapeo y anotación de lecturas

Para comprobar la calidad y el tamaño de las lecturas crudas de Illumina utilizaremos el programa FastQC (Andrews, 2010) y retiraremos los códigos de barras con TRIMMOMATIC (Bolger et al., 2014). Debido a la ausencia de genomas de referencia de las especies de interés, realizaremos un ensamblaje *de novo*. Obtendremos un transcriptoma ensamblado de calidad mediante la agrupación y fusión de transcriptomas contruidos mediante diferentes programas. Para ello probaremos distintos tamaños de k-meros y combinaremos al menos dos programas distintos, como por ejemplo MEGAHIT (Li et al., 2015), Trinity (Grabherr et al., 2011) y SPAdes (Bankevich et al., 2012). Según lo sugerido por Holding et al. (2018), utilizar distintos métodos de ensamblaje permite obtener transcriptomas que representan de manera más efectiva las familias de genes presentes en un organismo de interés. Usaremos un rango de tamaños de k-meros entre 35-45 para evitar problemas de quimeras en el ensamblaje (Tarvin et al., 2016). El transcriptoma consenso será evaluado con TransRate (Smith-Unna et al., 2016), lo cual nos permitirá: 1) identificar errores producto del ensamblaje sin una secuencia de referencia como quimeras, errores estructurales, ensamblajes incompletos y redundancias, y 2) excluir contigs < 200 pb. Además, valoraremos los métodos empleados midiendo su capacidad de recuperar conjuntos completos de transcriptomas mediante el software BUSCO (Waterhouse et al., 2018) y puntaje de DENOTATE (Li et al., 2014). Por último, utilizaremos BLAST+ (Camacho et al., 2009) para anotar los transcriptomas consenso comparándolos con las referencias de genomas más recientes en UnitPro de *Thamnophis sirtalis*.

2.1.4. *Captura de secuencias*

Nos enfocaremos en el estudio de dos receptores de iones que están involucrados en la resistencia a toxinas de anuros por parte de serpientes (Tabla 2). Los genes que analizaremos codifican canales de sodio voltaje-dependientes (Nav) y la bomba sodio potasio (ATPa1). Además, incluiremos los receptores de acetilcolina (nAChR) debido a que son los receptores objetivo de la epibatidina (Tabla 3; Tarvin et al., 2017). Hemos decidido estudiar estos receptores debido a que: 1) se han identificado serpientes que presentan sustituciones de bases que confieren resistencia a diferentes toxinas de anuros en estos canales (e.g. Feldman et al., 2009; Feldman et al., 2012; McGlothlin et al., 2016; Mohammadi et al., 2016a; Rodriguez, 2020), 2) tres toxinas peligrosas (i.e., epibatidina, histrionicotoxina y pumiliotoxina) presentes en ranas venenosas simpátricas a las serpientes de interés han demostrado afinidad por estos receptores (Santos et al., 2016; Spande et al., 1992; Vandendriessche et al., 2008) y 3) existe la secuenciación de genes que codifican estos receptores en distintas especies de serpientes (McGlothlin et al., 2016; Mohammadi et al., 2016a). Los transcriptomas que empaten con cada uno de estos genes con un valor de corte de $E\ 10^{-5}$ en BLAST+ serán analizados posteriormente (Tarvin et al., 2016).

Tabla 2. Genes relacionados con la resistencia a toxinas presentes en anfibios venenosos por parte de serpientes.

GENES	CÓDIGO UNIPROT	RECEPTOR	TEJIDOS	REFERENCIAS
SCN4A	C7AKA1 (<i>Thamnophis couchii</i>)	Canal de sodio voltaje-dependiente	Músculo estriado	Feldman et al. (2009), Feldman et al. (2012), Geffeney et al. (2005), McGlothlin et al. (2014), McGlothlin et al. (2016)
SCN8A	A0A590UK43 (<i>Homo sapiens</i>)	Canal de sodio voltaje-dependiente	Nervios periféricos	McGlothlin et al. (2014); McGlothlin et al. (2016)
SCN9A	A0A1B0Z7P9 (<i>Erythrolamprus miliaris</i>)	Canal de sodio voltaje-dependiente	Nervios periféricos	McGlothlin et al. (2016)
ATP1A1	Q92123 (<i>Xenopus laevis</i>)	Bomba sodio-potasio	Todos los tejidos	Herrera-Álvarez et al. (2017)
ATP1A2	P50993 (<i>Homo sapiens</i>)	Bomba sodio-potasio	Predominantemente en corazón, cerebro y músculo	Herrera-Álvarez et al. (2017)
ATP1A3	P13637 (<i>Homo sapiens</i>)	Bomba sodio-potasio	Tejidos del sistema nervioso	Herrera-Álvarez et al. (2017); Mohammadi et al. (2016)

Tabla 3. Genes relacionados con la resistencia a la epibatidina.

GENES	CÓDIGO UNIPROT	RECEPTOR	TEJIDOS	REFERENCIAS
CHRNA2	P17787 (<i>Homo sapiens</i>)	Receptor de acetilcolina	Músculo	Tarvin et al. (2017)
CHRNA4	G1KER0 (<i>Anolis carolinensis</i>)	Receptor de acetilcolina	Músculo	Tarvin et al. (2017)

2.2. COMPARACIONES INTER E INTRAGENÉRICAS DE SUSTITUCIONES DE AMINOÁCIDOS

2.2.1. *Análisis de sustitución de aminoácidos*

Las secuencias serán alineadas usando Geneious Pro 8.3.1 y ajustadas para coincidir con los codones iniciales y terminales del genoma de *Thamnophis sirtalis* (NCBI GenBank GCA_001077635.2; Perry et al., 2018) de los genes SCN4A, ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, CHRN2B, CHRN4A (Tabla 2 y 3). Para cada uno, armaremos una filogenia individual en la que incluiremos cuatro grupos de especies: 1) serpientes ojos de gato secuenciadas en este estudio, 2) serpientes neotropicales especialistas en ranas (Toledo et al., 2007) con secuencias habilitadas en GenBank (*Chironius exoletus*, NCBI: SRX-2726995; *Erythrolamprus almadensis* NCBI: SRX-2727014; *E. poecilogyrus*; NCBI: SRX-2727013 y *E. reginae* NCBI: SRX-2727004), 3) serpientes que no consumen anfibios y secuenciadas en otros estudios (Herrera-Álvarez et al., 2017; McGlothlin et al., 2016) y 4) un grupo exterior conformado por otros tetrápodos. Analizaremos las secuencias sitio a sitio para identificar loci conservados entre los grupos tres y cuatro, pero que muestran patrones de sustitución de aminoácidos en las especies que se alimentan de anfibios.

2.2.2. *Filogenia*

Siguiendo los métodos presentados por Tarvin et al. (2016), para el Oe1 construiremos un árbol de referencia con nuestras serpientes secuenciadas y grupo externos, a partir de genes mitocondriales derivados de capturas previamente secuenciadas y contenidos en GenBank (Pyron et al., 2011; Torres-Carvajal et al. 2019; Torres-Carvajal et al., 2020; Zheng y Wiens, 2016). Estas secuencias serán alineadas, a la vez que se estima una filogenia con modelos de evolución de secuencias de nucleótidos escogidos en jModelTest, mediante el software RAxML (Posada, 2008; Stamatakis, 2014). La filogenia será armada mediante un análisis de Máxima Verosimilitud con un soporte de los nodos obtenidos mediante 100 repeticiones bootstraps y un total de 100 repeticiones.

2.2.3. *Reconstrucción del estado ancestral*

La reconstrucción del estado ancestral de la sustitución de aminoácidos será inferida con el software Mesquite (Maddison y Maddison, 2015) usando una estimación de máxima verosimilitud en los modelos Mk1 (1 parámetro) y AsymmMk (2 parámetros) (Tarvin et al., 2016).

Para determinar la relación que existe entre la aparición de sustituciones de aminoácidos en receptores de serpientes y su incursión dietética en ranas venenosas, realizaremos una reconstrucción de estado ancestral de la dieta de las serpientes secuenciadas. Para ello, codificaremos la dieta de las especies de serpientes como una variable discreta. Los reportes los obtendremos de literatura primaria y el paquete de R SquamataBase (Grundler, 2020). El estado ancestral de la dieta de las serpientes muestreadas será reconstruido con el software Mesquite (Maddison y Maddison, 2015) usando un modelo de parsimonia, tratando los caracteres en desorden, y mediante un modelo de máxima verosimilitud usando Bayes Traits 1.0 (Pagel et al., 2004). En el programa Bayes Trait, usaremos el método BayesMultistate restringiendo una igual probabilidad para cada uno de los cambios de estado refleje el modelo Mk1 de un parámetro.

2.2.4. *Selección positiva de aminoácidos*

Con el fin de cumplir con el Oe2 utilizaremos el programa HyPhy para encontrar tasas de evolución positiva en las filogenias construidas a partir de los genes analizados, tanto en posiciones específicas de aminoácidos como en las distintas ramas del árbol filogenético. Para ello, correremos cinco simulaciones diferentes sin ningún parámetro de selección establecido *a priori*. El modelo aBSREL, con el fin de comprobar si existen ramas del árbol filogenético con proporciones significativas de loci con selección positiva (Smith et al., 2015). Los programas FEL, FUBAR, MEME servirán para determinar tasas de selección positiva en codones específicos de las secuencias alineadas (Murrell et al., 2012; Murrell et al., 2013; Pond y Frost, 2005). Por último,

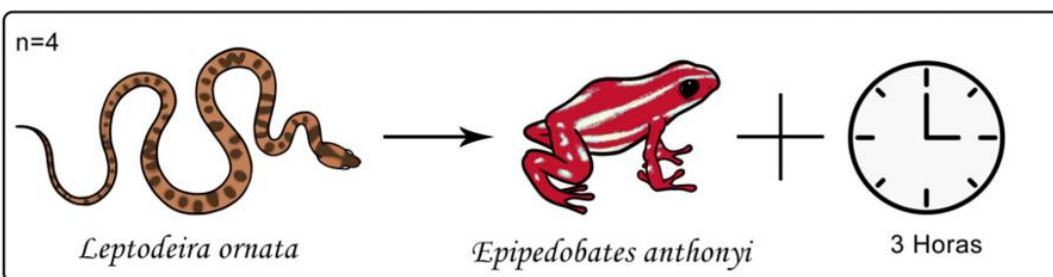
BUSTED para analizar selección positiva a lo amplio de las secuencias alineadas (Murrell et al., 2015); es decir, proporciona una prueba de la selección positiva en todo un gen.

2.3. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES

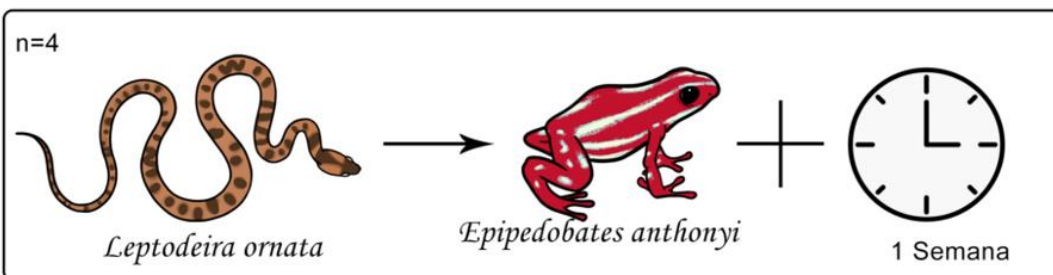
2.3.1. *Diseño experimental*

En Zapotillo, capturaremos 11 individuos adultos de *Leptodeira ornata* y los colocaremos individualmente en un balde plástico de 18 litros con sustrato de papel periódico y agua *ad libitum*. Esperaremos una semana para habituar a la serpiente al ambiente controlado y provocarle hambre antes de empezar con el experimento. De cada individuo tomaremos datos morfológicos de: 1) longitud rostro-cloaca (LRC) 2) peso, 3) sexo y 4) edad aproximada para tomar en cuenta su efecto en la expresión de genes. Una vez que concluya este período, designaremos de manera aleatoria un tratamiento a cada sujeto de estudio (Figura 5). Hemos establecido dos tratamientos diferentes y un control. En cada tratamiento realizaremos cuatro repeticiones (cuatro individuos por tratamiento) y en el control trabajaremos con tres serpientes. Utilizaremos el tiempo transcurrido desde el evento de depredación hasta el sacrificio y toma de las muestras de los individuos para la secuenciación como variable independiente de los tratamientos. De esta forma, el experimento nos ayudará a identificar genes que se expresan diferencialmente en *Leptodeira ornata* durante un proceso desintoxicación inmediato y tardío tras la ingesta de una rana venenosa de la familia Dendrobatidae. Además, los datos obtenidos nos permitirán entender los mecanismos fisiológicos de resistencia contra toxinas de ranas venenosas en serpientes.

TRATAMIENTO DESINTOXICACIÓN INMEDIATA



TRATAMIENTO RECUPERACIÓN INTOXICACIÓN



CONTROL

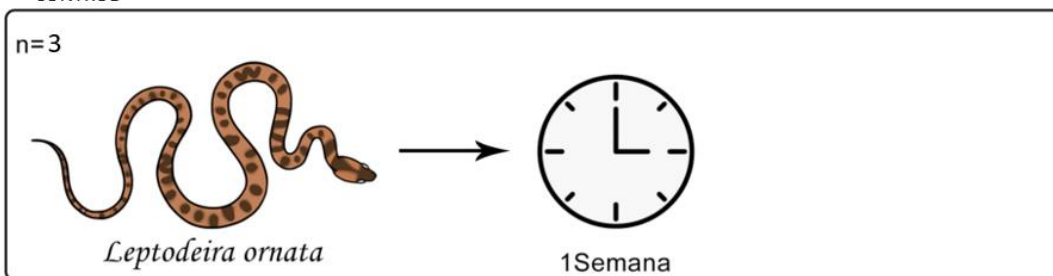


Figura 5. Diseño experimental. Se presentan los tres tratamientos establecidos para el experimento.

El primer tratamiento será desintoxicación inmediata (DI), donde daremos de comer una rana venenosa simpátrica (*Epipedobates anthonyi*) a los individuos de *L. ornata* y los sacrificaremos tres horas después del experimento. En segundo lugar, tendremos el tratamiento recuperación de intoxicación (RI), el cual consiste en alimentar a *L. ornata* con individuos de *Epipedobates anthonyi* y sacrificar a las serpientes una semana después del evento de depredación. Por último, en nuestro control, las serpientes serán mantenidas en condiciones de cautiverio durante una semana y sacrificadas sin ser alimentadas para obtener la expresión de genes de los individuos preexperimento. Para disminuir la variabilidad dentro de nuestros tratamientos experimentales, utilizaremos individuos de una sola población de *E. anthonyi*. Esto debido a que otras especies de dendrobátidos muestran diferencias en el perfil de alcaloides a nivel interpoblacional (Saporito et al., 2006).

Para alimentar a las serpientes, introduciremos los anuros en un balde de plástico manteniendo un monitoreo constante para visualizar ataques, intentos de depredación y depredación. Cualquiera de estos posibles eventos será anotado para determinar la hora cero antes de la extracción de muestras de tejidos para los análisis de expresión genética. En caso de no documentar ninguna interacción hasta la media noche, retiraremos a la presa y asignaremos al individuo de *Leptodeira ornata* al grupo control. En contraste, si existe un evento de ataque o depredación, las serpientes serán asignadas aleatoriamente a uno de nuestros dos tratamientos experimentales (i.e. desintoxicación inmediata y recuperación de intoxicación). Una vez se encuentren situadas en uno de estos tratamientos, realizaremos observaciones enfocadas en: 1) los efectos producto de la ingesta de toxinas y 2) el proceso de desintoxicación. En caso de observar un deceso en un individuo de *Leptodeira ornata* antes de cumplir con el tiempo estimado de su tratamiento experimental asignado, extraeremos muestras de tejidos inmediatamente.

2.3.2. Expresión de genes de resistencia a toxinas

Para la cuantificación de genes expresados en tejidos específicos, se utilizará los algoritmos paramétricos de RSEM (RNA-Seq by Expectation Maximization) y Salmon (Li y Dewey, 2011; Patro et al., 2017). Estos programas son útiles para la cuantificación de transcritos cuando las mismas lecturas se alinean a múltiples loci (e.g. múltiples isoformas), tal cual sucede en el ensamblaje *de novo*. El procedimiento estará organizado de la siguiente manera. En primer lugar, las lecturas pulidas serán mapeados en la secuencia de genes objetivo usando bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2012). Posteriormente, el resultado del alineamiento será organizado y utilizado para calcular la abundancia de los transcritos (Li y Dewey, 2011). Estos datos serán normalizados con respecto al tamaño total de la librería usando el método proporción estándar de las medias (Love et al., 2014). Siguiendo los métodos realizados por Reimche et al. (2020) utilizamos la matriz de covarianza de los datos obtenidos de abundancia de transcritos filtrados y normalizados para correr un Análisis de Componentes Principales (PCA). Esto para determinar si la varianza observada

entre las muestras está explicada por el tipo de tejido o los tratamientos experimentales. El PCA será realizado en R mediante el paquete mixOmics (Rohart et al., 2017).

2.3.3. *Análisis de expresión de genes*

Tras filtrar y normalizar los datos obtenidos de transcritos, la diferenciación de genes entre los distintos tratamientos será evaluada usando DESeq2 y edgeR (Robinson et al., 2010; Love et al., 2014). Realizaremos comparaciones pareadas entre los diferentes tratamientos para cada tipo de tejido (e.g. HígadoControl x HígadoTratamiento 1). Los genes candidatos que se expresan diferencialmente debido a la ingesta de toxinas serán identificados y jerarquizados mediante una disminución en el logaritmo de cambio en el umbral de expresión de los genes (*log-fold change*; *LFC*) en log2-fold changes y ajustado a un valor $p < 0.001$ en DESeq2 y los módulos complementarios (Zhu et al., 2018). Para el grupo de genes que muestre valores extremos en los estimados de LFC, la expresión genética deberá ser validada y cuantificada usando una qPCR junto al gen constitutivo (e.g. 18S) para normalizar la expresión.

2.3.4. *Análisis estadísticos*

Usaremos el paquete de R glmm TMB (Magnusson et al., 2017) para comprobar diferencias significativas en la expresión de genes entre los distintos tratamientos y tejidos. Para ello, elaboraremos un modelo de Efectos Lineales Mixtos con los tejidos y tratamientos como variables de efectos fijos y la especie, población y sexo como variables de efectos aleatorios.

3. RESULTADOS ESPERADOS

Con la realización de este proyecto, esperamos obtener información relevante para entender los posibles mecanismos de resistencia a toxinas de ranas venenosas por parte de *Leptodeira* spp. Es así que este proyecto es un primer acercamiento a los mecanismos genéticos de resistencia presentes en serpientes neotropicales y, en especial de *Leptodeira*. En cuanto al Oe1, esperamos conseguir una reconstrucción del estado ancestral de la dieta en serpientes y de las sustituciones de aminoácidos en genes relacionados con la resistencia a toxinas de anfibios por parte de serpientes. Con ello, mediante una comparación entre ambas reconstrucciones, podremos identificar sustituciones de aminoácidos que ocurrieron en el género *Leptodeira* después de la incursión de estas ranas venenosas en su dieta. Estas sustituciones podrían estar relacionadas con la alteración de receptores objetivo de toxinas presentes en dendrobátidos. Las sustituciones de aminoácidos que ocurrieron después de la relación presa-depredador entre anuros venenosos y *Leptodeira* podrían ser analizadas en el futuro con experimentos electrofisiológicos.

Mediante el Oe2 esperamos obtener alineamientos completos de genes relevantes para la resistencia genética de toxinas y, mediante los análisis propuestos, encontrar distintos loci que presenten tasas de evolución positiva. Las posiciones que presentan evolución positiva serán analizadas para identificar posibles sustituciones de aminoácidos que ocurrieron en respuesta a la interacción receptor-toxina. Además, esperamos encontrar ramas de nuestro árbol filogenético con selección positiva de las poblaciones ecuatorianas de *Leptodeira* spp. que han evolucionado resistencia genética contra las toxinas presentes en diferentes anuros. Considerando los eventos de depredación de la población de Zapotillo a individuos de *E. anthonyi*, creemos que esta población puede presentar tasas de evolución positiva, tanto en posiciones concretas de la cadena de AA de genes relacionados con resistencia a toxinas, como en su rama filogenética.

Por último, en nuestro Oe3 esperamos encontrar una expresión diferencial de genes en los tratamientos al ser comparados entre estos y cada uno con el control. Considerando la diferencia de tiempo que hemos establecido entre los tratamientos, creemos que se presentará una

sobreexpresión de genes en hígado y músculo en el primer tratamiento (desintoxicación inmediata), en contraste con nuestro segundo tratamiento y el control. Esperamos que esta expresión diferenciada se evidencie en genes vinculados con la resistencia a toxinas. Tomando en cuenta los resultados obtenidos por Herrera-Álvarez et al. (2015) en el gen ATP1A1 de la bomba sodio-potasio, pensamos que podría haber genes que se expresan de manera diferente entre los tejidos analizados y estos cambios en la regulación de la expresión podrían estar relacionados con la resistencia a toxinas por parte de serpientes.

4. CONCLUSIONES

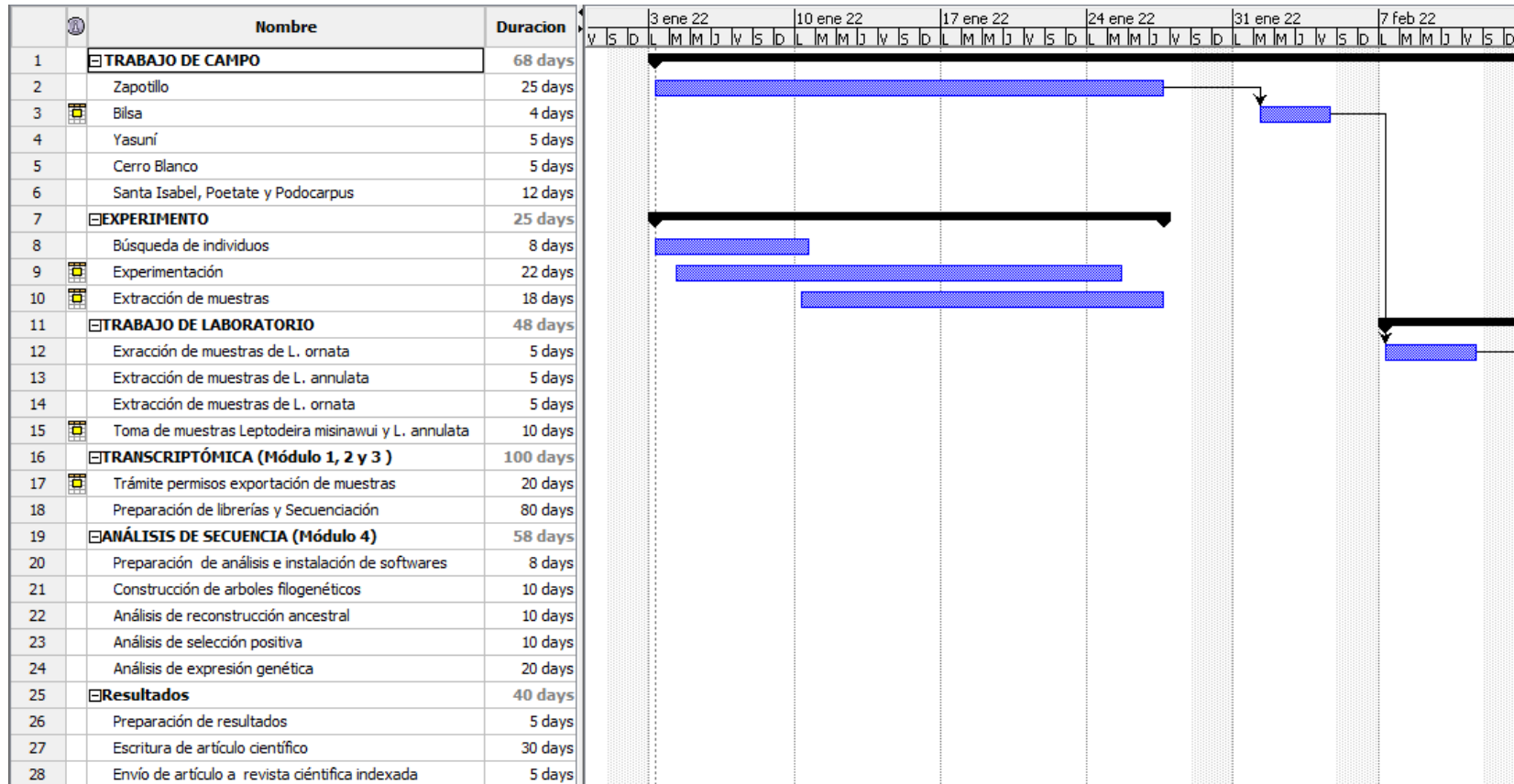
Entender la evolución de adaptaciones a nivel molecular es fundamental para el avance de la biología evolutiva. Las relaciones entre anfibios tóxicos y resistencia de serpientes son sistemas relevantes que suelen contribuir a los conocimientos generados alrededor de esta rama científica. Debido a ello, la relación entre *Leptodeira* spp. y ranas venenosas presenta una oportunidad para el desarrollo de investigaciones relacionadas a importante área dentro de la teoría evolutiva como: coevolución (Broddie III y Brodie Jr, 1999), convergencia molecular (Ujvari et al., 2015) y mecanismos genéticos de adaptación (Reimche, 2020). Por lo cual, creemos que este proyecto contribuirá al surgimiento de investigaciones en cualquiera de estos tres marcos teóricos.

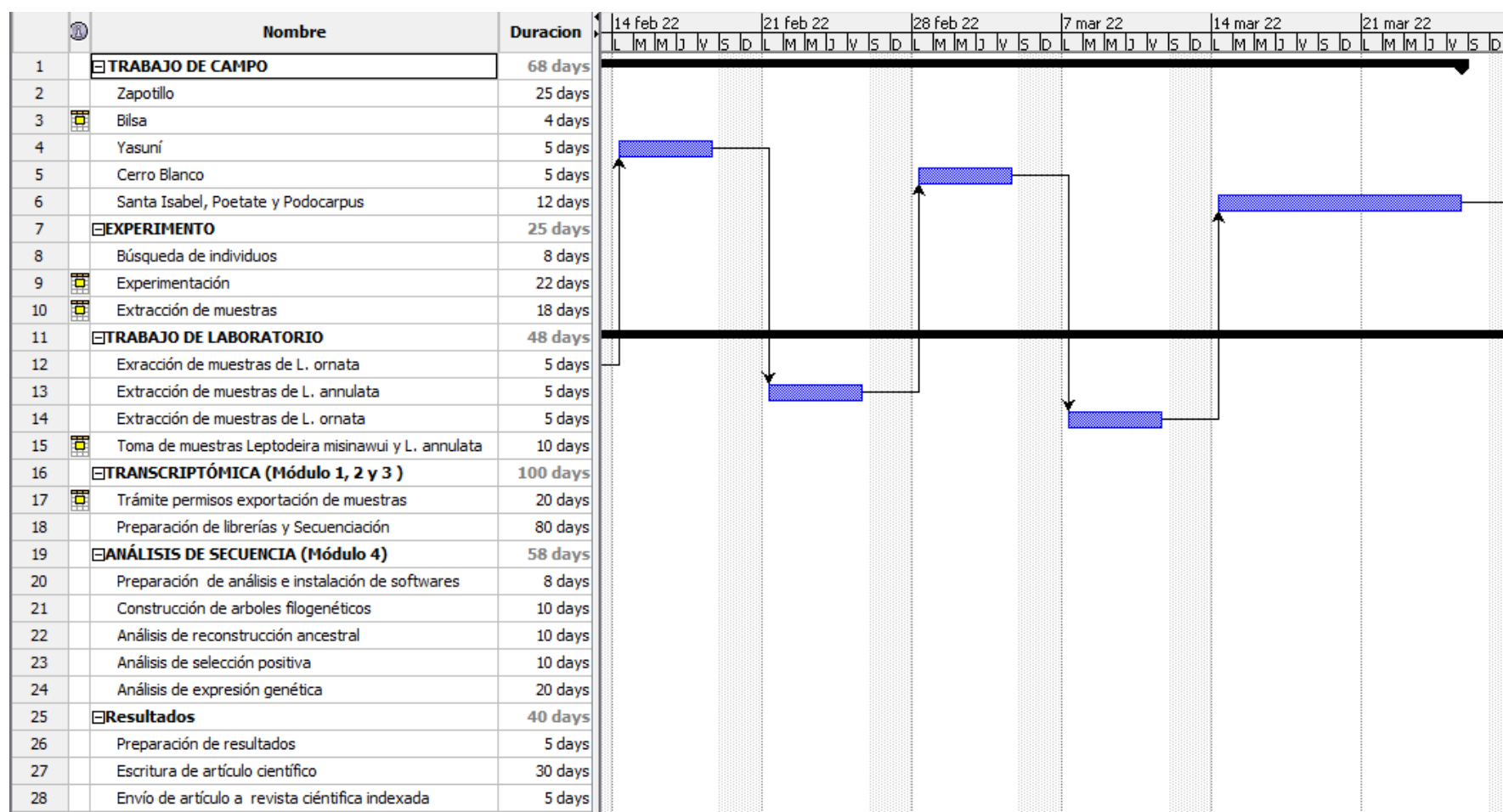
Nuestro sistema de estudio difiere en tres aspectos importantes comparados con los modelos de coevolución de anfibios venenosos y serpientes resistentes de zonas templadas: 1) las serpientes neotropicales deben enfrentarse a una diversidad mayor de anuros tóxicos, 2) a nivel interespecífico existen diferentes toxinas en la piel de los dendrobátidos que pueden afectar distintos canales de iones y 3) a nivel individual un solo dendrobátido presenta diversos alcaloides a los cuales las serpientes deberían sobreponerse. Por tal razón, el desarrollo de sistemas de estudios de ranas venenosas y serpientes resistentes en el Neotrópico es primordial para ampliar la frontera del conocimiento en las interacciones entre anuros y serpientes resistentes.

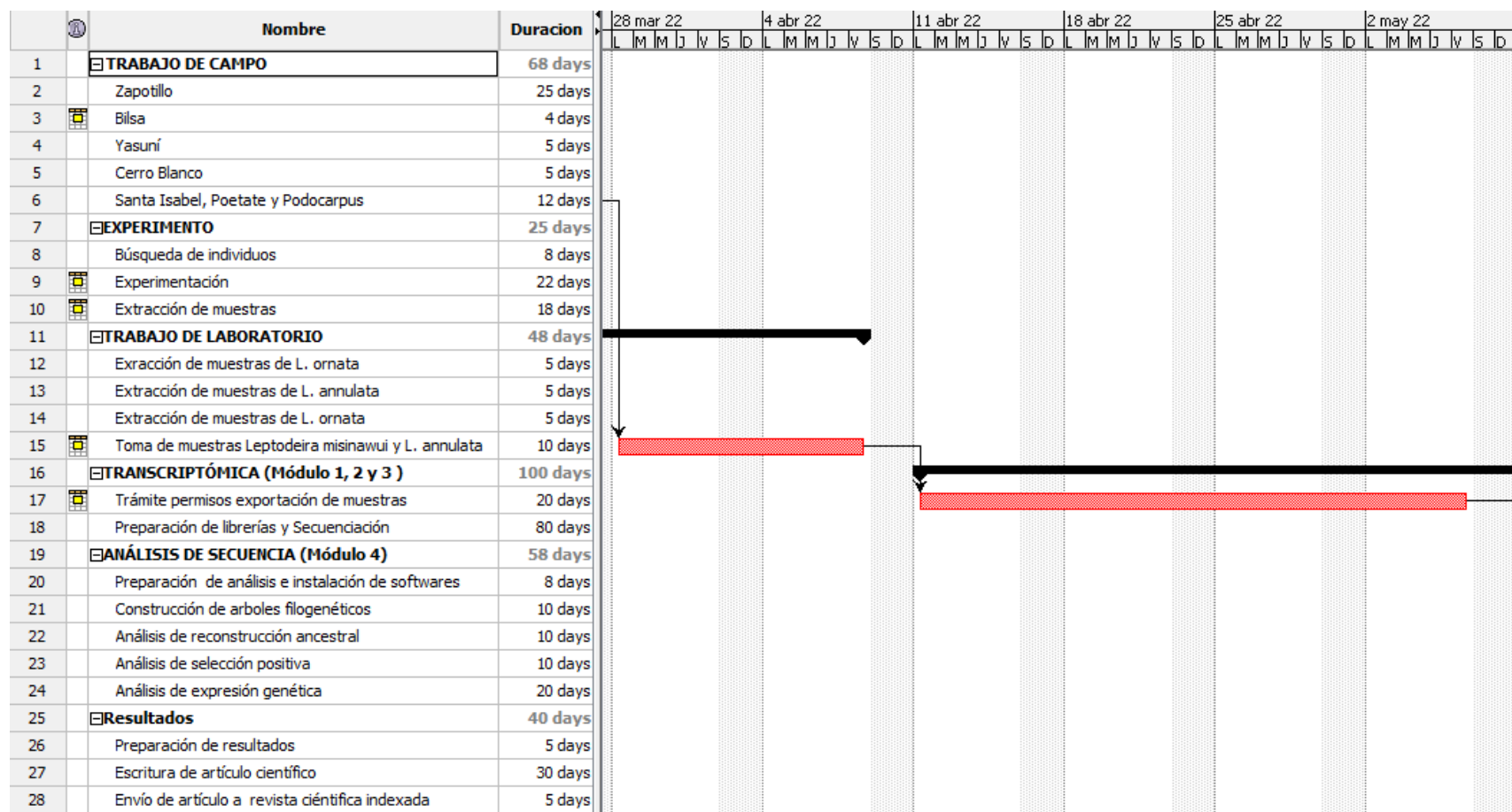
Considerando la información obtenida y analizada en este documento, creemos que el género *Leptodeira* cuenta con características relevantes para ser objeto de estudio en un sistema ranas venenosas y serpientes resistentes. Primero, si bien la variedad de presas que consume sugiere una dieta generalista, no existe duda que los anuros son una pieza notable de su dieta. Segundo, existen varios registros de *Leptodeira* alimentándose de diferentes familias de anuros químicamente defendidos; esto podría implicar que estas culebras cuenten con mecanismos generales de desintoxicación ante sus presas para así evitar los efectos de un amplio rango de anuros venenosos. Por último, existen registros de las poblaciones del sur del Ecuador alimentándose de *E. anthonyi* y, contrario a otras especies de serpientes neotropicales que se

alimentan de Dendrobatidae (e.g. *Erythrolamprus* spp.), suelen ser abundantes y fáciles de encontrar en campo, por lo cual son ideales para el diseño experimental que hemos propuesto.

5. CRONOGRAMA





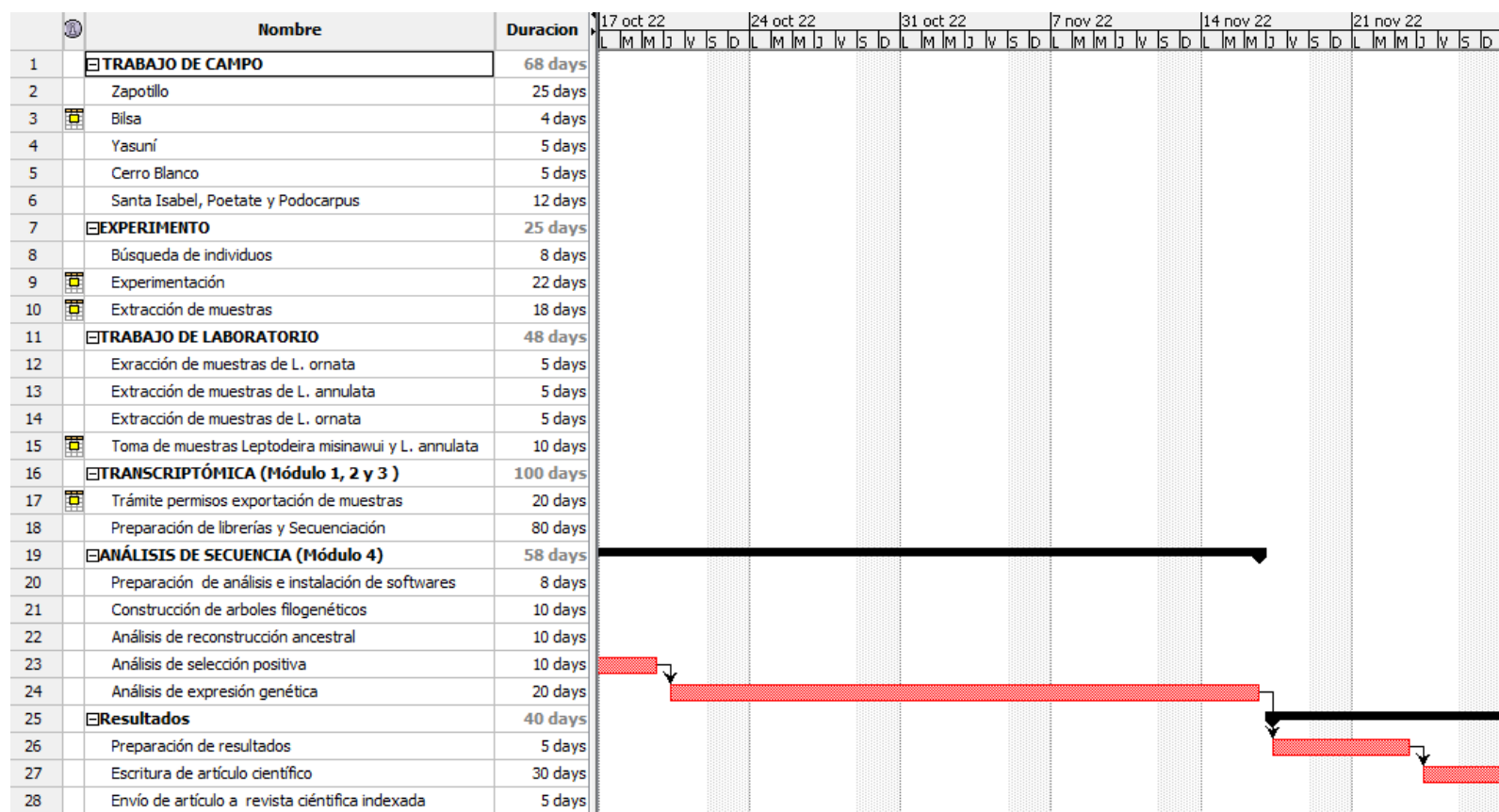


		Nombre	Duración	9 may 22	16 may 22	23 may 22	30 may 22	6 jun 22	13 jun 22
				L M M J v S D	L M M J v S D	L M M J v S D	L M M J v S D	L M M J v S D	L M M J v S D
1		TRABAJO DE CAMPO	68 days						
2		Zapotillo	25 days						
3		Bilsa	4 days						
4		Yasuní	5 days						
5		Cerro Blanco	5 days						
6		Santa Isabel, Poetate y Podocarpus	12 days						
7		EXPERIMENTO	25 days						
8		Búsqueda de individuos	8 days						
9		Experimentación	22 days						
10		Extracción de muestras	18 days						
11		TRABAJO DE LABORATORIO	48 days						
12		Extracción de muestras de L. ornata	5 days						
13		Extracción de muestras de L. annulata	5 days						
14		Extracción de muestras de L. ornata	5 days						
15		Toma de muestras Leptodeira misinawui y L. annulata	10 days						
16		TRANSCRIPTÓMICA (Módulo 1, 2 y 3)	100 days						
17		Trámite permisos exportación de muestras	20 days						
18		Preparación de librerías y Secuenciación	80 days						
19		ANÁLISIS DE SECUENCIA (Módulo 4)	58 days						
20		Preparación de análisis e instalación de softwares	8 days						
21		Construcción de arboles filogenéticos	10 days						
22		Análisis de reconstrucción ancestral	10 days						
23		Análisis de selección positiva	10 days						
24		Análisis de expresión genética	20 days						
25		Resultados	40 days						
26		Preparación de resultados	5 days						
27		Escritura de artículo científico	30 days						
28		Envío de artículo a revista científica indexada	5 days						

		Nombre	Duracion	13 jun 22							20 jun 22							27 jun 22							4 jul 22							11 jul 22							18 jul 22						
				L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D							
1		 TRABAJO DE CAMPO	68 days																																										
2		Zapotillo	25 days																																										
3		Bilsa	4 days																																										
4		Yasuní	5 days																																										
5		Cerro Blanco	5 days																																										
6		Santa Isabel, Poetate y Podocarpus	12 days																																										
7		 EXPERIMENTO	25 days																																										
8		Búsqueda de individuos	8 days																																										
9		Experimentación	22 days																																										
10		Extracción de muestras	18 days																																										
11		 TRABAJO DE LABORATORIO	48 days																																										
12		Extracción de muestras de L. ornata	5 days																																										
13		Extracción de muestras de L. annulata	5 days																																										
14		Extracción de muestras de L. ornata	5 days																																										
15		Toma de muestras Leptodeira misinawui y L. annulata	10 days																																										
16		 TRANSCRIPTÓMICA (Módulo 1, 2 y 3)	100 days																																										
17		Trámite permisos exportación de muestras	20 days																																										
18		Preparación de librerías y Secuenciación	80 days																																										
19		 ANÁLISIS DE SECUENCIA (Módulo 4)	58 days																																										
20		Preparación de análisis e instalación de softwares	8 days																																										
21		Construcción de arboles filogenéticos	10 days																																										
22		Análisis de reconstrucción ancestral	10 days																																										
23		Análisis de selección positiva	10 days																																										
24		Análisis de expresión genética	20 days																																										
25		 Resultados	40 days																																										
26		Preparación de resultados	5 days																																										
27		Escritura de artículo científico	30 days																																										
28		Envío de artículo a revista científica indexada	5 days																																										

		Nombre	Duración	25 jul 22	1 ago 22	8 ago 22	15 ago 22	22 ago 22	29 ago 22
				L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D	L M M J V S D
1		TRABAJO DE CAMPO	68 days						
2		Zapotillo	25 days						
3		Bilsa	4 days						
4		Yasuní	5 days						
5		Cerro Blanco	5 days						
6		Santa Isabel, Poetate y Podocarpus	12 days						
7		EXPERIMENTO	25 days						
8		Búsqueda de individuos	8 days						
9		Experimentación	22 days						
10		Extracción de muestras	18 days						
11		TRABAJO DE LABORATORIO	48 days						
12		Extracción de muestras de L. ornata	5 days						
13		Extracción de muestras de L. annulata	5 days						
14		Extracción de muestras de L. ornata	5 days						
15		Toma de muestras Leptodeira misinawui y L. annulata	10 days						
16		TRANSCRIPTÓMICA (Módulo 1, 2 y 3)	100 days						
17		Trámite permisos exportación de muestras	20 days						
18		Preparación de librerías y Secuenciación	80 days						
19		ANÁLISIS DE SECUENCIA (Módulo 4)	58 days						
20		Preparación de análisis e instalación de softwares	8 days						
21		Construcción de árboles filogenéticos	10 days						
22		Análisis de reconstrucción ancestral	10 days						
23		Análisis de selección positiva	10 days						
24		Análisis de expresión genética	20 days						
25		Resultados	40 days						
26		Preparación de resultados	5 days						
27		Escritura de artículo científico	30 days						
28		Envío de artículo a revista científica indexada	5 days						

	Nombre	Duración	5 sep 22							12 sep 22							19 sep 22							26 sep 22							3 oct 22							10 oct 22							
			L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D	L	M	M	J	V	S	D								
1	TRABAJO DE CAMPO	68 days																																											
2	Zapotillo	25 days																																											
3	Bilsa	4 days																																											
4	Yasuní	5 days																																											
5	Cerro Blanco	5 days																																											
6	Santa Isabel, Poetate y Podocarpus	12 days																																											
7	EXPERIMENTO	25 days																																											
8	Búsqueda de individuos	8 days																																											
9	Experimentación	22 days																																											
10	Extracción de muestras	18 days																																											
11	TRABAJO DE LABORATORIO	48 days																																											
12	Extracción de muestras de L. ornata	5 days																																											
13	Extracción de muestras de L. annulata	5 days																																											
14	Extracción de muestras de L. ornata	5 days																																											
15	Toma de muestras Leptodeira misinawui y L. annulata	10 days																																											
16	TRANSCRIPTÓMICA (Módulo 1, 2 y 3)	100 days																																											
17	Trámite permisos exportación de muestras	20 days																																											
18	Preparación de librerías y Secuenciación	80 days																																											
19	ANÁLISIS DE SECUENCIA (Módulo 4)	58 days																																											
20	Preparación de análisis e instalación de softwares	8 days																																											
21	Construcción de arboles filogenéticos	10 days																																											
22	Análisis de reconstrucción ancestral	10 days																																											
23	Análisis de selección positiva	10 days																																											
24	Análisis de expresión genética	20 days																																											
25	Resultados	40 days																																											
26	Preparación de resultados	5 days																																											
27	Escritura de artículo científico	30 days																																											
28	Envío de artículo a revista científica indexada	5 days																																											



[illegible]

6. PRESUPUESTO

ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	ITEM	# UNIDADES	COSTO UNITARIO (USD)	DESCRIPCIÓN	COSTO TOTAL (USD)	
TRABAJO DE CAMPO	AYUDANTES DE	Hospedaje y viáticos	77	\$ 35,00	Valor x día x persona	\$ 2.695,00	UTI
	TRANSPORTE	Gasolina	12	\$ 20,00	Gasolina x día de recorrido	\$ 240,00	
	EXPERIMENTOS	Baldes de plástico	12	\$ 4,80	Balde plástico 18 litros	\$ 57,60	
	TOTAL DE LA ACTIVIDAD					\$ 2.992,60	
TRABAJO DE LABORATORIO	SECUENCIACIÓN	Preparación de librerías y secuenciación	40	\$ 7.000,00	Secuenciación x muestra	\$ 7.000,00	St. John's University
					TOTAL DE LA ACTIVIDAD		\$ 7.000,00
TOTAL DEL PROYECTO						\$ 9.992,60	

7. REFERENCIAS

- Aguilar-López, J. (2019). Four cases of prey-predator interaction (anuran-snake) through their geographical distribution. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 2(01), 31-34.
- Almendáriz, A., Simmons, J., Brito, J. y Vaca-Guerrero, J. (2014). Overview of the herpetofauna of the unexplored Cordillera del Cóndor of Ecuador. *Amphibian y Reptile Conservation* 8(1) [Special Section]: 45–64 (e82).
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Recuperado el 8 de diciembre del 2020. Recueperado de <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arbuckle, K. (2017). Evolutionary context of venom in animals. *Evolution of Venomous Animals and Their Toxins*; Gopalakrishnokone, P., Malhotra, A., Eds, 3-31. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6458-3_16
- Arbuckle, K., de la Vega, R. y Casewell, N. (2017). Coevolution takes the sting out of it: Evolutionary biology and mechanisms of toxin resistance in animals. *Toxicon*, 140, 118-131. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.026>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A., Dvorkin, M., Kulikov, A., Lesin, V. M., Nikolenko, S., Pham, S., Pjribelski, A., Psyshkin, A. S., Sirotkin, A., Vyahni, N. y Pevzner, P. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Barrio-Amorós, C. (2019). On the taxonomy of snakes in the genus *Leptodeira*, with an emphasis on Costa Rican species. *Reptiles y Amphibians*, 26(1), 1-15.

- Bernarde, P. y Abe, A. (2010). Hábitos alimentares de serpentes em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil. *Biota Neotropica*, 10(1), 167-173.
<https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000100017>
- Bolger, A., Lohse, M., y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Boyd, C. y Goodyear, C. (1971). The protein content of some common reptiles and amphibians. *Herpetologica*, 317-320.
- Bringsøe, H., Suthanthangjai, M., Suthanthangjai, W., y Nimnuam, K. (2020). Eviscerated alive: Novel and macabre feeding strategy in *Oligodon fasciolatus* (Günther, 1864) eating organs of *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799) in Thailand. *Herpetozoa*, 33, 157.
<https://doi.org/10.3897/herpetozoa.33.e57096>
- Brizzi, R. y Corti, C. (2007). Cutaneous antipredatory secretions and pheromones in anurans and urodeles. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 40(3), 225-231.
<https://doi.org/10.1080/10236240701557016>
- Brodie III, E., y Brodie Jr, E. (1999). Predator-prey arms races: asymmetrical selection on predators and prey may be reduced when prey are dangerous. *Bioscience*, 49(7), 557-568.
<https://doi.org/10.2307/1313476>
- Brodie, E., Feldman, C., Hanifin, C., Motychak, J., Mulcahy, D. y Williams, B. (2005). Parallel arms races between garter snakes and newts involving tetrodotoxin as the phenotypic interface of coevolution. *Journal of chemical ecology*, 31(2), 343-356.
<https://doi.org/10.1007/s10886-005-1345-x>
- Brodie, E. (2009). Toxins and venoms. *Current Biology*, 19(20), R931-R935.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.011>

- Caldart, V., Iop, S., Rocha, M. y Cechin, S. (2011). Diurnal and nocturnal predators of *Crossodactylus schmidtii* Gallardo, 1961 (Anura, Hylodidae) in southern Brazil. *North-Western Journal of Zoology*, 7(2), 342-345.
- Cantor, M. y Pizzatto, L. (2008): *Leptodeira annulata* (Banded Cateyed Snake). Diet. *Herpetological Review* 39: 470-471
- Carroll, S. (2005). Evolution at two levels: on genes and form. *PLoS Biol*, 3(7):e245
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030245>
- Clayton, D., Bush, S. y Johnson, K. (2015). *Coevolution of life on hosts: integrating ecology and history*. University of Chicago Press.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. y Madden, T. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10(1), 421.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Choi, I., Lee, S. y Ricklefs, R. (1999). Effectiveness and ecological implications of anuran defenses against snake predators. *Korean Journal of Biological Sciences*, 3(3), 247-252.
<https://doi.org/10.1080/12265071.1999.9647493>
- Cortés-Gomez, A., Ruiz-Agudelo, C., Valencia-Aguilar, A. y Ladle, R. (2015). Ecological functions of neotropical amphibians and reptiles: a review. *Universitas Scientiarum*, 20(2), 229-245. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-2.efna>

- Costa, W. y Trevelin, C. (2020). Unsuccessful predation attempts by snakes on anuran amphibians: how successful are snakes?. *Herpetology Notes*, 13, 649-660.
- Dawkins, R. y Krebs, J. (1979). Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 205(1161), 489-511.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1979.0081>
- Duellman, W. (1958). A monographic study of the colubrid snake genus *Leptodeira*. *Bulletin of the AMNH*; v. 114, article 1.
- Daly, J. y Spande, T. F. (1986). Amphibian alkaloids: chemistry, pharmacology, and biology. *Alkaloids: chemical and biological perspectives*, 4, 1-274.
- Daly, J., Spande, T. y Garraffo, H. (2005). Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. *Journal of natural products*, 68(10), 1556-1575.
<https://doi.org/10.1021/np0580560>
- Darst, C., Menéndez-Guerrero, P., Coloma, L. y Cannatella, D. (2005). Evolution of dietary specialization and chemical defense in poison frogs (Dendrobatidae): a comparative analysis. *The American Naturalist*, 165(1), 56-69. <https://doi.org/10.1086/426599>
- Duellman, W. (1988). Patterns of species diversity in anuran amphibians in the American tropics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79-104. <https://doi.org/10.2307/2399467>
- Espinoza, A. (2020). *Dieta de Leptodeira (Colubridae: Serpentes) (Fitzinger 1843) en Ecuador y notas ecológicas de una población de L. septentrionalis larcorum (Kennicott 1859) en Zapotillo-Loja, Ecuador*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Central del Ecuador].

- Evans, C. y Brodie, E. D. (1994). Adhesive strength of amphibian skin secretions. *Journal of Herpetology*, 28(4), 499-502. <https://doi.org/10.2307/1564965>
- Falkenberg, L., Protázio, A., Albuquerque, R., y Mesquita, D. (2013). Predation of *Phyllomedusa nordestina* (Anura: Hylidae) by *Leptodeira annulata* (Serpente: Dipsadidae) in a temporary pond. *Evolutionary Ecology*, 16, 101-122.
- Feldman, C., Brodie, E., y Pfrender, M. (2009). The evolutionary origins of beneficial alleles during the repeated adaptation of garter snakes to deadly prey. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13415-13420. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901224106>
- Feldman, C., Brodie, E. y Pfrender, M. (2012). Constraint shapes convergence in tetrodotoxin-resistant sodium channels of snakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(12), 4556-4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113468109>
- Feldman, C., Durso, A., Hanifin, C., Pfrender, M., Ducey, P., Stokes, A., Barnett, K., Brodie III, E. y Brodie Jr, E. (2016). Is there more than one way to skin a newt? Convergent toxin resistance in snakes is not due to a common genetic mechanism. *Heredity*, 116(1), 84-91. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.73>
- Ferreira, R., Lourenço-de-Moraes, R., Zocca, C., Duca, C., Beard, K. y Brodie, E. (2019). Antipredator mechanisms of post-metamorphic anurans: a global database and classification system. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 73(5), 69. <https://doi.org/10.1007/s00265-019-2680-1>
- Flier, J., Edwards, M., Daly, J. y Myers, C. (1980). Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the ouabain site of Na⁺, K⁺-ATPase. *Science*, 208(4443), 503-505. <https://doi.org/10.1126/science.6245447>

- Frost, D. R. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Recuperado el 2 de febrero del 2021. Tomado de <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>
- Geffeney, S., Brodie, E. y Ruben, P. (2002). Mechanisms of adaptation in a predator-prey arms race: TTX-resistant sodium channels. *Science*, 297(5585), 1336-1339. <https://doi.org/10.1126/science.1074310>
- Geffeney S., Fujimoto E., Brodie E., Brodie E. y Ruben P. (2005). Evolutionary diversification of TTX-resistant sodium channels in a predator-prey interaction. *Nature*, 434, 759–763. [doi:10.1038/nature03444](https://doi.org/10.1038/nature03444)
- Glendinning, J. (2007). How do predators cope with chemically defended foods? *The Biological Bulletin*, 213(3), 252-266. <https://doi.org/10.2307/25066643>
- Grundler, M. (2020). SquamataBase: a natural history database and R package for comparative biology of snake feeding habits. *Biodiversity Data Journal*, 8. <https://dx.doi.org/10.3897%2FBDJ.8.e49943>
- Grabherr, M., Haas, B., Yassour, M., Levin, J., Thompson, D., Amit, I. y Chen, Z. (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology*, 29(7), 644. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fnbt.1883>
- Hanifin, C. (2010). The chemical and evolutionary ecology of tetrodotoxin (TTX) toxicity in terrestrial vertebrates. *Marine Drugs*, 8(3), 577-593. <https://doi.org/10.3390/md8030577>

- Hague, M., Toledo, G., Geffeney, S., Hanifin, C., Brodie Jr, E. y Brodie III, E. (2018). Large-effect mutations generate trade-off between predatory and locomotor ability during arms race coevolution with deadly prey. *Evolution letters*, 2(4), 406-416.
<https://doi.org/10.1002/evl3.76>
- Herrera-Álvarez, S., Rodríguez-Ordóñez, M., Adolfo, P., y Crawford, A. J. (2015). *Parallel evolution of toxin resistance in a predator-prey system*.
- Holding, M., Margres, M., Mason, A., Parkinson, C., y Rokyta, D. (2018). Evaluating the performance of de novo assembly methods for venom-gland transcriptomics. *Toxins*, 10(6), 249. <https://doi.org/10.3390/toxins10060249>
- Hossie, T. y Sherratt, T. (2013). Defensive posture and eyespots deter avian predators from attacking caterpillar models. *Animal Behaviour*, 86(2), 383-389.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2013.05.029>
- Humphreys, R. y Ruxton, G. (2018). A review of thanatosis (death feigning) as an anti-predator behaviour. *Behavioral ecology and sociobiology*, 72(2), 22.
<https://doi.org/10.1007/s00265-017-2436-8>
- Hutchinson, D., Mori, A., Savitzky, A., Burghardt, G., Wu, X., Meinwald, J. y Schroeder, F. (2007). Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2265-2270. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610785104>
- Hutchinson, D., Savitzky, A., Mori, A., Burghardt, G., Meinwald, J. y Schroeder, F. (2012). Chemical investigations of defensive steroid sequestration by the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. *Chemoecology*, 22(3), 199-206. <https://doi.org/10.1007/s00049-011-0078-2>
- Janzen, D., Hallwachs, W. y Burns, J. (2010). A tropical horde of counterfeit predator eyes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11659-11665.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0912122107>

- Kennicott, R. (1859). *Notes on Coluber calligaster of Say, and a description of new species of serpents in the collection of the North Western University of Evanston, Ill.*
- Kojima, Y. y Mori, A. (2015). Active foraging for toxic prey during gestation in a snake with maternal provisioning of sequestered chemical defences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1798), 20142137. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2137>
- König, E., Bininda-Emonds, O. y Shaw, C. (2015). The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides*, 63, 96-117. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.11.003>
- Lenger, D., Berkey, J. y Dugas, M. (2014). Predation on the toxic *Oophaga pumilio* (Anura: Dendrobatidae) by *Rhadinaea decorata* (Squamata: Collubridae). *Herpetology News*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422997112>
- Linné, C. V. (1789). *Systema naturae per regna tria naturae: secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Vol. 1, pt. 7.* Lugduni: Apud JB Delamolliere.
- Li, B., Fillmore, N., Bai, Y., Collins, M., Thomson, J., Stewart, R., y Dewey, C. (2014). Evaluation of de novo transcriptome assemblies from RNA-Seq data. *Genome biology*, 15(12), 553. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0553-5>
- Li, D., Liu, C., Luo, R., Sadakane, K., y Lam, T. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, 31(10), 1674-1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>
- Liu, K., Raghavan, S., Nelesen, S., Linder, C. y Warnow, T. (2009). Rapid and accurate large-scale coestimation of sequence alignments and phylogenetic trees. *Science*, 324(5934), 1561-1564. <https://doi.org/10.1126/science.1171243>

- Lister, R., Gregory, B. y Ecker, J. (2009). Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Current opinion in plant biology*, 12(2), 107-118. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.11.004>
- Lorentz, M., Stokes, A., Rößler, D. y Lötters, S. (2016). Tetrodotoxin. *Current Biology*, 26(19), R870-R872.
- Lüddecke, T., Schulz, S., Steinfartz, S., y Vences, M. (2018). A salamander's toxic arsenal: review of skin poison diversity and function in true salamanders, genus *Salamandra*. *The Science of Nature*, 105(9), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00114-018-1579-4>
- Maddison, W. y Maddison, D. (2015). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04. 2015.
- Magnusson, A., Skaug, H., Nielsen, A., Berg, C., Kristensen, K., Maechler, M. y Brooks, M. (2017). Package 'glmmTMB'. *R Package Version 0.2. 0*. Recuperado el 3 de enero del 2021. Tomado de <https://cran.r-project.org/web/packages/glmmTMB/index.html>
- Martins, M. y Oliveira, M. (1998). Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. *Herpetological Natural History*, 6(2), 78-150.
- McGlothlin, J., Chuckalovcak, J., Janes, D., Edwards, S., Feldman, C., Brodie Jr, E., Pfreder, M. y Brodie III, E. (2014). Parallel evolution of tetrodotoxin resistance in three voltage-gated sodium channel genes in the garter snake *Thamnophis sirtalis*. *Molecular biology and evolution*, 31(11), 2836-2846. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu237>
- McGlothlin, J., Kobiela, M., Feldman, C., Castoe, T., Geffeney, S., Hanifin, C., Toledo, G., Vonk, F., y Pfreder, M. (2016). Historical contingency in a multigene family facilitates adaptive evolution of toxin resistance. *Current Biology*, 26(12), 1616-1621. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.056>

- Mebs, D. (2001). Toxicity in animals. Trends in evolution?. *Toxicon*, 39(1), 87-96. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00155-0)
- Mebs, D., Lorentz, M., Yotsu-Yamashita, M., Rößler, D. C., Ernst, R., y Lötters, S. (2018). Geographic range expansion of tetrodotoxin in amphibians—First record in *Atelopus hoogmoedi* from the Guiana Shield. *Toxicon*, 150, 175-179. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.05.011>
- Mohammadi, S., McCoy, K., Hutchinson, D., Gauthier, D. y Savitzky, A. (2013). Independently evolved toad-eating snakes exhibit sexually dimorphic enlargement of adrenal glands. *Journal of Zoology*, 290(4), 237-245. <https://doi.org/10.1111/jzo.12038>
- Mohammadi, S., Gompert, Z., Gonzalez, J., Takeuchi, H., Mori, A., y Savitzky, A. (2016a). Toxin-resistant isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in snakes do not closely track dietary specialization on toads. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1842). <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2111>
- Mohammadi, S., Brodie Jr, E., Neuman-Lee, L. y Savitzky, A. (2016b). Mutations to the cardiotonic steroid binding site of Na⁺/K⁺-ATPase are associated with high level of resistance to gamabufotalin in a natricine snake. *Toxicon*, 114, 13-15.
- Mohammadi, S., Savitzky, A., Lohr, J. y Dobler, S. (2017). Toad toxin-resistant snake (*Thamnophis elegans*) expresses high levels of mutant Na⁺/K⁺-ATPase mRNA in cardiac muscle. *Gene*, 614, 21-25. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.02.028>
- Mohammadi, S., Petschenka, G., French, S. S., Mori, A., y Savitzky, A. H. (2018). Snakes exhibit tissue-specific variation in cardiotonic steroid sensitivity of Na⁺/K⁺-ATPase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 217, 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.11.014>

- Mohammadi, S., French, S., Neuman-Lee, L., Durham, S., Kojima, Y., Mori, A., y Savitzky, A. H. (2017b). Corticosteroid responses of snakes to toxins from toads (bufadienolides) and plants (cardenolides) reflect differences in dietary specializations. *General and Comparative Endocrinology*, 247, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.03.015>
- Motychak, J., Brodie Jr, E. y Brodie III, E. (1999). Evolutionary response of predators to dangerous prey: preadaptation and the evolution of tetrodotoxin resistance in garter snakes. *Evolution*, 53(5), 1528-1535. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb05416.x>
- Murrell, B., Wertheim, J., Moola, S., Weighill, T., Scheffler, K. y Pond, S. (2012). Detecting individual sites subject to episodic diversifying selection. *PLoS genet*, 8(7), e1002764.
- Murrell, B., Moola, S., Mabona, A., Weighill, T., Sheward, D., Kosakovsky Pond, S. y Scheffler, K. (2013). FUBAR: a fast, unconstrained bayesian approximation for inferring selection. *Molecular biology and evolution*, 30(5), 1196-1205. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst030>
- Murrell, B., Weaver, S., Smith, M., Wertheim, J., Murrell, S., Aylward, A. y Kosakovsky Pond, S. (2015). Gene-wide identification of episodic selection. *Molecular biology and evolution*, 32(5), 1365-1371. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv035>
- Muscat, E., y Moroti, M. (2018). Predation of *Rhinella ornata* (Anura: Bufonidae) by the water snake *Erythrolamprus miliaris* (Squamata: Dipsadidae) in São Paulo, Brazil. *Herpetology Notes*, 11, 449-450.
- Myers, C., Daly, J. y Malkin, B. (1978). A dangerously toxic new frog (*Phylllobates*) used by Emberá Indians of western Colombia, with discussion of blowgun fabrication and dart poisoning. *Bulletin of the AMNH*; v. 161, article 2.
- Nelsen, D., Nisani, Z., Cooper, A., Fox, G., Gren, E., Corbit, A. y Hayes, W. (2014). Poisons, toxungens, and venoms: redefining and classifying toxic biological secretions and the

- organisms that employ them. *Biological Reviews*, 89(2), 450-465.
<https://doi.org/10.1111/brv.12062>
- Noguchi, T. y Ebesu, J. S. (2001). Puffer poisoning: epidemiology and treatment. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 20(1), 1-10. <https://doi.org/10.1081/TXR-100103080>
- Pagel, M., Meade, A., y Barker, D. (2004). Bayesian estimation of ancestral character states on phylogenies. *Systematic biology*, 53(5), 673-684.
<https://doi.org/10.1080/10635150490522232>
- Pašukonis, A. y Loretto, M. (2020). Predation on the Three-striped poison frog, *Ameerega trivitatta* (Boulenger 1884; Anura: Dendrobatidae), by *Erythrolamprus reginae* (Linnaeus 1758; Squamata: Collubridae). *Herpetology Notes*, 13, 557-559.
- Pazmiño-Otamendi, G. (2019a). *Leptodeira annulata*. En: Torres-Carvajal, O., Pazmiño-Otamendi, G. y Salazar-Valenzuela, D. Reptiles del Ecuador. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Recuperado el 24 de noviembre de 2020. Tomado de <https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Leptodeira%20annulata>
- Pazmiño-Otamendi, G. (2019b) *Leptodeira ornata*. En: Torres-Carvajal, O., Pazmiño-Otamendi, G. y Salazar-Valenzuela, D. Reptiles del Ecuador. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Leptodeira%20ornata>,.
- Perry, B., Card, D., McGlothlin, J., Pasquesi, G., Adams, R., Schield, D. y Vandewege, M. (2018). Molecular adaptations for sensing and securing prey and insight into amniote genome diversity from the garter snake genome. *Genome biology and evolution*, 10(8), 2110-2129.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evy157>

- Phillips, B. y Shine, R. (2007). When dinner is dangerous: toxic frogs elicit species-specific responses from a generalist snake predator. *The American Naturalist*, 170(6), 936-942. <https://doi.org/10.1086/522845>
- Pond, S. y Frost, S. (2005). Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular biology and evolution*, 22(5), 1208-1222. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi105>
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1253-1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Pough, F., Andrews, R., Cadle, J., Crump, M. y Savitsky, A. (2007). Notes on the ecology of the Colubrid Snake *Leptodeira annulata* in the Pantanal, Brazil. *Herpetological Review*, 38(3), 278-280.
- Pyron, R., Burbrink, F., Colli, G., De Oca, A., Vitt, L., Kuczynski, C. y Wiens, J. (2011). The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular phylogenetics and evolution*, 58(2), 329-342. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.11.006>
- Raaymakers, C., Verbrugghe, E., Hernot, S., Hellebuyck, T., Betti, C., Peleman, C., Claeys, M., Bert, W., Caveliers, V., Ballet, S., Martel, A., Pasmans, F., y Roelants, K. (2017). Antimicrobial peptides in frog poisons constitute a molecular toxin delivery system against predators. *Nature communications*, 8(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01710-1>
- Reimche, J. (2020). *Evolution of an Adaptive Trait: Phenotypic, Physiological, and Genetic Patterns of TTX Resistance in the Sierra Garter Snake *Thamnophis couchii**. [Tesis Doctoral, University of Nevada].

- Reimche, J., Brodie Jr, E., Stokes, A., Ely, E., Moniz, H., Thill, V., Hallas, J., Pfreder, M., Brodie III, E. y Feldman, C. (2020) The geographic mosaic in parallel: Matching patterns of newt tetrodotoxin levels and snake resistance in multiple predator–prey pairs. *Journal of Animal Ecology*, 89(7), 1645-1657.
- Rodriguez, S. [Boletín Facultad de Ciencias]. (2020, diciembre 10). Molecular mechanisms in potassium voltage-gated channels underlying toxin resistance in neotropical [Archivo video]. Recuperado el 6 de diciembre. Tomado de <https://www.youtube.com/watch?v=f-fLrUQVaNM&t=278s>
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A. y Lê Cao, K. A. (2017). mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS computational biology*, 13(11). <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13212>
- Saporito, R., Donnelly, M., Garraffo, H., Spande, T., y Daly, J. (2006). Geographic and seasonal variation in alkaloid-based chemical defenses of *Dendrobates pumilio* from Bocas del Toro, Panama. *Journal of chemical ecology*, 32(4), 795-814. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9034-y>
- Santos-Silva C, Andrade I, Araújo M, Barros L, Gomes L, Ferrari S. (2014). Predation of six anuran species by the banded cat-eyed snake, *Leptodeira annulata* (Serpentes: Dipsadidae), in the Caatinga scrub of northeastern Bahia, Brazil. *Herpetol Notes*. 7:123–126.
- Santos, J., Coloma, L., y Cannatella, D. (2003). Multiple, recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(22), 12792-12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.2133521100>
- Santos, J., y Cannatella, D. (2011). Phenotypic integration emerges from aposematism and scale in poison frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 6175–6180. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010952108>

- Santos, J., Tarvin, R., y O'Connell, L. (2016). A review of chemical defense in poison frogs (Dendrobatidae): ecology, pharmacokinetics, and autoresistance. In *Chemical signals in vertebrates 13* (pp. 305-337). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22026-0_21
- Savage, J. (2002): The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna between Two Continents, between Two Seas. Chicago, The University of Chicago Press.
- Sellmeijer, B., y Van den Burg, M. (2020). Tadpole predation in the chemically defended *Oophaga pumilio* (Anura: Dendrobatidae) by *Oxybelis aeneus* (Squamata: Colubridae). *Herpetology Notes*, 13, 301-303.
- Schalk, C. y Cove, M. (2018). Squamates as prey: Predator diversity patterns and predator-prey size relationships. *Food Webs*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2018.e00103>
- Sinhorin, A., Kerkhoff, J., Dall'Oglio, E., De Jesus Rodrigues, D., de Vasconcelos, L. y Sinhorin, V. D. G. (2020). Chemical profile of the parotoid gland secretion of the Amazonian toad (*Rhinella margaritifera*). *Toxicon*, 182, 30-33. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.04.106>
- Skelhorn, J., Halpin, C. y Rowe, C. (2016). Learning about aposematic prey. *Behavioral Ecology*, 27(4), 955-964. <https://doi.org/10.1093/beheco/arw009>
- Smith, M., Wertheim, J., Weaver, S., Murrell, B., Scheffler, K. y Kosakovsky Pond, S. (2015). Less is more: an adaptive branch-site random effects model for efficient detection of episodic diversifying selection. *Molecular biology and evolution*, 32(5), 1342-1353. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv022>

- Smith-Unna, R., Boursnell, C., Patro, R., Hibberd, J., y Kelly, S. (2016). TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome research*, 26(8), 1134-1144. <https://doi.org/10.1101/gr.196469.115>
- Spande, T., Garraffo, H., Edwards, M., Yeh, H., Pannell, L. y Daly, J. W. (1992). Epibatidine: a novel (chloropyridyl) azabicycloheptane with potent analgesic activity from an Ecuadorian poison frog. *Journal of the American Chemical Society*, 114(9), 3475-3478. <https://doi.org/10.1021/ja00035a048>
- Speed, M., Fenton, A., Jones, M., Ruxton, G. y Brockhurst, M. 2015. Coevolution can explain defensive secondary metabolite diversity in plants. *New Phytologist*, 208:1251-1263. <https://doi.org/10.1111/nph.13560>
- *Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stynoski, J., Shelton, G. y Stynoski, P. (2014). Maternally derived chemical defences are an effective deterrent against some predators of poison frog tadpoles (*Oophaga pumilio*). *Biology letters*, 10(5), 20140187. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2014.0187>
- Tarvin, R., Santos, J., O'Connell, L., Zakon, H., y Cannatella, D. (2016). Convergent substitutions in a sodium channel suggest multiple origins of toxin resistance in poison frogs. *Molecular biology and evolution*, 33(4), 1068-1080. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv350>
- Tarvin, R., Borghese, C., Sachs, W., Santos, J., Lu, Y., O'Connell, L. A. y Zakon, H. H. (2017). Interacting amino acid replacements allow poison frogs to evolve epibatidine resistance. *Science*, 357(6357), 1261-1266. <https://doi.org/10.1126/science.aan5061>

- Toledo, L. (2005). Predation of juvenile and adult anurans by invertebrates: current knowledge and perspectives. *Herpetological Review*, 36(4), 395-399.
- Toledo, L., Ribeiro, R., y Haddad, C. (2007). Anurans as prey: an exploratory analysis and size relationships between predators and their prey. *Journal of Zoology*, 271(2), 170-177. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2006.00195.x>
- Torres-Carvajal, O., Echevarría, L., Lobos, S., Venegas, P., y Kok, P. (2019). Phylogeny, diversity and biogeography of Neotropical sipo snakes (Serpentes: Colubrinae: Chironius). *Molecular phylogenetics and evolution*, 130, 315-329.
- Torres-Carvajal, O. Sánchez-Nivicela, J. C., Posse, V., Celi, E., y KOCH, C. (2020). A new species of cat-eyed snake (Serpentes: Dipsadinae: Leptodeirini) from the Andes of southern Ecuador. *Zootaxa*, 4895(3), 357-380.
- Thompson, J. (1994). *The coevolutionary process*. University of Chicago Press.
- Valencia-Aguilar, A., Cortés-Gómez, A., y Ruiz-Agudelo, C.(2013). Ecosystem services provided by amphibians and reptiles in Neotropical ecosystems. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services & Management*, 9(3), 257-272. <https://doi.org/10.1080/21513732.2013.821168>
- Uetz, P., Freed, P., y Hosek, J. *The Reptile Database*. Recuperado el 15 de diciembre del 2020. Tomado de: <https://reptile-database.reptarium.cz/search?search=leptodeira&submit=Search>
- Uetz, P., Freed, P., y Hosek, J. *The Reptile Database*. Recuperado el 2 de febrero del 2021. Tomado de <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>
- Ujvari, B., Casewell, N., Sunagar, K., Arbuckle, K., Wüster, W., Lo, N., O'Meally, D., Beckmann, C., King, G., Deplazes, E. y Madsen, T. (2015). Widespread convergence in toxin

resistance by predictable molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(38), 11911-11916. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511706112>

Valdez, J. (2020). Arthropods as vertebrate predators: A review of global patterns. *Global Ecology and Biogeography*, 29(10), 1691-1703. <https://doi.org/10.1111/geb.13157>

Vandendriessche, T., Abdel-Mottaleb, Y., Maertens, C., Cuypers, E., Sudau, A., Nubbemeyer, U. y Tytgat, J. (2008). Modulation of voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels by pumiliotoxin 251D: a “joint venture” alkaloid from arthropods and amphibians. *Toxicon*, 51(3), 334-344.

Vargas-Salinas, F., y Aponte-Gutierrez, A. (2013). A race for survivorship: failed predation on the toad *Rhinella humboldti* (Gallardo, 1965) by the Cat-eyed snake.

Vermeij, G. (1994). The evolutionary interaction among species: selection, escalation, and coevolution. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25(1), 219-236. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.25.110194.001251>

Vrcibradic, D., Siqueira, C., Rocha, C., Van Sluys, M., y Pontes, J. (2007). *Leptodeira annulata* (Banded Cat-eyed Snake). Size, reproduction, and prey. *Herpetological Review*, 38(1), 89-90.

Vornanen, M., Hassinen, M. y Haverinen, J. (2011). Tetrodotoxin sensitivity of the vertebrate cardiac Na⁺ current. *Marine drugs*, 9(11), 2409-2422. <https://doi.org/10.3390/md9112409>

Wang, Z., Gerstein, M. y Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57-63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>

Waterhouse, R., Seppey, M., Simão, F., Manni, M., Ioannidis, P., Klioutchnikov, G., Kriventseva, E., y Zdobnov, E. (2018). Applications from quality assessments to gene prediction and

- phylogenomics. *Molecular biology and evolution*, 35(3), 543-548.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx319>
- Weinstein, S. y White, J. (2018). Toxins from venoms and poisons. *Medical Aspects of Biological Warfare*.
- Wells, K. (2010). *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press.
- Zakon, H., Jost, M. y Lu, Y. (2011). Expansion of voltage-dependent Na⁺ channel gene family in early tetrapods coincided with the emergence of terrestriality and increased brain complexity. *Molecular biology and evolution*, 28(4), 1415-1424.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msq325>
- Zheng, Y. y Wiens, J. (2016). Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. *Molecular phylogenetics and evolution*, 94, 537-547.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.10.009>
- Zipkin, E., DiRenzo, G., Ray, J., Rossman, S. y Lips, K. (2020). Tropical snake diversity collapses after widespread amphibian loss. *Science*, 367(6479), 814-816.
<https://doi.org/10.1126/science.aay5733>