

Adriana Moriguchi Jeckel

Eficiência de sequestro e composição de alcaloides
em rãs-de-veneno da família Dendrobatidae

Sequestration efficiency and alkaloid composition in
poison frogs of the family Dendrobatidae



São Paulo

2020

Adriana Moriguchi Jeckel

Eficiência de sequestro e composição de alcaloides
em rãs-de-veneno da família Dendrobatidae

Sequestration efficiency and alkaloid composition in
poison frogs of the family Dendrobatidae

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Zoologia.

Orientadores:

Dr. Taran Grant

Dr. Ralph A. Saporito

São Paulo

2020

Jeckel, Adriana Moriguchi

Eficiência de sequestro e composição de
alcaloides em rãs-de-veneno da família

Dendrobatidae

160 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo. Departamento de
Zoologia.

1. Defesa Química 2. Anfíbios 3.

Adelphobates galactonotus I. Universidade de São
Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de
Zoologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais,
Emilio e Cristina

Epígrafe

Penso que só há um caminho para a ciência
ou para a filosofia:
Encontrar um problema, ver a sua beleza
e apaixonar-se por ele; casar e viver feliz com ele até que a
morte vos separe — a não ser que encontrem
um outro problema ainda mais fascinante, ou, evidentemente,
a não ser que obtenham uma solução.
Mas, mesmo que obtenham uma solução, poderão então
descobrir, para vosso deleite,
a existência de toda uma família de problemas-filhos,
encantadores ainda que talvez difíceis, para cujo bem-estar
poderão trabalhar, com um sentido,
até o fim dos vossos dias.

Karl Popper

Introdução Geral

A defesa química ocorre numa interação interespecífica que funciona através de compostos químicos que influenciam negativamente alvos moleculares de predadores ou patógenos, protegendo os organismos portadores dessa forma de defesa (Wink, 2003). As estruturas dos compostos defensivos são similares às estruturas de moléculas endógenas inatas do metabolismo animal e agem tanto por efeito agonista, ligando-se aos receptores celulares com ação similar ao composto inato, quanto por efeito antagonista, bloqueando os receptores celulares (e.g. Wink et al., 1998; Badio & Daly, 1994).

A presença de compostos defensivos evoluiu independentemente em diferentes linhagens, desde as esponjas-do-mar (Taylor et al., 2007) e as grandes linhagens de invertebrados (e.g. Cimino & Ghiselin; 1998, Laurent et al., 2003) aos vertebrados (e.g. Noguchi et al., 2006; Ligabue-Braun et al., 2012; Ligabue-Braun & Carli, 2015). Atualmente se conhecem milhares de tipos diferentes de compostos, com grandes variações estruturais entre espécies (Wink, 1993; Daly et al., 2005). Além da variação entre diferentes espécies, os compostos defensivos de um único indivíduo também podem ter uma grande diversidade, contendo mais de um tipo de substância (e.g. Jeckel et al., 2015), os quais conferem proteção e ação a diferentes tipos de ameaças e moléculas, respectivamente (Wink, 2003). Ademais, essa variedade pode ter importância funcional, interferindo na viscosidade da substância (Blum et al., 1973); ou um papel sinérgico, onde a soma de duas ou mais substâncias combinadas é mais eficaz do que a ação de apenas uma (Pasteels, 1983), ou até mesmo como forma de evitar adaptações por parte do predador (Barnett et al., 2014). Alguns compostos são específicos de determinados grupos taxonômicos, podendo ser utilizados como fontes de evidência para inferir hipóteses de relacionamento evolutivo entre grupos, sendo, por isso, usados como evidência na taxonomia e sistemática (e.g. Pasteels, 1993; Cei et al., 1967; Grant et al., 2017).

Apesar de normalmente relacionarmos a defesa química com toxicidade letal, a grande maioria dos compostos químicos presentes nesses organismos não são fatais aos predadores nas quantidades apresentadas. Parte da consequência da estratégia de defesa é que os predadores sobrevivam, sejam capazes de aprender e evitem atacar em encontros futuros (Brower et al., 1968; Servedio, 1999). Por isso, os compostos defensivos geralmente causam algum tipo de desconforto, como gosto ruim (e.g. Skelhorn & Rowe, 2006; Bolton et al., 2017), alteração na pressão sanguínea ou no ritmo cardíaco (e.g. Clarke 1997), indigestibilidade e desconforto gastrointestinal (e.g. Brower et al., 1968; Wouters et al.,

2016) ou até mesmo mudanças temporárias de comportamento (e.g. Jumar et al., 2014; Zou et al., 2016). Uma hipótese para explicar a importância desse aprendizado pelos possíveis predadores é o surgimento de colorações brilhantes e disruptivas que servem como aviso e reforço de aprendizado para predadores visualmente orientados, uma estratégia chamada aposematismo (revisão em Mappes et al., 2005). Essa hipótese vem sendo empiricamente comprovada ao longo dos anos para muitos grupos de organismos (e.g. Schmidt & Blum, 1977; Rubino & McCarthy, 2004; Saporito et al., 2007). Entretanto, aposematismo e defesa química nem sempre protegem esses organismos de ataques ou predação e/ou infecção por seus inimigos naturais. Muitos predadores adquiriram resistência aos compostos e são capazes de superar o arsenal químico (Geffeney et al., 2005; Despres et al., 2007; Pittendrigh et al., 2013; Ujvari et al., 2015).

A resistência a compostos químicos pode ser alcançada através de detoxificação química por enzimas generalistas ou específicas (Hartmann & Ober, 2000; Heidel-Fischer & Vogel, 2015). Predação quase sempre envolve ingestão da presa e, conseqüentemente, os compostos defensivos estarão expostos ao metabolismo do sistema digestivo do predador. O metabolismo de compostos ativos é amplamente estudado em mamíferos, principalmente por interesses farmacêuticos e econômicos. Em humanos, por exemplo, a concentração total de xenobióticos (compostos químicos estranhos a um organismo, como medicamentos e pesticidas) é diminuída consideravelmente pelo fígado antes de atingir a circulação sistêmica (Pond & Tozer, 1984). As enzimas do sistema do citocromo P450 (CYP450) são as principais responsáveis por modificarem compostos tóxicos em compostos mais estáveis e hidrofílicos, facilitando a excreção no rim. Mamíferos herbívoros, como ovelhas e *hamsters*, e insetos que se alimentam de plantas com defesa química, possuem um arsenal de enzimas CYP450, além de enzimas da família monooxigenase contendo flavina, que permitem que se alimentem dessas plantas para proporcionar estabilização e excreção das toxinas (Ehmke et al., 1990; Miranda et al., 1991; Huan et al., 1998; Hartmann et al., 1999).

Outra forma de resistir às defesas químicas das presas é através de insensibilidade das moléculas alvo, geralmente canais iônicos, através de substituições nas sequências de aminoácidos nos sítios de ligação (Wang & Wang, 1999; Geffeney et al., 2002; Tarvin et al., 2016). Porém, essa substituição pode ter um custo, o que faz com que essa forma de resistência seja menos comum e, quando existe, os aminoácidos substituídos são bastante conservados e convergentes entre diferentes espécies (Feldman et al., 2012; Ujvari et al., 2015). Um caso clássico é o da serpente *Thamnophis sirtalis* (Linnaeus, 1758) que é resistente à toxina da salamandra *Taricha granulosa* (Skilton, 1849), a tetrodotoxina (TTX),

uma das toxinas conhecidas mais potentes, a qual age bloqueando canais de sódio (Mosher et al., 1964). Essas serpentes são capazes de predação dessas salamandras devido a uma variedade de mutações no gene que codifica a região de afinidade do TTX com os canais de sódio, a região NaV1.4 (Geffeney et al., 2002). A variedade em tipos e quantidades de mutações de aminoácidos nessa região confere às serpentes diferentes graus de resistência, permitindo se adaptar às concentrações de toxinas das salamandras em populações específicas (Hanifin et al., 2008; Williams et al., 2010). Por exemplo, em localidades onde a salamandra possui concentrações menores de TTX, as mutações são diferentes das mutações em serpentes em regiões onde as presas possuem mais TTX (Hanifin et al., 2008). Isso acontece porque essas mutações têm um custo muito elevado, pois interfere na capacidade de locomoção e reação das serpentes após ingestão da toxina (Feldman et al., 2012). Essa relação é um clássico exemplo de corrida armamentista na coevolução dessas duas espécies (Brodie III et al., 2005). Adaptações para resistir às toxinas das presas parecem ser uma estratégia importante, principalmente para animais que desenvolveram uma dieta especializada.

Procedência dos compostos em organismos quimicamente defendidos

Compostos defensivos podem ser (1) sintetizados pelo próprio organismo (biossintetizados), (2) adquiridos por simbiose ou (3) adquiridos do ambiente. As fontes desses compostos não são mutuamente exclusivas de modo que, por exemplo, o mesmo indivíduo pode sintetizar substâncias e também adquirir do ambiente (*e.g.* Jeckel et al., 2015). Dentre os compostos biossintetizados, alguns são produtos de metabolismo secundário, usando esteróides ou aminoácidos como substrato (Erspamer, 1954; Pasteels, 1983), enquanto outros são proteínas e peptídeos, que são codificados geneticamente (König et al., 2015). Esses compostos são produzidos em tecidos específicos, sendo armazenado ou não em glândulas. A biossíntese, seja por tradução direta das proteínas ou por síntese *de novo* (i.e. síntese de moléculas complexas a partir de moléculas menores) das moléculas, parece ser a forma mais comum dentre as defesas químicas conhecidas nos animais, sendo muito comum em artrópodes terrestres (Whitman et al., 1990) e anuros (Erspamer, 1994).

A outra fonte de compostos de defesa pode ser por associação simbiótica com microrganismos (Flórez et al., 2015). Por exemplo, toxinas encontradas em esponjas das Filipinas, *Theonella swinhoei* (Gray, 1868), são produzidas por bactérias simbióticas filamentosas e unicelulares (Bewley et al., 1996). Porém, o caso mais famoso e ainda controverso é o das bactérias produtoras de TTX encontradas em diversas espécies de peixes

baiaicus (revisão por Noguchi et al., 2006) e outros invertebrados marinhos (Chau et al., 2011). Apesar de vários estudos demonstrarem que bactérias produtoras de TTX vivem em simbiose com inúmeras espécies que contêm TTX, a rota biossintética ou os genes codificantes de TTX ainda não foram descritos em nenhuma dessas bactérias. Além disso, este tipo de bactérias não foi encontrado em nenhum vertebrado terrestre que possui TTX, como o caso de algumas espécies de anfíbios (Mosher et al., 1964). Acredita-se que em salamandras, o TTX é produzido endogenamente, sem interação simbiótica para a síntese (Lehman et al., 2004). Porém, ainda não existem evidências empíricas que suportem essa hipótese.

Finalmente, a terceira fonte de compostos é por aquisição do ambiente. Alguns gafanhotos, por exemplo, se alimentam de plantas com defesa química e ganham certa proteção enquanto os compostos nocivos estão no trato digestivo. Porém, assim que o trato é esvaziado e/ou a fonte da alimentação modifica, os gafanhotos perdem a proteção química (Sword, 1999). Alternativamente, os compostos podem ser sequestrados da dieta, ou seja, os compostos são ingeridos, absorvidos, transportados e armazenados em tecidos especializados.

Insetos herbívoros evoluíram a capacidade de sequestrar como forma a superar o grande arsenal de metabólitos secundários produzido pelas plantas em resposta à herbivoria (Pasteels, 1983; Wink, 1993). Muitas espécies de insetos são capazes de tolerar a toxicidade e utilizar o composto tanto para defesa quanto para outras funções fisiológicas e ecológicas (Dussourd et al., 1989; Brückmann et al., 2000; Erb & Robert, 2016). Por exemplo, o sequestro de cardenolídeos, um tipo de esteroide do grupo dos glicosídeos cardíacos, é conhecido em diversas ordens de insetos como Lepidoptera (Brower et al., 1984; Black, 1976; Nishio, 1980; Cohen & Brower, 1982), Coleoptera (Dobler et al., 1998; Isman et al., 1977b; Duffey & Scudder, 1972; Nishio et al., 1983), Hemiptera (Rothschild et al., 1970; Duffey & Scudder, 1972; Duffey et al., 1978) e Orthoptera (von Euw et al., 1967). Um caso clássico é o do sequestro de cardenolídeos de plantas do gênero *Asclepias* pelas larvas de borboletas monarcas (Malcom & Brower, 1989). Os compostos sequestrados enquanto larvas são armazenadas de forma que os protegem mesmo depois da metamorfose, até a fase adulta (Brower et al., 1968). Outro sistema de sequestro em insetos muito estudado é o dos alcaloides pirrolizidinas (AP). Diversas espécies de Lepidoptera (Nickisch-Rosenegk & Wink, 1993) e de Coleoptera (como espécies do gênero *Oreina*, Rowell-Rahier, et al 1991) se alimentam de plantas produtoras de AP e sequestram o alcaloide, transportando-o para glândulas especializadas ou simplesmente acumulando-o na hemolinfa (Hartmann & Ober, 2000).

Dentre os vertebrados, algumas linhagens de aves, serpentes e anfíbios, também adquiriram a capacidade de sequestrar compostos da dieta. A serpente *Rhabdophis tigrinus* (Boie, 1826), por exemplo, alimenta-se de anuros da família Bufonidae (Hutchinson et al., 2007). Esses sapos possuem nas suas glândulas cutâneas altas concentrações de um tipo de glicosídeo cardíaco, o bufodienolídeo, que possui grande afinidade com Na^+/K^+ -ATPase, molécula que mantém o potencial de membrana das células (Agrawal et al., 2012). A *R. tigrinus* tem a capacidade de sequestrar esses esteróis e armazenar em glândulas especializadas na região da cabeça (Hutchinson et al., 2007). Outro exemplo são as espécies de aves da Nova Guiné, dos gêneros *Pitohui* e *Ifrita* que sequestram batracotoxina (BTX) de besouros do gênero *Choresine* (Melyridae; Dumbacher et al., 1992, 2009; Ligabue-Braun & Carli, 2015). A BTX é um dos alcaloides mais tóxicos encontrados na natureza, tendo uma grande afinidade com canais de sódio de membranas de músculos e células nervosas, mantendo-as bloqueadas (Daly et al., 1965). A alta toxicidade da BTX já era conhecida por sua presença em outros vertebrados que sequestram alcaloides: as rãs-de-veneno. As rãs-de-veneno são o grupo de vertebrados mais estudado que sequestra compostos defensivos da dieta. Eles sequestram alcaloides principalmente de formigas e ácaros e os acumulam em glândulas de veneno da pele (Daly et al., 1994, 2005; Smith et al., 2002; Hantak et al., 2013).

O sequestro de compostos químicos da dieta adiciona mais um nível de interação trófica entre os organismos (Fig. 1). O organismo quimicamente defendido, que precisa sequestrar os compostos defensivos, é o predador de um outro animal quimicamente defendido, ambos necessariamente devem ter desenvolvido resistência não só à ação da

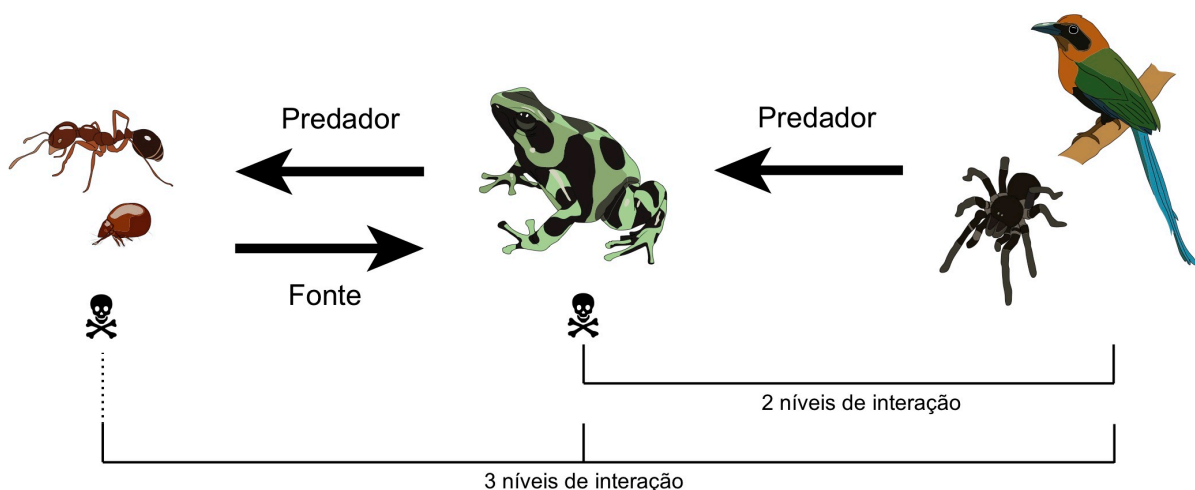


Figura 1. Interações ecológicas em um sistema de presa-predador de animais quimicamente defendidos. Em um sistema onde existe o sequestro de compostos defensivos, uma das presas é a fonte da toxina para o organismo que sequestra.

toxina, mas também ao acúmulo deliberado desses compostos no próprio corpo. Por exemplo, as formigas, que são fonte de alcaloides para as rãs-de-veneno, são produtoras de uma grande variedade de tipos de alcaloides (Edcoubas & Blum, 1990). Devido à toxicidade e função repelente, esses alcaloides são utilizados pelas formigas durante interações agressivas e competitivas (Adams & Traniello, 1981; Adams et al., 2013; Obin & Vander Meer, 1985). As rãs-de-veneno, por sua vez, parecem ter desenvolvido mecanismos que permitem se alimentar desses compostos e acumular sem nenhuma adversidade. Pelo contrário, eles adquiriram vantagens ao sequestrarem esses compostos e se defenderem dos seus próprios predadores. O mesmo sistema acontece em insetos que sequestram metabólitos secundários das plantas. Esses compostos provêm proteção às folhas e outros órgãos da planta e têm função repelente para a grande maioria de herbívoros generalistas (e.g. Pasteels, 1983; Detzel & Wink, 1995; Wouters et al., 2016). Como forma de inativar ou reduzir a toxicidade dos metabólitos, e ainda proporcionar uma adaptação contra predadores, insetos especialistas em certas espécies de plantas possuem mecanismos que permitem que tais compostos sejam absorvidos e transportados pelo corpo em uma forma estrutural não tóxica. Cada espécie que sequestra um determinado tipo de composto químico desenvolveu mecanismos e estratégias específicas que permitem que esse sistema funcione de forma eficiente.

Adaptações fisiológicas e moleculares do sequestro

A capacidade de sequestro evoluiu independentemente em diversos grupos animais (Daly et al., 1994; Duffey, 1980; Dumbacher et al., 1992; Hutchinson et al., 2007) e, apesar do mecanismo em si variar entre espécies e tipos de compostos químicos, todos eles tiveram que adaptar certos pontos em comum para que a estratégia de defesa fosse eficiente. Essa convergência em diferentes grupos poderia ser resultado de um menor custo fisiológico ao sequestrar um composto já existente ao invés de biosintetizar (Zvereva et al., 2016). Assim, diversas rotas metabólicas não precisariam existir. Entretanto, quando parâmetros fisiológicos e ecológicos são observados, o sequestro não é necessariamente menos custoso ou mais simples (Duffey, 1980; Zvereva et al., 2016). Na verdade, diversas adaptações são necessárias, incluindo mecanismos fisiológicos para absorver e transportar os compostos ao mesmo tempo evitando autointoxicação (Duffey, 1980) e mecanismos comportamentais, como forrageamento, já que dependem da dieta para adquirir a proteção química (Termonia et al., 2001; Darst et al., 2005; Agrawal et al., 2012). As adaptações para evitar autointoxicação são similares ou até iguais a mecanismos comentados anteriormente sobre

predadores adaptados a animais quimicamente defendidos. A diferença no caso de animais que sequestram é que a resistência deve ser eficiente o suficiente para transporte e armazenamento de grandes quantidades do composto defensivo.

Uma das estratégias de se evitar a autointoxicação é por insensibilidade da molécula alvo através de substituições nas sequências de aminoácidos nos sítios de ligação (Wang & Wang, 1999; Tarvin et al., 2016). No entanto, a insensibilidade à toxina pode afetar a sensibilidade dos sítios de ligação ao seu ligante endógeno (Tarvin et al., 2017). Por isso, em proteínas tão conservadas quanto canais iônicos, as substituições possíveis são restritas, resultando em substituições na mesma posição de aminoácido (Ujvari et al., 2016). É o caso da resistência a glicosídeos cardíacos, que surgiu várias vezes independentemente entre invertebrados e vertebrados (Dobler et al., 2012; Bramer et al., 2015; Ujvari et al., 2016; Mohammadi et al., 2016; Holzinger & Wink, 1996; Petschenka et al., 2012). Os dois tipos de glicosídeos cardíacos já citados, os cardenólídeos e os bufodienolídeos, interagem com a ubíqua enzima de membrana Na^+/K^+ -ATPase, bloqueando o transporte de íons (Agrawal et al., 2012). A região mais importante para a ligação desses esteroides com a enzima fica no *loop* extracelular entre os dois primeiros segmentos transmembrana (H1-H2), dentre dez existentes, da subunidade alfa (Agrawal et al., 2012). Estudos revelaram que substituições em dois aminoácidos, nas posições 111 e 122 do *loop* do H1-H2 são suficientes para conferir baixa afinidade da enzima aos esteroides e consequente resistência às toxinas em diversas espécies de insetos (Dobler et al., 2012), especialmente Lepidoptera (Holzinger & Wink, 1996; Petschenka et al., 2012; Bramer et al., 2015), e em serpentes com dieta especializada em bufonídeos (Ujvari et al., 2015; Mohammadi et al., 2016).

Em rãs-de-veneno, espécies do gênero *Phyllobates* tem insensibilidade ao alcaloide presente nas suas glândulas da pele, o BTX, enquanto outras espécies da mesma família não. Essa insensibilidade se deve a algumas substituições no segmento 6 do domínio I e IV da subunidade alfa de canais de sódio voltagem-dependente (Wang & Wang, 1999; Tarvin et al., 2016). Presume-se que substituições nesses mesmos segmentos também podem conferir insensibilidade à pumiliotoxina e histrionicotoxina, outras duas classes de alcaloides comumente encontrados em anfíbios que sequestram alcaloide (Fig. 2; Tarvin et al., 2016). Insensibilidade à epibatidina, outro alcaloide encontrado em rãs-de-veneno, também foi elucidada recentemente (Tarvin et al., 2017). Este alcaloide interage com receptores nicotínicos de acetilcolina e o sítio de ligação do alcaloide é exatamente no mesmo sítio que a acetilcolina. Apenas uma substituição de aminoácidos nesse sítio foi encontrada, o suficiente para diminuir a sensibilidade do sítio à epibatidina, mas também à acetilcolina. Encontraram,

então, que outras substituições em regiões diferentes do receptor resgataram a capacidade da acetilcolina de se ligar, mantendo a insensibilidade ao alcaloide (Tarvin et al., 2017).

Apesar de substituições de aminoácidos aos alvos moleculares desses compostos proverem insensibilidade permitindo resistência e sequestro, elas podem não ser suficientes para alguns táxons devido a grande e complexa variedade de compostos que um mesmo indivíduo pode possuir (Pasteels, 1983; Jeckel et al., 2015a). Um exemplo desta grande

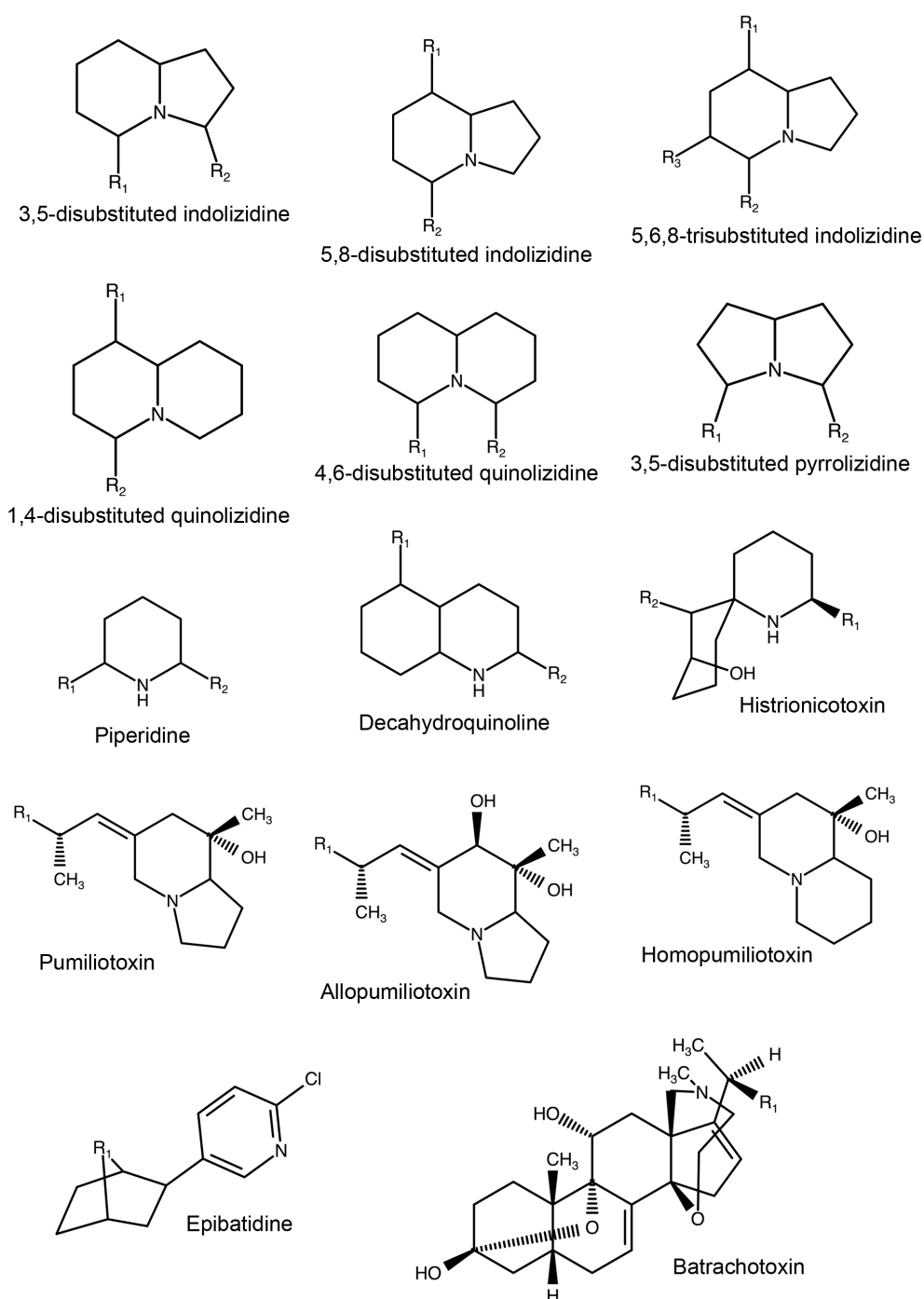


Figure 2. Estrutura química dos alcaloides comumente encontrados em rãs-de-veneno.

variação são as próprias rãs-de-veneno, que podem apresentar na sua pele dezenas de tipos de alcaloides diferentes, que podem ter ações variadas em diferentes moléculas-alvo (revisão em Daly et al., 2005). Por isso, além da insensibilidade, vias fisiológicas de resistência e metabolização dos compostos podem ter um papel importante na prevenção da autointoxicação.

Algumas estratégias de metabolização já foram descritas para insetos herbívoros. Essas estratégias servem para armazenar o composto em uma forma menos nociva ou para facilitar o sequestro, modificando a polaridade dos compostos, já que o transporte transmembrana de compostos apolares é mais fácil, e a manutenção de compostos polares no citosol é menos custoso (Duffey, 1980; Lindigkeit et al., 1997). Um exemplo bem estudado é o das larvas de algumas espécies de mariposas. As plantas possuem alcaloides pirrolizidina (AP) na forma N-oxidada (hidrofílica), que é a forma não tóxica. Quando ingerido, o AP é reduzido para sua forma de alcaloide terciária (lipofílica) no trato digestivo, ficando susceptível à ação das enzimas monooxigenase P450. As enzimas P450 participam na metabolização de xenobióticos lipofílicos, convertendo-os em metabólitos excretáveis. Porém, no caso de APs, eles convertem o alcaloide para uma forma instável, bioativando o composto e tornando-o tóxico. Os insetos capazes de sequestrar AP possuem as enzimas flavoproteicas que rapidamente N-oxidam o alcaloide para sua forma não tóxica, permitindo acúmulo e armazenagem (Hartmann e Ober 2000). Essa forma de estabilização dos compostos para sequestro também ocorre com a lagarta-da-raiz do milho (*Diabrotica virgifera virgifera* [LeConte, 1868]). Eles sequestram benzoxazinoides (BXD) presentes na planta do milho e acumulam principalmente na hemolinfa e na quitina do exoesqueleto (Robert et al., 2017). As plantas armazenam BXD na sua forma glicosilado, ou seja, com uma molécula de glicose acoplada. Quando atacada por um herbívoro, no próprio citoplasma da planta a BXD é deglicosilada, se tornando tóxica e fazendo com que o herbívoro cesse a alimentação (Wouters et al., 2016). As lagartas, por sua vez, se alimentam desses compostos e glicosilam os BXD no seu próprio trato digestivo, impedindo a ação tóxica e acumulando os compostos para defesa contra seus próprios entomopatógenos (Robert et al., 2017).

Diferente da detoxificação de compostos nocivos, o sistema de sequestro necessita que os compostos mantenham sua estrutura química básica intacta para manter também a sua funcionalidade. Por isso, existe uma grande variedade de sistemas em que cada espécie apresenta formas únicas de lidar com compostos específicos, permitindo absorção, transporte e armazenamento evitando a autointoxicação, mas mantendo a natureza defensiva do

composto sequestrado. Assim, o foco deste estudo é o sistema de sequestro de alcaloides por uma das linhagens de rãs-de-veneno, as rãs da família Dendrobatidae.

Rãs-de-veneno

Aproximadamente 160 espécies de anuros são capazes de sequestrar alcaloides da dieta, formando um conjunto polifilético de ampla distribuição geográfica chamado “rãs-de-veneno” (Fig. 3A), que inclui membros das famílias Bufonidae (*Melanophryniscus*; Daly et al., 1984), Dendrobatidae (gêneros *Ameerega*, *Epipedobates* e subfamília Dendrobatinae; Myers et al., 1978), Eleutherodactylidae (parte do grupo de espécies de *Eleutherodactylus limbatus*; Rodriguez et al., 2010), Mantellidae (*Mantella*; Daly et al., 1984) e Myobatrachidae (*Pseudophryne*; Daly et al., 1984). Todos esses gêneros não-relacionados compartilham diversas características, que podem estar ligados à capacidade de sequestro de alcaloides. As rãs-de-veneno são diurnas (Santos & Grant, 2010); são micrófagas, ou seja, se alimentam de presas pequenas (Toft, 1995; Bonanseira & Vaira, 2007; Moskowicz et al., 2018); tem tamanhos similares (15–45mm de comprimento rostro-cloacal); habitam normalmente a serapilheira dos ambientes; e geralmente apresentam coloração apossemática, ou seja, coloração que sinaliza presença de químicos defensivos para predadores visualmente orientados (Saporito et al., 2007b; Noonan & Comeault, 2008; Bordignon et al., 2018).

Dentre os dendrobatídeos, a capacidade de sequestrar alcaloides parece ter surgido pelo menos quatro vezes ao longo da filogenia da família (Grant et al., 2017), incluindo 10 dos 16 gêneros descritos (*Adelphobates*, *Andinobates*, *Ameerega*, *Dendrobates*, *Epipedobates*, *Minyobates*, *Oophaga*, *Paruwrobates*, *Phyllobates* e *Ranitomeya*; Fig. 4), e somando quase metade das 200 espécies da família (Frost, 2020). Apesar da monofilia do grupo ser bem suportada (Grant et al., 2017), a sua posição em relação a outros anuros ainda parece variar muito (e.g. Pyron 2014; Feng et al. 2017; Jetz and Pyron 2018). Os dendrobatídeos tem uma distribuição geográfica ampla, desde a Nicarágua passando pela bacia amazônica da Bolívia e sudeste brasileiro, até as Guianas (Frost, 2020).

Esse grupo é famoso por suas colorações brilhantes (Fig. 3B) e por seu diverso e muitas vezes complexo modo reprodução e cuidado parental. Diferentemente do modo clássico de reprodução de anfíbios em grandes corpos d’água, os dendrobatídeos desovam nas folhas da serapilheira ou em fitotelmos de bromélias e outras cavidades naturais. Além disso, algumas espécies possuem modos elaborados de cuidado parental, que podem envolver desde comportamento como o transporte de girinos no dorso para fitotelmos, até provisão de

ovócitos nutritivos como a única fonte de alimentação da larva. Outra característica desse grupo, que também pode estar relacionado com a reprodução, é a grande variedade de polimorfismo em algumas espécies. Estudos mostraram que as fêmeas podem basear a sua escolha de parceiro pela coloração do macho, e que a sua preferência pode ser resultado do *imprinting* durante a fase larval, enquanto foi carregado pelos seus progenitores (Yang et al., 2019). Todas as rãs desse grupo são diurnos e são forrageadores ativos, sendo que as espécies que sequestram são especialistas em formigas e ácaros (Santos et al., 2003; Darst et al., 2005), principal fonte dos alcaloides defensivos.

Mais de 1200 alcaloides de 28 classes estruturais diferentes já foram reportados para o grande grupo das rãs-de-veneno (Fig. 2; Daly et al., 2005; Jeckel et al., 2019). Acredita-se que os ácaros e formigas fornecem quase todos os tipos de alcaloides encontrados na pele desses anfíbios (Saporito et al., 2004, 2007). Devido a origem dos compostos defensivos, uma característica importante desse sistema é a grande variação inter e intraespecífica de tipos, quantidade e composição de alcaloides. Fatores como a localização geográfica (Saporito et al., 2006, 2007), a estação (Saporito et al., 2010a), a idade e os estágios de vida (Daly et al., 2002; Stynoski et al., 2014; Jeckel et al., 2015) e o tamanho corporal (Saporito et al., 2010b) interferem diretamente na composição e quantidade de alcaloides presentes em cada indivíduo e população.

Além das causas dessa grande variação, as consequências também são importantes para entender como, quanto e se essa característica funciona como um mecanismo de defesa contra os inimigos naturais das rãs-de-veneno. A relação da presença de alcaloides com a coloração é sinalizada através da coloração aposemática desses animais para seus predadores visualmente orientados, em especial as rãs da família Dendrobatidae (Saporito et al., 2007b; Noonan & Comeault, 2008). A relação direta entre parâmetros visuais e a diversidade de alcaloides, porém, ainda é controversa. Alguns estudos demonstraram que indivíduos de populações com parâmetros de brilho ou tonalidade mais altas, tendem a ser mais “tóxicas” do que indivíduos com a pele com coloração mais opaca (Summers & Clough, 2001; Maan & Cummings, 2012). Entretanto, outros estudos encontraram relação inversa ou até mesmo nenhuma relação entre esses fatores (Daly & Myers, 1967; Wang, 2011; Lawrence et al., 2019). Independentemente dos valores dos parâmetros visuais, as colorações dão um sinal

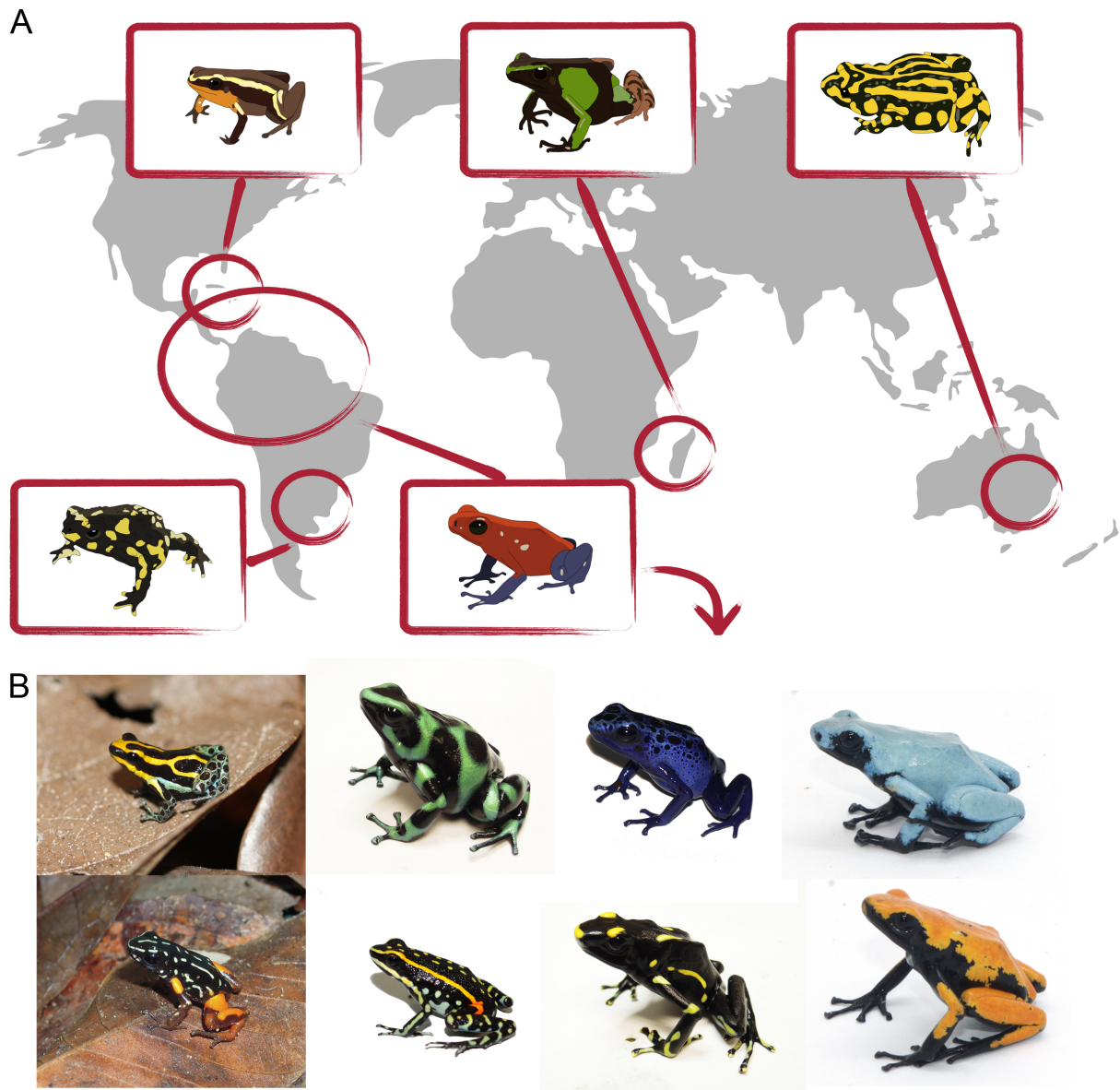


Figura 3. A) Distribuição geográfica das cinco famílias de anuros que sequestram alcaloides: Eleutherodactylidae (parte do grupo *Eleutherodactylus limbatus*) de Cuba, Mantellidae de Madagascar, Myobatrachidae da Austrália, Bufonidae da região sul da América do Sul, e Dendrobatidae, da região Neotropical das Américas Central e Sul. B) Rãs-de-veneno da família Dendrobatidae. Da esquerda para direita, de cima para baixo: *Ranitomeya amazônica*, *Dendrobates auratus*, *Dendrobates tinctorius*, *Adelphobates galactonotus*, *Adelphobates castaneoticus*, *Ameerega flavopicta* (foto de M. Anganoy-Criollo), *Dendrobates tinctorius*, *Adelphobates galactonotus*.

honesto da presença de compostos nocivos para os seus predadores visualmente orientados (Stuckert et al., 2014, 2018).

Parte da variação encontrada entre indivíduos, populações e espécies também pode ser consequência de variações no mecanismo de sequestro. Apesar de se intuir que o mecanismo deva ser similar, se não igual, para as espécies que sequestram dentre os

Dendrobatidae, estudos com alimentação controlada de alcaloides mostram que nem sempre o sistema responde de forma igual a todos os tipos de alcaloide. Nos primeiros experimentos de alimentação com alcaloides, diferenças no sequestro entre tipos de alcaloides já eram evidenciados. Por exemplo, *Dendrobates auratus* (Girard, 1855) prontamente sequestrou as decahidroquinolinas, pirrolidinas, indolizidinas, quinolizidinas e histrionicotoxinas oferecidas na alimentação, mas não sequestrou a pirrolidina 2,5-disubstituída nem a piperidina 2,6-disubstituída (Daly et al., 1994). Modificações de alcaloides também evidenciam que nem toda diversidade de alcaloides é diretamente resultado da disponibilidade na dieta. Por exemplo, *Adelphobates castaneoticus* (Caldwell & Myers, 1990), *A. galactotnotus* (Steindachner, 1864) e *D. auratus* sequestram e hidroxilam o alcaloide PTX **251D** em um composto cinco vezes mais tóxico, a alopumiliotoxina (aPTX) (+)-**267A**, enquanto que *Epipedobates anthony* e *Phyllobates bicolor* sequestram PTX **251D** sem modificações (Daly et al., 2003). Além disso, as mesmas espécies que modificam o PTX **251D** parecem não sequestrar eficientemente o alcaloide decahidroquinolina (DHQ) **233F** (Daly et al., 2003). A variação e a especificidade do sistema ficam ainda mais complexas quando são oferecidos alcaloides que não são encontrados naturalmente em certas espécies. Por exemplo, *Oophaga pumilio* (Schmidt, 1857) sequestra uma forma não natural de DHQ (apenas o esqueleto da estrutura básica do alcaloide, sem as substituições naturais nas posições 2 e 5), armazenando o alcaloide nas glândulas da pele e até transferindo o alcaloide para os ovócitos de alimentação para seus girinos (Saporito et al., 2019). Um outro exemplo é a epibatidina, um tipo de alcaloide encontrado apenas em espécies do gênero *Ameerega* e *Epipedobates* (Spande et al., 1992). Quando ela foi oferecida para duas espécies do gênero *Dendrobates*, apenas *D. auratus* sequestrou o alcaloide, enquanto *D. tinctorius* (Cuvier, 1797) não sequestrou (Sanchez et al., 2019). Esses exemplos demonstram que todos os alcaloides presentes na pele desses animais provêm da dieta, mas nem todos os alcaloides disponíveis na dieta são sequestrados e armazenados nas glândulas da pele.

Neste contexto, o objetivo geral da presente tese de doutorado foi avaliar como o mecanismo de sequestro pode interferir na variação de tipos, quantidade e composição geral de alcaloides encontrados em rãs-de-veneno da família Dendrobatidae.

Apresentação dos capítulos da tese

Devido à grande variedade de colorações exuberantes e ao seu comportamento de atividade diurna, existe um grande mercado para criadores desses anfíbios como animais de estimação nos países europeus e norte-americanos, ou como atrações em zoológicos e

aquários do mundo inteiro. Independente de questões éticas e legais, como o possível incentivo à biopirataria, o movimento de criação *ex situ* de rãs-de-veneno produziu uma gama de informações sobre a manutenção e reprodução das mesmas em cativeiro (Lötters et al., 2010), facilitando a sua criação também para fins científicos. Como as rãs-de-veneno adquirem as toxinas da alimentação, os animais nascidos em cativeiro são totalmente desprovidos de qualquer tipo de alcaloide na pele. Esta característica permite que experimentos de alimentação controlada de alcaloides possam ser feitos em laboratório para testar diversas hipóteses sobre o sequestro e, também, sobre a relação do alcaloide com outros fatores, como a coloração da pele e o comportamento.

Para a primeira parte deste estudo, foi eleita a espécie *Adelphobates galactonotus* como modelo, por ser uma espécie brasileira que metaboliza um tipo de alcaloide (Daly et al., 2003). Essa espécie está distribuída na região das florestas de várzea ao sul do rio Amazonas, a leste do rio Tapajós e até a foz do rio Amazonas (Frost, 2020), e tem uma grande variedade de coloração dorsal, com populações que variam de amarelo, laranja e vermelho a azul claro, todas elas contrastando com a coloração ventral preta (Hoogmoed & Ávila-Pires, 2012). Em janeiro de 2017, foram coletados indivíduos adultos de *A. galactonotus* na Floresta Nacional de Caxiuanã, Pará, Brasil. Na região da baía de Caxiuanã, ocorrem dois morfotipos de coloração contrastante, o laranja e o azul claro, cada tipo ocorrendo em lados opostos da baía (Hoogmoed & Ávila-Pires, 2012). A fim de identificar os alcaloides presentes naturalmente nos indivíduos dessas duas populações e, para garantir o sucesso da reprodução em cativeiro independente do morfotipo, foram coletados indivíduos das duas populações e transportados para as dependências do Biotério do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, em colaboração com o Prof. Carlos Jared e Prof^a Marta Maria Antoniazzi. Após identificação de todos os indivíduos através de foto-identificação e determinação do sexo, através da dilatação relativa da região distal da última falange dos dedos da mão (Lötters et al., 2010), estabeleceram-se casais para serem mantidos em terrários apropriados para reprodução (Lötters et al., 2010). Dez indivíduos (5 de cada morfotipo) foram utilizados para avaliar a variação de composição de alcaloides e de palatabilidade entre as duas populações. Esta fase foi importante para a determinação dos tipos de alcaloides sequestrados nessas populações e para verificar possíveis diferenças de quantidade ou predominância de algum determinado tipo de alcaloide. Esse estudo resultou no **capítulo 1** desta tese, intitulado “*Geographically separated orange and blue populations of the Amazonian poison frog Adelphobates galactonotus (Anura, Dendrobatidae) do not differ in alkaloid composition or palatability*”, publicada na *Chemoecology*, em novembro de 2019.

Para a segunda parte deste estudo, e a primeira parte experimental, o objetivo foi investigar se o sequestro de alcaloides, tanto no tipo quanto na quantidade, é limitado pela disponibilidade de alcaloides na dieta ou pelo próprio mecanismo de sequestro. Para responder à pergunta, foram testados dois tipos de alcaloides, oferecidos em três concentrações diferentes de cada tipo para as rãs. A hipótese era de que o mecanismo de sequestro seria o mais eficiente possível, sequestrando todo o alcaloide disponível, independente da quantidade. Isso porque, como essas rãs dependem do alcaloide disponível na alimentação para sequestro, os sistemas de absorção, transporte e armazenagem seriam quase que 100% eficientes. Mas, antes da finalização desta etapa do experimento, desenvolveu-se no laboratório um novo método de alimentação de alcaloides de uma forma que fosse possível quantificar o alcaloide oferecido e sequestrado para cada indivíduo experimental.

Apesar dos aspectos ecológicos relacionados aos alcaloides tegumentares de rãs-de-veneno serem estudados desde os anos 1960, o sequestro só foi confirmado em meados de 1990. O método utilizado para experimentos de alimentação, desde então, é a indução da ingestão de alcaloides através de uma mistura de alcaloide em pó com a vitamina de dieta pulverizada em drosófilas (Daly et al., 1994; Hantak et al., 2013). Os grãos ficam grudados em pequenas quantidades nas moscas e os sapos se alimentam e ingerem os alcaloides. O sequestro é então comprovado depois de alguns dias ou semanas de alimentação, analisando a pele desses animais, através de métodos de separação e identificação de compostos, como cromatografia líquida ou gasosa acompanhada de análise de espectrometria de massas. Esse método de alimentação de alcaloides foi e ainda é amplamente utilizado em experimentos de sequestro com as diversas linhagens de rãs-de-veneno (Hantak et al., 2013; Saporito et al., 2019; Sanchez et al., 2019). A desvantagem desse método é que não permite a quantificação do alcaloide ingerido, permitindo comparar eficiência de sequestro apenas indiretamente, comparando proporção de dois ou mais alcaloides sequestrados em relação a proporção oferecida (Hantak et al., 2013).

No **capítulo 2**, foi descrito o novo método de administração de alcaloide em rãs-de-veneno que consiste em, utilizando uma micropipeta, injetar uma solução de alcaloide dissolvido em álcool 50% diretamente na parte posterior da boca do animal. Já que esse método permite a administração de quantidades exatas de alcaloide no organismo, outro método descrito foi de determinação da concentração de alcaloide a ser administrada por vez. Como o objetivo desse experimento era testar a eficiência de sequestro, a quantificação de alcaloide administrada por dia deveria ser biologicamente relevante. Era importante não

exceder na quantidade administrada por dia, pois não havia informação se isso poderia desencadear outro tipo de reação do animal, como uma reação de detoxificação. Assim que os protocolos de alimentação foram estabelecidos, neste capítulo, foi demonstrado que o mecanismo de sequestro responde de forma diferente para cada alcaloide testado e que a eficiência difere dependendo da concentração administrada por dose. O capítulo, intitulado “*Dose dependent sequestration efficiency in poison frogs*”, será submetido à revista *Physiological and Biochemistry Zoology*.

O terceiro aspecto investigado foi a distribuição espaço-temporal do alcaloide no corpo depois de ingerido. Ao avaliar quais órgãos e tecidos entram em contato com o alcaloide antes de ser armazenado na pele, pode-se inferir que tipo de transportadores estariam envolvidos no sequestro e onde ocorreriam os mecanismos como a modificação de alcaloides. A distribuição anatômica dos alcaloides em animais coletados da natureza foi reportada para poucas espécies, demonstrando presença de alcaloides em tecidos como fígado, músculo e ovário (Grant et al., 2012; Stynoski et al., 2014). Esse tipo de avaliação não permite sugerir o envolvimento desses tecidos com o sequestro em si, pois em animais coletados da natureza não se sabe quando e o que comeram pela última vez. Com o objetivo de determinar a distribuição dos alcaloides em determinados tempos depois da administração, utilizou-se o método de imageamento através de espectrômetro de massas (*Mass Spectrometry Imaging* - MSI). Esse método separa, ioniza e detecta as substâncias diretamente do espécime, produzindo um conjunto de espectros de massa representando a composição molecular de um pixel de uma secção de um tecido (McDonnell & Heeren, 2007). Através de um software especializado, os pixels são combinados para montar a imagem final do corte analisado. A vantagem desse método sobre outros como histoquímica ou imunohistoquímica é que, além de permitir detectar mais de um tipo de composto por vez, também não necessita de marcadores com afinidade específica a determinados tipos de moléculas. Dependendo da técnica de espectrometria de massas, é dispensado qualquer tipo de tratamento ao tecido alvo, minimizando contaminação ou lavagem da molécula (Cooks et al., 2006). O método específico empregado foi o chamado imageamento por espectrometria de massas com ionização de dessorção por *eletrospray* (DESI-MSI; Wiseman et al., 2008). O treinamento e a obtenção dos dados com essa técnica, de julho de 2018 a janeiro de 2019, foram possíveis com a concessão da Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) pela FAPESP e pela acolhida no laboratório do Dr. Demian Ifa, na York University, em Toronto, Canadá. Durante esse período, desenvolveu-se um protocolo de criosecção e de detecção de alcaloides em cortes de corpo inteiro em rãs, que resultou, em abril de 2020, em uma

publicação de descrição do método na *Journal of Mass Spectrometry* intitulado “*Use of whole-body cryosectioning and desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging to visualize alkaloid distribution in poison frogs*” (**capítulo 3**).

Ao combinar o método de MSI com o método já comumente empregado pelo nosso grupo de pesquisa, o GC-MS, foi possível o mapeamento e a quantificação (em diferentes tempos após a administração) de alcaloides no corpo de rãs que receberam uma dose única de alcaloides. Dessa forma, o objetivo desse capítulo foi determinar a distribuição espaço-temporal dos alcaloides após a ingestão. Com esses dois métodos pudemos avaliar a rapidez de sequestro, além da eficiência de uma dose única. Nesta terceira etapa do projeto, desenvolvida totalmente na York University (DESI-MSI) e na John Carroll University (GC-MS), utilizou-se como modelo a espécie *Dendrobates tinctorius*. Esta espécie foi usada para estudos anteriores com alimentação de alcaloide e é facilmente adquirida no mercado de animais de estimação nos Estados Unidos. O **capítulo 4**, intitulado “*Sequestration timeframe and systemic distribution of two alkaloids in a Dendrobatid poison frog*”, sugere pela primeira vez que o mecanismo de sequestro é ainda mais rápido do que anteriormente sugerido e que a distribuição anatômica do alcaloide não varia entre os dois alcaloides testados. Este capítulo será submetido ao *Journal of Experimental Biology*.

O principal aspecto que interfere na presença de alcaloides, obviamente, é a capacidade de sequestrar ou não os alcaloides disponíveis na dieta. Na família Aromobatidae, o grupo irmão de Dendrobatidae (Grant et al., 2017), existem espécies simpátricas com várias espécies de rãs-de-veneno, porém nenhuma análise detectou acúmulo de alcaloide nessas espécies. Além disso, dentro da família Dendrobatidae, existem diversos gêneros em que nenhum alcaloide foi detectado na pele (Fig. 4). Em um estudo (Daly et al., 1994), *Allobates talamancae* (Cope, 1875; Aromobatidae) e *Colostethus panamansis* (Dunn, 1933; Dendrobatidae) foram alimentados com dieta contendo alcaloides por cinco semanas, o mesmo tratamento que as rãs-de-veneno *Dendrobates auratus* e *Phyllobates bicolor* Bibron, 1840 (Dendrobatidae). As duas espécies de rãs-de-veneno sequestraram eficientemente o alcaloide provido na dieta, enquanto o *Allobates* e *Colostethus* não acumularam nada do alcaloide na pele. Mesmo assim, não foi reportado nenhum tipo de efeito adverso nessas duas

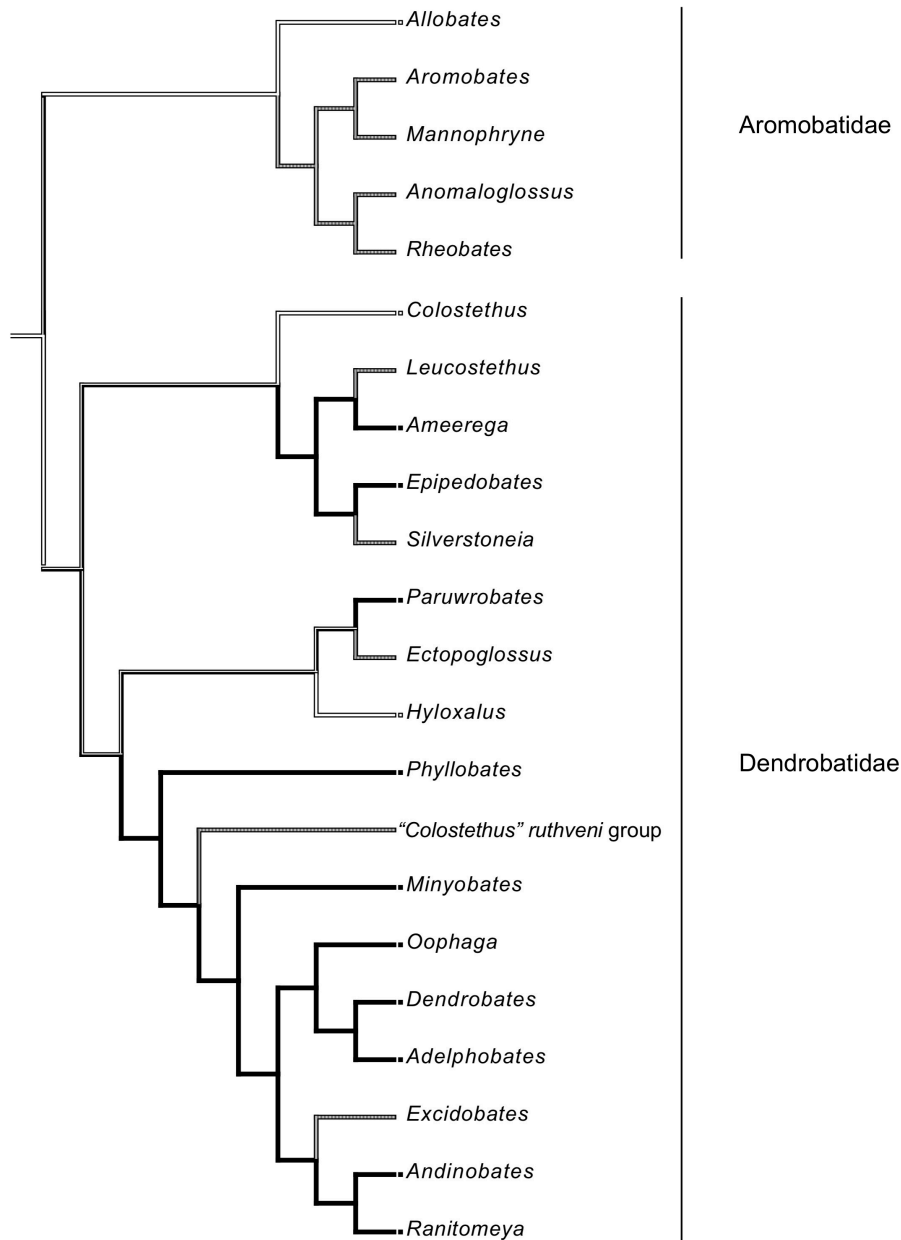


Figura 4. Distribuição filogenética da presença e ausência de alcaloides na pele. Em preto, os gêneros em que foram testados e foram detectados alcaloides; em branco, os gêneros que foram testados e não foram encontrados alcaloides; e em cinza, os gêneros sem informação sobre presença de alcaloides. Topologia retirada de Grant et al 2017.

espécies. Como o alcaloide provém da dieta, esses compostos devem estar expostos a caminhos farmacocinético de um xenobiótico qualquer, sofrendo os mecanismos necessários para excreção. Independentemente do mecanismo de resistência à autointoxicação, presume-se que a resistência tenha surgido antes da capacidade de sequestro (Darst et al., 2005; Mohammadi et al., 2016). Provavelmente, nos animais que sequestram, esse caminho metabólico é modificado para possibilitar o sequestro e o armazenamento dos compostos.

Esse caminho metabólico, porém, pode resultar também em modificação de determinados alcaloides, como comentado anteriormente. Enzimas específicas modificam alcaloides sequestrados da dieta em outros alcaloides (Daly et al., 2003), podendo ter um papel na diversidade dos alcaloides encontrados na pele de diferentes espécies. A última etapa do projeto então, foi testar se a resistência a alcaloides é plesiomórfica para rãs-de-veneno e seus parentes que não sequestram, como membros da família Aromobatidae. Além disso, comparou-se a eficiência de sequestro e a capacidade de modificação de alcaloide em diferentes espécies de rãs-de-veneno em diferentes experimentos de alimentação de alcaloide. Este capítulo sugere a existência de um mecanismo plesiomórfico em anuros para enfrentar os efeitos nocivos dos alcaloides, e que, aparentemente, foi diminuído em rãs-de-veneno, permitindo a evolução da capacidade de sequestro. O **capítulo 5** é intitulado “*The evolution of sequestration of alkaloids in poison frogs*” e será submetido para a *Proceeding of the National Academy of Sciences*.

Todos os capítulos serão formatados em estilo de manuscrito a ser submetido aos jornais citados. Por questões estéticas, as formatações como títulos, margem e espaçamento de linhas seguirão o padrão sugerido pelo modelo de dissertações do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Referências

- Adams ES, Traniello JFA (1981) Chemical interference competition by *Monomorium minimum* (Hymenoptera: Formicidae). *Oecol* 51(2): 265–270.
<https://doi.org/10.1007/BF00540612>
- Adams RMM, Liberti J, Illum AA, Jones TH, Nash DR, Boomsma JJ (2013) Chemically armed mercenary ants protect fungus-farming societies. *Proc Nat Acad Scie USA* 110(39): 15752–15757. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311654110>
- Adams RMM, Jones TH, Longino JT, Weatherford RG, Mueller UG (2015) Alkaloid Venom Weaponry of Three *Megalomyrmex* Thief Ants and the Behavioral Response of *Cyphomyrmex costatus* Host Ants. *J Chem Ecol*. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0565-y>
- Agrawal AA, Petschenka G, Bingham RA, Weber MG, Rasmann S (2012) Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant–herbivore interactions. *New Phytol* 194: 28–45.
- Badio B, Daly JW (1994) Epibatidine, a Potent Analgetic and Nicotinic Agonist. *Mol Pharmacol* 45: 563–569.
- Barnett CA, Bateson M, Rowe C (2014) Better the devil you know: avian predators find variation in prey toxicity aversive. *Biol Letters* 10:20140533.
<http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2014.0533>
- Bewley CA, Holland ND, Faulkner DJ (1996) Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* 52(7): 716–722. <http://doi.org/10.1007/BF01925581>
- Blum MS, Wallace JB, Fales HM (1973) Skatole and tridecene: Identification and possible role in a chrysopid secretion. *Insect Biochem* 3(12): 353–357.
[http://doi.org/10.1016/0020-1790\(73\)90068-1](http://doi.org/10.1016/0020-1790(73)90068-1)
- Boie H (1826) Merkmale einiger japanischer Lurche. *Isis von Oken, Jena*. 18–19: 203–216
- Bolton SK, Dickerson K, Saporito RA (2017) Variable Alkaloid Defenses in the Dendrobatid Poison Frog *Oophaga pumilio* are Perceived as Differences in Palatability to Arthropods. *J Chem Ecol* 43(3): 273–289. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0827-y>
- Bonanseal MI, Vaira M (2007) Geographic Variation of the Diet of *Melanophryniscus rubriventris* (Anura: Bufonidae) in Northwestern Argentina. *J Herpet* 41(2): 231–236.
[https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2007\)41\[231:GVOTDO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2007)41[231:GVOTDO]2.0.CO;2)
- Bordignon DW, Caorsi VZ, Colombo P, Abadie M, Brack IV, Dasoler B., Borges-Martins M (2018) Are the unken reflex and the aposematic colouration of red-bellied toads

- efficient against bird predation? *PLoS ONE* 13(3): 1–13.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193551>
- Bramer C, Dobler S, Deckert J, Stemmer M, Petschenka G (2015) Na⁺/K⁺-ATPase resistance and cardenolide sequestration: basal adaptations to host plant toxins in the milkweed bugs (Hemiptera: Lygaeidae: Lygaeinae). *Proc Biol Soc B* 282(20142346).
- Brodie III ED, Feldman CR, Hanifin CT, Motychak JE, Mulcahy DG, Williams BL, Brodie Jr ED (2005) Parallel Arms Races between Garter Snakes and Newts Involving Tetrodotoxin as the Phenotypic Interface of Coevolution. *J Chem Ecol* 31(2): 343–356. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-1345-x>
- Brower LP, Ryerson WN, Coppinger LL, Glazier SC (1968) Ecological Chemistry and the Palatability Spectrum. *Science* 161(September): 1349–1350.
- Brower LP, Seiber JN, Nelson CJ, Lynch SP, Hoggard MP, Cohen JA (1984) Plant-determined variation in cardenolide content and thin-layer chromatography profiles of monarch butterflies, *Danaus plexippus* reared on milkweed plants in California. *J Chem Ecol* 10(12): 1823–1857. <https://doi.org/10.1007/BF00987364>
- Brückmann M, Trigo JR, Foglio MA, Hartmann T (2000) Storage and metabolism of radioactively labeled pyrrolizidine alkaloids by butterflies and larvae of *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae, Ithomiinae). *Chemoecology* 10: 25–32.
<http://doi.org/10.1007/s000490050004>
- Caldwell JP, Myers CW (1990) A new poison frog from Amazonian Brazil, with further revision of the *quinquevittatus* group of *Dendrobates*. *Am Mus Novit* 2988: 1–21
- Cei JM, Erspamer V, Roseghini M (1967) Taxonomic and Evolutionary Significance of Biogenic Amines and Polypeptides Occurring in Amphibian Skin. I. Neotropical Leptodactylid Frogs. *Syst Zool* 16(4): 328–342.
- Chau R, Kalaitzis JA, Neilan, BA (2011) On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. *Aquat Toxicol* 104(1–2): 61–72. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.04.001>
- Cimino G, Ghiselin MT (1998). Chemical defense and evolution in the *Sacoglossa* (Mollusca: Gastropoda: Opisthobranchia). *Chemoecology* 8(2): 51–60.
<http://doi.org/10.1007/PL00001804>
- Cohen JA, Brower LP (1982) Oviposition and Larval Success of Wild Monarch Butterflies (Lepidoptera : *Danaidae*) in Relation to Host Plant Size and Cardenolide Concentration. *J Kansas Entomol Soc* 55(2): 343–348.
<https://doi.org/10.2307/25084295>

- Clarke BT (1997) The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol Rev* 72(3): 365–379.
- Cooks RG, Ouyang Z, Takats Z, Wiseman JM (2006) Ambient Mass Spectrometry. *Science* 311(March): 1566–1570.
- Cope ED. (1875 "1876"). On the Batrachia and Reptilia of Costa Rica. *J Acad Nat Sci PHL*. 8: 93–154.
- Cuvier GLCFD (1797) "An. VI". Tableau Élémentaire de l'Histoire Naturelle des Animaux. Paris: Baudoin.
- Daly JW, Witkop B, Bommer P, Biemann K, Wiktop B (1965) Batrachotoxin. The Active Principle of the Colombian Arrow Poison Frog, *Phyllobates bicolor*. *J Am Chem Soc* 87(1): 124–126.
- Daly JW, Myers CW (1967) Toxicity of Panamanian poison frogs (*Dendrobates*): some biological and chemical aspects. *Science* 156(3777): 970–973.
- Daly JW, Hight RJ, Myers CW (1984). Occurrence of skin alkaloids in non-dendrobatid frogs from Brazil (Bufonidae), Australia (Myobatrachidae) and Madagascar (Mantellinae). *Toxicon* 22: 905–19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6523513>
- Daly JW, Secunda S, Garraffo HM, Spande TF, Wisnieski A, Cover Jr JF (1994) An Uptake System for Dietary Alkaloids in Poison Frogs (Dendrobatidae). *Toxicon* 32: 657–663.
- Daly JW, Kaneko T, Wilham J, Garraffo HM, Spande TF, Espinosa A, Donnelly MA (2002) Bioactive alkaloids of frog skin: combinatorial bioprospecting reveals that pumiliotoxins have an arthropod source. *Proc Nat Acad Sci USA* 99(22): 13996–14001. <https://doi.org/10.1073/pnas.222551599>
- Daly JW, Garraffo HM, Spande TF, Clark VC, Ma J, Ziffer H, Cover J F (2003) Evidence for an enantioselective pumiliotoxin 7-hydroxylase in dendrobatid poison frogs of the genus *Dendrobates*. *Proc Nat Acad Sci USA* 100: 11092–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.1834430100>
- Daly JW, Spande TF, Garraffo HM (2005) Alkaloids from Amphibian Skin: A Tabulation of Over Eight-Hundred Compounds. *J Nat Prod* 68: 1556–1575. <http://doi.org/10.1021/np0580560>
- Darst CR, Menéndez-Guerrero PA, Coloma LA, Cannatella DC (2005) Evolution of dietary specialization and chemical defense in poison frogs (Dendrobatidae): a comparative analysis. *Am Nat* 165(1): 56–69. <https://doi.org/10.1086/426599>

- Despres L, David JPP, Gallet C, Després L, David JPP, Gallet C (2007) The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol Evol* 22(6): 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.02.010>
- Detzel A, Wink M (1995) Evidence for a Cardenolide Carrier in *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Insecta: Hemiptera). *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C J Biosciences*, 50: 127–134. <http://doi.org/10.1515/znc-1995-1-219>
- Dobler S, Daloze D, Pasteels JM (1998) Sequestration of plant compounds in a leaf beetle's defensive secretion: Cardenolides in *Chrysochus*. *Chemoecology* 8(3): 111–118. <https://doi.org/10.1007/s000490050015>
- Dobler S, Dalla S, Wagschal V, Agrawal AA (2012) Community-wide convergent evolution in insect adaptation to toxic cardenolides by substitutions in the Na,K-ATPase. *Proc Nat Acad Sci USA* 109(32): 13040–13045. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202111109>
- Duffey SS, Scudder GGE (1972) Cardiac glycosides in North American Asclepiadaceae, a basis for unpalatability in brightly coloured Hemiptera and Coleoptera. *J Insect Phys* 18(1): 63–78. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(72\)90065-0](https://doi.org/10.1016/0022-1910(72)90065-0)
- Duffey SS, Blum MS, Isman MB, Scudder GGE (1978) Cardiac glycosides: A physical system for their sequestration by the milkweed bug. *J Insect Phys* 24(8–9): 639–644. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(78\)90127-0](https://doi.org/10.1016/0022-1910(78)90127-0)
- Duffey SS (1980). Sequestration of Plant Natural Products by Insects. *Annu Rev Entomol* 25(1): 447–477. <http://doi.org/10.1146/annurev.en.25.010180.002311>
- Dumbacher J, Beehler BM, Spande TF, Garraffo HM, Daly JW (1992) Homobatrachotoxin in the Genus *Pitohui*: Chemical Defense in Birds? *Science* 258: 799–800.
- Dumbacher JP, Menon G, Daly JW (2009). Skin as a toxin storage organ in the endemic New Guinean genus *Pitohui*. *The Auk* 126(3): 520–530.
- Dunn ER (1933) Amphibians and reptiles from El Valle de Anton, Panama. *Occasional Papers of the Boston Society of Natural History* 8: 65–79.
- Dussourd DE, Harvis CA, Meinwald J, Eisner T (1989) Paternal allocation of sequestered plant pyrrolizidine alkaloids to eggs in the danaine butterfly, *Danaus gilippus*. *Experientia* 45: 896–898.
- Ehmke A, Witte L, Biller A, Hartmann T (1990) Sequestration, N-oxidation and transformation of plant pyrrolizidine alkaloids by the arctiid moth *Tyria jacobaeae* L. *Z Naturforsch* 45c: 1185–1192.

- Erb M, Robert CAM (2016) Sequestration of plant secondary metabolites by insect herbivores: Molecular mechanisms and ecological consequences. *Curr Opin Insect Sci* 14: 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.11.005>
- Erspamer V (1954) Pharmacology of Indolealkylamines. *Pharmacol Rev* 6(4): 425–487.
- Erspamer V (1994) Bioactive Secretions of the Amphibian Integument. *In Amphibian Biology* pp. 178–350.
- Feldman CR, Brodie Jr ED, Brodie III ED, Pfrender ME (2012) Constraint shapes convergence in tetrodotoxin-resistant sodium channels of snakes. *Proc Nat Acad Sci USA*, 109(12): 4556–4561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113468109>
- Feng YJ, Blackburn DC, Liang D, Hillis DM, Wake DB, Cannatella DC, Zhang P (2017) Phylogenomics reveals rapid, simultaneous diversification of three major clades of Gondwanan frogs at the Cretaceous–Paleogene boundary. *Proc Nat Acad Sci USA* 114(29): E5864–E5870. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704632114>
- Flórez LV, Biedermann PHW, Engl T, Kaltenpoth M (2015) Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Nat Prod Rep* 32(7): 904–936. <http://doi.org/10.1039/C5NP00010F>
- Frost DR (2020) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.1 (Date of access). Electronic Database accessible at <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA. doi.org/10.5531/db.vz.0001
- Geffeney S, Brodie ED, Ruben PC, Brodie ED (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 SL, Fujimoto E, Brodie Jr ED, Brodie III ED, Ruben PC (2005) Evolutionary diversification of TTX-resistant sodium channels in a predator-prey interaction. *Nature* 434(7034): 759–763. <https://doi.org/10.1038/nature03392>
- Girard C (1855 "1854") Abstract of a report to Lieut. James M. Gilliss, U.S.N., upon the reptiles collected during the U.S.N. Astronomical Expedition to Chili. *P Acad Nat Sci Phila* 7: 226.
- Grant T, Colombo P, Verrastro L, Saporito RA (2012) The occurrence of defensive alkaloids in non-integumentary tissues of the Brazilian red-belly toad *Melanophryniscus simplex* (Bufonidae). *Chemoecology* 22(3): 169–178. <https://doi.org/10.1007/s00049-012-0107-9>

- Grant T, Rada M, Anganoy-Criollo M, Batista A, Dias PH, Jeckel AM, Machado DJ, Rueda-Almonacid JV (2017) Phylogenetic Systematics of Dart-Poison Frogs and Their Relatives Revisited (Anura: Dendrobatoidea). *S Am J Herpetol* 12.
<http://doi.org/10.2994/SAJH-D-17-00017.1>
- Gray JE (1868) Note on Theonella, a new genus of coralloid sponges from Formosa. *P Zool Soc Lond*
- Hanifin CT, Brodie Jr ED, Brodie III ED (2008) Phenotypic mismatches reveal escape from arms-race coevolution. *PLoS Biol* 6(3): e60.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060060>
- Hantak MM, Grant T, Reinsch S, Mcginnity D, Loring M, Toyooka N, Saporito RA (2013) Dietary Alkaloid Sequestration in a Poison Frog: An Experimental Test of Alkaloid Uptake in *Melanophryniscus stelzneri* (Bufonidae). *J Chem Ecol* 39: 1400–1406.
<http://doi.org/10.1007/s10886-013-0361-5>
- Hartmann T, Ober D (2000) Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. *Top Curr Chem* 209: 208–243.
<http://doi.org/10.1007/3-540-48146-X>
- Hartmann T, Theuring C, Schmidt J, Rahier M, Pasteels JM (1999) Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adults and larvae of chrysomelid leaf beetles. *J Insect Physiol* 45(12): 1085–1095. [http://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00093-1](http://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00093-1)
- Heidel-Fischer H, Vogel H (2015) Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds. *Curr Opin Insect Sci* 8: 8–14.
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.02.004>
- Holzinger F, Wink M (1996) Mediation of cardiac glycoside insensitivity in the monarch butterfly (*Danaus plexippus*): Role of an amino acid substitution in the ouabain binding site of Na⁺,K⁺-ATPase. *J Chem Ecol* 22(10): 1921–1937.
<http://doi.org/10.1007/BF02028512>
- Hoogmoed MS, Avila-Pires TC (2012) Inventory of color polymorphism in populations of *Dendrobates galactonotus* (Anura: Dendrobatidae), a poison frog endemic to Brazil. *Phyllomedusa* 11(2): 95–115. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v11i2p95-115>
- Huan JY, Miranda CL, Buhler DR, Cheeke PR (1998) The Roles of CYP3A and CYP2B Isoforms in Hepatic Bioactivation and Detoxification of the Pyrrolizidine Alkaloid Senecionine in Sheep and Hamsters. *Toxicol Appl Pharm* 151(2): 229–235.
<https://doi.org/10.1006/taap.1998.8482>

- Hutchinson DA, Mori A, Savitzky AH, Burghardt GM, Wu X, Meinwald J, Schroeder FC (2007) Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. *Proc Nat Acad Sci USA* 104(7): 2265–2270.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0610785104>
- Isman MB, Duffey SS, Scudder GGE (1977) Cardenolide content of some leaf- and stem-feeding insects on temperate North American milkweeds (*Asclepias* spp.). *Can J Zool* 55(6): 1024–1028. <https://doi.org/10.1139/z77-130>
- Jeckel AM, Grant T, Saporito RA (2015a) Sequestered and Synthesized Chemical Defenses in the Poison Frog *Melanophryniscus moreirae*. *J Chem Ecol* 41(5): 505–512.
<http://doi.org/10.1007/s10886-015-0578-6>
- Jeckel AM, Saporito RA, Grant T (2015b) The relationship between poison frog chemical defenses and age, body size, and sex. *Front Zool* 12(1): 27.
<http://doi.org/10.1186/s12983-015-0120-2>
- Jeckel AM, Kocheff S, Saporito RA, Grant T (2019) Geographically separated orange and blue populations of the Amazonian poison frog *Adelphobates galactonotus* (Anura , Dendrobatidae) do not differ in alkaloid composition or palatability. *Chemoecology* 29(0123456789): 225–234. <https://doi.org/10.1007/s00049-019-00291-3>
- Jetz W, Pyron RA (2018) The interplay of past diversification and evolutionary isolation with present imperilment across the amphibian tree of life. *Nat Ecol Evol* 2(5): 850–858.
<https://doi.org/10.1038/s41559-018-0515-5>
- Jones TH, Blum MS (1982) Ant venom alkaloids from *Solenopsis* and *Monomorium* species. *Tetrahedron* 38(13): 1949–1958. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(82\)80044-6](https://doi.org/10.1016/0040-4020(82)80044-6)
- Jones TH, Gorman JST, Snelling RR, Delabie JHC, Blum MS, Garraffo HM, ... Spande TF (1999) Further alkaloids common to ants and frogs: Decahydroquinolines and a quinolizidine. *J Chem Ecol* 25(5): 1179–1193.
<https://doi.org/10.1023/A:1020898229304>
- König E, Bininda-Emonds ORP, Shaw C (2015) The diversity and evolution of anuran skin peptides. *Peptides* 63: 96–117. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.11.003>
- Kumar P, Pandit SS, Steppuhn A, Baldwin IT (2014) Natural history-driven, plant-mediated RNAi-based study reveals CYP6B46's role in a nicotine-mediated antipredator herbivore defense. *Proc Nat Acad Sci USA* 111(4): 1245–1252.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1600609113>

- Laurent P, Braekman JC, Daloz D, Pasteels J (2003) Biosynthesis of Defensive Compounds from Beetles and Ants. *Eur J Org Chem* 2003(15): 2733–2743.
<http://doi.org/10.1002/ejoc.200300008>
- Lawrence JP, Rojas B, Fouquet A, Mappes J, Blanchette A, Saporito RA, ... Noonan BP (2019) Weak warning signals can persist in the absence of gene flow. *Proc Natl Acad Sci USA* 1–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901872116>
- LeConte JL (1868) in Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2019, Catalogue of Life
- Lehman EM, Brodie Jr ED, Brodie III ED (2004) No evidence for an endosymbiotic bacterial origin of tetrodotoxin in the newt *Taricha granulosa*. *Toxicon* 44(3): 243–249.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.019>
- Ligabue-Braun R, Carlini CR (2015) Poisonous birds: A timely review. *Toxicon* 99: 102–108.
- Ligabue-Braun R, Verli H, Carlini CR (2012) Venomous mammals: A review. *Toxicon* 59(7–8): 680–695. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.012>
- Lindigkeit R, Biller A, Buch M, Schiebel HM, Boppré M, Hartmann T (1997) The two facies of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its N-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *Eur J Biochem* 245(3): 626–636.
<http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00626.x>
- Linnaeus C (1758) *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Tomus I. Editio decima, reformata. Laurentii Salvii, Holmiæ. 10th Edition: 824 pp.
- Lötters S, Jungfer KH, Henkel FW, Schmidt W (2007) *Poison Frogs. Biology, Species & Captive Husbandry (Chimaira)*. Frankfurt: Andreas S. Brahm.
- Maan ME, Cummings ME (2012) Poison frog colors are honest signals of toxicity, particularly for bird predators. *Amer Nat* 179(1): E1-14.
<https://doi.org/10.1086/663197>
- Malcolm SB, Brower LP (1989) Evolutionary and ecological implications of cardenolide sequestration in the monarch butterfly. *Experientia* 45(3): 284–295.
<https://doi.org/10.1007/BF01951814>
- Mappes J, Marples N, Endler JA (2005) The complex business of survival by aposematism. *Trends Ecol Evol* 20(11): 598–603. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2005.07.011>
- McDonnell LA, Heeren RMA (2007) Imaging mass spectrometry. *Mass Spect Rev* 26(4): 606–643. <https://doi.org/10.1002/mas.20124>

- Miranda CL, Chung W, Reed RE, Zhao X, Henderson MC, Wang JL, ... Buhler DR (1991) Flavin-containing monooxygenase: A major detoxifying enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea pig tissues. *Biochem Biophys Res Comm* 178(2): 546–552. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)90142-T](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)90142-T)
- Mohammadi S, Gompert Z, Gonzalez J, Takeuchi H, Mori A, Savitzky AH (2016) Toxin-resistant isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in snakes do not closely track dietary specialization on toads. *Proc R Soc B-Biol Sci* 283(1842): 20162111. <http://doi.org/10.1098/rspb.2016.2111>
- Mosher HS, Fuhrman FA, Buchwald HD, Fischer HG (1964) Tarichatoxin-Tetrodotoxin: A Potent Neurotoxin. *Science* 144(3622): 1100–1110. <http://doi.org/10.1126/science.144.3622.1100>
- Moskowitz NA, Roland AB, Fischer EK, Ranaivorazo N, Vidoudez C, Aguilar MT, ... O'Connell LA (2018) Seasonal changes in diet and chemical defense in the Climbing *Mantella* frog (*Mantella laevigata*). *PLoS ONE* 13(12): 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207940>
- Myers CW, Daly JW, Malkin B (1978) A dangerously toxic new frog (*Phylllobates*) used by Emberá Indians of Western Colombia, with discussion of blowgun fabrication and dart poisoning. *B Am Mus Nat Hist* 161(2): 307–366.
- Nickisch-Rosenegk E, Wink M (1993) Sequestration of pyrrolizidine alkaloids in several arctiid moths (Lepidoptera: Arctiidae). *J Chem Ecol* 19(9): 1889–1903.
- Noguchi T, Arakawa O, Takatani T (2006) TTX accumulation in pufferfish. *Comp Biochem Phys* 1: 145–152. <http://doi.org/10.1016/j.cbd.2005.10.006>
- Noonan BP, Comeault AA (2009) The role of predator selection on polymorphic aposematic poison frogs. *Biol Letters* 5(1): 51–54. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0586>
- Paluh DJ, Kenison EK, Saporito RA (2015) Frog or Fruit? The Importance of Color and Shape to Bird Predators in Clay Model Experiments. *Copeia* 103(1): 58–63. <http://doi.org/10.1643/CE-13-126>
- Pasteels JM, Grégoire JC, Rowell-Rahier M (1983) The Chemical Ecology of Defense in Arthropods. *Ann Rev Entomol* 28(1): 263–289. <http://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.001403>
- Pasteels JM (1993) The value of defensive compounds as taxonomic characters in the classification of leaf beetles. *Biochem Syst Ecol* 21(1): 135–142. [http://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90019-N](http://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90019-N)

- Petschenka G, Fandrich S, Sander N, Wagschal V, Boppré M, Dobler S (2013) Stepwise evolution of resistance to toxic cardenolides via genetic substitutions in the Na⁺/K⁺-atpase of milkweed butterflies (Lepidoptera: *Danaini*). *Evolution* 67(9): 2753–2761. <https://doi.org/10.1111/evo.12152>
- Pittendrigh BR, Margam VM, Walters KR, Steele LD, Olds BP, Sun L, ... Clark JM (2013) Understanding Resistance and Induced Responses of Insects to Xenobiotics and Insecticides in the Age of “Omics” and Systems Biology. *In Insect Resistance Management: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396955-2.00003-5>
- Pond SM, Tozer TN (1984). First-Pass Elimination Basic Concepts and Clinical Consequences. *Clin Pharmacok* 9(1): 1–25. <https://doi.org/10.2165/00003088-198409010-00001>
- Pyron RA (2014) Biogeographic analysis reveals ancient continental vicariance and recent oceanic dispersal in amphibians. *Syst Biol* 63(5): 779–797. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syu042>
- Robert CAM, Zhang X, Machado RAR, Schirmer S, Lori M, Mateo P, ... Gershenzon J (2017) Sequestration and activation of plant toxins protect the western corn rootworm from enemies at multiple trophic levels. *ELife* 6: 1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.29307>
- Rodríguez A, PothD, Schulz S, Vences M (2010) Discovery of skin alkaloids in a miniaturized eleutherodactylid frog from Cuba. *Biol Letters* 7(3): 414–8. <http://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0844>
- Rothschild M, von Euw J, Reichstein T (1970) Cardiac glycosides in the oleander aphid, *Aphis nerii*. *J Insect Phys* 16(6): 1141–1145. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(70\)90203-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(70)90203-9)
- Rowell-Rahier M, Witte L, Ehmke A, Hartmann T, Pasteels JM (1991) Sequestration of plant pyrrolizidine alkaloids by chrysomelid beetles and selective transfer into the defensive secretions. *Chemoecology* 2(1): 41–48. <http://doi.org/10.1007/BF01240665>
- Rubino DL, McCarthy BC (2004) Presence of Aposematic (Warning) Coloration in Vascular Plants of Southeastern Ohio. *J Torrey Bot Soc* 131(3): 252–256.
- Sanchez E, Rodríguez A, Grau JH, Lötters S, Künzel S, Saporito RA, ... Vences M (2019) Transcriptomic Signatures of Experimental Alkaloid Consumption in a Poison Frog. *Genes-Basel* 10(10): 733. <https://doi.org/10.3390/genes10100733>

- Santos RR, Grant T (2010) Diel pattern of migration in a poisonous toad from Brazil and the evolution of chemical defenses in diurnal amphibians. *Evol Ecol*
<https://doi.org/10.1007/s10682-010-9407-0>
- Santos JC, Coloma LA, Cannatella DC (2003) Multiple, recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. *P Natl Acad Sci USA* 100(22): 12792–12797.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2133521100>
- Saporito RA, Garraffo HM, Donnelly MA, Edwards AL, Longino JT, Daly JW (2004) Formicine ants: An arthropod source for the pumiliotoxin alkaloids of dendrobatid poison frogs. *P Natl Acad Sci USA* 101(21): 8045–8050.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0402365101>
- Saporito RA, Donnelly MA, Garraffo HM, Spande TF, Daly JW (2006). Geographic and seasonal variation in alkaloid-based chemical defenses of *Dendrobates pumilio* from Bocas del Toro, Panama. *J Chem Ecol* 32(4): 795–814.
<https://doi.org/10.1007/s10886-006-9034-y>
- Saporito RA, Zuercher R, Roberts M, Gerow KG, Donnelly MA (2007) Experimental Evidence for Aposematism in the Dendrobatid Poison Frog *Oophaga pumilio*. *Copeia* 2007(4): 1006–1011.
- Saporito RA, Isola M, Maccachero VC, Condon K, Donnelly MA (2010) Ontogenetic scaling of poison glands in a dendrobatid poison frog. *J Zool* 282: 238–245.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2010.00732.x>
- Saporito RA, Donnelly MA, Madden AA, Garraffo HM, Spande TF (2010) Sex-related differences in alkaloid chemical defenses of the dendrobatid frog *Oophaga pumilio* from Cayo Nancy, Bocas del Toro, Panama. *J Nat Prod* 73(3): 317–321.
<https://doi.org/10.1021/np900702d>
- Saporito RA, Russell MW, Richards-Zawacki CL, Dugas MB (2019) Experimental evidence for maternal provisioning of alkaloid defenses in a dendrobatid frog. *Toxicon* 161: 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.02.008>
- Schmidt JO, Blum MS (1977) Adaptations and Responses of *Dasymutilla occidentalis* (Hymenoptera: Mutillidae) to Predators. *Entomol Exp App* 21: 99–111.
- Schmidt O (1857) Diagnosen neuer Frösche des zoologischen Cabinets zu Krakau. Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Classe* 24: 10–15.
- Servedio MR (2000). The Effects of Predator Learning, Forgetting, and Recognition Errors on the Evolution of Warning Coloration. *Evolution* 54(3): 751–763.

- Skelhorn J, Rowe C (2006) Avian predators taste-reject aposematic prey on the basis of their chemical defence. *Biol Lett* 2(3): 348–350. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0483>
- Skilton AJ (1849). Description of new reptiles from Oregon. *Am J Sci Arts* 7: 202.
- Smith BP, Tyler MJ, Kaneko T, Garraffo HM, Spande TF, Daly JW (2002) Evidence for biosynthesis of pseudophrynamine alkaloids by an Australian myobatrachid frog (*Pseudophryne*) and for sequestration of dietary pumiliotoxins. *J Nat Prod* 65(4): 439–447. <https://doi.org/10.1021/np010506a>
- Spande TF, Garraffo HN, Daly JW, Tokuyama T, Shimada A (1992) Identification of Hitronicotoxins by GC-MS and GC-FTIR: Photo- and Chemical-artefacts and revised ¹³C NMR Assignments. *Tetrahedron* 48(10): 1823–1836.
- Steindachner F (1864) Batrachologische Mittheilungen. *Verhandlungen des Zoologisch-Botanischen Vereins in Wien* 14: 239–288.
- Stuckert AMM, Saporito RA, Venegas PJ, Summers K (2014) Alkaloid defenses of co-mimics in a putative Müllerian mimetic radiation. *BMC Evol Biol* 14(76): 1–8.
- Stuckert AMM, Saporito RA, Summers K (2018) An Empirical Test Indicates Only Qualitatively Honest Aposematic Signaling Within a Population of Vertebrates. *J Herpet* 52(2): 201–208. <https://doi.org/10.1670/17-047>
- Stynoski J, Torres-Mendoza Y, Sasa-Marin M, & Saporito RA (2014) Evidence of maternal provisioning of alkaloid-based chemical defenses in the strawberry poison frog *Oophaga pumilio*. *Ecology* 95(3): 587–593.
- Summers K, Clough ME (2001) The evolution of coloration and toxicity in the poison frog family (Dendrobatidae). *P Natl Acad Sci USA* 98(11): 6227–6232.
- Sword GA (1999) Density-dependent warning coloration. *Nature* 397(6716): 217–217. <http://doi.org/10.1038/16609>
- Tarvin RD, Santos JC, O’Connell LA, Zakon HH, Cannatella DC (2016) Convergent Substitutions in a Sodium Channel Suggest Multiple Origins of Toxin Resistance in Poison Frogs. *Mol Biol Evol* 1–35.
- Tarvin RD, Borghese CM, Sachs W, Santos JC, Lu Y, O’Connell LA, ... Zakon HH (2017) Interacting amino acid replacements allow poison frogs to evolve epibatidine resistance. *Science* 357(6357): 1261–1266. <http://doi.org/10.1126/science.aan5061>
- Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M (2007) Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiol Mol Biol R* 71(2): 295–347. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00040-06>

- Termonia A, Hsiao TH, Pasteels JM, Milinkovitch MC (2001) Feeding specialization and host-derived chemical defense in Chrysomeline leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end. *P Natl Acad Sci USA* 98(7): 3909–3914.
<https://doi.org/10.1073/pnas.061034598>
- Toft CA (1995) Evolution of Diet Specialization in Poison-Dart Frogs (Dendrobatidae). *Herpetologica* 51(2): 202–216.
- Ujvari B, Casewell NR, Sunagar K, Arbuckle K, Wüster W, Lo N, ... Madsen T (2015) Widespread convergence in toxin resistance by predictable molecular evolution. *Proc Nat Acad Sci USA* 112(38): 11911–11916. <http://doi.org/10.1073/pnas.1511706112>
- von Euw J, Fishelson L, Parsons JA, Reichstein T, Rothschild M (1967) Cardenolides (heart poisons) in a grasshopper feeding on milkweeds. *Nature* 214(5083): 35–39.
<https://doi.org/10.1038/214035a0>
- Wang SY, Wang GK (1999) Batrachotoxin-resistant Na⁺ channels derived from point mutations in transmembrane segment D4-S6. *Biophys J* 76(6): 3141–3149.
[http://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77465-5](http://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77465-5)
- Wang IJ (2011) Inversely related aposematic traits: Reduced conspicuousness evolves with increased toxicity in a polymorphic poison-dart frog. *Evolution* 65(6): 1637–1649.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01257.x>
- Whitman DW, Blum MS, Alsop DW (1990) Allomonens: chemicals for defense. *In Insect Defenses: adaptive mechanisms and strategies of prey and predators* 289-351.
- Williams BL, Hanifin CT, Brodie Jr ED, Brodie III ED (2010) Tetrodotoxin affects survival probability of rough-skinned newts (*Taricha granulosa*) faced with TTX-resistant garter snake predators (*Thamnophis sirtalis*). *Chemoecology* 20(4): 285–290.
<https://doi.org/10.1007/s00049-010-0057-z>
- Wink M (1993) Allelochemical Properties or the Raison D ' Etre of Alkaloids. *In The Alkaloids* (Vol. 43).
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64(1): 3–19. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5)
- Wink M, Schmeller T, Latz-Brüning B (1998) Modes of action of allelochemical alkaloids: Interaction with neuroreceptors, DNA, and other molecular targets. *J Chem Ecol* 24(11): 1881–1937. <http://doi.org/10.1023/A:1022315802264>
- Wiseman JM, Ifa DR, Zhu Y, Kissinger CB, Manicke NE, Kissinger PT, Cooks RG (2008) Desorption electrospray ionization mass spectrometry: Imaging drugs and metabolites

in tissues. *Proc Nat Acad Sci USA* 105(47): 18120–18125.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0801066105>

Wouters FC, Blanchette B, Gershenson J, Vassão DG (2016) Plant defense and herbivore counter-defense: benzoxazinoids and insect herbivores. *Phytochem Rev* 15(6): 1127–1151. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9481-1>

Yang Y, Servedio MR, Richards-Zawacki CL (2019) Imprinting sets the stage for speciation. *Nature* 574(7776): 99–102. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1599-z>

Zou X, Xu Z, Zou H, Liu J, Chen S, Feng Q, Zheng S (2016) Glutathione S-transferase SIGSTE1 in *Spodoptera litura* may be associated with feeding adaptation of host plants. *Insect Biochem Mol Biol* 70: 32–43.

<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.10.005>

Zvereva EL, Zverev V, Kruglova OY, Kozlov MV (2017) Strategies of chemical anti-predator defences in leaf beetles: is sequestration of plant toxins less costly than de novo synthesis? *Oecologia* 183(1): 93–106. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3743->

Considerações finais

As causas e consequências da variação na composição de alcaloides acumulados por rãs-de-veneno são os principais aspectos investigados para entender a evolução do sequestro de alcaloides e sua importância ecológica na proteção contra predadores e patógenos. Foi testada, principalmente, a influência do mecanismo de sequestro e da sua eficiência, tanto na variação interespecífica, quanto na variação dos tipos de alcaloides presentes em cada espécie. No geral, as hipóteses testadas ajudaram a avançar o limite de conhecimento desta área de estudo, demonstrando que (1) existe uma grande variação na eficiência do sequestro por espécie, tipo de alcaloide, concentração de alcaloide e modificação de alcaloide; (2) o sequestro em rãs-de-veneno é um processo pouco eficiente; e (3) parece existir um mecanismo plesiomórfico de detoxificação/degradação de alcaloides em anuros que permite evitar intoxicação.

A variação na eficiência de sequestro entre espécies e tipos de alcaloides era um resultado esperado devido aos estudos anteriores com experimentos de alimentação. Entretanto, os resultados apresentados nesta tese foram os primeiros a demonstrar essa variação de forma quantitativa, permitindo maior refinamento analítico nas comparações entre espécies e tipos de alcaloide. Estudos futuros podem tentar explicar por que existe uma variação na eficiência de sequestro quando a concentração das doses é diferente, e também se existe um efeito do número de doses administrado em cada organismo.

O Capítulo 2, em que foram feitos experimentos com múltiplas doses, mostrou que, para HTX, parece existir um processo endógeno de aumento da eficiência conforme a dose aumenta. Esse resultado pode ser analisado em contraste com o resultado do Capítulo 4, no qual a administração de uma dose única desse mesmo alcaloide, não suscitou uma resposta muito eficiente do mecanismo de sequestro. Em contrapartida, a quantidade de doses ou a concentração da mesma não teve efeito sobre a eficiência de sequestro de DHQ. É possível que as propriedades físico-químicas dos alcaloides tenham efeito direto na eficiência de sequestro, como discutido no Capítulo 2. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que os mesmos transportadores e outras moléculas envolvidas no mecanismo de sequestro respondam de formas diferentes para distintas classes de alcaloides.

A modificação de alcaloides é outro processo ainda pouco entendido. Provavelmente essa modificação ocorre através da ação de enzimas que promovem a transformação químico-estrutural da molécula e algumas destas podem não estar presentes em todas as espécies de rãs-de-veneno. Até mesmo espécies de um mesmo gênero apresentam capacidades diferentes

de modificação de alcaloide, como demonstrado no caso de *Dendrobates auratus* e *D. tinctorius*, no Capítulo 5. Além da capacidade de modificação, ainda fica em aberto a importância ecológica, se houver, desse processo de modificação na proteção contra predadores e patógenos. Como demonstrado no teste de palatabilidade incluído no Capítulo 1, independentemente da variação observada na composição dos alcaloides entre os indivíduos, todos estavam igualmente protegidos de possíveis predadores quimicamente orientados ao transmitir a mesma mensagem da presença de compostos defensivos. Se a capacidade de modificação existe para aumentar a diversidade de alcaloides presentes na pele, ainda precisamos entender as consequências dessa diversidade. Como demonstrado no Capítulo 5, a capacidade de modificação surgiu em apenas uma das linhagens de Dendrobatidae que sequestram alcaloide, o que significa que não é uma característica fundamental para o sequestro.

A dualidade entre sequestro e degradação dos alcaloides parece ser a peça chave da evolução do sequestro. Entretanto, parece contraproducente que um organismo que depende completamente do composto sequestrado para proteção química, degrade quase metade do que é consumido (Capítulos 2, 4 e 5). Pode ser que esse mecanismo ainda esteja presente como resquício de uma condição pleiomórfica amplamente presente em anuros. Ou ainda, é possível que tal mecanismo tenha a função de evitar a concentração de grandes quantidades de toxina absorvida no corpo em um determinado período de tempo, evitando autointoxicação.

Como perspectivas de pesquisas futuras, surgem diversas perguntas quanto a esse mecanismo contraditório de degradação que pode explicar a evolução dessa habilidade de sequestrar alcaloides da dieta. Pode ser que a diminuição da eficiência de degradação tenha dado oportunidade para os processos envolvidos no sequestro de alcaloides surgirem, como o transporte e o armazenamento. Sob a perspectiva bioquímica, a pergunta é sobre a identidade e o mecanismo de ação das enzimas que aparentemente degradam de forma eficiente os alcaloides ingeridos, tanto pelas rãs-de-veneno, quanto pelos outros anuros que não sequestram (*Allobates* e *Hyla*, por exemplo, estudados no Capítulo 5). Outro aspecto importante é o órgão responsável pela degradação. No Capítulo 4, verificou-se que o fígado pode ter um papel importante na metabolização dos alcaloides, por concentrar parte deles mesmo depois de horas após a sua administração. Mas outros órgãos do sistema digestivo, como o intestino, também podem ser importantes na eficiência de absorção dos alcaloides, e também na metabolização por enzimas locais.

Em uma perspectiva evolutiva, necessitamos responder se todas as linhagens das cinco famílias de anuros, que tem a habilidade de sequestrar alcaloides, possuem mecanismos de sequestro parecidos aos demonstrados para Dendrobatidae. Seria também a capacidade de sequestro dos anuros pertencentes às linhagens ainda não investigadas pouco eficiente devido a degradação dos alcaloides? Caso esses grupos (ou parte deles) apresentem a capacidade de degradação de alcaloides, seria o mecanismo bioquímico envolvido plesiomórfico ou convergente entre linhagens? Através de estudos de expressão gênica e identificação dos possíveis genes candidatos envolvidos na degradação de alcaloides, será possível estabelecer uma hipótese que relacionará expressão gênica à capacidade ou não de sequestro e à taxa de degradação de alcaloides.

O conhecimento sobre os mecanismos de sequestro em rãs-de-veneno vem aumentando pouco a pouco nos últimos anos. Com a emergência das “omics”, as possibilidades de investigação sobre transporte, modificação, degradação e armazenamento de alcaloides em rãs-de-veneno são inúmeras. Nesta tese foram investigadas as influências do mecanismo de sequestro sobre a variação de alcaloides presentes em rãs-de-veneno. Os resultados mostram que é um mecanismo ainda mais complexo e multifatorial do que a hipótese original da tese, apontando direções importantes a serem tomadas em pesquisas futuras.

Resumo

Algumas das espécies de animais evoluíram, independentemente, a capacidade de sequestrar esses compostos da dieta. Neste mecanismo, os compostos são ingeridos, absorvidos, transportados e armazenados em tecidos especializados. As espécies que são capazes de sequestrar compostos da dieta desenvolveram mecanismos e estratégias específicas que permitem eles consigam se alimentar e acumular grandes quantidades desses compostos sem se autointoxicar. As rãs-de-veneno são o grupo de vertebrados mais estudado que sequestra compostos defensivos da dieta. Eles sequestram alcaloides principalmente de formigas e ácaros e os acumulam em glândulas de veneno da pele. Devido a origem dos compostos defensivos, uma característica importante desse sistema é a grande variação inter e intraespecífica de tipos, quantidade e composição de alcaloides. Muitas causas ecológicas são conhecidas por interferirem diretamente nessa variação, como a localização geográfica, estação do ano, sexo, idade e disponibilidade de alimentos no ambiente. Entretanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de sequestro em si e como ele pode também ser responsável por grande parte da variação de alcaloides em rãs-de-veneno. O objetivo geral da presente tese de doutorado foi avaliar como o mecanismo de sequestro pode interferir na variação de tipos, quantidade e composição geral de alcaloides encontrados em rãs-de-veneno da família Dendrobatidae. A tese se divide em cinco capítulos em formato de manuscrito científico que foram ou serão submetidos a jornais da área. No geral, as hipóteses testadas ajudam a avançar o limite de conhecimento desta área de estudo, demonstrando que (1) existe uma grande variação na eficiência do sequestro por espécie, tipo de alcaloide, concentração de alcaloide e modificação de alcaloide; (2) o sequestro em rãs-de-veneno é um processo pouco eficiente; e (3) parece existir um mecanismo plesiomórfico de detoxificação/degradação de alcaloides em anuros que permite evitar intoxicação. Os resultados mostram que o sequestro em rãs-de-veneno é um mecanismo ainda mais complexo e multifatorial do que originalmente hipotetizado, mas apontam direções importantes a serem tomadas em pesquisas futuras.

Abstract

Several species of animals independently evolved the ability to sequester compounds from their diet. In this mechanism, compounds are ingested, absorbed, transported and stored in specialized tissues. These species have developed mechanisms and strategies to eat and accumulate high quantities of these chemical compounds avoiding self-intoxication. Poison frogs are the most widely studied group of vertebrates that sequesters defense compounds from dietary sources. They primarily sequester alkaloids from ants and mites and accumulate them in skin poison glands. Due to the origin of defense compounds, an important characteristic of this system is the high inter- and intraspecific variation of types, quantity and composition of alkaloids. Ecological factors such as geographic location, season, sex, age and life stage and body size are known to directly interfere in the composition and amount of alkaloids present in each individual and population. However, little is known about the mechanism of sequestration itself and how it can also be responsible for the variation of alkaloids in poison frogs. The general objective of this doctoral thesis was to evaluate how the sequestration mechanism affects the variation of types, quantity and general composition of alkaloids found in poison frogs of the family Dendrobatidae. The chapters follow a manuscript format to be submitted to their respective journals. In general, the hypotheses tested provided more information about this area of study, demonstrating that (1) there is wide variation in sequestration efficiency per species, alkaloid type, alkaloid concentration, and alkaloid modification; (2) sequestration in poison frogs is an inefficient process; and (3) there seems to be a plesiomorphic mechanism of detoxification/degradation of alkaloids in anurans that prevents intoxication. Those results support that this mechanism is even more complex and multifactorial than originally hypothesized, as well as point to important directions for future research.

Biografia

Adriana Moriguchi Jeckel se formou bacharel em Ciências Biológicas no ano de 2011 e licenciada em Ciências Biológicas no ano de 2012 pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). De janeiro de 2008 a dezembro de 2009, foi bolsista do Programa de Educação Tutorial - SeSU/MEC. Durante a graduação, fez parte como iniciação científica do Laboratório de Sistemática de Vertebrados sob orientação do prof. Taran Grant (junho/2007–junho/2008; junho/2010–dezembro/2012) e do Laboratório de Plasticidade no Sistema Nervoso sob orientação da profa. Monica Ryff Moreira Vianna (julho/2008–dezembro/2009). O primeiro semestre da graduação de 2010 foi cursado na University of Regina, em Regina, Canadá, como participante do programa de Mobilidade Acadêmica da PUCRS, onde cursou as seguintes disciplinas: Vertebrate Animal Biology, Vascular Plants, Biogeochemistry e Evolutionary Biology of Reproduction. Em fevereiro de 2011, estagiou no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, sob orientação do prof. Carlos Jared e da profa. Marta Antoniazzi.

Adriana é mestra em Ciências Biológicas (Área Zoologia) pelo Programa de Pós-Graduação em Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (PPG-Zoo/IBUSP; janeiro/2013–junho/2015). Durante o mestrado, fez parte da sua pesquisa na John Carroll University (JCU), nos Estados Unidos, sob orientação do prof. Ralph Saporito, financiado pela Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior (BEPE), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a qual financiou também parte do seu mestrado. Os primeiros seis meses de mestrado foram financiados pelo Conselho Nacional de Pesquisa do Brasil (CNPq).

Durante o doutorado pelo PPG-Zoo/IBUSP, Adriana liderou a montagem e a manutenção da criação de rãs-de-veneno da espécie *Adelphobates galactonotus* no Biotério do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, em colaboração com os prof. Carlos Jared e profa. Marta Antoniazzi, e da colônia de moscas-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, em colaboração com técnicos do IBUSP e colegas do Laboratório de Anfíbios USP. Além disso, fez pelo menos seis visitas oficiais ao laboratório do prof. Ralph Saporito, co-orientador desta tese, na JCU, para fazer análises químicas e experimentos de sequestro. Financiada pela BEPE-FAPESP, fez parte da sua pesquisa em mapeamento de compostos químicos através de espectrometria de massas na York University (YorkU), no Canadá, no laboratório do prof. Demian Ifa. Adriana também teve a oportunidade de orientar quatro alunos de graduação, na USP e também como pesquisadora visitante na JCU e na YorkU, em

projetos de ecologia química e de otimização de protocolos de alimentação de animais e de imageamento por espectrômetro de massas.

Ao longo da sua vida acadêmica na USP, de 2014 a 2019, fez parte da comissão organizadora do Curso de Verão em Zoologia, o qual organizou e lecionou aulas na área de zoologia. Além disso, foi representante discente na Comissão de Coordenação do PPG-Zoo/IBUSP (2017) e no Conselho do Departamento de Zoologia (2019–2020). Fez parte também de promoção das mulheres na ciência e na Herpetologia, resultando em publicações e capítulos de livro no tópico.

Durante o doutorado, publicou os seguintes artigos:

- Soares, K.D.A., **Jeckel, A.M.**, Silva, G.M., Giovannetti, V., Mathubara, K. 2020. University extension and teacher training in Brazil: The Zoology Summer Course. Revista Brasileira de Extensão Universitária, *in press*.
- Jeckel, A.M.**, Matsumura, K., Nishikawa, K., Morimoto, Y., Saporito, R.A, Grant, T., Ifa, D. 2020. Use of Whole-Body Cryosectioning and Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging (DESI- MSI) to Visualize Alkaloid Distribution in Poison Frogs. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 55, e4520. DOI: doi.org/10.1002/jms.4520
- Werneck, F.P; **Jeckel, A.M.**; Friol, N.R.; Toledo, D.G.P.; Targino, M.; Montesinos, R.; Nascimento, L.B.; Silvano, D.L.; França, D.P.F; Pereira, J.A.; Pinto, R.R.; Costa-Rodrigues, A.P.V.; Pereira, E.G.; Mângia, S.; Canedo, C. 2019. Diagnóstico e Propostas para Ampliar a Representatividade de Pesquisadoras em Herpetologia no Brasil. *Herpetologia Brasileira*, v. 8, p. 36–48.
- Jeckel, A.M.**; Kocheff, S.; Saporito, R.; Grant, T. 2019. Geographically Separated Orange and Blue Populations of the Amazonian Poison Frog *Adelphobates galactonotus* (Anura, Dendrobatidae) Do Not Differ in Alkaloid Composition or Palatability. *Chemoecology*, v. 29, p. 225–234. DOI: [10.1007/s00049-019-00291-3](https://doi.org/10.1007/s00049-019-00291-3)
- Jeckel, A.M.**; Caorsi, V.Z.; Grant, T; Borges-Martins, M. 2019. The Nuptial Pads of *Melanophryniscus* (Anura: Bufonidae), with the Unexpected Occurrence of Nuptial-Pad-Like Structures in Females of Two Species. *Journal of Herpetology*, v. 53, p. 53–61. DOI: [10.1670/18-104](https://doi.org/10.1670/18-104)
- Grant, T.; Rada, M.; Anganoy-Criollo, M.; Batista, A.; Dias, P.H.; **Jeckel, A.M.**; Machado, D.J.; Rueda-Almonacid, J.V. 2017. Phylogenetic Systematics of Dart-Poison Frogs

and Their Relatives Revisited (Anura: Dendrobatoidea). South American Journal of Herpetology, v. 12, p. S1–S90. DOI: 10.2994/SAJH-D-17-00017.1

Rada, M.; **Jeckel, A.M.**; Caorsi, V.Z.; Barrientos, L.S.; Rivera-Correa, M.; Grant, T. 2017. A Remarkable New White-Eyed Glassfrog Species of *Sachatamia* from Colombia (Anura: Centrolenidae), with Comments on the Systematics of the Genus. South American Journal of Herpetology, v. 12, p. 157–173. DOI: 10.2994/SAJH-D-16-00041.1

Capítulo de livro:

Jeckel, A.M.; Henrique, R.S. 2017. A Zoologia e seu Papel na Sociedade. In: Beneti, J.S.; Montesinos, R.; Giovannetti, V. (Org.). Tópicos de pesquisa em Zoologia. 1 ed., p. 177-184.

Publicações anteriores ao doutorado:

Jeckel, A.M.; Saporito, R.A.; Grant, T. 2015. The Relationship Between Poison Frog Chemical Defenses and Age, Body Size, and Sex. *Frontiers in Zoology*, v. 12, p. 1-8. DOI: 10.1186/s12983-015-0120-2

Jeckel, A.M.; Grant, T.; Saporito, R.A. 2015. Sequestered and Synthesized Chemical Defenses in the Poison Frog *Melanophryniscus moreirae*. *Journal of Chemical Ecology*, v. 41, p. 505–512. DOI: 10.1007/s10886-015-0578-6

Carvajalino-Fernandez, J.M.; **Jeckel, A.M.**; Indicatti, R.P. 2013. *Melanophryniscus moreirae* (Amphibia, Anura, Bufonidae): Dormancy and Hibernacula Use During Cold Season. *Herpetologia Brasileira*, v. 2, p. 61.