

ZOOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)



MATHEUS DA NÓBREGA ESTRELA

**EVOLUÇÃO BIOGEOGRÁFICA E DE TRAÇOS DO GÊNERO *MICRURUS* (Wagler,
1824)**

JOÃO PESSOA

2020

1848.

h.s.

SAMPLE COPY

MATHEUS DA NÓBREGA ESTRELA

**EVOLUÇÃO FILOGENÉTICA E DE TRAÇOS DO GÊNERO *MICRURUS* (Wagler,
1824)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Sávio Torres de Farias

JOÃO PESSOA

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

E82e Estrela, Matheus da Nobrega.

Evolução biogeográfica e de traços do gênero *Micrurus*
(Wagler, 1824) / Matheus da Nobrega Estrela. - João
Pessoa, 2020.

64 f. : il.

Orientação: Sávio Torres Farias.

Coorientação: Gustavo Henrique Calazans Vieira.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. *Micrurus*. 2. filogenia. 3. coevolução. 4.
aposematismo. 5. veneno. I. Farias, Sávio Torres. II.
Vieira, Gustavo Henrique Calazans. III. Título.

UFPB/BC

MATHEUS DA NÓBREGA ESTRELA

EVOLUÇÃO BIOGEOGRÁFICA E DE TRAÇOS DO GÊNERO *MICRURUS* (Wagler, 1824)

Esta dissertação/tese foi julgada e aprovada para obtenção do Grau de Mestre/Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

João Pessoa, ___ de ___ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sávio Torres de Farias (UFPB) – Orientador

Dr. Adrian Antônio Garda (UFRN)

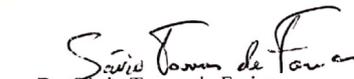
Dr. Gentil Alves Pereira Filho (MZUSP)

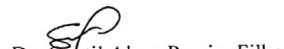
1 **Ata da 330ª Apresentação e Banca de Defesa**
2 **de Mestrado de Matheus da Nobrega Estrela**
3

4 Ao(s) vinte e oito dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte, às 09:30 horas, no(a) Sala de
5 Reuniões do CCEN, da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se, em caráter de solenidade
6 pública, membros da banca examinadora para avaliar a dissertação de mestrado de **Matheus da**
7 **Nobrega Estrela**, candidato(a) ao grau de Mestre em Ciências Biológicas. A banca examinadora
8 foi composta por orientador(es) **Dr. Sávio Torres de Farias, UFPB/PB**, ; e examinadores **Dr.**
9 **Gentil Alves Pereira Filho, MZUSP** e **Dr. Adrian Antônio Garda, UFRN/RN**. Compareceram
10 à solenidade, além do(a) candidato(a) e membros da banca examinadora, alunos e professores do
11 PPGCB. Dando início à sessão, a coordenação fez a abertura dos trabalhos, apresentando o(a)
12 discente e os membros da banca. Foi passada a palavra ao(à) orientador(a), para que assumisse a
13 posição de presidente da sessão. A partir de então, o(a) presidente, após declarar o objeto da
14 solenidade, concedeu a palavra a **Matheus da Nobrega Estrela**, para que dissertasse, oral e
15 sucintamente, a respeito de seu trabalho intitulado “**Evolução Filogenética e de Traços do**
16 **Gênero Micrurus**”. Passando então a discorrer sobre o aludido tema, dentro do prazo legal, o(a)
17 candidato(a) foi a seguir arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou
18 a Comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por
19 atribuir-lhe o conceito APROVADO. Perante o resultado proclamado, os documentos
20 da banca foram preparados para trâmites seguintes. Encerrados os trabalhos, nada mais havendo a
21 tratar, eu, **Dr. Sávio Torres de Farias**, como presidente, lavrei a presente ata que, lida e
22 aprovada, assino juntamente com os demais membros da banca examinadora.
23

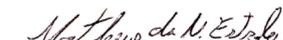
24

João Pessoa, 28/02/2020.


Dr. Sávio Torres de Farias


Dr. Gentil Alves Pereira Filho


Dr. Adrian Antônio Garda


Matheus da Nobrega Estrela
(discente ciente do resultado)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente quero agradecer a todo o suporte recebido pelo CAPES/CNPq, com as bolsas de estudo, e a toda a equipe do PPGCB, principalmente a secretaria e coordenação, por todo o apoio e informações prestados durante toda a minha passagem pelo programa. Claro que também devo meus agradecimentos aos meus orientadores: Sávio, que topou me orientar nesse projeto, mesmo não sendo sua área principal de estudo, e o fez com excelência; e Gustavo que está trabalhando comigo desde o começo da minha graduação, sempre me dando conselhos e mentorias a respeito da vida acadêmica. Além deles, também agradeço ao Fred, que concordou em colaborar comigo nesse trabalho, dando vários comentários valiosos para melhorar o estudo. E também devo agradecer ao Felipe Boy, que me auxiliou nas construções das filogenias e nas análises.

Devo agradecer aos que tiveram aquela contribuição indireta, mas de importância imensurável, durante o meu mestrado. A minha família, que sempre me apoiou nos estudos e sempre me motivou a continuar o mestrado. Aos melhores parceiros, os Victors (Victor, Victor e Vitor), que sempre me ajudaram e me apoiaram em todos os momentos, me distraíndo quando eu precisava esquecer um pouco os estresses e também me motivando a manter o foco. E claro que devo os maiores agradecimentos à Deborah, minha namorada, que me acompanhou durante toda essa minha jornada sempre me apoiando e me dando forças pra manter a mente clara e sã, seguindo em frente mesmo em meio a tantos momentos que tive dificuldades, tanto na vida pessoal, acadêmica e profissional.

A todos, o meu mais sincero obrigado!

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo entender melhor como ocorreu a evolução filogenética do gênero *Micrurus* dentro do continente americano, respondendo às perguntas como quando o gênero se originou, onde foi o centro de dispersão, e qual caminho as espécies percorreram até sua atual distribuição. Para isso, primeiramente construímos uma filogenia baseada no gene NADH sub-unidade 4, que revelou o surgimento do grupo ainda no Mioceno, antes do que sugerem outros trabalhos relacionados. As espécies de padrão de coloração tricolor mônade e tríade formaram dois grupos monofiléticos. Pelos tempos de divergência apresentados pela nossa filogenia, nós corroboramos a atual hipótese de que a população ancestral de *Micrurus* entrou na América do Sul através de um arco de ilhas que conectou a América do Norte com a do Sul durante o Mioceno, e que o gênero teve uma origem sul-americana. Sugerimos também que a criação da América Central com o fechamento do Istmo do Panamá, o levantamento da Cadeia Montanhosa dos Andes, o fechamento do Sistema Acre formando o Rio Amazonas e o surgimento do Planalto Central Brasileiro foram fatores chave para a evolução de *Micrurus*. Ainda, nossos dados apontam que o centro de dispersão do gênero foi ao norte da América do Sul, de onde uma população ancestral do grupo mônade migrou em direção ao sul, colonizando a costa leste do continente e a Floresta Amazônica – após o fechamento do Sistema Acre – e uma segunda população migrou em direção à América Central e do Norte – após o fechamento do Istmo do Panamá. Já o grupo tríade se dispersou em direção ao sul, colonizando desde áreas secas na Caatinga e Cerrado brasileiro até áreas úmidas na Amazônia. A divergência das espécies sul-americanas foi bastante influenciada pelo levantamento dos Andes, que foi provavelmente responsável por eventos de vicariância, separando espécies nos lados cis- e trans-Andes. Além disso, foi testada a hipótese de se a coloração dita aposemática das cobras-corais do gênero *Micrurus* está em coevolução com a toxicidade de seu veneno. Para isso foram construídas duas filogenias para cada uma das duas principais toxinas do veneno de *Micrurus*, PLA2 e 3FTx, para serem comparadas com a filogenia do NADH que nos mostra como ocorreu a história evolutiva do grupo. Ao analisar os grupos formados na filogenia do NADH foi sugerido que o padrão de coloração dessas serpentes é uma característica ligada a história filogenética do grupo, e não tanto a fatores ambientais. Da mesma forma, os grupos formados nas árvores das toxinas nos fizeram sugerir que a composição do veneno dessas serpentes também segue a história evolutiva do grupo, em vez de fatores ambientais. Com esses resultados, nós sugerimos que os genes responsáveis pela expressão da coloração das cobras-corais estão intimamente ligados aos genes codificadores das toxinas que compõem seu veneno e, assim, essas duas características podem realmente estar em coevolução, e que a coloração tem, de fato, uma função aposemática nessas serpentes.

Palavras-chave: *Micrurus*; filogenia; coevolução; aposematismo; veneno.

ABSTRACT

This work aimed to understand better how the phylogenetic evolution of the genus *Micrurus* occurred within the American continent, answering questions such as when the genus originated, where it was the center of dispersion, and which path the species took until its current distribution. To do this, we first constructed a phylogeny based on the NADH sub-unit 4 gene, which revealed the group's emergence still during the Miocene, before what other related works say. The tricolor monads and triads color pattern species formed two monophyletic groups. By the divergence times presented by our phylogeny, we corroborate with the current hypothesis that the ancestral population of *Micrurus* entered South America through an arch of islands that connected North and South America during the Miocene, and that the genus had a South American origin. We also suggest that the creation of Central America with the closing of the Panama's Isthmus; the uplift of the Andes Mountain Range; the closure of the Acre System forming the Amazon River; and the rise of the Brazilian Central Plateau were key factors for the evolution of *Micrurus*. Furthermore, our data indicate that the center of dispersion of the genus was in the north of South America, from where an ancestral population of the monad group migrated towards the south, colonizing the east coast of the continent and the Amazon Forest - after the closure of the System Acre - and a second population migrated towards Central and North America - after the closing of the Panama's Isthmus. The triad group dispersed towards the south, colonizing from dry areas in the Caatinga and Brazilian Cerrado, to wet areas in the Amazon. The divergence of South American species was greatly influenced by the Andes uplift, which was probably responsible for vicariance events, separating species on the cis- and trans-Andes sides. In addition, we tested the hypothesis that the so-called aposematic coloration of the snakes of the genus *Micrurus* is co-evolving with the toxicity of their venom. And, this time, two phylogenies were built for each of the two main toxins from *Micrurus'* venom, PLA2 and 3FTx, to be compared with the NADH phylogeny that shows us how the group's evolutionary history occurred. Thus, when analyzing the groups formed in the NADH phylogeny we suggested that the color pattern of these snakes is a characteristic linked to the phylogenetic history of the group, and not so much to environmental factors. Likewise, the groups formed in the toxin trees made us suggest that the composition of the venom of these snakes also follows the evolutionary history of the group, rather than environmental factors. With these results, we suggest that the genes responsible for the expression of the coloration of coral snakes are closely linked to the genes encoding the toxins that make up their venom, and thus, these two characteristics may actually be in coevolution, and the coloration does, in fact, have an aposematic function in these snakes.

Keywords: *Micrurus*; phylogeny; coevolution; aposematism; venom.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	8
2. REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO I.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3. RESULTADOS	23
4. DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÃO.....	35
6. REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO II.....	42
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3. RESULTADOS	53
4. DISCUSSÃO	56
5. CONCLUSÕES	61
6. REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Elapidae engloba cerca de 58 gêneros de serpentes (registradas pelo *Reptile Database*) distribuídas ao redor do globo. Como pertencentes do grande grupo das serpentes avançadas, Caenophidia, todos os elapídeos possuem glândulas de veneno e dentição proteróglifa para defesa. Os elapídeos do Velho Mundo – onde se encontra a maioria dos gêneros da família, incluindo as najas (*Naja*), cobra-rei (*Ophiophagus*) e mambas (*Dendroaspis*) – se diferenciam dos gêneros do Novo Mundo principalmente pela morfologia do hemipênis e coloração do corpo. Já no Novo Mundo, existem dois gêneros que são popularmente conhecidos como cobras-corais: *Micruroides* e *Micrurus* (Campbell e Lamar 2004) (Figura 2).

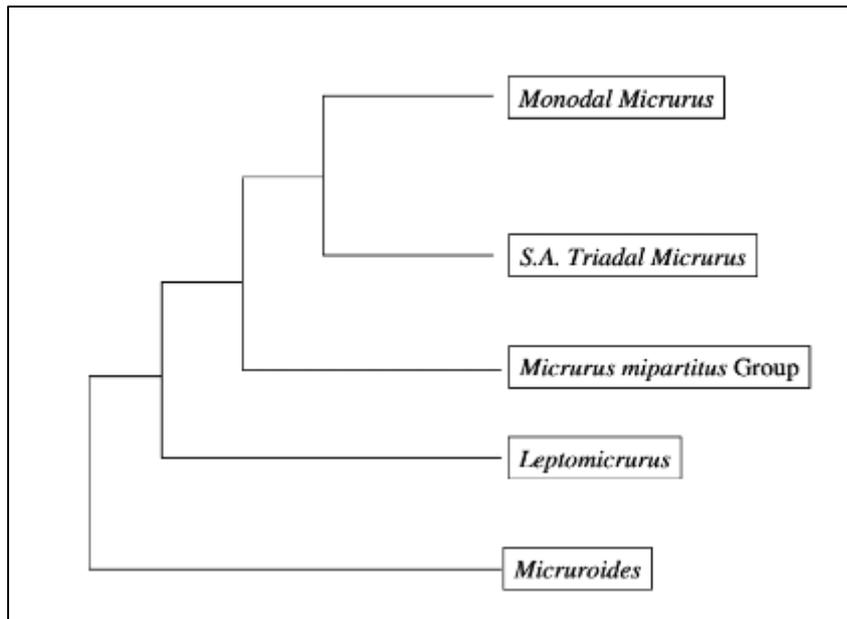




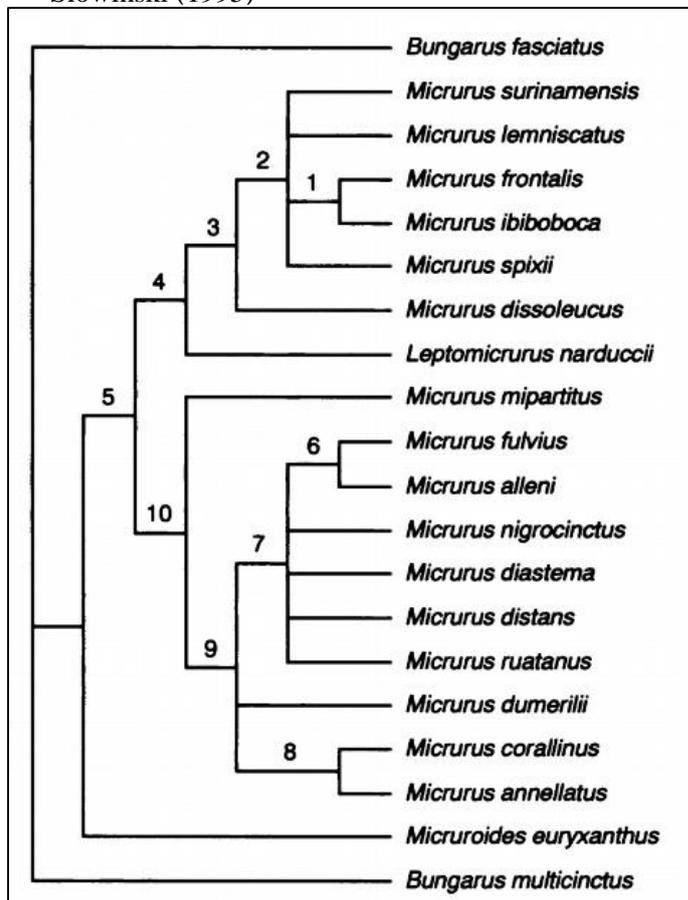
Figura 2: Gêneros de cobras-corais *Micruroides* (A), *Micrurus* (B) e a antiga *Leptomicrurus narduccii* (hoje incluída no gênero *Micrurus*) (C). Imagens do google.com\imghp

Muitos estudos filogenéticos têm sido conduzidos analisando as relações evolutivas das espécies de cobras-corais, mas mesmo assim as posições filogenéticas dentro do grupo ainda são incertas. Como classicamente proposto por Roze e Bernal-Carlo (1987) (Figura 2A), o gênero *Micruroides* é colocado como grupo irmão de *Leptomicrurus* e *Micrurus*, e este último ainda é subdividido em quatro grupos: espécies com anéis arranjados em mônades de três cores; espécies mexicanas com tríades de três cores; espécies da América Central e do Sul com tríades de três cores; e o grupo de *Micrurus mipartitus*, o mais basal. Esses grupos também são suportados por outros caracteres morfológicos como o tamanho da cauda e a forma do hemipênis (Slowinski 1995) (Figura 2B). Após o avanço das técnicas moleculares e a chegada das filogenias moleculares, com Silva Jr. e Sites (2001) (Figura 2C) como um dos pioneiros, vários avanços foram feitos em relação às relações filogenéticas do gênero *Micrurus*. Por exemplo, na filogenia do Pyron *et al.* (2013) (Figura 2D), baseado em 12 genes (7 nucleares e 5 mitocondriais), o grupo da *Leptomicrurus* foi incluído no gênero *Micrurus*, que fica como grupo irmão de *Sinomicrurus* (elapideos do Velho Mundo), e esses dois como grupo irmão de *Micruroides*, o mais basal dos três.

Roze e Bernal-Carlo (1987)



Slowinski (1995)



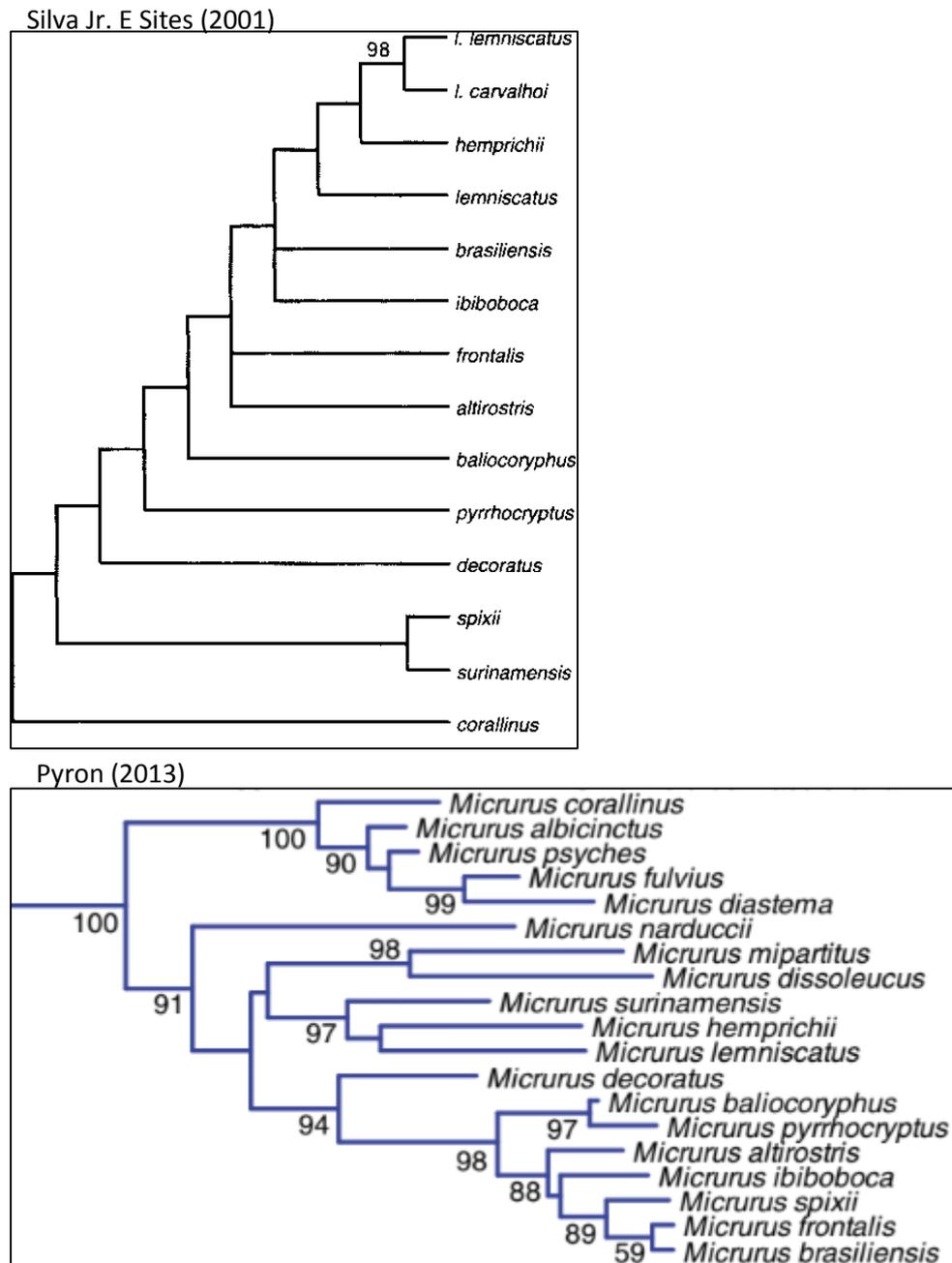


Figura 2: Filogenias apresentadas por Roze e Bernal-Carlo (1987), Slowinski (1995), Silva Jr. E Sites (2001), e parte da filogenia apresentada por Pyron *et al.* (2013) apenas com o gênero *Micrurus*.

Dentre as cobras-coraís, o gênero *Micrurus* é o mais representativo, com 81 espécies registradas pelo *Reptile Database* (Uetz 2010). Por ter um hábito fossorial, elas são encontradas geralmente em galerias ou sob a serapilheira, e algumas espécies não chegam a medir nem 70cm de comprimento total, enquanto outras podem chegar a mais de 1,5m (Campbell e Lamar 2004). Essas cobras-coraís são amplamente distribuídas, desde o Sudeste dos Estados Unidos, passando pela América Central, até a área central da Argentina, habitando ambientes desde desertos até florestas de altitude (Roze e Tilger 1983; Campbell

e Lamar 2004; Zaracho *et al.* 2014; Mata-Silva *et al.* 2015). O gênero *Micrurus* está presente no continente Americano desde o Mioceno (Kelly *et al.* 2009), porém não entendemos muito bem como se deu, nem que eventos podem ter influenciado, a dispersão e diversificação das espécies ao longo do continente; o que será abordado ao longo dessa dissertação.

As cobras-corais verdadeiras têm uma dieta especializada em presas com corpo alongado, muitas vezes composta de Squamata com hábitos fossoriais ou crípticos. Vários estudos mostram que suas principais presas são anfisbenas, gimnofionas e lagartos (Ávila *et al.* 2010; Silva 2014), mas também peixes com corpo alongados são uma das principais presas de *M. surinamensis* (Morais *et al.* 2011) e ovos de répteis também são comuns na dieta de algumas *Micrurus*, como *M. nigrocinctus* (Roze 1996; Campbell and Lamar 2004). Serpentes (Colubridae e Diapsidae) também estão largamente presentes nas dietas das cobras-corais (Marques and Sazima 1997; Urdaneta *et al.* 2004; Outerial 2005), inclusive as da própria família Elapidae, com casos de canibalismo (Jackson and Fran 1981). Sendo assim, sua alimentação é denominada estenofágica, por ser bastante especializada em animais vermiformes, e ofiófaga, por frequentemente conter serpentes (Campbell e Lamar 2004).

As cobras-corais matam suas presas com seu veneno altamente potente, constituído de peptídeos neurotóxicos, como a Toxina de Três dígitos e a Fosfolipase A2, dois dos principais componentes de seu veneno (Lomonte, Rey-Suárez, *et al.* 2016). A presença de toxinas potentes também é uma forma de afastar possíveis predadores (Fry *et al.* 2008). De fato, características que contribuam para a camuflagem ou para se proteger de possíveis predadores são vantajosas e devem ser selecionadas nos animais (Jackson *et al.* 1976). No caso das cobras-corais, uma de suas características mais marcantes é seu padrão de cores chamativo com anéis alternados que é tida como um alerta à sua toxicidade para possíveis predadores (Roze e Tilger 1983; Campbell e Lamar 2004; Nascimento 2016). Dentro do gênero *Micrurus*, é possível identificar ao menos três padrões de coloração dos anéis: a) Bicolor, com anéis dispostos em preto e amarelo, branco ou vermelho (1 preto: 1 branco/amarelo/vermelho); e b) Tricolor com anéis em mônades, dispostos em um anel preto entre dois anéis vermelhos; c) Tricolor com anéis em tríades, dispostos em dois anéis vermelhos

separados por uma sequência de preto-branco-preto-branco-preto (Savage e Slowinski 1992) (Figura 2). Faz sentido pensarmos que essa toxicidade do veneno dessas serpentes permite que suas cores chamativas tenham uma função aposemática, porém, até hoje não há muitos estudos que discutam ou analisem a relação evolutiva e filogenética dessas duas características, o que será um dos temas discutidos aqui.



Figura 2: Padrão de cor das cobras-corais do Novo Mundo. A) Coloração bicolor de *M. mipartitus*. B) Coloração tricolor com anéis em tríades de *M. frontalis* C) Coloração tricolor com anéis em mônades de *M. fulvius*.

2. REFERÊNCIAS

- Ávila RW, Kawashita-ribeiro RA, Ferreira VL. 2010. Natural History of The Coral Snake *Micrurus pyrrhocryptus* Cope 1862 (Elapidae) from Semideciduous Forests of Western Brazil. *South Am. J. Herpetol.* 5:97–101.
- Campbell HW, Lamar WW. 2004. *The Venomous Reptiles of Western Hemisphere: Coral snakes and sea snakes, Elapidae Family.* Nova York: Cornell University Press.
- Fry BG, Scheib H, van der Weerd L, Young B, McNaughtan J, Ramjan SFR, Vidal N, Poelmann RE, Norman JA. 2008. Evolution of an Arsenal. *Mol. Cell. Proteomics* 7:215–246. doi:10.1074/mcp.M700094-MCP200.
- Jackson DR, Fran R. 1981. Ecology of the Eastern Coral Snake (*Micrurus fulvius*) in Northern Peninsular Florida. *Herpetologica* 37:213–228.
- Jackson JF, Ingram W, Campbell HW. 1976. The Dorsal Pigmentation Pattern of Snakes as an Antipredator Strategy: A Multivariate Approach. *Am. Nat.* 110:1029–1053. doi:10.1086/283125.
- Kelly CMR, Barker NP, Villet MH, Broadley DG. 2009. Cladistics Elapoidea : a rapid radiation in the late Eocene. *Mol. Ecol.* 25:38–63. doi:10.1111/j.1096-0031.2008.00237.x.
- Lomonte B, Rey-Suárez P, Fernández J, Sasa M, Pla D, Vargas N, Bénard-Valle M, Sanz L, Corrêa-Netto C, Núñez V, *et al.* 2016. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon* 122:7–25. doi:10.1016/j.toxicon.2016.09.008.
- Marques OA V., Sazima I. 1997. Diet and feeding behavior of the coral snake *Micrurus corallinus*, from the Atlantic Forest of Brazil. *Herpetol. Nat. Hist.* 5:88–93.
- Mata-Silva V, Johnson JD, Wilson LD, García-Padilla E. 2015. Herpetofauna of Oaxaca , México: composition, physiographic distribution, and conservation status. *Mesoamerican Herpetol.* 2:6–62.
- Morais DH, Ávila RW, Kawashita-ribeiro RA, Carvalho MA De. 2011. Squamata, Elapidae, *Micrurus surinamensis* (Cuvier, 1817): New records and distribution map in the state of Mato Grosso, Brazil, with notes on diet and activity period. *Check List - J. species List. Distrib.* 7:350–351.
- Nascimento LRDS. 2016. Revisão taxonômica do complexo *Micrurus spixii* Wagler , 1824 (Serpentes , Elapidae). Universidade Federal do Pará.

Outerual AB. 2005. História natural de uma comunidade de serpentes da serra do sudeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Pyron R, Burbrink FT, Wiens JJ, Greene H, Vitt L, Caldwell J, Pianka E, Vitt L, Kasturiratne A, Wickremasinghe A, *et al.* 2013. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. BMC Evol. Biol. 13:93. doi:10.1186/1471-2148-13-93.

Roze JA. 1996. Coral snakes of the Americas: biology, identification, and venoms. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company.

Roze JA, Bernal-Carlo A. 1987. Las serpientes corales venenosas del genero *Leptomicrurus* (serpentes, Elapidae) de Suramérica con descripción de una nueva subespecie. Bollettino. Mus. Reg. di Sci. Nat. Torino 5:573–608.

Roze JA, Tilger GM. 1983. *Micrurus fulvius* (Linnaeus) North American Coral Snake. Cat. Am. Amphib. Reptil.:1951–1954.

Savage JM, Slowinski JB. 1992. The colouration of the venomous coral snakes (family Elapidae) and their mimics (families Aniliidae and Colubridae). Biol. J. Linn. Soc. 45:235–254. doi:10.1111/j.1095-8312.1992.tb00642.x.

Silva CCA. 2014. História natural e análise citogenética de *Micrurus frontalis* (Duméril, Bibron & Duméril, 1854) (serpentes: elapidae). Universidade Federal de Viçosa.

Silva Jr. NJ, Sites JC. 2001. Phylogeny of South American triad coral snakes (Elapidae: *Micrurus*) based on molecular characters. Herpetologica 57:1–22.

Slowinski J. 1995. A phylogenetic analysis of the New World Coral Snakes (Elapidae: *Leptomicrurus*, *Micruroides*, and *Micrurus*) Based on Allozymic and Morphological Characters. 29:325–338.

Uetz P. 2010. The original descriptions of reptiles. Zoo:59–68.

Urdaneta AH, Bolaños F, Gutiérrez JM. 2004. Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) on its natural prey in captivity. Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 138:485–492. doi:10.1016/j.cca.2004.08.018.

Zaracho VH, Ingaramo R, Semhan RV, Eduardo EG, Acosta JL, Falcione AC, Álvarez BB. 2014. Herpetofauna de la Reserva Natural Provincial Isla Apipé Grande (Corrientes, Argentina). Cuad. Herpetol. 28:153–160.

CAPÍTULO I

HISTÓRIA BIOGEOGRÁFICA DO GÊNERO *MICRURUS* (Wagler, 1824)

1. INTRODUÇÃO

As cobras-corais verdadeiras são historicamente conhecidas por sua coloração conspícua e seu veneno composto por potentes neurotoxinas (Campbell e Lamar 2004). As cobras-corais do gênero *Micrurus* têm uma larga distribuição dentro das Américas, desde o sudeste dos Estados Unidos até a região central da Argentina (Campbell e Lamar 2004). Sua coloração geralmente consiste em anéis transversais alternados, de duas (bicolor) ou três (tricolor) cores, em padrões de tríades ou mônades, com cores bem destacadas como vermelho, branco, preto e amarelo. Esse padrão de coloração separa as cobras-corais em grupos filogenéticos bem definidos (Roze e Bernal-Carlo 1987), sendo as de padrão tricolor tríade geralmente da América do Sul e as tricolor mônades da América do Norte, do Sul e Central (Campbell e Lamar 2004). Devido a tais características, as cobras-corais já foram alvos de diversos estudos, desde modelos para testar a teoria do mimetismo (Brodie 1993; Brodie e Janzen 1995) até na área clínica, devido a alguns casos graves de acidentes ofídicos e ao seu veneno com importância médica (Pettigrew 1985; Kitchens and Mierop 1987; Peterson 2006; Kryukova *et al.* 2019).

As cobras-corais são normalmente atribuídas aos gêneros *SinoMicrurus*, *Micruroides* e *Micrurus* (principalmente este último, pela sua grande diversidade), da família Elapidae. A origem dos Elapídeos se deu na região Oriental do globo, há aproximadamente 37Ma (Ma = milhões de anos), durante o Oligoceno, logo depois da colisão da Índia com a Eurásia (Kelly *et al.* 2009). O grupo dispersou para o resto da região Oriental provavelmente por questões climáticas e mudanças ocorridas após as colisões das placas tectônicas da Índia e Eurásia, até que chegou ao Novo Mundo entre 29 e 25Ma, atravessando a ponte onde hoje fica o estreito de Bering, a qual conectou a Eurásia à América do Norte até aproximadamente 5Ma (Marincovich e Gladenkov 2001; Kelly *et al.* 2009).

Trabalhos com hipóteses biogeográficas utilizando datações de árvores filogenéticas baseadas em genes vêm ajudando a desvendar como ocorreu a diversificação do grupo (Savage 1982; Savage 2002; Gutberlet e Harvey 2004; Lee *et al.* 2016; Lomonte *et al.* 2016; Jowers *et al.* 2019). Kelly *et al.* (2009)

realizaram a datação da superfamília Elapoidea utilizando dados de sequências de *Cit-b*, *ND4* e *c-mos*, sugerindo a origem da superfamília na África na metade do Eoceno e a origem de Elapidae no Oriente, durante o Oligoceno. Logo depois houve o aparecimento do gênero *Sinomicrurus*, se diversificando ainda no Oriente, dando origem ao grupo das cobras-corais (americanas). Ainda no Oligoceno, uma população migrou para o Novo mundo, onde se isolou, cerca de 29Ma antes do presente, e iniciou a diversificação do grupo dos Elapídeos do Novo Mundo, com os surgimentos do gênero *Micruroides* no início do Mioceno e do gênero *Micrurus* já na metade do Mioceno. Entretanto, os autores ressaltam que tais cenários são provisórios e que devido à falta de registros fósseis fica difícil tirar conclusões mais concretas. Fósseis do começo e meio do Mioceno descobertos na Europa foram descritos a partir de vértebras, provavelmente de *Micrurus* (Rage and Holman 1984; Szyndlar and Schleich 1993; Ivanov 2000). Se essas informações estiverem corretas, é possível que as cobras-corais tenham tido uma distribuição extensiva na Eurásia e na América, e o possível isolamento do grupo nessas duas áreas deve ter sido muito mais recente (Kelly *et al.* 2009). Em geral, tais hipóteses estão de acordo com a datação de Lee *et al.* (2016) que utilizou sequências de quatro genes mitocondriais e três nucleares como base de dados, com exceção do surgimento mais antigo de *Micruroides*, ainda no Oligoceno, e *Micrurus*, no início do Mioceno.

Já para Jowers *et al.* (2019), que construiu uma árvore do gênero *Micrurus* baseada na subunidade 4 do NADH, a divergência entre *Micrurus* e *Micruroides* ocorreu ainda no Eoceno, com *Micrurus* surgindo cedo no Oligoceno, há cerca de 30Ma. Apesar de tudo, ainda não se sabe ao certo qual a origem do gênero e qual caminho foi tomado dentro das Américas. Por *Micruroides* ser um grupo com distribuição restrita à América do Norte, e pela presença de fósseis de uma espécie extinta de *Micrurus* (*M. gallicus*) nessa área, é plausível pensar que o gênero *Micrurus* teve uma origem norte americana. Porém, filogenias moleculares mais recentes do grupo mostram que os clados de *Micrurus* presentes na América do Norte (*M. fulvius* e *M. tener*) são relativamente recentes e, filogeneticamente, os mais divergentes e distantes de *Micruroides*. Sendo assim, sugere-se que *Micrurus* tenha surgido na América do Sul no começo do Cenozóico, em algum ponto da história bem antes do

fechamento do Istmo do Panamá, quando uma conexão de pequenas ilhas (o Arco Proto-Antílico) unia a América do Norte e do Sul, permitindo a passagem de populações ancestrais do Norte para o Sul (Savage 1982; Zamudio and Greene 1997; Savage 2002; Rey-Suárez *et al.* 2016). Como o Arco do Panamá existia como uma cadeia de ilhas semiemergentes entre o Oligoceno e o Mioceno, ocorria uma intensa troca de águas do Oceano Pacífico e Atlântico, dificultando a passagens de animais. A colisão dessas ilhas começou a cerca de 24Ma, permitindo migrações de animais terrestres, até o fechamento dessas intensas trocas oceânicas cerca de 9Ma, possibilitando migrações mais frequentes dos animais (Newkirk and Martin 2009; Osborne *et al.* 2014). Uma das filogenias mais completas que temos hoje para as serpentes, e Squamata em geral, é a de Tonini *et al.* (2016), que complementou os dados de Pyron *et al.* (2013) com mais 5 genes (totalizando 17 genes). Apesar dos referidos trabalhos não terem como objetivo principal as questões biogeográficas das cobras-corais, podemos utilizar tais dados para inferir e comparar hipóteses a partir das datações geradas pelos autores, como será discutido mais à frente.

É notável que, apesar dos esforços feitos para gerar mais dados que nos forneçam informações sobre a história evolutiva do grupo, ainda há muitas perguntas não respondidas, como por exemplo: onde ocorreu a divergência do gênero *Micrurus* dentro das Américas? Quais rotas foram percorridas após a divergência? Que eventos levaram grande diversificação dessas serpentes? Para isso, novos dados devem ser gerados e novas análises devem ser realizadas para chegarmos perto de um consenso sobre a história dessas serpentes.

Com isso, este trabalho busca contribuir com a discussão a respeito da história filogenética das cobras-corais do gênero *Micrurus*, apresentando mais uma datação do grupo baseada no gene NADH desidrogenase, sugerindo uma nova hipótese sobre sua história dentro das Américas e comparando com os trabalhos mais recentes sobre o assunto. O NADH é um gene codificador bastante utilizado para realizar reconstruções filogenéticas de serpentes e Squamata em geral, que, em teoria, essa molécula está sob a mesma pressão evolutiva em todas as espécies e, assim, a diferença entre elas será de acordo com a divergência dos clados (Alfaro and Arnold 2001; Queiroz *et al.* 2002; Nagy *et al.* 2004; Pyron *et al.* 2013; Sanders *et al.* 2013; Jowers *et al.* 2019).

Dentre os mitocondriais, esses genes são os que possuem maior número de sequências depositadas no GenBank para as espécies de *Micrurus* (principalmente a subunidade 4 da NADH (ND4)), fazendo dele um bom candidato para ser utilizado no presente trabalho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todas as sequências de nucleotídeos da ND4 disponíveis do gênero *Micrurus* foram extraídas do NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) (Tabela 1, 2 e 3 do Anexo I). Todas as sequências foram visualmente analisadas, incluindo suas referências para atestar se eram realmente das espécies a que se referiam, e as sequências repetidas, foram descartadas para não causarem interferência nas análises. Após coletadas, as sequências foram alinhadas na web Server MAFFT v7 online (Kato *et al.* 2017) com todos os parâmetros no modo *default*. A partir do alinhamento, os fragmentos de tRNA (184bp) adjacentes aos genes ND4 foram descartados manualmente no próprio programa MAFFT v7 por que mais da metade das sequências não apresentavam tais frações, restando apenas sequências de ND4 de 666 pares de base (bp) para as análises. Devido à grande disparidade da quantidade de sequências amostradas para algumas espécies sobre outras (por exemplo, 36 sequências amostradas para *M. tener* e apenas duas de *M. corallinus*), uma sequência consenso foi gerada pelo programa Jalview (Waterhouse *et al.* 2009), de modo automático ao importar as sequências, para cada espécie que tinha mais de duas sequências de ND4 utilizadas.

Considerando a heterogeneidade da taxa evolutiva de cada códon do gene, o alinhamento foi particionado por posição do códon (1º, 2º e 3º códon) e foi utilizado o JModelTest 2.1.10 no modo default e o Critério de Informação Bayesiano (AIC e BIC) para selecionar o melhor esquema de partição para o alinhamento (Darriba, Taboada, Doallo, & Posada, 2012). Com isso, a árvore datada gerada, pelo método de inferência Bayesiana, foi construída pelo programa BEAST v1.10 (Suchard *et al.* 2018).

O modelo evolutivo sugerido para cada partição foi o HKY+G (para o códon 1 e 2) e TrN+G (para o códon 3). Para a datação da árvore foi utilizado o

modelo *strict clock*, com o modelo de especiação *Yule*, usando uma taxa de mutação de 1.4×10^{-8} substituições/sítio/ano, como já utilizado antes para calibrar filogenias de *Micrurus* com dados mitocondriais (Castoe *et al.* 2007; Streicher *et al.* 2016; Jowers *et al.* 2019), e 10.000.000 de cadeias, amostrando a cada 1.000 rodadas. Para essas análises a espécie *Micruroides euryxanthus* e *Sinomicrurus japonicus* foi utilizada como grupo externo e *Leptomicrurus narduccii* foi incluída como pertencente ao gênero *Micrurus*, como já proposto em outros trabalhos (Slowinski 1995; Gutberlet and Harvey 2004; Castoe *et al.* 2007). A visualização e a edição da árvore foi feita pelo programa FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). As análises geradas pelo BEAST tiveram a convergência e a estabilidade checadas usando o programa Tracer 1.5 (Suchard *et al.* 2018), e todas apresentaram valores do tamanho efetivo da amostra (ESS) > 200.

A partir das árvores geradas pelo BEAST, também foi feito uma Análise de Dispersão-Vicariância (S-DIVA) (Yu *et al.* 2010) implementado pelo programa RASP (Yu *et al.* 2015), com todos os parâmetros no modo *default*, para fazer a reconstrução da história biogeográfica do gênero *Micrurus*. Por recomendação do manual do autor (<http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/RASP/>) os grupos externos foram retirados da análise. O mapa do continente Americano foi dividido em cinco áreas (usando como base o trabalho de Givnish *et al.* (2011) e (Comas *et al.* (2013)) que abrangem de modo geral a distribuição atual das espécies de *Micrurus* (Figura 2 e Tabela 1), e essas áreas foram as usadas para calcular a área ancestral de cada nó da filogenia. Áreas geográficas amplas foram usadas em vez de áreas específicas por causa do grande número de localizações a serem consideradas e pela incerteza na distribuição geográfica de algumas espécies que ainda possuem problemas taxonômicos, como por exemplo a grupo das *Micrurus lemniscatus*, *Micrurus corallinus* e *Micrurus ibiboboca*.



Figura 1: Separação do continente Americano abrangendo a distribuição geográfica do gênero *Micrurus*.

Tabela 1: Áreas inseridas no programa RASP e seus respectivos representantes (Region name).

Area	Region name
A	SE EUA
B	CENTRAL AMERICA+MEXICO
C	TRANS-ANDES
D	AMAZONIA
E	BRAZILIAN SHIELD

3. RESULTADOS

A filogenia datada foi gerada baseada em 49 seqüências (consenso ou não) do gene ND4 de espécies do gênero *Micrurus* (Figura 2). As relações de parentesco entre as espécies estão de acordo com outras filogenias de trabalhos anteriores, com um grupo bem definido de serpentes com padrão de coloração tricolor em mônades da América do Norte, do Sul e Central e outro grupo com padrão tricolor em triádes da América do Sul.

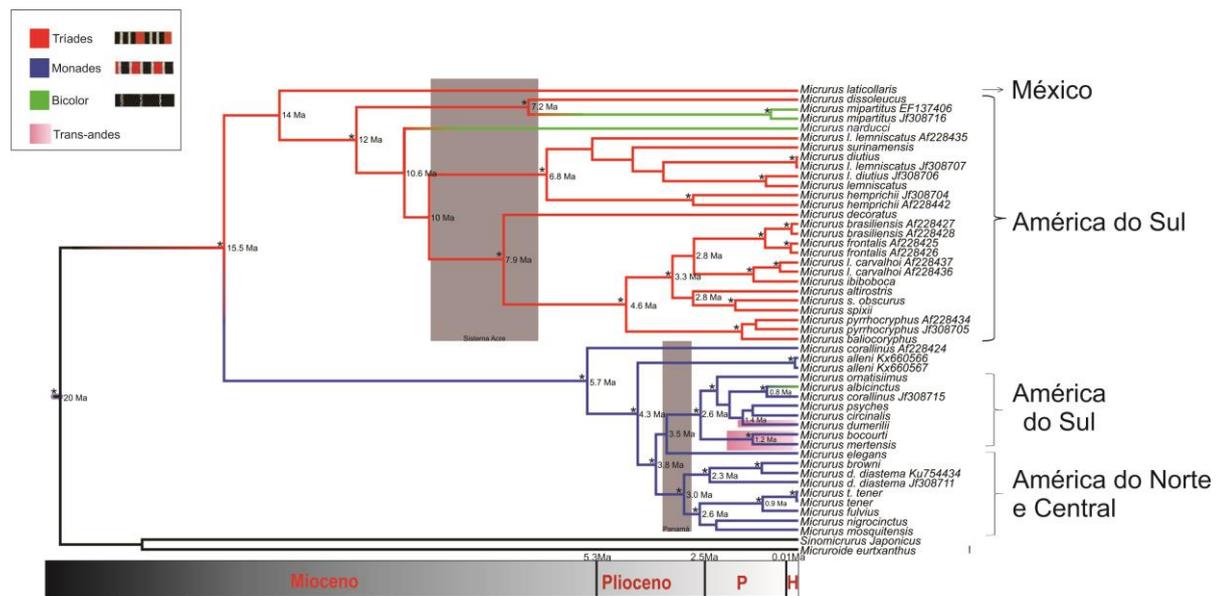


Figura 2: Datação baseada no gene ND4 do gênero *Micrurus*. Os valores dos nós representam as idades, em milhões de anos, de cada divergência. Na escala de tempo geológica “P” representa o Pleistoceno e o “H” a atual era, o Holoceno. Os ramos das espécies com padrão em triádes estão coloridos de vermelho; os ramos das espécies com padrão mônade estão em azul; os ramos das espécies bicolor estão em verde; e o ramos das espécies mônades sul-americanos com distribuição trans-andes (ao norte dos andes) estão em roxo. As retângulos sombreados marcam o espaço de tempo quando ocorreram dois fatores chave na divergência e distribuição atual das espécies de *Micrurus* (discutidos posteriormente): o sistema Acre (10 a 6,8Ma) e o fechamento do Istmo do Panamá (há cerca de 3,5Ma).

A datação sugere uma separação entre *Micrurus* e *Micruroides* ainda no Mioceno (20Ma, 16-24Ma, 95% *highest posterior density* (HPD)). O surgimento do grupo das cobras-corais triádes sul-americanas há cerca de 14Ma (11-16Ma, 95% HPD) (cerca de 9 milhões antes do surgimento do grupo das mônades) sugere que as espécies mais antigas de *Micrurus*, existentes hoje, estão na América do Sul, sendo um indício da diversificação do gênero primeiro no continente sul-americano. Das 37 espécies de nossa filogenia, *Micrurus*

laticollaris, *dissoleucus*, *mipartitus* e *narduccii* aparecem como as mais antigas, mostrando que o surgimento do padrão bicolor aconteceu cedo na história do gênero.

O ancestral comum do grupo das *Micrurus* com padrão mônades existentes se diversificou há cerca de 5,7 milhões de anos (6,7-4,5Ma, 95% HPD), com *M. corallinus*, *alleni* e *elegans* sendo as espécies existentes mais antigas. *M. corallinus* e *alleni* aparecem como grupo irmão de todos os outros membros do grupo (*elegans* + *mertensis*, *bocourti* + *albicintus* + *corallinus* + *ornatissimus* + *psyches* + *dumerilii* e *fulvius* + *tener* + *mosquitensis* + *nigrocinctus* + *diastema* + *browni*). O fato de que *M. tener* e *fulvius* aparecem como um dos clados mais divergente dentro da América do Norte, filogeneticamente muito distantes do grupo irmão *Micruroides*, é um indício do surgimento sul-americano de *Micrurus*.

Além da coloração, os grupos formados por nossa filogenia também indicam o monofiletismo suportado pelo caractere tamanho de cauda. Como já bem discutido por Gutberlet and Harvey (2004), as espécies com padrão de anéis em tríades possuem caudas curtas (4-10,8% do tamanho corporal), e as espécies com anéis em mônades têm caudas alongadas (10-18,5% do tamanho corporal).

O resultado da análise S-DIVA (Figura 2) apresentou uma probabilidade de 72% do ancestral do gênero *Micrurus* (nó 93 da Figura 3) (resultado completo no arquivo “Dispersa linfo” do material suplementar) estar presente na América do Sul e Central há cerca de 15Ma, o que dá suporte a teoria da origem sul-americana do gênero, e uma migração tardia para o norte. Já para o ancestral comum das espécies tríades (nó 73 da figura 3), a análise mostrou uma probabilidade de 99% que ele estava presente entres as áreas onde hoje estão a América Central e Amazônia durante a metade do Mioceno. Além disso, foi calculada uma probabilidade de 90% de ter ocorrido um evento de vicariância que levou a especiação da linhagem de *M. laticollaris* e o ancestral comum de todas as outras espécies tríades. A separação entre o ancestral comum das cobras-corais tríades típicas de áreas mais úmidas na Floresta Amazônica (grupo *M. lemniscatus*, *surinemensis* e *hemprichii*) e os ancestral comum as demais do sul da América do Sul (grupo *M. decoratus* até *M. baliocoryphus*) (nó 70),

parece ter ocorrido também por vicariância (96% na matriz de eventos). Os nós 71 e 65 marcam especiações que ocorreram por dispersão (48% e 90% respectivamente), no primeiro caso separando a linhagem de *M. narducci* do ancestral das demais espécies tríades da América do Sul, e no segundo caso (nó 65) separando os ancestrais das espécies *M. altirostris* e *spixii*, dos ancestrais de *M. brasiliensis*, *frontalis*, e *ibiboboca*, serpentes mais adaptados a climas secos.

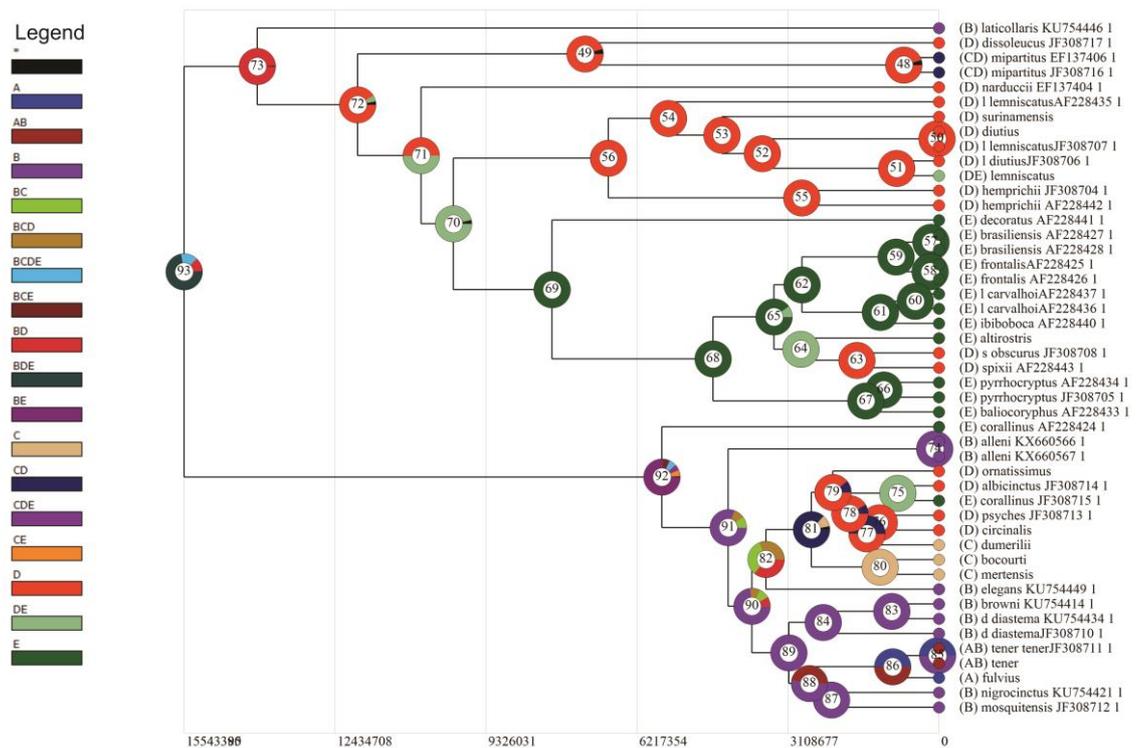


Figura 3: Árvore gerada pela análise S-DIVA no programa RASP. A datação em anos está presente em baixo da árvore. Os gráficos de pizza em cada nó da árvore reflete a probabilidade do ancestral na respectiva área. As áreas são codificadas por cores como mostrado na legenda ao lado, permitindo distribuições únicas ou combinadas. Dentro de cada gráfico de pizza está o número de identificação de cada nó. Antes do nome de cada espécie está atribuída a sua área, que está de acordo com a tabela 1.

Para o ancestral comum das espécies mônades, a análise S-DIVA calculou uma probabilidade de 76% que ele estava distribuído entre as áreas da América Central e do Sul (*Brazilian shield*, Figura 1), com probabilidade de 61% de um evento de vicariância ter separado a linhagem de *M. corallinus*, do ancestral das demais espécies mônades. Eventos de vicariância também foram sugeridos nos: nó 82 (31%), separando *M. elegans* (hoje da América Central) do ancestral comuns de outras espécies mônades da América do Sul; nó 81 (77%) separando ancestrais das espécies com distribuição trans e cis-Andes; e nó 75 (100%), separando *M. albicinctus* (da Floresta Amazônica) de *M. corallinus* (da

Mata Atlântica). Eventos de dispersão foram atribuídos nos nós 90 e 82, porém com probabilidades ainda mais baixas (26% e 31% respectivamente), e ambos os nós marcam separações dos ancestrais de espécies mônades que estão presentes hoje estão na América do Norte e Central, e espécies mônades que permaneceram na América do Sul.

4. DISCUSSÃO

Foram usados todos os dados publicamente acessíveis do gene ND4 para construir uma filogenia datada do gênero *Micrurus* e uma análise de dispersão e vicariância, com o intuito de entendermos melhor a história biogeográfica do grupo dentro das Américas. A filogenia resultante apresentou grupos congruentes com a maioria das árvores filogenéticas da literatura, mas a datação apresentada aqui aponta para um surgimento mais recente do gênero em comparação com esses outros trabalhos (Pyron *et al.* 2013; Tonini *et al.* 2016; Jowers *et al.* 2019). O monofiletismo dos dois grandes grupos baseado, no padrão de coloração das serpentes, é suportado pelo caractere tamanho de cauda e forma do hemipênis como na filogenia de Slowinski (1996), e também por outras filogenias moleculares (Jorge da Silva and D. Aird 2001; Gutberlet and Harvey 2004).

É interessante ressaltar que algumas hipóteses que levam em consideração caracteres morfológicos sugeriam colocar *M. laticollaris* como grupo irmão de *M. elegans* por ambas apresentarem padrão de anéis aparentemente em tríades e distribuição restrita no México (Gutberlet and Harvey 2004; Lomonte, Rey-Suárez, *et al.* 2016), mas nossa filogenia, assim como a construída por Jowers *et al.* (2019) refuta essa ideia. Na verdade, os anéis corporais da *M. elegans* não formam tríades completas, sugerindo um padrão de coloração derivado, e sua posição filogenética dentro do grupo com mônades pode indicar que a espécie está passando por uma transição no seu padrão de cor (Campbell and Lamar 2004); assim ela será tratada no presente trabalho como pertencente ao grupo mônade. Além disso, a forma do hemipênis de *M. elegans* é semelhante às outras do grupo mônade, dando suporte ao monofiletismo do grupo (Campbell and Lamar 2004). Também é importante

ressaltar que *M. laticollaris* apresenta apenas uma sequência amostrada nos bancos de dados do NCBI, e sua posição na filogenia não está bem suportada para darmos maior certeza sobre a sua posição filogenética.

4.1. Origem sul-americana de *Micrurus*

Nossa árvore mostra espécies sul-americanas, em especial *M. laticollaris*, *dissoleucus* e *mipartitus*, como as primeiras espécies tricolor tríades a se divergirem, entre 16 e 11 Ma, e logo depois mais espécies sul-americanas, principalmente tricolores tríades e bicolor, se diversificaram, o que suporta a ideia da origem Sul-Americana do gênero *Micrurus* (Savage 1982; Gutberlet and Harvey 2004). Esses mesmos resultados foram encontrados por Jowers *et al.* (2019). Por *Micruroides* ser endêmica da América do Norte, pensava-se que a origem de seu grupo irmão, *Micrurus*, era justamente nessa região, porém *Micruroides* está filogeneticamente muito distante de outros grupos de *Micrurus* tipicamente da América do Norte, como *M. fulvius* e *M. tener*, que são uma das espécies mais divergentes do gênero de acordo com nossa datação e as de outros autores (Lee *et al.* 2016; Tonini *et al.* 2016; Jowers *et al.* 2019). Logo, populações ancestrais dessas duas espécies norte americanas migraram para a América do Norte a posteriori da diversificação (na América do Sul) do gênero. Nossa análise S-DIVA suporta essa hipótese, porém aponta a distribuição do ancestral de *Micrurus* também na área onde hoje se encontra a América Central, sugerindo a colonização de ilhas presentes entre a América do Norte e do Sul, durante a formação do Panamá.

Nossa datação aponta para a divergência entre *Micruroides* e *Micrurus* já durante o Mioceno (Figura 2), com o ancestral de *Micrurus* se divergindo entre os grupos mônades e tríades há cerca de 15.5 milhões de anos (13-18 Ma, 95% HPD). Se já sabemos que a dispersão das cobras-corais para as Américas se deu pela ponte onde hoje se encontra o estreito de Bering (Kelly *et al.* 2009), então uma população migrou da América do Norte para o Sul, onde aconteceu a divergência de *Micrurus*. Desta forma, sugere-se que essa migração para a América do Sul ocorreu através de um arco de ilhas resultante da elevação das principais cadeias montanhosas da América Central durante meados do Mioceno, entre 20 e 10 milhões de anos atrás (Pindell and Kennan 2001; Savage 2002; Dick *et al.* 2004; James 2005; Lomonte, Rey-Suárez, *et al.* 2016).

Nessa época o planeta estava passando pela transição climática do Mioceno, com sua temperatura sendo reduzida cerca de 6°-8°C, o que pode ter sido um dos motivos de uma possível migração de populações ancestrais das serpentes, vindas do Norte em direção regiões mais quentes, ao Sul (Mercer and Sutter 1982; Harris and Mix 2002; Shevenell 2004; Lewis *et al.* 2008). Eventos migratórios e até de extinção nesse período de resfriamento já foram documentados para animais ectotérmicos (Bohme 2003). Como consequência dessa queda de temperatura, as calotas polares começaram a aumentar de volume, e o nível do mar foi diminuindo (Shevenell, 2004; Lewis, 2008), o que pode ter facilitado a passagem de animais pelos arcos de ilhas. Tais ilhas também já facilitaram a dispersão de outros grupos que formaram a atual herpetofauna neotropical (Savage 2002). A probabilidade da área ancestral calculada pela análise S-DIVA (72% no nó 93 da Figura 3) também dá suporte à hipótese dessa rota de dispersão Norte-Sul do ancestral de *Micrurus*, possivelmente com grupos de indivíduos tendo permanecido em uma dessas ilhas que ligavam a América do Norte e Sul. A datação de Tonini (2016) parece corroborar com essa hipótese, tendo em vista que em sua filogenia o surgimento de *Micrurus* está datado há cerca de 19.7 milhões de anos, com *M. narducci* como primeiro grupo a se diversificar na América do Sul (*M. laticollaris* não foi incluída na referida filogenia).

Uma outra alternativa seria o cenário em que o ancestral de *Micrurus* chegou na América do Sul num passado ainda mais distante, através do Arco da Proto-Antilha, que durante o Eoceno pode ter servido como um corredor de ilhas entre a América do Norte e do Sul que durou entre 10 e 5 milhões de anos (Savage 1982; Pindell and Kennan 2001; Savage 2002; Dick *et al.* 2004; Lomonte, Rey-Suárez, *et al.* 2016; Jowers *et al.* 2019). Assim, da mesma forma que aponta Lomonte *et al.* (2016), independente de quando aconteceu, foi uma população ancestral provavelmente sul-americana que deu origem ao gênero *Micrurus*.

4.2. Dispersão grupo tríade

A linhagem que deu origem à *Micrurus laticollaris*, a única espécie com padrão tríade de nossa filogenia que não está distribuída na América do Sul, foi uma das primeiras a se diversificar dentro do grupo das cobras-corais com

padrão em tríades. Alinhado com os resultados da análise S-DIVA que aponta um ancestral comum de *Micrurus* tríade também presente na América Central, pode significar que uma parcela dessa população ancestral vinda da América do Norte permaneceu nas ilhas que conectava o continente Sul-Americano do Norte-Americano, que posteriormente formou a América Central. Outra alternativa seria considerar duas levas de migração, em que, após a chegada da população ancestral na América do Sul, a linhagem que deu origem à *Micrurus laticollaris* migrou de volta para o norte dos arcos de ilhas existentes na época e se isolado na área onde hoje se encontra o México. Mas devido ao baixo suporte da posição filogenética dessa espécie em nossa árvore não é possível fazer afirmações mais conclusivas sem que mais dados moleculares, morfológicos e ecológicos sejam coletados.

Da mesma forma do grupo mônade, a maior parte dos processos de especiação nas linhagens da América do Sul ocorreram durante o Plioceno e Pleistoceno (Figura 2). O levantamento dos Andes parece ter tido grande participação na evolução do grupo das *Micrurus* com coloração bicolor ou tricolor com padrão tríade. A cadeia de montanhas dos Andes é um resultado de processos de subducção de placas tectônicas às margens do Pacífico que começou ainda no período Paleogeno (há cerca de 65Ma), chegando próximo de sua configuração atual há cerca de 2.5 milhões de anos (Hoorn *et al.* 2010; Mora *et al.* 2010).

Podemos ver um claro exemplo de como essas montanhas podem ter moldado a distribuição das espécies ao olharmos *M. dissoleucus* e sua espécie irmã bicolor, *M. mipartitus*, que têm sua distribuição margeando os Andes desde o Equador até a Venezuela. A população ancestral que deu origem à *M. narduccii* (antigamente presente no gênero *Leptomicrurus* (Gutberlet and Harvey 2004)), apesar de baixa probabilidade calculada pela análise S-DIVA (48% de probabilidade de especiação por dispersão) parece ter descido do centro de distribuição do gênero, margeando as encostas leste dos Andes e se divergindo entre 9 e 12,5 milhões de anos na região cis-andina onde hoje se encontram a Bolívia e Peru.

As demais espécies do grupo do tricolor em tríades tomaram rotas de dispersão diferentes na América do Sul, todas apresentando distribuição trans-andina. Nossa filogenia sugere que o grupo formado por *decoratus*, *frontalis*, *brasiliensis*, *ibiboboca*, *lemniscatus carvalhoi*, *altirostris*, *spixii*, *pyrrhocryptus* e *baliocryphus* teve uma rota de dispersão que dependeu do fechamento do grande sistema “Acre” (Cavalcante 2006; Hoorn *et al.* 2010) para possibilitar a migração dessas espécies em direção ao sul. Com início do processo da orogênese dos Andes no oeste da América do Sul, uma espécie de Canyon se formou ao leste das montanhas criando uma área pantanosa pelo acúmulo de água vinda dos Andes entre 23 e 10 milhões de anos atrás. Essa área posteriormente deu lugar ao sistema “Acre”, um grande sistema fluvial transcontinental que percorria desde a área mais oeste da Floresta Amazônica até desembocar no Oceano Atlântico, na área do Brasil onde hoje se encontram os estados do Amapá e Pará, entre 10 e 7 milhões de anos atrás (Figueiredo *et al.* 2009; Hoorn *et al.* 2010). Essa massa de água teve papéis importantes na diversificação na biota atual dessa área (Fine *et al.* 2005). Já há cerca de 6.8 milhões de anos, sedimentos arrastados dos Andes fizeram com que esse canal de água diminuísse, e posteriormente desse lugar ao Rio Amazonas (Hoorn *et al.* 2010). De fato, algumas dessas espécies são encontradas em ambientes bastante secos - como *M. ibiboboca* presente na Caatinga; *M. brasiliensis* e *frontalis* no Cerrado – o que pode demonstrar que as populações ancestrais dessas espécies não tinham adaptabilidades para lidar com o ambiente aquático, que pudessem ser necessárias para que conseguissem atingir as localidades de suas distribuições atuais. Apesar de que as flutuações pleistocênicas possam também ter contribuído com a migração dessas espécies para essas áreas secas, que eram úmidas na época do pleistoceno (Wang *et al.* 2004), as áreas inundadas pelo sistema fluvial devem ter tido grande influência na dispersão do grupo.

É interessante notar que a distribuição de *M. lemniscatus carvalhoi* é simpátrica com as demais do seu grupo (*frontalis*, *brasiliensis*, *ibiboboca*, *lemniscatus carvalhoi*, *altirostris pyrrhocryptus* e *baliocryphus*). Dessa forma o parafiletismo do grupo de sub-espécies de *lemniscatus*, também comentado por Gutberlet and Harvey (2004), pode ser indício da presença de espécies crípticas.

O último grupo sugerido pela nossa filogenia (*hemprichii*, *surinamensis*, *lemniscatus* (sub-espécie não definida) e *l. lemniscatus*) teve sua população ancestral surgindo cerca de 10 milhões de anos (11,8 - 8,4Ma, 95% HPD) e sua dispersão parece ter acontecido principalmente na região da Floresta Amazônica. Nessa época, o sistema “Acre” ainda era uma grande massa de água transcontinental, mas *M. surinamensis* (cobra-coral aquática) e *M. lemniscatus* são frequentemente encontradas em regiões alagadas, e *M. hemprichii* é tipicamente encontrada às margens do Rio Amazonas (Gutberlet and Harvey 2004). Sendo assim, esse grupo parece ter uma adaptação melhor a ambientes aquáticos e florestais do que o grupo anterior, e a transição do sistema “Acre” para o Rio Amazonas não deve ter limitado sua dispersão. Já o Planalto Central do Brasil aparenta ter sido um fator limitante para a distribuição do grupo. Esse planalto é resultado de diversos processos erosivos que ocorreram na América do Sul durante a era Cenozoica e o Quaternário (Motta *et al.* 2002; Marques *et al.* 2004), e também delimita a distribuição de alguns outros grupos de Squamata (Nogueira *et al.* 2011; Valduju *et al.* 2012). A distribuição atual do grupo *lemniscatus* + *hemprichii* + *surinamensis* nas florestas aos redores da área do Planalto Central sugere que essa formação geológica teve um papel importante na história evolutiva dessas espécies, delimitando sua distribuição.

A análise S-DIVA sugeriu uma probabilidade de 96% de especiação por vicariância entre os ancestrais das espécies que formam o grupo mais do sul da América do Sul (*decoratus*, *frontalis*, *brasiliensis*, *ibiboboca*, *lemniscatus carvalhoi*, *altirostris*, *spixii*, *pyrrhocryptus* e *baliocryphus*) e os ancestrais das espécies do grupo da Floresta Amazônica (*surinamensis*, *hemprichii* e *lemniscatus*) (nó 70 da figura 3). Esse evento ocorreu provavelmente pela atuação do Sistema Acre na distribuição e diversificação das espécies de *Micrurus* tríades, dando suporte às hipóteses discutidas nos parágrafos anteriores.

4.3. Dispersão do grupo mônade

Durante o Mioceno e o Plioceno, muitas mudanças geomorfológicas e paleoclimáticas estavam acontecendo nas Américas que provavelmente tiveram protagonismo na história evolutiva do gênero *Micrurus*, como a aproximação da América do Norte e da América do Sul; formação da América Central e

fechamento do Istmo do Panamá; formação do arco de ilhas do Caribe; além do levantamento da cadeia montanhosa dos Andes, que teve implicações em todo o território sul-americano (Bacon 1971; Coates *et al.* 1992; Zamudio and Greene 1997; Zachos 2001; Ehlers and Poulsen 2009; Hoorn *et al.* 2010; Mora *et al.* 2010; Dea *et al.* 2016).

Das espécies existentes, nossa filogenia aponta *M. corallinus* e *alleni* como as mais antigas espécies mônades, com posterior diversificação das demais espécies da América do Sul, Central e do Norte, sugerindo que duas migrações ocorreram, uma em direção ao norte e uma segunda voltando para o sul. O surgimento do grupo, entre 6,9 e 4,5 milhões de anos (95% HPD), com *M. alleni* (da América Central) como uma das primeiras a se divergir aponta mais uma vez para a hipótese da colonização das ilhas semiemergentes presentes onde hoje está a América Central, antes do fechamento do Istmo do Panamá (Jowers *et al.* 2019), como já discutido no tópico anterior. Porém, o escasso registro fóssil do grupo torna difícil fazer afirmações mais concretas sobre essa história evolutiva (Streicher *et al.* 2016). As demais espécies mônades se dividiram em dois grupos, um que continuou na América Central e chegou a colonizar até a América do Norte; e outro grupo que fez uma segunda migração de volta para a América do Sul.

É importante notar que o monofiletismo de *M. corallinus* não foi suportado por nossa filogenia, o que levanta nossa atenção para a possibilidade de espécies crípticas ou erro na identificação de sequências depositadas no NCBI. Jowers *et al.* (2019), também chegou no mesmo resultado, e em Lee *et al.* (2016) e Tonini *et al.* (2016) uma divergência mais basal de *M. corallinus* também é suportada, mas os dois autores não incluíram *M. alleni* em suas análises.

A análise S-DIVA mostrou uma probabilidade de 80% da área ancestral das *Micrurus* mônades ser na América Central. Isso, juntamente com a datação e posição filogenética de *M. elegans* e *alleni*, duas das mais antigas espécies do grupo a divergirem, sugere que o centro de dispersão do grupo foi onde hoje está presente a América Central, quando o Istmo do Panamá estava já se fechando.

As *Micrurus* mônades são classificadas por Gutberlet and Harvey (2004) como mônades da América Central e do Norte, e mônades da América do Sul. Ao olharmos como o grupo sul-americano (*corallinus*, *circinalis*, *mertensis*, *bocourti*, *albicinctus*, *ornatissimus*, *psyches* e *dumerilii*) se distribui, vemos que o surgimento dos Andes deve ter moldado sua distribuição geográfica, sendo importante para o processo de evolução das cobras-corais (Lomonte 2016; Jowers 2018). Essas espécies são distribuídas no oeste da Floresta Amazônica (*ornatissimus* e *albicinctus*), na área trans-Andes do Equador e Colômbia (*bocourti* e *mertensis*), margeando a costa trans-andina, desde o Equador até o final dos Andes na Venezuela, e chegando até o Amapá no Brasil (*dumerilii*, *circinalis* e *psyches*), e na costa leste brasileira (*corallinus*). A distribuição de *M. ornatissimus* na margem cis-andina do Equador, com *M. bocourti* e *M. mertensis* do lado trans-andino do Equador sugere um processo de especiação por vicariância, dado por 77% de probabilidade pela análise S-DIVA (nó 81 da figura 3). Da mesma forma, *M. dumerilii* parece ter sua distribuição limitada pelo trans-Andes venezuelano, enquanto *M. psyches* está presente na área cis-Andes da Venezuela, sugerindo também um evento de vicariância (50% de probabilidade S-DIVA, nó 77 da figura 3).

A divergência entre *M. albicinctus* e *corallinus* foi uma das mais recentes do grupo (0,8Ma, 0,4 – 1,2Ma 95% HPD), e já mais distantes das montanhas dos Andes. Enquanto *albicinctus* tem uma distribuição na Floresta Amazônica brasileira e peruana, *corallinus* está presente na Mata Atlântica brasileira, na Argentina e no Paraguai (Campbell and Lamar 2004). Já se sabe que esses dois biomas já foram conectados algumas vezes no passado com a retração e expansão das matas, tendo o Chaco, Cerrado e Caatinga como conectores (Batalha-filho *et al.* 2013; Batalha-filho and Miyaki 2014). Uma dessas conexões ocorreu durante o Pleistoceno, quando flutuações no paleoclima causaram um aumento na umidade das florestas sul-americanas, e sua consequente expansão, que conectou a Amazônia à Mata Atlântica pelo Nordeste brasileiro (Auler and Smart 2001; Wang *et al.* 2004). A relação filogenética próxima das duas espécies sugere que sua linhagem ancestral teve uma distribuição mais extensa na América do Sul, com populações se isolando na Amazônia e na Mata Atlântica quando houve a retração dessas florestas. A

análise S-DIVA calculou uma probabilidade de 100% de um evento de vicariância entre essas duas espécies (nó 75 da figura 3).

Já a linhagem ancestral que deu origem as demais espécies do grupo mônade da América Central e do Norte (*browni*, *diastema*, *nigrocinctus*, *mosquitensis*, *tener* e *fulvius*) tinha um ancestral comum presente na América Central (100% probabilidade S-DIVA), e aparentemente começou a migrar na direção norte há cerca de 4 milhões de anos, quando o Istmo do Panamá já estava em sua fase final de fechamento (Coates *et al.* 1992; Bermingham and Martin 1998; Haug *et al.* 2001; Dick *et al.* 2004). Esse evento teve implicações não só na divergência de grupos de serpentes, mas na configuração fauno e florística atual das Américas, além de em processos evolutivos, geológicos, oceanográficos e climáticos (Zachos 2001; Bartoli *et al.* 2005; Lunt *et al.* 2008; Hoorn *et al.* 2010; Bacon, Christine D. Silvestro, Daniele Jaramillo, Carlos Smith, Tilston Brian Chakrabarty, Prosanta Antonelli 2015; Dea *et al.* 2016). Nesse tempo, a Terra vinha sofrendo um aquecimento que começou há cerca de 6 milhões de anos até 3 milhões de anos atrás (Zachos 2001). Esse aumento de temperatura se deu principalmente nas altas latitudes do hemisfério norte, chegando a ser cerca de 10°-20°C mais quente em latitudes acima de 70°N do que encontramos hoje, enquanto que em baixas latitudes as temperaturas eram próximas do que temos atualmente (Robinson *et al.* 2008), o que sugere que a temperatura da época permitia que as serpentes alcançassem regiões mais ao norte, que eram, antes de 6Ma, inviáveis devido às baixas temperaturas.

Com a colonização da América Central e do Norte, provavelmente surgiram novos nichos ecológicos que possibilitaram processos de especiação. Nesse período (há cerca de 3 milhões de anos), a Terra começou a se resfriar até as temperaturas atuais (Zachos 2001; Bartoli *et al.* 2005; Lunt *et al.* 2008). Assim, grande parte das espécies de *Micrurus* mônades divergiram nesse meio tempo (~3 milhões de anos), com algumas espécies (*M. fulvius* e *tener*) chegando até a região que hoje é o sul dos Estados Unidos há cerca de 1 milhão de anos, de acordo com nossa datação e registros fósseis (Streicher *et al.* 2016).

5. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram utilizados as sequências de ND4 do NCBI para construir uma filogenia datada do gênero *Micrurus*. Diferentemente de outros trabalhos, todas as sequências disponíveis de ND4 foram usadas, gerando uma sequência consenso para cada espécie da árvore. A datação apresentada aqui revelou uma divergência mais recente do gênero *Micrurus* do que em estudos passados. Sugerimos que população ancestral do gênero entrou América do Sul por um arco de ilhas que conectou a América do Norte e do Sul durante o Mioceno, apontando uma origem sul-americana de *Micrurus*. Também foi feita uma análise S-DIVA a partir da filogenia gerada, o que apontou uma provável área ancestral do gênero *Micrurus* abrangendo a América Central e do Sul. A análise também mostrou pontos de provável eventos de especiação por vicariância e dispersão, que tiveram bastante influência na história evolutiva do grupo. O fechamento do Sistema “Acre” e o fechamento do Istmo do Panamá foram dois eventos chaves que moldaram distribuição do grupo de *Micrurus* monades e tríades, abrindo novos nichos para a colonização de áreas na América do Norte, Central e Sul. A divergência das espécies da América do Sul foi bastante influenciada também pelo levantamento dos Andes, que provavelmente foi responsável por eventos de vicariância, separando espécies nos lados cis- e trans-andinos. Apesar de esforços feitos nos últimos anos para levantar mais informações sobre o gênero, ainda há poucos dados moleculares, ecológicos e fósseis, o que dificulta fazer afirmações mais concretas a respeito da história evolutiva de *Micrurus*.

6. REFERÊNCIAS

- Alfaro ME, Arnold SJ. 2001. Molecular Systematics and Evolution of Regina and the Thamnophiine Snakes. *Mol. phylo* 21:408–423. doi:10.1006/mpev.2001.1024.
- Auler AS, Smart PL. 2001. Late Quaternary Paleoclimate in Semiarid Northeastern Brazil from U-Series Dating of Travertine and Water-Table Speleothems. *Quat. Res.* 55:159–167. doi:10.1006/qres.2000.2213.
- Bacon, Christine D. Silvestro, Daniele Jaramillo, Carlos Smith, Tilston Brian Chakrabarty, Prosanta Antonelli A. 2015. Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112. doi:10.1073/pnas.1509107112.

- Bacon M. 1971. Distribution and ecology of the crabs *Cyclograpsus lavauxi* and *C. insularum* in northern New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 5:415–426. doi:10.1080/00288330.1971.9515395.
- Bartoli G, Sarnthein M, Weinelt M, Erlenkeuser H, Lea DW. 2005. Final closure of Panama and the onset of northern hemisphere glaciation. *Earth Planet. Sci. Lett.* 237:33–44. doi:10.1016/j.epsl.2005.06.020.
- Batalha-filho H, Fjeldsa J, Fabre P, Miyaki CY. 2013. Connections between the Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. *J. Ornithol* 154:41–50. doi:10.1007/s10336-012-0866-7.
- Batalha-filho H, Miyaki CY. 2014. Processos Evolutivos na Amazônia e na Mata Atlântica Evolutionary Processes in the Amazon and Atlantic Forest. *J. Soc. Technol. Environ. Sci.* 3:34–44.
- Bermingham E, Martin P. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes : testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Mol. Ecol.* 7:499–517.
- Bohme M. 2003. The Miocene Climatic Optimum : evidence from ectothermic vertebrates of Central Europe. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 195:389–401. doi:10.1016/S0031-0182(03)00367-5.
- Brodie EDI. 1993. Differential avoidance of coral snake banded patterns by free-ranging avian predators in Costa Rica. *Evolution (N. Y.)* 47:227–235.
- Brodie EDI, Janzen FJ. 1995. Experimental Studies of Coral Snake Mimicry: Generalized Avoidance of Ringed Snake Patterns by Free-Ranging Avian Predators. *Funct. Ecol.* 9:186. doi:10.2307/2390563.
- Campbell HW, Lamar WW. 2004. *The Venomous Reptiles of Western Hemisphere: Coral snakes and sea snakes, Elapidae Family.* Nova York: Cornell University Press.
- Castoe TA, Smith EN, Brown RM, Parkinson CL. 2007. Higher-level phylogeny of Asian and American coralsnakes , their placement within the Elapidae (Squamata), and the systematic affinities of the enigmatic Asian coralsnake *Hemibungarus calligaster* (Wiegmann , 1834). *Zool. J. Linn. Soc.* 151:809–831.
- Cavalcante LM. 2006. Aspectos Geológicos do Estado do Acre e Implicações na Evolução da Paisagem República Federativa do Brasil. :25.
- Coates AG, Jackson JBC, Collins LS, Cronin TM, Dowsett J, Bybell LM, Jung P, Obando JA. 1992. Geological Society of America Bulletin Closure of the Isthmus of Panama : The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geol. Soc. Am. Bull.* 104:814–828. doi:10.1130/0016-7606(1992)104<0814.
- Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, *et al.* 2013. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat. Publ. Gr.* 45. doi:10.1038/ng.2744.

- Darriba D, Taboada G, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9:772.
- Dea AO, Lessios HA, Coates AG, Eytan RI, Restrepo-moreno SA, Cione AL, Collins LS, Queiroz A De, Farris DW, Norris RD, *et al.* 2016. Formation of the Isthmus of Panama. *Sci. Adv.* 2:1–12.
- Dick CW, Pennington RT, Dick CW, Trans P, Lond RS. 2004. The role of immigrants in the assembly of South American rainforest flora. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 359:1611–1622. doi:10.1098/rstb.2004.1532.
- Ehlers TA, Poulsen CJ. 2009. Influence of Andean uplift on climate and paleoaltimetry estimates. *Earth Planet. Sci. Lett.* 281:238–248. doi:10.1016/j.epsl.2009.02.026.
- Figueiredo J, Hoorn C, Ven P Van Der, Soares E. 2009. Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan : Evidence from the Foz do Amazonas Basin. *Geology* 37:619–622. doi:10.1130/G25567A.1.
- Fine PVA, Daly DC, Munoz GV, Mesones I, Cameron KM. 2005. The Contribution Of Edaphic Heterogeneity To The Evolution And Diversity Of Burseraceae Trees In The Western Amazon. *Evolution (N. Y.)*. 59:1464–1478.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Ee B Van, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, *et al.* 2011. Phylogeny, Adaptative Radiation, and Historical Biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am. J. Bot.* 98:872–895. doi:10.3732/ajb.1000059.
- Gutberlet RL, Harvey MB. 2004. The evolution of New World venomous snakes. In: *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*. NY: Cornell University Press. p. 634–682.
- Harris SE, Mix AC. 2002. Climate and tectonic influences on continental erosion of tropical. *Geology* 30:447–450. doi:10.1130/0091-7613(2002)030<0447.
- Haug GH, Sciences E, Geomar RT. 2001. Role of Panama uplift on oceanic freshwater balance. *Geology* 29:207–210.
- Hoorn C, Wesselingh FP, Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Sanmartín I, Anderson CL, Figueiredo JP, Jaramillo C, *et al.* 2010. Amazonia Through Time: Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity. *Science (80-.)*. 330:927–932.
- Ivanov M. 2000. Snakes of the lower / middle Miocene transition at Vieux Collonges (Rhône , France), with comments on the colonisation of western Europe by colubroids. *Geodiversitas* 22:559–588.
- James KH. 2005. Arguments for and against the Pacific origin of the Caribbean Plate and arguments for an in situ origin. *Caribb. J. Earth Sci.* 39:47–67.
- Jorge da Silva N, D. Aird S. 2001. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms.

- Jowers MJ, Murphy JC, Luis J, Mudarra G. 2019. Phylogeography of West Indies Coral snakes (*Micrurus*): Island colonisation and banding patterns. *Zool. Scr.* 48:263–276. doi:10.1111/zsc.12346.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.*:1–7. doi:10.1093/bib/bbx108.
- Kelly CMR, Barker NP, Villet MH, Broadley DG. 2009. Cladistics Elapoidea : a rapid radiation in the late Eocene. *Mol. Ecol.* 25:38–63. doi:10.1111/j.1096-0031.2008.00237.x.
- Kitchens CS, Mierop V. 1987. Envenomation by the Eastern Coral Snake (*Micrurus fulvius fulvius*) Study of 39 Victims. *JAMA* 12.
- Kryukova E V, Egorova NS, Kudryavtsev DS, Lebedev DS. 2019. From Synthetic Fragments of Endogenous Three-Finger Proteins to Potential Drugs. *Front. Pharmacol.* 10. doi:10.3389/fphar.2019.00748.
- Lee MSY, Sanders KL, King B, Palci A. 2016. Diversification rates and phenotypic evolution in venomous snakes (Elapidae) Subject Category : Subject Areas : R. Soc. open Sci. 3. doi:http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150277.
- Lewis AR, Marchant DR, Ashworth AC, Hedena L, Leng MJ, Machlus ML, Newton AE, Raine JJ, Willenbring JK, Williams M, *et al.* 2008. Mid-Miocene cooling and the extinction of tundra in continental Antarctica. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:10676–10680.
- Lomonte B, Rey-Suárez P, Fernández J, Sasa M, Pla D, Vargas N, Bénard-Valle M, Sanz L, Corrêa-Netto C, Núñez V, *et al.* 2016. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon* 122:7–25. doi:10.1016/j.toxicon.2016.09.008.
- Lunt DJ, Foster GL, Haywood AM, Stone EJ. 2008. Late Pliocene Greenland glaciation controlled by a decline in atmospheric CO₂ levels. *Nature* 454. doi:10.1038/nature07223.
- Marincovich L, Gladenkov AY. 2001. New evidence for the age of Bering Strait. *Quat. Sci. Rev.* 20:329–335.
- Marques JJ, Schulze DG, Curi N, Mertzman SA. 2004. Major element geochemistry and geomorphic relationships in Brazilian Cerrado soils. *Geoderma* 119:179–195. doi:10.1016/S0016-7061(03)00260-X.
- Mercer JH, Sutter JF. 1982. Late Miocene-Earliest Pliocene glaciation in Southern Argentina: Implications for global ice-sheet history. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 38:185–206.
- Mora A, Baby P, Roddaz M, Parra M, Brusset S, Hermoza W, Espurt N. 2010. Tectonic history of the Andes and sub-Andean zones : implications for the development of the Amazon drainage basin. In: C. Hoorn FPW, editor. *Amazonia, Landscape and Species Evolution: A Look into the Past.* Wiley-Blackwell. p. 38–60.

- Motta PEF, Filho A de C, Ker JC, Pereira NR, Junior W de C, Blancaneaux P. 2002. Relações solo-superfície geomórfica e evolução da paisagem em uma área do Planalto Central Brasileiro. *Pesq. agropec. bras.* 37:869–878.
- Nagy ZT, Lawson R, Joger U, Wink M. 2004. Molecular systematics of racers , whipsnakes and relatives (Reptilia : Colubridae) using mitochondrial and nuclear markers. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 42:223–233.
- Newkirk DR, Martin EE. 2009. Circulation through the Central American Seaway during the Miocene carbonate crash. *Geology* 37:87–90.
doi:<https://doi.org/10.1130/G25193A.1>.
- Nogueira C, Ribeiro S, Costa GC, Colli GR. 2011. Vicariance and endemism in a Neotropical savanna hotspot : distribution patterns of Cerrado squamate reptiles. *J. Biogeogr.* 38:1907–1922. doi:10.1111/j.1365-2699.2011.02538.x.
- Osborne AH, Newkirk DR, Groeneveld J, Martin EE, Tiedemann R, Frank M. 2014. The seawater neodymium and lead isotope record of the final stages of Central American Seaway closure. *Paleoceanography* 29:715–729.
doi:10.1002/2014PA002676.Received.
- Peterson ME. 2006. Snake Bite : Coral Snakes. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 21.
doi:10.1053/j.ctsap.2006.10.005.
- Pettigrew C. 1985. Neurologic complications of a coral snake bite. *Neurology* 35:589–592.
- Pindell J, Kennan L. 2001. Kinematic Evolution of the Gulf of Mexico and Caribbean. *Pet. Syst. Deep. Basins–Global Gulf Mex. Exp.* 21.
doi:<https://doi.org/10.5724/gcs.01.21.0193>.
- Pyron R, Burbrink FT, Wiens JJ, Greene H, Vitt L, Caldwell J, Pianka E, Vitt L, Kasturiratne A, Wickremasinghe A, *et al.* 2013. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evol. Biol.* 13:93.
doi:10.1186/1471-2148-13-93.
- Queiroz A De, Lawson R, Lemos-espinal JA. 2002. Phylogenetic Relationships of North American Garter Snakes (*Thamnophis*) Based on Four Mitochondrial Genes : How Much DNA Sequence Is Enough ? *Mol. Phylogenet. Evol.* 22:315–329.
doi:10.1006/mpev.2001.1074.
- Rage J-C, Holman J. 1984. DES SERPENTS (REPTILIA, SQUAMATA) DE TYPE NORD-AMIÉRICAIN DANS LE MIOCIÈNE FRANÇAIS. ÉVOLUTION PARALLÈLE OU DISPERSION ? *Geobios* 17:89–104.
- Rey-Suárez P, Núñez V, Fernández J, Lomonte B. 2016. Integrative characterization of the venom of the coral snake *Micrurus dumerilii* (Elapidae) from Colombia: Proteome, toxicity, and cross-neutralization by antivenom. *J. Proteomics* 136:262–273.
doi:10.1016/j.jprot.2016.02.006.
- Robinson MM, Dowsett HJ, Chancler M. 2008. Pliocene Role in Assessing Future Climate Impacts. *Eos (Washington. DC).* 89:501–512.

- Roze JA, Bernal-Carlo A. 1987. Las serpientes corales venenosas del genero *Leptomicrurus* (serpentes, Elapidae) de Suramérica con descripción de una nueva subespecie. Bollettino. Mus. Reg. di Sci. Nat. Torino 5:573–608.
- Sanders KL, Lee MSY, Bertozzi T, Rasmussen AR. 2013. Molecular Phylogenetics and Evolution Multilocus phylogeny and recent rapid radiation of the viviparous sea snakes (Elapidae : Hydrophiinae). Mol. Phylogenet. Evol. 66:575–591. doi:10.1016/j.ympev.2012.09.021.
- Savage JM. 1982. The enigma of the Central American herpetofauna: dispersals or vicariance? Ann. Missouri Bot. Gard. 69:464–547.
- Savage JM. 2002. The amphibians and reptiles of Costa Rica: a herpetofauna between two continents, between two seas. University of Chicago press.
- Shevenell AE. 2004. Middle Miocene Southern Ocean Cryosphere Expansion. Science (80-.). 305:1766–1770. doi:10.1126/science.1100061.
- Slowinski J. 1995. A phylogenetic analysis of the New World Coral Snakes (Elapidae: *Leptomicrurus*, *Micruroides*, and *Micrurus*) Based on Allozymic and Morphological Characters. 29:325–338.
- Streicher JW, Mcentee JP, Drzich LC, Card DC, Schield DR, Smart U, Parkinson CL, Jezkova T, Smith EN, Castoe TA. 2016. Genetic surfing , not allopatric divergence , explains spatial sorting of mitochondrial haplotypes in venomous coralsnakes. Evolution (N. Y). 70:1435–1449. doi:10.1111/evo.12967.
- Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1 . 10. Virus Evol. 4:1–5. doi:10.1093/ve/vey016.
- Szyndlar Z, Schleich HH. 1993. Description of Miocene snakes from Petersbuch 2 with comments on the Lower and Middle Miocene ophidian faunas of southern Germany. Stuttg. Beitr. Naturk 192:1–47.
- Tonini JFR, Beard KH, Barbosa R, Jetz W, Pyron RA. 2016. Fully-sampled phylogenies of squamates reveal evolutionary patterns in threat status. Biol. Conserv. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2016.03.039.
- Valduju PH, Silvano DL, Colli G, Martins M. 2012. Anuran species composition and distribution patterns in brazilian cerrado , a neotropical hotspot. South Am. J. Herpetol. 7:63–78.
- Wang X, Auler AS, Edwards RL, Cheng H. 2004. Wet periods in northeastern Brazil over the past 210 kyr linked to distant Wet periods in northeastern Brazil over the past 210 kyr linked to distant climate anomalies. Nature 432. doi:10.1038/nature03067.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. 2009. Jalview Version 2 — a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics 25:1189–1191. doi:10.1093/bioinformatics/btp033.

Yu Y, Harris AJ, He X. 2010. Molecular Phylogenetics and Evolution S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): A tool for inferring biogeographic histories. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56:848–850. doi:10.1016/j.ympev.2010.04.011.

Yu Y, Harris AJ, Blair C, He X. 2015. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): A tool for historical biogeography *Molecular Phylogenetics and Evolution Short Communication* *Mol. Phylogenet. Evol.* 87:46–49. doi:10.1016/j.ympev.2015.03.008.

Zachos J. 2001. Trends , Rhythms , and Aberrations in Global Climate 65 Ma to Present. *Science* (80-). 292:686–693. doi:10.1126/science.1059412.

Zamudio KR, Greene HW. 1997. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta* : Viperidae): implications for neotropical biogeography , systematics , and conservation. *Biol. J. Linn. Soc.* 62:421–442.

CAPÍTULO II

**EVIDÊNCIAS DE COEVOLUÇÃO ENTRE OS TRAÇOS DE COLORAÇÃO E
VENENO DE COBRAS-CORAIS DO GÊNERO *MICRURUS* (Wagler, 1824)**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aposematismo

Cores vivas e chamativas são características que compõem um complexo sistema de comunicação visual entre animais. Historicamente, tais características são interpretadas como um sinal de alerta, mostrando que o referido animal apresenta algum risco se confrontado; muitas vezes por ele apresentar alguma toxina (Brodie and Janzen 1995). Uma característica se torna aposemática geralmente quando um predador tem uma experiência desagradável com uma presa com características conspícuas, e por aprendizado, o predador começa a evitar tais padrões conspícuos na natureza (Savage and Slowinski 1992). Com isso, animais inofensivos que possuem esse padrão, serão beneficiados, já que os predadores irão tender a generalizar esse sinal visual recebido, confundindo os animais com as mesmas característica.

A coloração aposemática aparenta estar presente em vários grupos animais, como insetos (Sword *et al.* 2000; Tullberg *et al.* 2005; Grant 2007), rãs (Saporito *et al.* 2007), gastropoda (Guilford and Cuthill 1991), e serpentes (Wuster *et al.* 2004; Valkonen *et al.* 2011), especialmente, as cobras-corais do gênero *Micrurus* (Savage and Slowinski 1992; Brodie 1993; Brodie and Janzen 1995; Buasso *et al.* 2006; Ham *et al.* 2006), pelo seu padrão de cores chamativas em anéis, bicolor, tricolor e até quadricolor, com diferentes padrões, por exemplo em díades ou tríades. A coloração das *Micrurus* inclusive segue o padrão filogenético e geográfico do grupo, formando um grupo com coloração geralmente tricolor em tríades presentes na América Central e do Sul e outro grupo com coloração geralmente tricolor em mônades presentes nos três continentes Americanos (Campbell and Lamar 2004).

A função aposemática da coloração das cobras-corais já é debatida há mais de século, desde Wallace (1867), e estudos demonstram como a coloração poderia servir para evitar predadores (Jackson *et al.* 1976; Savage and Slowinski 1992; Ham *et al.* 2006). Utilizando modelos experimentais com pintura semelhante às de cobras-corais colocados na natureza ou à frente de possíveis predadores, vários trabalhos mostram que tais modelos são menos predados do que aqueles com coloração não chamativa, o que dá suporte a teoria do

aposematismo da coloração das cobras corais (Smith 1975; Brodie 1993; Brodie and Janzen 1995; Buasso *et al.* 2006).

Apesar de tudo, esses estudos com modelos abstratos podem não servir como evidência incondicional da função aposemática da coloração conspícua das cobras-corais. Quando a situação ocorre com cobras-corais vivas na natureza, nem sempre sua coloração é o bastante para afastar predadores (Beckers *et al.* 1996).

Por outro lado, outra pista para o aposematismo das cobras-corais é o suposto mimetismo que ocorre entre elas e outras serpentes. Quando os predadores passam a evitar presas relativamente inofensivas devido a sua característica aposemática damos o nome de mimetismo. Algumas serpentes não venenosas ou com uma baixa toxicidade, em relação às cobras-corais, possuem um padrão de coloração muito parecido ou às vezes exatamente igual ao de algumas cobras-corais, como algumas espécies do gênero *Erythrolamprus* da família Dipsadidae (ex-Colubridae) (M. G. Emsley 1966) (Figura 2). Essas serpentes, chamadas popularmente de “falsas-corais”, possuem a coloração dita aposemática das corais-verdadeiras, e são por isso chamadas de mímicas. Essa semelhança pode ser tão grande que não é incomum humanos confundirem umas das outras e acabarem sofrendo acidentes (Seib 1980; Minton 1990; Strauch *et al.* 2018).





Figura 2: (A) *Erythrolamprus aesculapii* apresenta um padrão de coloração muito similar ao padrão mônade de *Micrurus alleni*.

Se usarmos esses estudos como evidências, fica fácil pensarmos que a coloração das cobras-corais é realmente aposemática. Se esse for o caso, a coloração estaria servindo como um alerta para possíveis predadores à alta toxicidade do veneno dessas serpentes, como é, de fato, tradicionalmente entendido. Sendo assim, faz sentido, então, que esse padrão de cores tenha coevoluído com a toxicidade de veneno dessas serpentes. Porém, apesar dessa hipótese ser vista como um paradigma, não há muitos estudos que utilizem técnicas moleculares/evolutivas para demonstrarem essa relação entre o veneno das cobras-corais e suas cores chamativas.

1.2. O veneno das cobras-corais

A potencialidade do veneno das serpentes do gênero *Micrurus* é alta suficiente para matar grandes mamíferos (Roze 1996). Apesar da dificuldade de capturar e manter essas serpentes em cativeiro, além da baixa quantidade de veneno geralmente obtida nas extrações, já é bem entendido o mecanismo de ação das toxinas das cobras-corais (da Silva and Bucarechi 2003).

Sabe-se que uma das ações do veneno das cobras-corais é a miotóxica. A miotoxicidade pode causar mionecrose, atingindo principalmente a sarcolema, o que leva a danos mitocondriais e hipercontração dos microfilamentos pelo influxo de Ca^{2+} para o citosol (Gutiérrez *et al.* 1992).

Outra ação do veneno é a das neurotoxinas, que age com dois mecanismos: *pré-sináptica*, causada pela presença de proteínas com atividade fosfolipásicas, atuando em terminações axônicas impedindo a liberação de

acetilcolina (ACh) em nervos motores; e a *pós-sinápticas*, causada por proteínas desprovidas de ação enzimática (*three finger-toxin*, 3FTx), atuando em receptores de membranas pós-sinápticas da junção neuromuscular de nervos motores. Sendo assim, ambos os mecanismos das neurotoxinas vão causar paralisia (da Silva and Bucarechi 2003).

Ações hemorrágicas e neurotóxicas também já foram registradas, mas apenas em parte das espécies do gênero *Micrurus* (Francis *et al.* 1993; Francis *et al.* 1997; da Silva and Bucarechi 2003).

1.3. Toxicidade do veneno

A toxicidade do veneno das cobras-corais é relativa à suas presas. Tendo uma dieta altamente especializada, o veneno das *Micrurus* tem uma potencialidade maior em suas presas naturais do que nas não naturais. No estudo de Jorge da Silva e D. Aird (2001), eles testaram a toxicidade do veneno de 15 espécies de corais nas suas presas preferenciais (cobras, anfisbenas ou peixes) e em presas não naturais (ratos de laboratório). Como resultado, todos os venenos testados, com exceção do veneno da *M. albicinctus*, se mostraram mais tóxicos para as presas naturais dessas espécies do que as não naturais. Ainda, venenos injetados intravenosamente foram mais tóxicos do que os injetados intraperitoneal e intramuscularmente em presas naturais, mas não foram significativamente diferentes nos ratos de laboratório. Tais resultados mostram uma forte relação evolutiva entre predador-presas dentro do grupo das corais.

Além da toxicidade relativa a presas específicas, a composição do veneno das corais possuem baixa ou ausente atividade proteolítica, diferente do que se encontra em espécies de viperídeos. Uma alta atividade proteolítica acelera e aumenta a eficiência do processo de digestão de presas com uma baixa relação superfície–volume (típicas de viperídios) (Kardong 1980; Kardong 2012). Porém, geralmente as presas de *Micrurus* são cilíndricas e com uma alta relação de superfície–volume (anfibenas, lagartos ou cobras (Campbell and Lamar 2004)), mostrando que as presas são um importante fator na composição do veneno.

1.4. Composição do veneno

A composição do veneno pode ser analisada através da caracterização do seu proteoma ou pelo transcriptoma da glândula de veneno (Fry 2005; Kaas and Craik 2015). O veneno das serpentes é um complexo que contém cerca de 25% de sólidos totais, compondo carboidratos, nucleotídeos, compostos orgânicos, íons, e principalmente (70 a 90%), proteínas e polipeptídeos (da Silva and Bucarechi 2003). No caso do veneno das cobras-corais, seu veneno possui grandes variações composicional inter e intraespecíficas (Aird and Jorge da Silva 1991). Apesar da composição das toxinas das corais variarem bastante, diversos estudos mostram que os principais componentes do veneno das cobras-corais é a fosfolipase A2 (PLA2) e a toxina de três dígitos (3FTx), com múltiplas subclasses estruturais dessas toxinas, compondo entre 90 e 99% do veneno do grupo (figura 2) (Alape-Girón *et al.* 1999; Olamendi-Portugal *et al.* 2008; Dokmetjian *et al.* 2009; Ciscotto *et al.* 2011; Margres *et al.* 2013; Lomonte, Rey-Suárez, *et al.* 2016; Aird *et al.* 2017; Dashevsky and Fry 2018). Fora essas dois compostos, outras toxinas podem estar presentes e agem sinergicamente para o mecanismo de ação do veneno, como Peptídeo Natriurético Tipo-C (CNP), Lectina Tipo-C (CTL), Lectina Ligadora de Galactose (GBL), Metaloproteases (MP), entre outros (Aird *et al.* 2017). Apesar disso, tendo em vista o gasto para produção de veneno, é de se pensar que os dois compostos mais abundantes no veneno terão o maior papel em sua toxicidade (Lomonte, Rey-Suárez, *et al.* 2016). Os níveis de PLA2 e da 3FTx, além da presença e níveis dos outros peptídeos, determinam a diferença da composição do veneno entre as cobras-corais.

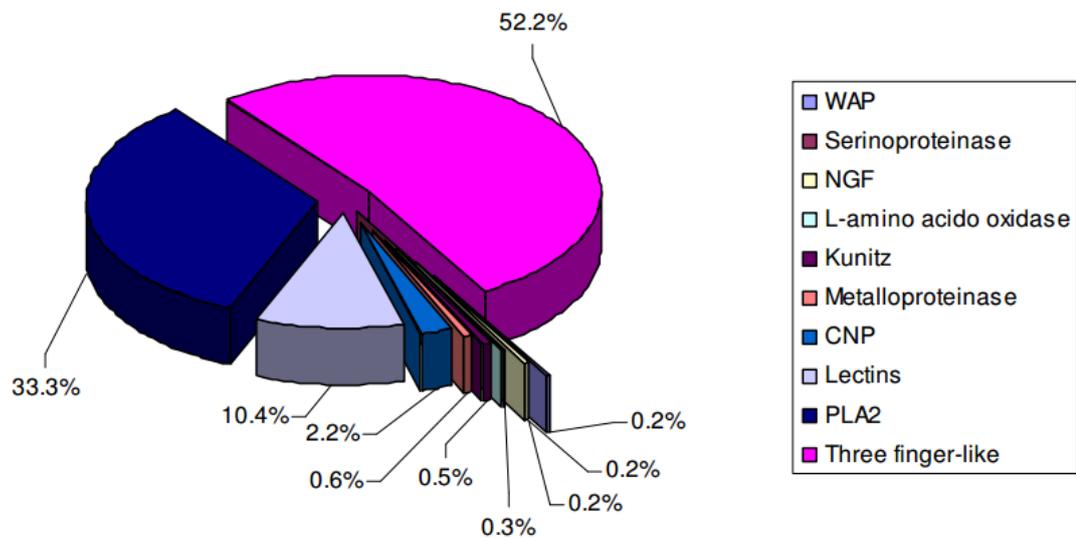


Figura 2: Proporção relativa das toxinas encontradas na glândula de veneno de *Micrurus corallinus*. Modificado de Leão *et al.* (2009).

A fosfolipase A2 (PLA2) (Figura 3) são mediadores celulares presentes em diversos venenos animais, não só de serpentes elapídios (Argiolas and Pisano 1983; Aird and Jorge da Silva 1991; Calvete *et al.* 2007). PLA2s são caracterizados por serem Ca^{2+} dependentes, conter grande conteúdo de ligações dissulfeto, e ter baixa massa molecular (Dennis 1994). Nos venenos das serpentes, a PLA2 exibe ações citotóxicas, neurotóxicas, miotóxicas, anticoagulantes e inflamatórias (Gutiérrez and Lomonte 1995; Alape-Girón *et al.* 1999; Aird *et al.* 2017). Elas são separadas em 3 grupos de acordo com a posição da ligação dissulfeto e tamanho das cisteínas, e possuem suas sequências de aminoácidos bem conservadas. As PLA2 dos elapídios pertencem ao grupo I; as PLA2 dos viperídios, crotalídeos e alguns mamíferos no grupo II; e PLA2 presente em lagartos das famílias Varanidae, Anguillidae e Helodermatidae estão no grupo III (Dennis 1994; Gutiérrez and Lomonte 1995; Fry *et al.* 2006).

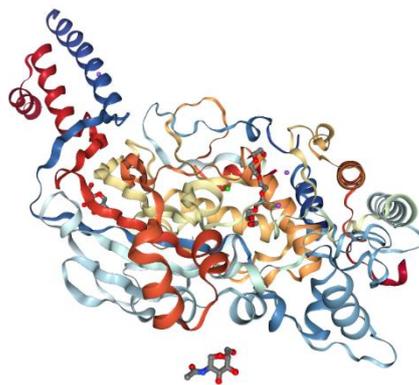


Figura 3: Estrutura da fosfolipase A2 extraída de *Micrurus tener*. Imagem do PDB, identificação: 4NTW. DOI: 10.2210/pdb4NTW/pdb.

As toxinas PLA2 estão presentes no clado dos *Reptilia* provavelmente desde a separação dos grupos de lagartos e serpentes (Fry *et al.* 2006). As PLA2 do grupo I foram recrutadas para o clado das serpentes provavelmente no ancestral do grupo dos Colubroidea no final do Eoceno (Fry *et al.* 2006; Fry *et al.* 2008; Kelly *et al.* 2009). E através de PLA2 do grupo II extraídas do veneno de *Bothrops jararacussu*, dá-se a hipótese que essa toxina surgiu por duplicação de genes (Moura-da-Silva *et al.* 1995).

A toxina de três dígitos (3FTx) contém de 60 a 77 aminoácidos, e é caracterizada por apresentar em sua estrutura três alças formadas por cinco folhas beta pregueadas antiparalelas emergindo de um núcleo globular, formando uma estrutura semelhante a três dedos estendidos de uma mão, daí vindo o nome da proteína (Endo and Tamiya 1991) (figura 4). Elas são resistentes a varrições físicas e ambientais, e pelo seu pequeno tamanho elas são absorvidas e se distribuem com facilidade no organismo da presa (Prieto da Silva 2001). A 3FTx possui ligações dissulfeto conservadas entre membros da família proteica, e além disso oito cisteínas bem conservadas estão presentes nas sequencias de aminoácidos dessa proteína ajudando a manter sua conformação (Dufton and Hider 1983; Antil *et al.* 1999). Dentro desta diversa família, as proteínas agem biologicamente interferindo com ações musculares por se ligar em receptores específicos, além de possuírem ações citotóxicas e cardiotoxícas (Kini and Doley 2010). Porém, a estrutura de três dígitos não é exclusiva de proteínas tóxicas, havendo várias proteínas e polipeptídios não-tóxicos

pertencentes a essa superfamília. Sendo assim, é provável que a família da 3FTx tenha evoluído de um ancestral não tóxico, através de duplicação de genes, por, por exemplo, substituições não-sinônimas de nucleotídeos (Fry *et al.* 2003; Kini and Doley 2010). O recrutamento dessa toxina no clado *Reptilia* ocorreu aparentemente apenas dentro do grupo das serpentes, antes da diversificação do grupo das Elapoidea e Colubroidea, no começo do Eoceno (Fry *et al.* 2006; Fry *et al.* 2008; Kelly *et al.* 2009).



Figura 4: Estrutura cristalina da toxina de três dígitos extraída de *Micrurus fulvius*. Imagem do PDB, identificação: 4RUD. DOI: 10.2210/pdb4RUD/pdb

A variação composicional do veneno das cobras-corais parece estar ligada à história evolutiva do gênero. Identificando algumas espécies de *Micrurus* com 3FTx dominante em seu veneno, e outras com PLA2 dominante, é possível perceber uma polarização das espécies ao longo da sua distribuição pelas Américas (Lomonte, Rey-Suárez, *et al.* 2016) (figura 5). Espécies que apresentam veneno rico em PLA2 tem um padrão mônade e estão mais concentradas na América do Norte, e as que apresentam veneno rico em 3FTx tem um padrão tríade e estão mais concentradas na América do sul, enquanto na América Central há uma mistura com algumas espécies ricas em 3FTx e algumas ricas em PLA2.

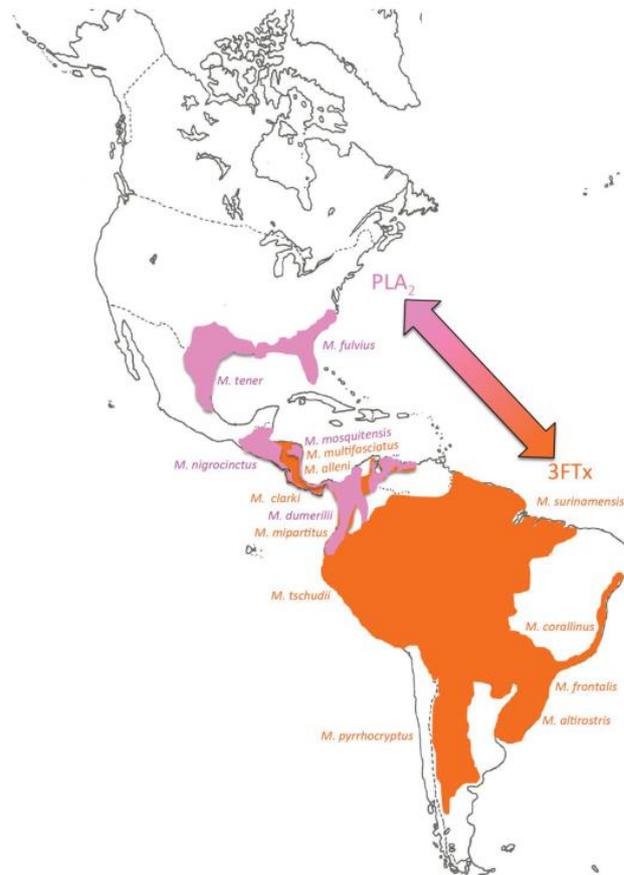


Figura 5: Polaridade da composição do veneno nas espécies de *Micrurus*. Em laranja as espécies com a toxina 3FTx dominante no veneno, em roxo as espécies com PLA₂ dominante no veneno. Modificado de Lomonte *et al.* (2016).

A combinação das toxinas PLA₂ e 3FTx é o que resulta na alta toxicidade do veneno das cobras-corais, e justamente por essa toxicidade que a coloração conspícua do grupo supostamente tem uma função aposemática. Sendo assim, é de se esperar que tais características estejam evolutivamente relacionadas. Com isso, o objetivo deste trabalho é testar se a coloração das cobras-corais coevoluiu com a toxicidade de seu veneno, dando a coloração sua característica aposemática, a partir de dados evolutivos e filogenéticos do gênero *Micrurus*. Foi feita uma filogenia para as duas toxinas mais relevantes no veneno dessas serpentes (3FTx e PLA₂), que foram comparadas com uma filogenia geral do grupo baseada na proteína NADH. Já que a coloração das cobras-corais segue o padrão de sua história evolutiva, essa comparação serve para investigar evidências de uma possível coevolução entre o veneno e a coloração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As sequências da sub-unidade 4 da NADH desidrogenase (ND4) foram escolhidas para serem utilizadas para a construção das filogenias por serem os genes com maior número de sequências extraídas de espécies de *Micrurus* nos bancos de dados. Todas as sequências de nucleotídeos da ND4 disponíveis do gênero *Micrurus* foram extraídas do NCBI. Todas as sequências foram visualmente analisadas, incluindo suas referências para atestar se eram realmente das espécies a que se referiam, e as sequências com dados perdidos (representado pela letra *n* no lugar do referido nucleotídeo), assim como as sequências repetidas, foram descartadas para não causarem interferência nas análises. Após coletadas, as sequências foram alinhadas no site do MAFFT v7 online (Kato *et al.* 2017). A partir do alinhamento, os fragmentos de tRNA (184bp) adjacentes aos genes ND4 foram descartados manualmente no próprio programa MAFFT v7 porque mais da metade das sequências não apresentavam tais frações, restando apenas sequências de ND4 de 666 pares de base (bp) para as análises. Devido à grande disparidade da quantidade de sequências amostradas para algumas espécies sobre outras (por exemplo, 60 sequências amostradas para *M. tener* e apenas uma de *M. corallinus*), o que podia resultar numa análise tendenciosa, uma sequência consenso foi gerada pelo programa Jalview (Waterhouse *et al.* 2009) para cada espécie que tinha mais de duas sequências de ND4 utilizadas. Considerando a heterogeneidade da taxa evolutiva de cada códon do gene, o alinhamento foi particionado por posição do códon (1º, 2º e 3º códon) e foi utilizado o programa PartitionFinder2 (PF) usando o algoritmo *greedy* e o Critério de Informação Bayesiano (BIC) para selecionar o melhor esquema de partição para o alinhamento (Lanfear *et al.* 2016).

Com isso, a árvore gerada foi construída pelo programa BEAST v1.10 (Suchard *et al.* 2018), com o modelo *uncorrelated relaxed log normal clock* com o modelo de especiação *Birth and Death*, e 10.000.000 de cadeias, amostrando a cada 1.000 rodadas. O modelo de partição sugerido foi o TrN+I+G (para o códon 1 e 2) e GTR+G (para o códon 3). Para essas análises a espécie *Micruroides euryxanthus* foi utilizada como grupo externo, e *Leptomicrurus narducci* foi incluída como pertencente ao gênero *Micrurus*, como já proposto em outros trabalhos (Slowinski 1995; Gutberlet and Harvey 2004; Castoe *et al.* 2007).

Para as filogenias baseadas no veneno das cobras-corais, todas as sequências das proteínas 3FTx e PLA2 disponíveis do gênero *Micrurus* foram extraídas do NCBI, excluídas as sequências repetidas. O alinhamento foi feito no site MAFFT v7 online (Kato *et al.* 2017). Uma sequência consenso de cada proteína foi gerada pelo programa Jalview (Waterhouse *et al.* 2009) para cada espécie que tinha mais de duas sequências disponíveis no banco de dados. Os melhores modelos evolutivos foram encontrados pelo programa ProtTest 3.2 (Darriba *et al.* 2011), que inferiu o modelo Blosum+I+G para o 3FTx e WAG+I+G para o PLA2. As árvores de inferência Bayesiana para as duas proteínas foram geradas pelo programa BEAST v1.10 com as mesmas configurações da árvore de NADH (capítulo 1). A visualização e edição da árvore foram feitas pelo programa FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). As análises geradas pelo BEAST tiveram a convergência e a estabilidade checadas usando o programa Tracer 1.5 (Suchard *et al.* 2018), e todas apresentaram valores do tamanho efetivo da amostra (ESS) > 200.

3. RESULTADOS

Um total de 39 sequências consenso de espécies de *Micrurus* foram usadas como base para a filogenia do ND4, e como grupo externo foi utilizado o gênero *Micruroides* (Figura 2). Para a filogenia da toxina 3FTx, foram geradas treze sequências consenso de 3FTx disponíveis das treze espécies de *Micrurus*, e *Naja atra* foi incluída como grupo externo (número de acesso do GenBank: P07525.1) por ser o parente mais próximo de *Micrurus* com a toxina 3FTx sequenciada (Figura 2). Já para a filogenia da toxina PLA2, sequências consenso de PLA2 das oito espécies *Micrurus* disponíveis foram utilizadas e *Naja atra* (número de acesso do GenBank: P00598.2) também foi incluída como grupo externo (Figura 3).

A filogenia do ND4 se mostrou congruente com as demais filogenias da literatura, no sentido que há uma clara separação entre os grupos tricolor em tríades da América do sul, e as demais tricolor em mônades da América do Norte e Central. Assim, é sugerido aqui que o padrão da coloração é um traço

explicado pela filogenia do grupo, e a história evolutiva desse traço segue o padrão histórico do gênero *Micrurus*.

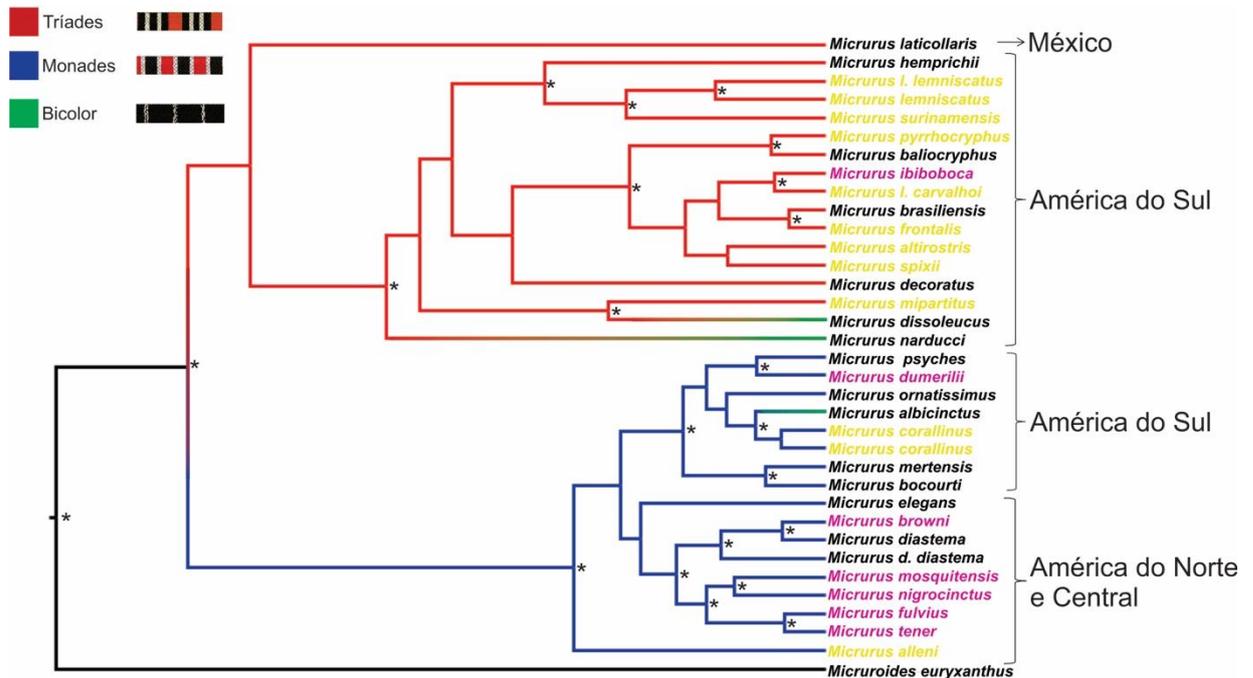


Figura 2: Árvore filogenética de Inferência Bayesiana baseada no gene ND4. Os ramos estão coloridos de acordo com o padrão de coloração das serpentes: espécies com padrão tríade (ramos em vermelho); espécies com padrão mônade (ramos em azul); e espécies com padrão bicolor (ramos em verde). Os nomes das espécies estão coloridos de acordo com a predominância das toxinas 3FTx ou PLA2 em seu veneno: espécies com nome amarelo têm 3FTx em predominância no seu veneno; espécies com nome roxo têm PLA2; espécies com nome preto não têm as devidas informações do seu veneno (dados retirados de Sanz *et al.* (2019)). Asteriscos indicam os nós com valores altos de suporte (>0.85).

Na filogenia da toxina 3FTx, vemos que as relações criadas pelas características da toxina seguem um padrão bastante próximo do que vemos na filogenia do ND4, com exceção de *M. nigrocinctus*, que será discutida melhor posteriormente. A posição de *M. laticollaris*, espécie norte americana, no grupo que está presente as espécies tipicamente sul-americanas com anéis em triades ou bicolor (*pyrrhocryptus* + *altirostris* + *mipartitus* + *frontalis* + *surinamensis*), e a posição de *M. corallinus*, espécie sul-américa, no grupo de espécies com anéis em mônades (*tener* + *fulvius* + *clarki* + *browni* + *diastema*) sugere que, da mesma forma do ND4, as características da toxina parecem ser explicadas pela filogenia do grupo, tendo padrão evolutivo que segue o padrão histórico do gênero *Micrurus*.

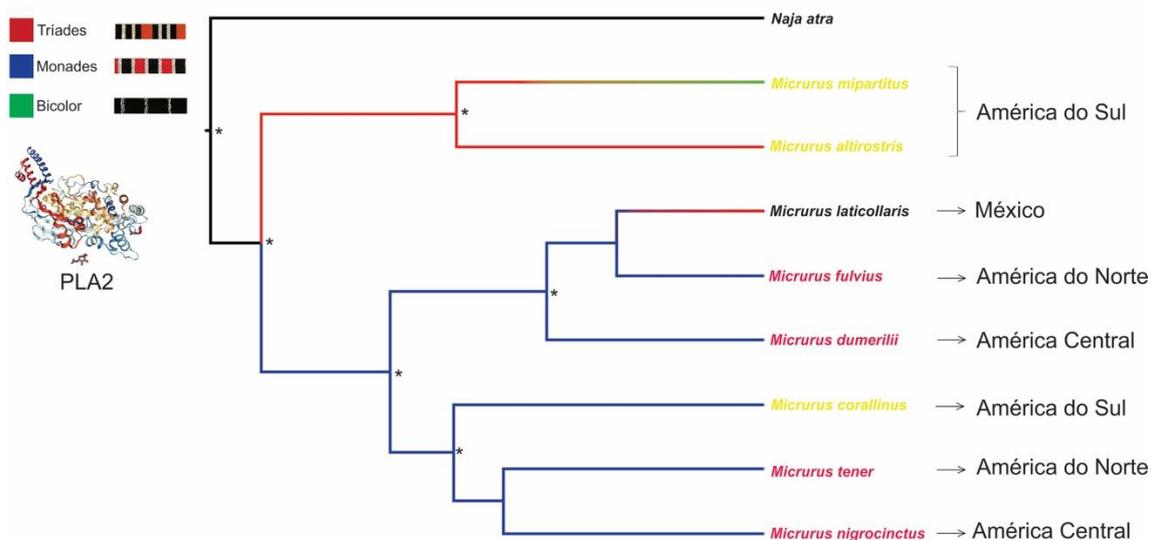


Figura 3: Árvore filogenética de Inferência Bayesiana baseada na toxina PLA2. Ramos e nomes das espécies coloridas da mesma forma da Figura 2. Asteriscos indicam os nós com valores altos de suporte (>0.85).

4. DISCUSSÃO

Nós reunimos sequências das toxinas 3FTx e PLA2 de serpentes do gênero *Micrurus* para construir uma filogenia de cada uma para verificar como o veneno de cada espécie se agrupa. A comparação foi feita com uma filogenia geral do grupo, baseada na proteína ND4, bastante utilizada em filogenias de Squamata (Pyron *et al.* 2013; Tonini *et al.* 2016; Jowers *et al.* 2019), e encontramos similaridades entre os grupos formados nas árvores do veneno e do ND4. O fato que a coloração das cobras-corais é uma característica que evoluiu de acordo padrão histórico do gênero, com grupos monofiléticos formados por serpentes do mesmo padrão de coloração, dá indícios que a coloração e o veneno das cobras-corais evoluíram juntos na história do grupo.

De modo geral, nossa filogenia do gene ND4 se mostrou congruente com outras árvores do gênero (Silva Jr. and Sites 2001; Gutberlet and Harvey 2004; Lee *et al.* 2016; Jowers *et al.* 2019), suportando a monofilia dos grupos baseados no padrão de coloração. As características do hemipênis e tamanho de cauda também suportam a monofilia desses grupos (Slowinski 1995; Gutberlet and Harvey 2004). As serpentes com padrão de coloração tricolor em tríades são distribuídas pela América do Sul, com exceção *M. laticollaris*, que tem

distribuição restrita ao México. Porém, ressaltamos que *M. laticollaris* apresenta apenas uma sequência amostrada nos bancos de dados do NCBI (Número de Acesso: KU754446.1), e sua posição na filogenia não está bem suportada para darmos maior certeza sobre a sua posição filogenética. Já as serpentes com padrão tricolor em mônades aparecem nos três continentes americanos (Roze and Tilger 1983; Roze and Bernal-Carlo 1987; Slowinski 1995; Roze 1996), se distribuindo por exemplo, desde o sul Mata Atlântica na costa leste brasileira com *M. corallinus*, passando pela América Central com *M. nigrocinctus*, e chegando na América do Norte com *M. fulvius* (Campbell and Lamar 2004).

A filogenia baseada ND4 nos conta a história evolutiva do gênero, e ao ver que os grupos formados em nossa filogenia estão separados de acordo com o padrão de coloração das espécies, sugerimos que a coloração é uma característica atrelada à história evolutiva do grupo, resultado também sugerido por outros trabalhos filogenéticos (Lomonte, Rey-Suárez, *et al.* 2016; Jowers *et al.* 2019). Se pensássemos que a coloração dessas serpentes fosse moldada de acordo com o ambiente em que elas vivem, ou de acordo com qualquer outro fator ambiental, provavelmente não veríamos as espécies de mesmo padrão de cor sendo agrupadas, mas sim espécies mais próximas geograficamente, ou relacionadas por algum fator ambiental específico, sendo agrupadas.

Mapeando o padrão de coloração das espécies podemos dar suporte à hipótese que esse traço surgiu no grupo das cobras-corais desde o início de sua história evolutiva, se diversificando de acordo com as divergências que aconteciam no grupo. O padrão tricolor em tríades parece ser um caráter ancestral, presente desde a origem do gênero *Micrurus*. A diversificação para o padrão tricolor em mônades, com *M. alleni*, ocorreu mais recentemente, à medida que as espécies do gênero se divergiam (ver Capítulo I e Jowers *et al.* (2019)).

4.1. Filogenia das toxinas

4.1.1. 3FTx

Pode-se pensar que a composição do veneno das cobras-corais seria explicada por fatores ambientais e/ou geográficos, já que os venenos das

serpentes são geralmente moldados de acordo com suas presas (Jorge da Silva and D. Aird 2001). Por essa razão não seria de muita surpresa um resultado que mostrasse, por exemplo, o veneno de *M. surinamenses*, que tem peixes como uma de suas principais presas (Morais *et al.* 2011), não estar relacionado com o veneno de *M. frontalis*, que se alimenta principalmente de anfisbenas, lagartos e cobras (Silva 2014). Porém, nossa filogenia da toxina 3FTx (figura 2) mostra o contrário, que na verdade a característica dessa toxina agrupa essas duas espécies de forma similar de como vemos na filogenia do ND4. Sendo essa uma primeira evidência apontando que a composição do veneno é um caráter intimamente ligado a história evolutiva do grupo.

Percebe-se que na filogenia do 3FTx, um dos grupos formados juntou *M. tener*, *fulvius*, *browni*, *diastema* e *clarki*, serpentes mônades típicas da América Central e do Norte, com *corallinus*, a única espécie mônade da América do Sul que temos o veneno sequenciado. Se fossemos pensar em um cenário em que as diferenças do veneno fossem moldadas por fatores ambientais, seria mais lógico vermos *M. corallinus* agrupado com *M. frontalis*, por exemplo, que possuem dietas praticamente idênticas com anfisbena, lagartos e cobras (Marques and Sazima 1997) e distribuições simpátricas no sul do Brasil (Campbell and Lamar 2004). Mas na verdade, *M. corallinus* está agrupado com *M. tener* e *fulvius*, espécies distribuídas no outro extremo do continente, nos Estados Unidos, de forma similar de como ocorre na filogenia do ND4, o que nos mostra outra evidência que as características do veneno evoluem juntas com a história evolutiva do gênero.

Outro ponto importante é a posição filogenética de *M. laticollaris*, espécie com padrão tríade do México, que está agrupada com *M. altirostris* e *M. pyrrhocryphus* espécies também tríades, mas do sul da América do Sul. Esse agrupamento de espécies de localidades bem distintas, mas com padrão de cor igual nos mostra mais indícios da evolução do veneno seguindo a história filogenética de *Micrurus*.

Porém, devemos levar em conta que a espécie com padrão em mônade e típica da América Central, *M. nigrocinctus*, também está presente no mesmo grupo de *M. laticollaris*, mostrando uma incongruência com a filogenia do ND4. Vale ressaltar que a única sequência de 3FTx de *M. nigrocinctus* utilizada

(número de acesso: P80548.1) foi publicada por Rosso *et al.* (1996), e que mais sequências deveriam ser analisadas para atestar se as características da toxina dessa espécie estão realmente mais relacionadas com às das serpentes sul-americanas. A alta variabilidade dos venenos de *Micrurus* (Aird and Jorge da Silva 1991) torna difícil basearmos nossos resultados na sequência de um único espécime.

A hipótese proposta da evolução do veneno das cobras-corais seguir o padrão da história evolutiva do gênero também foi discutida por Lomonte *et al.* (2016) ao explorar a dicotomia existente entre espécies de *Micrurus* com veneno mais rico em 3FTx e espécies com veneno mais rico em PLA2. O fato que as espécies ricas em 3FTx são as mais basais, possuem caudas curtas e estão distribuídas nas América do Sul e Central, enquanto as ricas em PLA2 são as espécies mais derivadas, que possuem caudas longas e distribuição na América do Norte e Central, fez Lomonte *et al.* (2016) concluir que a composição do veneno é explicada pela história evolutiva do grupo.

Essa dicotomia também foi suportada ao investigar outros venenos, como o de *M. clarki* (Lomonte, Sasa, *et al.* 2016) e *M. tschudii tschidii* (Sanz *et al.* 2016). Porém, o trabalho recente de Sanz *et al.* (2019) mostrou que a dicotomia da composição do veneno não é assim tão simples, ao explorar a composição do veneno de *M. ibiboboca*, tipicamente da América do Sul, que mostrou um veneno rico em PLA2. Sanz *et al.* (2019), no entanto, ressalta que as espécies de seu estudo que mostraram esse padrão incomum eram da Caatinga, uma ecoregião ainda pouco explorada cientificamente e que apresenta um *hotspot* de biodiversidade com propriedades de radiação adaptativa únicas (Santos *et al.* 2011; Guedes *et al.* 2014). Essas características podem ter favorecido de alguma forma para essa característica de veneno rico em PLA2, e mais estudos que mostrem a composição do veneno de outras espécies de *Micrurus* devem ser realizados para que a hipótese dessa dicotomia seja testada mais a fundo.

4.1.2. PLA2

Um padrão parecido com o encontrado para a filogenia do 3FTx ocorre na árvore do PLA2 (figura 3). Vemos que *M. altirostris* e *M. mipartitus*, ambas

distribuídas na América do Sul, se encontram isoladas na filogenia como as duas espécies com padrão tríade, dentre as três com esse padrão presentes, em nossa árvore. Assim, como na do 3FTx, a filogenia de PLA2 mostra uma incongruência, justamente com a posição da tríade *M. laticollaris*, que coincidentemente também só teve uma sequência (a única amostrada no NCBI. Número de acesso: ATA63216.1) utilizada para as análises. Nesse caso, o trabalho de Calcines-cruz *et al.* (2017) responsável pelo sequenciamento não deu detalhes a respeito do espécime utilizado em seu trabalho, levantando nossa atenção para possíveis casos de erros de identificação que são comuns na área de toxicologia (Fry *et al.* 2003).

Mas é interessante notar que a posição filogenética de *M. corallinus* está semelhante com o que vimos na filogenia do 3FTx, se agrupando com espécies distribuídas em regiões bem diferente, *M. tener e nigrocinctus*, da América do Norte e Central. Tal cenário não se encaixaria numa hipótese em que o veneno estaria evoluindo baseado em fatores ambientais como já discutido anteriormente. Dessa forma, identificamos aqui mais uma evidência que mostra como o veneno poderia estar seguindo a história evolutiva do gênero.

Apesar das incongruências encontradas com *nigrocinctus* na árvore da 3FTx e *laticollaris* na árvore da PLA2, não há como ignorar as similaridades encontradas na filogenia que explica o padrão de coloração do gênero *Micrurus* (ND4) com as que mostram como se agrupam filogeneticamente o veneno de cada espécie. Como é possível perceber que a coloração presente nas espécies da filogenia do ND4 está seguindo a história evolutiva do gênero (Lomonte, Rey-Suárez, *et al.* 2016; Jowers *et al.* 2019; Sanz *et al.* 2019), e que a composição do veneno também parece seguir esse mesmo padrão, os nossos resultados sugerem que a coloração pode, de fato, ter coevoluído com o veneno das cobras-corais.

Sem dúvidas esse padrão de cor conspícuo teve grande importância para o sucesso da evolução das cobras-corais, sendo mantido no grupo até hoje. Cores chamativas são geralmente associadas com a capacidade de evitar predadores alertando-os sobre um possível perigo (aposematismo), mas também pode ser uma estratégia de fuga, confundindo os predadores com as séries de anéis enquanto a serpente foge (Brattstrom 1955; Allen *et al.* 2013). Assim, é provável que uma pressão seletiva exercida por predadores tenha agido fortemente sobre

as cobras-corais e tenha resultado nesse padrão de cor aposemático que está sendo refletido pelo genoma (Lomonte, Rey-Suárez, *et al.* 2016; Rabosky *et al.* 2016; Jowers *et al.* 2019).

Sabemos que as toxinas do veneno das cobras-corais foram recrutadas muito antes da divergência do grupo (Fry *et al.* 2006; Fry *et al.* 2008), ou seja, antes do aparecimento do padrão de cor dessas serpentes. Isso sugere em que genes responsáveis pelo padrão de cor (e possivelmente tamanho de cauda e forma do hemipênis (Gutberlet and Harvey 2004; Lomonte, Rey-Suárez, *et al.* 2016)) surgiram e tiveram uma história evolutiva intimamente ligada aos genes responsáveis pela expressão das toxinas, sofrendo pressões seletivas ao menos similares, seja por pleiotropia, efeito carona ou qualquer outro fenômeno genético-evolutivo.

5. CONCLUSÕES

Através da construção da árvore filogenética baseada no gene ND4 de *Micrurus*, que mostra o padrão evolutivo da coloração do grupo, e árvores das principais toxinas de seu veneno, 3FTx e PLA2, nosso trabalho mostrou as similaridades existentes entre esses traços. Os resultados apresentados aqui suportam a hipótese que a coloração é um caráter que segue a história filogenética das cobras-corais, e que a composição do veneno do grupo também segue o padrão similar. Sendo assim, nossos resultados dão indícios que a coloração e o veneno dessas serpentes podem ter coevoluídos na história evolutiva do grupo, o que dá mais suporte à hipótese de que a coloração das cobras-corais tem uma função aposemática que serve para evitar possíveis predadores, alertando-os da potencialidade de seu veneno. Vale salientar que devido ao baixo número de espécies de cobras-corais com venenos extraídos e sequenciados as conclusões tiradas desse trabalho são provisórias. É importante aumentar nosso conhecimento a respeito da filogeografia e evolução dos venenos das cobras-corais para podermos propiciar resultados mais concretos e entendermos melhor sobre o atual fenótipo do grupo.

6. REFERÊNCIAS

Aird SD, Jorge da Silva N. 1991. Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B* 99:287–294. doi:10.1016/0305-0491(91)90093-S.

Aird SD, da Silva NJ, Qiu L, Villar-Briones A, Saddi VA, Telles MP de C, Grau ML, Mikheyev AS. 2017. Coralsnake venomomics: Analyses of venom gland transcriptomes and proteomes of six Brazilian taxa. *Toxins (Basel)*. 9:1–64. doi:10.3390/toxins9060187.

Alape-Girón A, Persson B, Cederlund E, Flores-Díaz M, Gutiérrez JM, Thelestam M, Bergman T, Jörnvall H. 1999. Elapid venom toxins: Multiple recruitments of ancient scaffolds. *Eur. J. Biochem.* 259:225–234. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00021.x.

Allen WL, Baddeley R, Scott-samuel NE, Cuthill IC. 2013. The evolution and function of pattern diversity in snakes. *Behav. Ecol.* 24:1237–1250. doi:10.1093/beheco/art058.

Antil S, Servent D, Ménez A. 1999. Variability among the sites by which curaremimetic toxins bind to Torpedo acetylcholine receptor, as revealed by identification of the functional residues of α -cobratoxin. *J. Biol. Chem.* 274:34851–34858. doi:10.1074/jbc.274.49.34851.

Argiolas A, Pisano JJ. 1983. Facilitation of phospholipase A2 activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. *J. Biol. Chem.* 258:13697–13702.

Beckers GJL, Leenders TAAM, Strijbosch H. 1996. Coral snake mimicry: live snakes not avoided by a mammalian predator. *Oecologia* 106:461–463.

Brattstrom BH. 1955. The Coral Snake “Mimic” Problem and Protective Coloration. *Evolution (N. Y)*. 9:217–219.

Brodie EDI. 1993. Differential avoidance of coral snake banded patterns by free-ranging avian predators in Costa Rica. *Evolution (N. Y)*. 47:227–235.

Brodie EDI, Janzen FJ. 1995. Experimental Studies of Coral Snake Mimicry: Generalized Avoidance of Ringed Snake Patterns by Free-Ranging Avian Predators. *Funct. Ecol.* 9:186. doi:10.2307/2390563.

Buasso CM, Leynaud GC, Cruz FB. 2006. Predation on snakes of Argentina: Effects of coloration and ring pattern on coral and false coral snakes. *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* 41:183–188. doi:10.1080/01650520600630725.

Calcines-cruz AC, Olvera A, Ricardo M, Zavala G, Alag A, Trujillo-rolid MA, Valdez-cruz NA. 2017. Recombinant-phospholipase A2 production and

architecture of inclusion bodies are affected by pH in *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Macromol.* doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.178.

Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Sanz L. 2007. Snake venomomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. *J. Proteome Res.* 6:326–336. doi:10.1021/pr060494k.

Campbell HW, Lamar WW. 2004. *The Venomous Reptiles of Western Hemisphere: Coral snakes and sea snakes, Elapidae Family*. Nova York: Cornell University Press.

Castoe TA, Smith EN, Brown RM, Parkinson CL. 2007. Higher-level phylogeny of Asian and American coral snakes, their placement within the Elapidae (Squamata), and the systematic affinities of the enigmatic Asian coral snake *Hemibungarus calligaster* (Wiegmann, 1834). *Zool. J. Linn. Soc.* 151:809–831.

Ciscotto PHC, Rates B, Silva DAF, Richardson M, Silva LP, Andrade H, Donato MF, Cotta GA, Maria WS, Rodrigues RJ, *et al.* 2011. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J. Proteomics* 74:1810–1825. doi:10.1016/j.jprot.2011.07.011.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2011. ProtTest 3 : fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27:1164–1165. doi:10.1093/bioinformatics/btr088.

Dashevsky D, Fry BG. 2018. Ancient Diversification of Three-Finger Toxins in *Micrurus* Coral Snakes. *J. Mol. Evol.* 86:58–67. doi:10.1007/s00239-017-9825-5.

Dennis EA. 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 269:13057–13060. doi:8175726.

Dokmetjian JC, del Canto S, Vinzón S, de Jiménez Bonino MB. 2009. Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon* 53:375–382. doi:10.1016/j.toxicon.2008.12.015.

Dufton MJ, Hider RC. 1983. Conformational properties of the neurotoxins and cytotoxins isolated from elapid snake venoms. *Crit. Rev. Biochem.* 14.

Endo T, Tamiya N. 1991. *Structure-function relationships of postsynaptic neurotoxins from snake venoms*. Nove York: Pergamon Press.

Francis B, Williams ES, Seebart C, Kaiser II. 1993. Proteins isolated from the venom of the common tiger snake (*Notechis scutatus scutatus*) promote hypotension and hemorrhage. *Toxicon* 31:447–458. doi:10.1016/0041-0101(93)90180-Q.

Francis BR, Jorge Da Silva N, Seebart C, Casais E Silva LL, Schmidt JJ, Kaiser II. 1997. Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus*

- frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A2 and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon* 35:1193–1203. doi:10.1016/S0041-0101(97)00031-7.
- Fry B. 2005. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res.* 15:403–420. doi:10.1101/gr.3228405.
- Fry BG, Scheib H, van der Weerd L, Young B, McNaughtan J, Ramjan SFR, Vidal N, Poelmann RE, Norman JA. 2008. Evolution of an Arsenal. *Mol. Cell. Proteomics* 7:215–246. doi:10.1074/mcp.M700094-MCP200.
- Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ, Scheib H, Ramjan SFR, Kuruppu S, Fung K, Hedges SB, Richardson MK, *et al.* 2006. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature* 439:584–588. doi:10.1038/nature04328.
- Fry BG, Wüster W, Kini RM, Brusica V, Khan A, Venkataraman D, Rooney AP. 2003. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. *J. Mol. Evol.* 57:110–129. doi:10.1007/s00239-003-2461-2.
- Grant JB. 2007. Ontogenetic colour change and the evolution of aposematism : a case study in panic moth caterpillars. *J. Anim. Ecol.* 76:439–447. doi:10.1111/j.1365-2656.2007.01216.x.
- Guedes TB, Nogueira C, Marques OA V. 2014. Diversity, natural history, and geographic distribution of snakes in the Caatinga, Northeastern Brazil.
- Guilford T, Cuthill I. 1991. The evolution of aposematism in marine gastropods. *Evolution* (N. Y). 45:449–451.
- Gutberlet RL, Harvey MB. 2004. The evolution of New World venomous snakes. In: *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*. NY: Cornell University Press. p. 634–682.
- Gutiérrez J, Lomonte B. 1995. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33:1405–1424. doi:10.1016/0041-0101(95)00085-Z.
- Gutiérrez J, Rojas G, Jorge da Silva N, Núñez J. 1992. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). *Toxicon* 30:1299–1302. doi:10.1016/0041-0101(92)90446-C.
- Ham AD, Ihalainen E, Lindström L, Mappes J. 2006. Does colour matter? The importance of colour in avoidance learning, memorability and generalisation. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60:482–491. doi:10.1007/s00265-006-0190-4.
- Jackson JF, Ingram W, Campbell HW. 1976. The Dorsal Pigmentation Pattern of Snakes as an Antipredator Strategy: A Multivariate Approach. *Am. Nat.* 110:1029–1053. doi:10.1086/283125.
- Jorge da Silva N, D. Aird S. 2001. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms.

- Jowers MJ, Murphy JC, Luis J, Mudarra G. 2019. Phylogeography of West Indies Coral snakes (*Micrurus*): Island colonisation and banding patterns. *Zool. Scr.* 48:263–276. doi:10.1111/zsc.12346.
- Kaas Q, Craik DJ. 2015. Bioinformatics-aided venomomics. *Toxins (Basel)*. 7:2159–2187. doi:10.3390/toxins7062159.
- Kardong K V. 1980. Evolutionary Patterns in Advanced Snakes. *Am. Zool.* 20:269–282.
- Kardong K V. 2012. *Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution*.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.*:1–7. doi:10.1093/bib/bbx108.
- Kelly CMR, Barker NP, Villet MH, Broadley DG. 2009. Cladistics Elapoidea : a rapid radiation in the late Eocene. *Mol. Ecol.* 25:38–63. doi:10.1111/j.1096-0031.2008.00237.x.
- Kini RM, Doley R. 2010. Structure, function and evolution of three-finger toxins: Mini proteins with multiple targets. *Toxicon* 56:855–867. doi:10.1016/j.toxicon.2010.07.010.
- Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T, Calcott B. 2016. PartitionFinder 2 : New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. *Mol. Biol. Evol.* 34:772–773. doi:10.1093/molbev/msw260.
- Leão LI, Ho PL, Junqueira-de-Azevedo I de L. 2009. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics* 10:1–14. doi:10.1186/1471-2164-10-112.
- Lee MSY, Sanders KL, King B, Palci A. 2016. Diversification rates and phenotypic evolution in venomous snakes (Elapidae) Subject Category : Subject Areas : R. Soc. open Sci. 3. doi:http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150277.
- Lomonte B, Rey-Suárez P, Fernández J, Sasa M, Pla D, Vargas N, Bénard-Valle M, Sanz L, Corrêa-Netto C, Núñez V, *et al.* 2016. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon* 122:7–25. doi:10.1016/j.toxicon.2016.09.008.
- Lomonte B, Sasa M, Rey-Suárez P, Bryan W, Gutiérrez JM. 2016. Venom of the coral snake *Micrurus clarki*: Proteomic profile, toxicity, immunological cross-neutralization, and characterization of a three-finger Toxin. *Toxins (Basel)*. 8:1–15. doi:10.3390/toxins8050138.
- M. G. Emsley. 1966. The mimetic significance of *Erythrolamprus aesculapii ocelatus* peters from Tobago. *Evolution (N. Y)*. 20:663–664.
- Margres MJ, Aronow K, Loyacano J, Rokyta DR. 2013. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom

- complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC Genomics* 14:531. doi:10.1186/1471-2164-14-531.
- Marques OA V., Sazima I. 1997. Diet and feeding behavior of the coral snake *Micrurus corallinus*, from the Atlantic Forest of Brazil. *Herpetol. Nat. Hist.* 5:88–93.
- Minton SA. 1990. Venomous bites by nonvenomous snakes: an annotated bibliography of colubrid envenomation. *J. Wilderness Med.* 1:119–127. doi:10.1580/0953-9859-1.2.119.
- Morais DH, Ávila RW, Kawashita-ribeiro RA, Carvalho MA De. 2011. Squamata, Elapidae, *Micrurus surinamensis* (Cuvier, 1817): New records and distribution map in the state of Mato Grosso, Brazil, with notes on diet and activity period. *Check List - J. species List. Distrib.* 7:350–351.
- Moura-da-Silva AM, Paine MJI, Diniz MRV, Theakston RDG, Crampton JM. 1995. The molecular cloning of a phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom: Evolution of venom group II phospholipase A2's may imply gene duplications. *J. Mol. Evol.* 41:174–179. doi:10.1007/BF00170670.
- Olamendi-Portugal T, Batista CVF, Restano-Cassulini R, Pando V, Villa-Hernandez O, Zavaleta-Martínez-Vargas A, Salas-Arruz MC, De La Vega RCR, Becerril B, Possani LD. 2008. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: Novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics* 8:1919–1932. doi:10.1002/pmic.200700668.
- Prieto da Silva ARB. 2001. Clonagem, expressão e estudo de alguns cDNAs codificando proteínas estruturalmente relacionadas à alfa neurotoxinas da glândula de veneno da cobra coral *Micrurus corallinus* (Sepentes, Elapidae). Universidade de São Paulo.
- Pyron R, Burbrink FT, Wiens JJ, Greene H, Vitt L, Caldwell J, Pianka E, Vitt L, Kasturiratne A, Wickremasinghe A, *et al.* 2013. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evol. Biol.* 13:93. doi:10.1186/1471-2148-13-93.
- Rabosky AR, Cox CL, Rabosky DL, Title PO, Holmes IA, Feldman A, McGuire JA. 2016. Coral snakes predict the evolution of mimicry across New World snakes. *Nat. Commun.* 7:1–9. doi:10.1038/ncomms11484.
- Rosso J-P, Vargas-rosso O, Gutierrez JM, Rochat H, Bougis PE. 1996. Characterization of α -neurotoxin and phospholipase A, activities from *Micrurus* venoms Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major α -neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Eur. J. Biochem* 238:231–239. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0231q.x.
- Roze JA. 1996. Coral snakes of the Americas: biology, identification, and venoms. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company.

- Roze JA, Bernal-Carlo A. 1987. Las serpientes corales venenosas del genero *Leptomicrurus* (serpentes, Elapidae) de Suramérica con descripción de una nueva subespecie. Bollettino. Mus. Reg. di Sci. Nat. Torino 5:573–608.
- Roze JA, Tilger GM. 1983. *Micrurus fulvius* (Linnaeus) North American Coral Snake. Cat. Am. Amphib. Reptil.:1951–1954.
- Santos JC, Leal IR, Almeida- JS, Fernandes GW, Tabarelli M. 2011. Caatinga : the scientific negligence experienced by a dry tropical forest. Trop. Conserv. Sci. 4:276–286.
- Sanz L, Pla D, Pérez A, Rodríguez Y, Zavaleta A, Salas M, Lomonte B, Calvete JJ. 2016. Venomic analysis of the poorly studied desert coral snake, *Micrurus tschudii tschudii*, supports the 3FTx/PLA2 dichotomy across *Micrurus* venoms. Toxins (Basel). 8:9–12. doi:10.3390/toxins8060178.
- Sanz L, Quesada-bernat S, Ramos T, Casais-e-silva LL, Corrêa-netto C, Silva-haad JJ, Sasa M, Lomonte B, Calvete JJ. 2019. New insights into the phylogeographic distribution of the 3FTx / PLA 2 venom dichotomy across genus *Micrurus* in South America. J. Proteomics 200:90–101. doi:10.1016/j.jprot.2019.03.014.
- Saporito RA, Zuercher R, Roberts M, Gerow KG, Donnelly A, Donnelly A. 2007. Experimental Evidence for Aposematism in the Dendrobatid Poison Frog *Oophaga pumilio*. Copeia 4:1006–1011.
- Savage JM, Slowinski JB. 1992. The colouration of the venomous coral snakes (family Elapidae) and their mimics (families Aniliidae and Colubridae). Biol. J. Linn. Soc. 45:235–254. doi:10.1111/j.1095-8312.1992.tb00642.x.
- Seib RL. 1980. Human envenomation from the bite of an aglyphous false coral snake, *Pliocercus elapoides* (Serpentes : Colubridae). Toxicon 18:399–401. doi:10.1016/0041-0101(80)90027-6.
- Silva CCA. 2014. História natural e análise citogenética de *Micrurus frontalis* (Duméril, Bibron & Duméril, 1854) (serpentes: elapidae). Universidade Federal de Viçosa.
- da Silva NJ, Bucarechi F. 2003. Mecanismos de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. São Paulo: FAPESP.
- Silva Jr. NJ, Sites JC. 2001. Phylogeny of South American triad coral snakes (Elapidae: *Micrurus*) based on molecular characters. Herpetologica 57:1–22.
- Slowinski J. 1995. A phylogenetic analysis of the New World Coral Snakes (Elapidae: *Leptomicrurus*, *Micruroides*, and *Micrurus*) Based on Allozymic and Morphological Characters. 29:325–338.
- Smith SM. 1975. Innate recognition of coral snakes pattern by a possible avian predator. Science (80). 187:759–760.
- Strauch MA, Souza GJ, Pereira JN, Ramos TS, Cesar MO, Tomaz MA, Monteiro-Machado M, Patrão-Neto FC, Melo PA. 2018. True or false coral

- snake: Is it worth the risk? A *Micrurus corallinus* case report. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 24:1–5. doi:10.1186/s40409-018-0148-9.
- Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1 . 10. *Virus Evol.* 4:1–5. doi:10.1093/ve/vey016.
- Sword GA, Simpson SJ, Taleb O, Hadi M El, Wilps H. 2000. Density-dependent aposematism in the desert locust. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267:63–68.
- Tonini JFR, Beard KH, Barbosa R, Jetz W, Pyron RA. 2016. Fully-sampled phylogenies of squamates reveal evolutionary patterns in threat status. *Biol. Conserv.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2016.03.039.
- Tullberg BS, Merilaita S, Wiklund C. 2005. Aposematism and crypsis combined as a result of distance dependence : functional versatility of the colour pattern in the swallowtail butterfly larva. *Proc. R. Soc. Lond. B* 272:1315–1321. doi:10.1098/rspb.2005.3079.
- Valkonen J, Niskanen M, Mappes J. 2011. Disruption or aposematism? Significance of dorsal zigzag pattern of European vipers pattern of European vipers. *Evol. Ecol.* 25:1047–1063. doi:10.1007/s10682-011-9463-0.
- Wallace AR. 1867. Mimicry and other protective resemblances among animals. *Westminster Foreign Q. Rev.* 32:1–43.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. 2009. Jalview Version 2 — a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189–1191. doi:10.1093/bioinformatics/btp033.
- Wuster W, Allum CSE, Bjargardo IB, Bailey KL, Dawson KJ, Guenioui J, Lewis J, Mcgurk J, Moore AG, Niskanen M, *et al.* 2004. Do aposematism and Batesian mimicry require bright colours ? A test using European viper markings. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271:2495–2499. doi:10.1098/rspb.2004.2894.