

A rã-cachorro e seu centrômero: um DNA satélite associado a CENP-A no complexo *Physalaemus cuvieri* – *Physalaemus ephippifer* (Anura, Leptodactylidae)

Palavras-Chave: cromossomo, DNA satélite, Leiuperinae

Autores:

Pedro Henrique Pacheco Mosquini, IB – UNICAMP

Ma. Jennifer Nunes Pompeo, IB - UNICAMP

Dr. Lucas Henrique Bonfim Souza (co-orientador), IB - UNICAMP

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço (orientadora), IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO

Centrômeros de eucariotos são comumente compostos por grandes arranjos de DNAs satélites (DNAsat), os quais são importantes para a correta segregação do material genético durante eventos de divisão celular (revisão de Vagnarelli et al., 2008; revisão de Leo et al., 2020). Contudo, embora a função do centrômero seja conservada ao longo de diferentes táxons, as sequências de DNA satélite centromérico (DNAcen) são altamente variáveis entre táxons e evoluem rapidamente (revisão de Plohl et al., 2012; Melters et al., 2013). Dentre os DNAcen conhecidos, o alfa-satélite é, indiscutivelmente, o mais estudado. O DNA alfa-satélite é o DNAsat mais abundante nos centrômeros de primatas, incluindo o ser humano (revisão de Plohl et al., 2012). O monômero desse DNAsat possui 171 pares de base e inclui uma região de 17 pares de base, denominada CENP-B box, que possui afinidade pela proteína CENP-B, proteína capaz de se ligar diretamente ao DNA e participar da organização do centrômero (revisão de Plohl et al., 2014). Ainda, estudos recentes apontam a transcrição do DNA alfa-satélite em um *non-coding RNA*, que se associa a proteínas centroméricas e, em última instância, participa da formação do cinetócoro (McNulty et al., 2017).

Embora o DNA alfa-satélite seja muito bem caracterizado, pesquisas relacionadas a DNAs centroméricos são escassas em outros organismos, como é o caso de anuros. Até o momento, em relação a DNAs satélites mapeados por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em regiões centroméricas de anuros, destacam-se o DNAsat PboSat01-176, mapeado em *Proceratophrys boiei*, *Pr. schirchi*, *Pr. melanopogon* e *Pr. laticeps* (Silva et al., 2023; Silva et al., 2024), o RrS1, mapeado em *Pelophylax ridibundus*, *Pe. kurtmuelleri*, *Pe. cretensis*, *Pe. lessonae* e *Pelophylax cf. bedriagae* (Marracci et al., 2011) e o PepSat3-152, mapeado em algumas linhagens do complexo de espécies *Physalaemus cuvieri* – *Physalaemus ephippifer*, dentre elas: em *Ph. ephippifer*, linhagem 1B de *Ph. cuvieri* e indivíduos de diferentes localidades da zona de contato entre *Ph. ephippifer* e linhagem 1B (Souza et al., 2025a).

O complexo de espécies *Ph. cuvieri* – *Ph. ephippifer* (Anura, Leptodactylidae) abrange, até o momento, sete linhagens: *Ph. ephippifer*, *Physalaemus* sp. e cinco linhagens outrora atribuídas a *Ph. cuvieri*, denominadas como L1 (composta pelos subclados L1A e L1B), L2, L3, L4 e o clado VBST (Souza et al., 2024; Figura 1). Além do PepSat3-152, outras sequências repetitivas interessantes foram descritas a partir de análises do complexo de espécies. Dentre elas se destaca o DNAsat PcP190, já observado em diversas famílias de Hyloidea (e.g., Vittorazzi et al., 2011, 2014, Gatto et al., 2018, Targueta et al., 2018). Nas linhagens 1B e 2, por exemplo, o PcP190 é encontrado clusterizado nas regiões (peri)centroméricas de todos os cromossomos, enquanto em

Ph. ephippifer é encontrado apenas na região pericentromérica do braço curto do cromossomo 3 e nos braços longos dos cromossomos Z e W (Vittorazzi et al., 2014, Souza et al., 2025b)

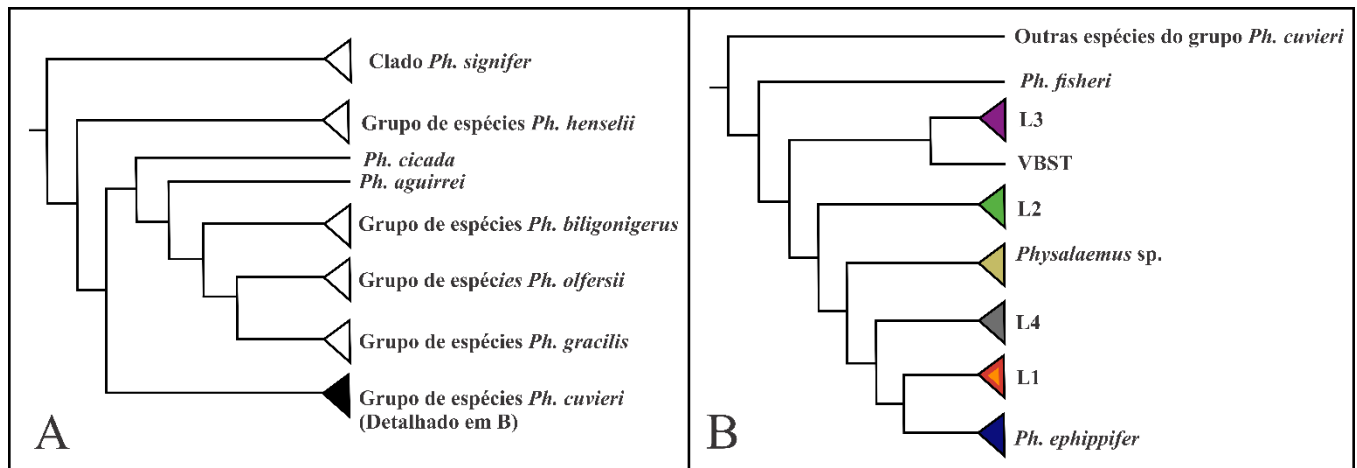


Figura 1. Relações filogenéticas no gênero *Physalaemus* inferidas a partir de DNA mitocondrial. A. visão geral das relações entre os grupos de espécies. B. Relações filogenéticas dentro do complexo de espécies *Ph. cuvieri* – *Ph. ephippifer*. Os cladogramas foram adaptados de análises anteriores do gênero *Physalaemus* (Lourenço et al., 2015; Souza et al., 2024).

Nesse projeto buscamos verificar se o DNAsat PepSat3-152 desempenha função de organização centromérica, bem como compreender a amplitude da distribuição desse DNAsat em anuros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Posição cromossômica relativa dos DNAsat PepSat3-152 e PcP190 e associação com CENP-A

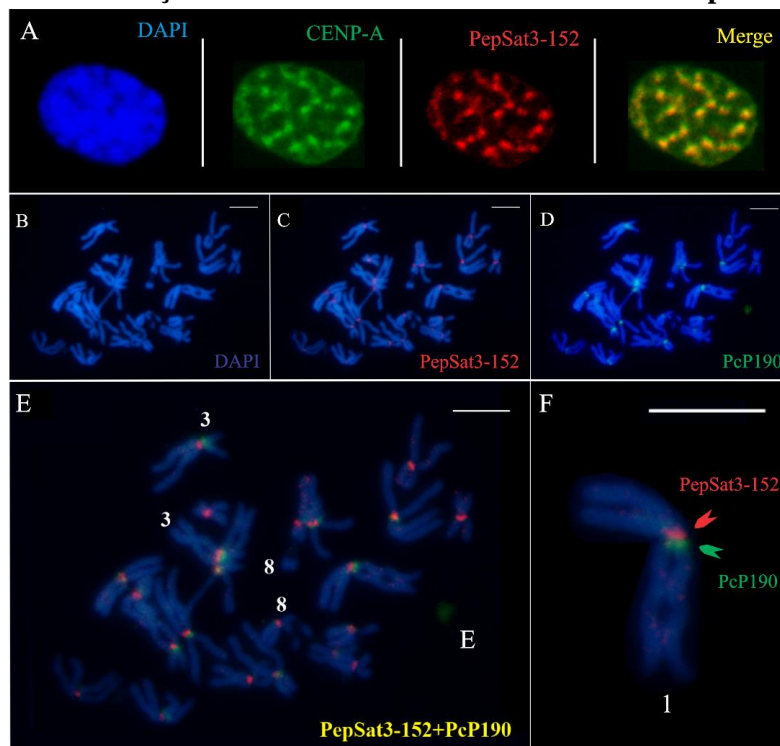


Figura 2. Colocalização de CENP-A e PepSat3-152 e sinais centroméricos de PepSat3-152 adjacentes aos sinais pericentroméricos de PcP190. Em A, imuno-FISH em núcleos interfásicos de células sanguíneas da linhagem 2 de *Ph. cuvieri*. Em verde e vermelho, sinais da CENP-A e da sonda para PepSat3-152, respectivamente. Em B-F, mapeamento cromossômico dos DNAs satélite PepSat3-152 e PcP190 na linhagem 2 de *Ph. cuvieri* (vermelho = PepSat3-152; verde = PcP190). Em D, sobreposição dos sinais das sondas para ambos os DNA satélites. O cromossomo 1 foi ampliado em E para melhor visualização dos sinais das sondas, note que os sinais são adjacentes, com o PcP190 localizado pericentromericamente. As micrografias dos núcleos foram capturadas com microscópio confocal com aumento de 670x. Barra de escala = 5 µm.

De modo a averiguar se o PepSat3-152 é, de fato, a sequência centromérica do complexo de espécies *Physalaemus cuvieri* – *Physalaemus ephippifer*, realizamos análises para examinar sua associação com a proteína A do centrômero (CENP-A), tida na literatura como principal marca epigenética de centrômeros. Para isso, foram feitos ensaios de imunofluorescência em células interfásicas de sangue seguidos de FISH com sondas para PepSat3-152. A partir de imagens obtidas com microscopia confocal, foi possível verificar a associação dessa sequência com CENP-A (Figura 2A). Esses dados estão em concordância com ensaios de Double-FISH de PcP190 e PepSat3-152 (Figura 2B-F), em que é possível observar a presença de sinais de PepSat3-152 na região centromérica dos cromossomos da linhagem 2 de *Ph. cuvieri*, enquanto o PcP190 apresenta sinais centroméricos e sinais pericentroméricos, a depender do cromossomo. A partir da associação desses

dados, concluímos que PepSat3-152 está associado com CENP-A, o que sugere que desempenhe papel centromérico nos cromossomos em que está clusterizado.

Análise da distribuição do DNAsat PepSat3-152

O DNAsat PepSat3-152 foi mapeado por FISH na região centromérica de todos os cromossomos dos cariótipos das linhagens 1A, 2, 3 e 4 de *Ph. cuvieri*, bem como em *Physalaemus* sp. (Figura 3).

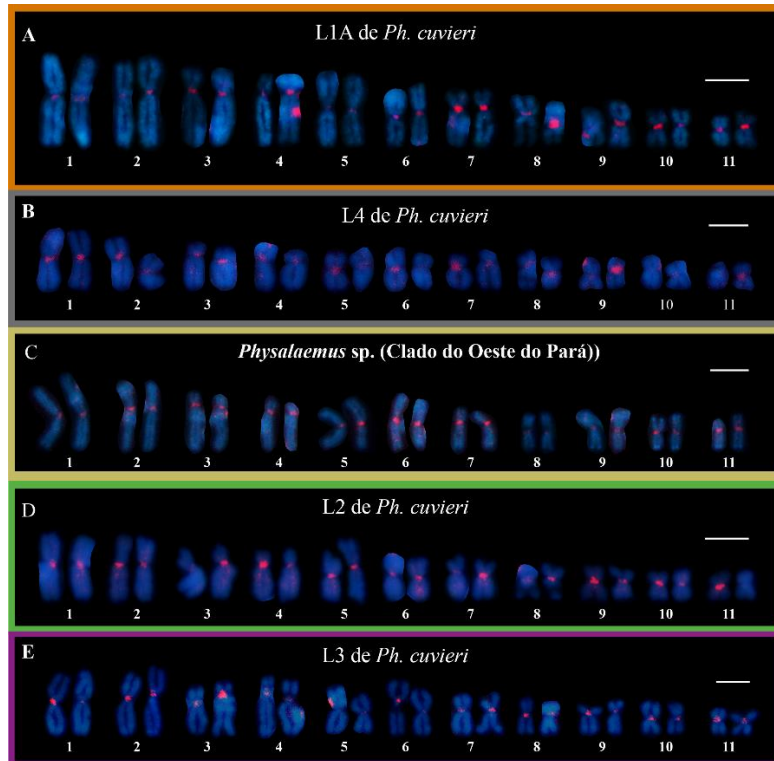


Figura 3. Mapeamento cromossômico do DNA satélite PepSat3-152 em cinco linhagens do complexo de espécies *Ph. cuvieri* - *Ph. ephippifer*. Barra de escala = 5 µm.

Todavia, ensaios de FISH com a mesma sonda não revelaram sinais dessa sequência nos cariótipos de *Ph. evangelistai*, *Ph. carrizorum*, *Ph. centralis*, *Ph. albifrons* e *Ph. deimaticus* (dados não mostrados). A partir desses resultados, optamos por buscar, por meio de PCR, a presença dessa sequência no genoma de diferentes espécies. Foram obtidos fragmentos de DNAsat PepSat3-152 dos genomas de *Ph. ephippifer*, *Ph. albifrons*, *Ph. evangelistai*, *Ph. signifer*, *Ph. nattereri*, *Physalaemus* sp. de Vila Bela Santíssima Trindade (Clado VBST), *Engystomops pustulosus*, *E. guayaco* e *Engystomops* sp. de Mato Grosso (MT) (Figura 4). O valor médio de *p-distance* das sequências obtidas, calculado através do MEGA11 (Tamura et al., 2021), foi de 0.0138, demonstrando alta similaridade entre sequências.

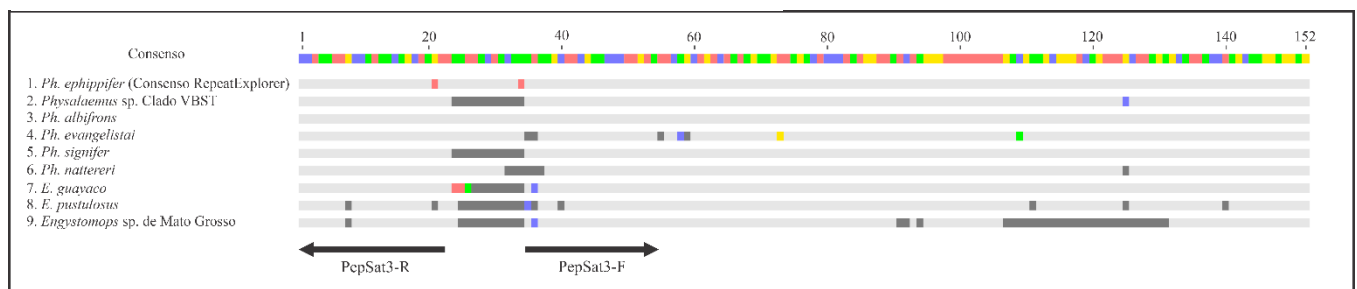


Figura 4. Alinhamento das sequências PepSat3-152 obtidas de *Physalaemus* sp. (Clado VBST), *Ph. albifrons*, *Ph. evangelistai*, *Ph. signifer*, *Ph. nattereri*, *E. guayaco*, *E. pustulosus* e *Engystomops* sp. do estado de Mato Grosso. A sequência denominada “Consenso” representa as posições mais frequentes entre as nove sequências analisadas. A sequência identificada como “1” corresponde ao consenso de PepSat3-152 obtido por Souza et al. (2025a) a partir de análises de reads com a ferramenta RepeatExplorer. Posições conservadas são destacadas em cinza claro, enquanto as divergências em relação ao consenso são indicadas em cores. Regiões não sequenciadas estão representadas em cinza escuro. As setas pretas indicam as regiões correspondentes aos primers utilizados.

Considerando o cenário exposto, optamos por realizar ensaios de Dot-blotting com sondas para PepSat3-152 para verificar a abundância desse satélite em diferentes genomas (Figura 5). Os Dots referentes aos genomas de *Ph. ephippifer*, linhagens 2 e 3 de *Ph. cuvieri* e *Physalaemus* sp. mostraram fortes sinais da sonda. Por sua vez, os dots dos genomas de *Ph. albifrons* e *Ph. albonotatus* apresentaram fracos sinais de sonda, mesmo quando utilizado 2500 ng de DNA genômico. Esses resultados estão de acordo com a hipótese da biblioteca de DNAsat, que propõe que DNAs satélites podem sofrer amplificação diferencial em distintas espécies, podendo apresentar grande variação no número de cópias (quantidade) mesmo entre espécies filogeneticamente próximas (Fry & Salser, 1977; revisão de Ugarković & Plohl, 2002). Com base nos nossos resultados, hipotetizamos que, embora presente no genoma de diferentes espécies de *Physalaemus* e de

Engystomops, o DNAsat PepSat3-152 está em menor abundância nos genomas de espécies externas ao complexo *Ph. cuvieri* – *Ph. ephippifer*, não desempenhando papel centromérico em tais espécies.

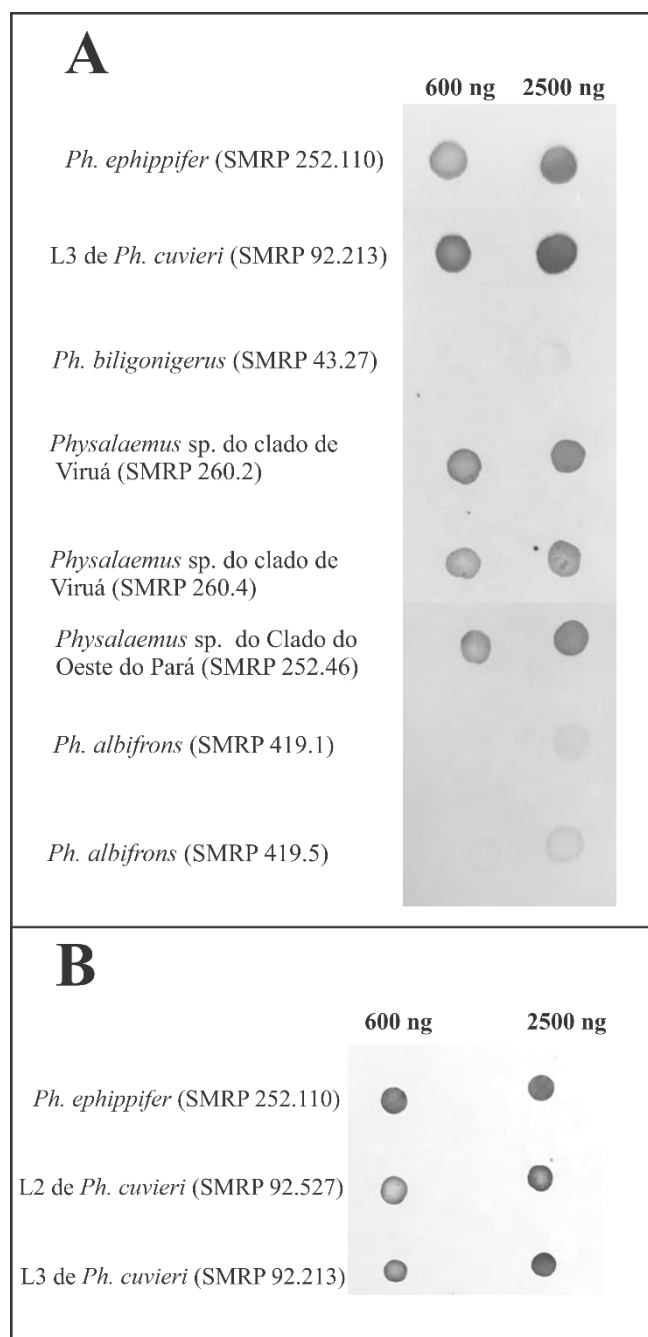


Figura 5. Detecção por Dot-blotting da abundância do DNAsat PepSat3-152 no genoma de diferentes espécies de *Physalaemus*. À esquerda, a espécie/linhagem do indivíduo analisado e seu respectivo código da coleção SMRP. Colunas 1 e 2 contêm 600 ng e 2500 ng de DNA genômico, respectivamente.

CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, é possível concluir que, embora presente no genoma de diferentes espécies do gênero *Physalaemus* e *Engystomops*, o DNAsat PepSat3-152 é encontrado em maior abundância nos genomas de espécies/linhagens do complexo de espécies *Ph. cuvieri* – *Ph. ephippifer*. A associação de PepSat3-152 e CENP-A sugere o papel centromérico dessa sequência no complexo de espécies em questão. Futuras análises de satelitoma de espécimes pertencentes a outros grupos de espécies do gênero *Physalaemus* poderão contribuir para o entendimento da diversidade de centrômeros nesse clado.

BIBLIOGRAFIA

- Fry, K., Salser, W. Nucleotide sequences of HS- α satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents. **Cell**. v. 12, n. 4, p. 1069–1084, 1977.
- Gatto, K. P., Mattos, J. V., Seger, K. R., Lourenço, L. B. Sex chromosome differentiation in the frog genus *Pseudis* involves satellite DNA and chromosome rearrangements. **Frontiers in Genetics**. v. 9, p. 301, 2018. DOI: 10.3389/fgene.2018.00301
- Leo, L., Marchetti, M., Giunta, S., Fanti, L. Epigenetics as an evolutionary tool for centromere flexibility. **Genes**. v. 11, n. 7, p. 809, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11070809>
- Lourenço, L. B., Targueta, C. P., Baldo, D., Nascimento, J., Garcia, P. C. A., Andrade, G. V., Haddad, C. F. B., Recco-Pimentel, S. M. Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 92, p. 204–216, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.06.011>
- Marracci, S., Michelotti, V., Guex, G.-D., Hotz, H., Uzzell, T., Raghianti, M. RrS1-like sequences of water frogs from Central Europe and around the Aegean Sea: Chromosomal organization, evolution, possible function. **Journal of Molecular Evolution**. v. 72, p. 368–382, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00239-011-9436-5>
- McNulty, S. M., Sullivan, L. L., Sullivan, B. A. Human centromeres produce chromosome-specific and array-specific alpha satellite transcripts that are complexed with CENP-A and CENP-C. **Developmental Cell**. v. 42, n. 3, p. 226–240.e6, 2017. DOI: 10.1016/j.devcel.2017.07.001
- Melters, D. P., Bradnam, K. R., Young, H. A., Telis, N., May, M. R., Ruby, J. G., Sebra, R., Peluso, P., Eid, J., Rank, D., Garcia, J. F., DeRisi, J. L., Smith, T., Tobias, C., Ross-Ibarra, J., Korf, I., Chan, S. W. L. Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. **Genome Biology**. v. 14, art. R10, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-1-r10>

Plohl, M., Luchetti, A., Meštrović, N., Mantovani, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. **Gene**. v. 409, n. 1–2, p. 72–82, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.11.013>

- Plohl, M., Meštrović, N., Mravinac, B. Centromere identity from the DNA point of view. **Chromosoma**. v. 123, p. 313–325, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00412-014-0462-0>
- Silva, M. J. Da, Gazoni, T., Haddad, C. F. B., Parise-Maltempi, P. P. Analysis in *Proceratophrys boiei* genome illuminates the satellite DNA content in a frog from the Brazilian Atlantic forest. **Frontiers in Genetics**. v. 14, p. 1101397, 2023. DOI: 10.3389/fgene.2023.1101397
- Silva, M. da, Destro, R. F., Gazoni, T., Parise-Maltempi, P. P. Interspecific cytogenomic comparison reveals a potential chromosomal centromeric marker in *Proceratophrys* frog species. **Chromosoma**. v. 133, n. 3, p. 1–8, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00412-024-00819-9>
- Souza, L. H. B., Pierson, T. W., Tenório, R. O., Ferro, J. M., Gatto, K. P., Silva, B. C., Andrade, G. V., Suárez, P., Haddad, C. F. B., Lourenço, L. B. Multiple contact zones and karyotypic evolution in a neotropical frog species complex. **Scientific Reports**. v. 14, n. 1, p. 1119, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-51421-z
- Souza L. H. B., Ferro J. M., Milanez H. M., Haddad C. F. B., Lourenço L. B. New Insights into the Sex Chromosome Evolution of the Common Barker Frog Species Complex (Anura, Leptodactylidae) Inferred from Its Satellite DNA Content. **Biomolecules**. v. 15, n. 6, p. 876, 2025a. DOI: 10.3390/biom15060876
- Souza, L. H. B., Ferro, J. M., Gatto, K. P., Sá, F. P., Haddad, C. F. B., Lourenço, L. B. Clinal variation in autosomal satellite DNA clusters across a contact zone in Barker frogs. **Journal of Evolutionary Biology**. v. 38, n. 2, p. 167–179, 2025b. DOI: <https://doi.org/10.1093/jeb/voae142>
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**. v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Targueta, C. P., Vittorazzi, S. E., Gatto, K. P., Bruschi, D. P., Veiga-Menoncello, A. C. P., Recco-Pimentel, S. M., Lourenço, L. B. *Anuran cytogenetics: an overview*. Em: Norris, N., Miller, C. (Eds.). *An Essential Guide to Cytogenetics*. Nova Science Publishers, New York, p. 1–64, 2018.
- Ugarković, Đ., Plohl, M. Variation in satellite DNA profiles—causes and effects. **The EMBO Journal**. v. 21, p. 5955–5959, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf612>
- Vagnarelli, P., Ribeiro, S.A., Earnshaw, W.C. Centromeres: Old tales and new tools. **FEBS Letters**. v. 582, n. 14, p. 1950–1959, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.014>
- Vittorazzi, S. E., Lourenço, L. B., Del-Grande, M. L., Recco-Pimentel, S. M. Satellite DNA derived from 5S rDNA in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae). **Cytogenetic and Genome Research**. v. 134, n. 2, p. 101–107, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1159/000325540>
- Vittorazzi, S. E., Lourenço, L. B., Recco-Pimentel, S. M. Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hylodid frogs. **BMC Genetics**. v. 15, art. 111, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0111-x>