

Fabiano Condé Araújo

Regulação da região promotora de genes  
do sistema renina-angiotensina pelas  
proteínas SRY e SOX3

Belo Horizonte  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2015

Fabiano Condé Araújo

# Regulação da região promotora de genes do sistema renina-angiotensina pelas proteínas SRY e SOX3

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para o título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Fernando M. Reis  
Co-orientadores: Profa. Dra. Helen L. Del Puerto e Dr. Jeremy W. Prokop

Belo Horizonte  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2015

Araújo, Fabiano Condé.  
A663r      Regulação da região promotora de genes do sistema renina-  
angiotensina pelas proteínas SRY e SOX3 [manuscrito]. / Fabiano Condé  
Araújo. - - Belo Horizonte: 2015.  
55f.: il.  
Orientador: Fernando Marcos dos Reis.  
Coorientador: Helen Lima Del Puerto, Jeremy William Prokop.  
Área de concentração: Medicina Molecular.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de  
Medicina.

1. Sistema Renina-Angiotensina. 2. Hipertensão. 3. Fatores de  
Transcrição SOX. 4. Regulação da Expressão Gênica. 5. Genes sry. 6.  
Dissertações Acadêmicas. I. Fernando Marcos dos Reis. II. Del Puerto,  
Helen Lima. III. Prokop, Jeremy William. IV. Universidade Federal de  
Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WG 106

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Reprodução Humana da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais e de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Akron, OH, EUA.

Apoio Financeiro: CAPES e CNPq.



Dedico esta vitória a Deus,  
às preciosas companheiras Helen e Helena,  
aos meus queridos pais e irmãos,  
e aos grandes professores e orientadores:  
Fernando, Amy e Jeremy.

## **AGRADECIMENTOS**

DEUS, obrigado por tudo o que o Senhor me concedeu nestes quatro anos. Não poderia ser melhor.

FERNANDO, AMY E JEREMY, esses nomes já estão marcados para sempre na minha memória. Como aprendi com estes orientadores maravilhosos, fontes inesgotáveis de conhecimento e sempre dispostos a ajudar. Não tenho como agradecer tamanho apoio e sim me desculpar se em algum momento não correspondi as vossas expectativas. OBRIGADO.

As duas pessoas muito especiais que Deus colocou no meu caminho e que tornaram a minha vida ainda mais completa: HELEN e o fruto do nosso amor, HELENA. Vocês são as testemunhas que eu pedi ao Senhor e sou muito grato a tudo o que vocês trouxeram para a minha vida. AMO VOCÊS.

Aos meus PAIS que sempre me ajudaram a enfrentar as dificuldades e desafios que a vida nos proporciona, MUITO OBRIGADO, vocês são muito importantes para mim. Aos meus IRMÃOS E CUNHADOS também sempre presentes e dispostos a ajudar nas dificuldades.

Aos COLEGAS dos laboratórios de Reprodução Humana da UFMG e de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Akron. MUITO OBRIGADO a TODOS que colaboraram para que essa tese fosse possível.

Aos FUNCIONÁRIOS da UFMG e da Universidade de Akron, em especial aqueles das secretarias, essenciais para o funcionamento e existência destas instituições e seus respectivos programas de pós-graduação.

*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	4
3. Material e métodos .....	5
3.1 Comparações <i>in silico</i> dos genes <i>Sry</i> e <i>Sox3</i> .....	5
3.2 Análise das regiões promotoras, regiões evolutivamente conservadas (ECR) e sítios de ligação dos fatores de transcrição .....	6
3.3 Clonagem .....	6
3.4 Co-transfecção e ensaios funcionais de luciferase em células CHO.....	8
3.5 Perfil de expressão dos genes <i>Sry</i> e <i>Sox3</i> no rato.....	9
3.6 Análise estatística dos dados .....	10
4. Resultados .....	11
5. Discussão.....	23
6. Conclusões .....	27
7. Referências.....	28
8. Apêndice 1 – Códigos de acesso do NCBI Nucleotide para <i>Sry</i> e <i>Sox3</i> utilizados nas comparações <i>in silico</i> .....	34
9. Apêndice 2 – Códigos de acesso do Rat BodyMap utilizados no mapeamento da expressão dos genes <i>Sry</i> e <i>Sox3</i> no rato .....	37
10. Anexo 1 – Artigos publicados.....	40
11. Anexo 2 – Ata da Defesa .....	41
12. Anexo 3 – Folha de Aprovação.....	42

## RESUMO

O sistema renina-angiotensina (RAS) está sujeito a uma modulação sexo-específica por hormônios e produtos gênicos. No entanto, as diferenças sexuais no balanço entre o eixo vasoconstritor/proliferativo ACE (enzima conversora da angiotensina)/Ang II (angiotensina II)/AGTR1 (receptor angiotensinérgico subtipo 1) e o eixo vasodilatador/anti-proliferativo ACE2 (enzima conversora da angiotensina 2)/Ang-(1-7) [angiotensina-(1-7)]/MAS1 ainda são pouco compreendidas. Dados obtidos em experimentos com ratos sugeriram que o gene *Sry*, específico do macho, contribuiria para este balanço entre os dois eixos, porém, sem uma razão evidente para esta função. Uma combinação de comparações genéticas/proteicas *in silico*, ensaios funcionais de luciferase com as regiões promotoras de genes do RAS humano e o mapeamento via RNAseq no rato foi utilizada para avaliar se a regulação do *Sry* no RAS estava conservada no *Sox3*, gene homólogo no cromossomo X. Tanto o SRY quanto o SOX3 estimularam o promotor do *angiotensinogênio (AGT)* e inibiram os promotores da *ACE2*, *AT2* e *MAS1*, provavelmente por mecanismos similares. A regulação do promotor do *MAS1* tanto por SRY quanto SOX3 indica uma modulação *in cis* por meio de múltiplos sítios de ligação SOX. O promotor da *Renina (REN)* foi estimulado pelo SRY e inibido pelo SOX3, provavelmente por mecanismos *trans* e *cis*, respectivamente. Transcritos do *Sry* foram encontrados em todos os tecidos de ratos machos analisados, incluindo os rins, enquanto transcritos do *Sox3* foram encontrados somente no cérebro e testículos, sugerindo que o tecido primário para a produção de renina (rim) poderia ser regulado somente pelo SRY. Esses resultados sugerem que a regulação do RAS pelo SRY é parcialmente compartilhada com o SOX3 e o SRY pode ter adquirido um controle sexo-específico nos rins para o passo limitante do RAS.

**Palavras-chave:** sistema renina-angiotensina, hipertensão arterial sistêmica, *Sox3*, *Sry*, diferenças sexuais.

## ABSTRACT

The renin-angiotensin system (RAS) is subject to sex-specific modulation by hormones and gene products. However, sex-differences in the balance between the vasoconstrictor/proliferative ACE (angiotensin-converting enzyme)/Ang II (angiotensin II)/AGTR1 (angiotensin II receptor, type 1) axis, and the vasodilator/anti-proliferative ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2)/Ang-(1-7) [angiotensin-(1-7)]/MAS1 axis are poorly known. Data in the rat have suggested that the male specific Y-chromosome gene *Sry* might contribute to the balance between these two axes, but why the testis-determining gene has these functions remains unknown. A combination of *in silico* genetic/protein comparisons, functional luciferase assays for promoters of the human RAS, and RNAseq profiling in rat were used to address if regulation of *Sry* on the RAS is conserved in the homologous X-chromosome gene, *Sox3*. Both SRY and SOX3 up-regulated the promoter of *Angiotensinogen (AGT)*, and down-regulated the promoters of *ACE2*, *AT2*, and *MAS1*, likely through overlapping mechanisms. The regulation by both SRY and SOX3 on the *MAS1* promoter indicates a cis regulation through multiple SOX binding sites. The *Renin (REN)* promoter is up-regulated by SRY and down-regulated by SOX3 likely through trans and cis mechanisms respectively. *Sry* transcripts are found in all analyzed male rat tissues including the kidney, while *Sox3* transcripts are found only in the brain and testis, suggesting that the primary tissue for renin production (kidney) can only be regulated by SRY and not SOX3. These results suggest that SRY regulation of the RAS is partially shared with its X-chromosome homolog SOX3, but SRY gained a sex-specific control in the kidney for the rate-limiting step of the RAS, potentially resulting in male specific blood pressure regulation.

**Keywords:** renin-angiotensin system, hypertension, *Sox3*, *Sry*, sex differences

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	enzima conversora da angiotensina I
ACE2	enzima conversora da angiotensina II
AGT	angiotensinogênio
AMBER	construção assistida de modelos com refinamento energético
Ang-(1-7)	angiotensina-(1-7)
Ang II	angiotensina II
AGTR1	receptor angiotensinérgico, tipo 1
AGTR2	receptor angiotensinérgico, tipo 2
AR	receptor de androgênio
ATG	sítio de início de tradução proteica
BN	rato normotenso Brown Norway
BP	pares de bases
BLAST	ferramenta básica de alinhamento local de sequências
CHO	ovário de hamster (criceto) chinês
DNA	ácido desoxirribonucleico
dN	taxa de substituição não sinônima de aminoácidos
dS	taxa de substituição sinônima de aminoácidos
ECR	região evolutivamente conservada
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HEPES	tampão <i>N</i> -(2-hidroxietil)piperazina- <i>N'</i> -(2-ácido etanosulfônico)
HMG-box	grupo de alta mobilidade
HPA	hipotálamo-hipófise-adrenal
PA	pressão arterial
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDB	banco de dados de proteínas
RAS	sistema renina-angiotensina
RMSF	flutuação média da raiz quadrada

REN	renina
RPKM	leituras por quilobase por milhão
SEM	erro padrão da média
SHR	rato espontaneamente hipertensos
SHRSP	rato espontaneamente hipertensos predispostos a derrame cerebral
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
SOX	<i>SRY (sex determining region Y)-box</i>
SRY	fator de determinação testicular ( <i>sex related Y chromosome gene</i> )
SS	ratos normotensos Dahl sensíveis a sal
TF	fator de transcrição
TSS	sítio de início de transcrição gênica
UTR	região não traduzida Nomenclatura genômica

Os padrões de siglas e abreviaturas dos genes utilizados nesta tese foram aqueles catalogados e recomendados pelo HGNC - *HUGO Gene Nomenclature Committee* ([www.genenames.org](http://www.genenames.org)) em Julho de 2014.

Gene	Símbolo	Localização	Identificador
<i>SRY (sex determining region Y)-box 3</i>	<i>SOX3</i>	Xq27.1	HGNC:11199
<i>sex determining region Y</i>	<i>SRY</i>	Yp11.3	HGNC:11311
<i>renin</i>	<i>REN</i>	1q32	HGNC:9958
<i>angiotensin I converting enzyme</i>	<i>ACE</i>	17q23.3	HGNC:2707
<i>angiotensin I converting enzyme 2</i>	<i>ACE2</i>	Xp22	HGNC:13557
<i>angiotensinogen</i>	<i>AGT</i>	1q42.2	HGNC:333
<i>angiotensin II receptor, type 1</i>	<i>AGTR1</i>	3q24	HGNC:336
<i>angiotensin II receptor, type 2</i>	<i>AGTR2</i>	Xq22-q23	HGNC:338
<i>MAS1 proto-oncogene</i>	<i>MAS1</i>	6q24-q27	HGNC:6899



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Conservação funcional do SRY e SOX3.....	12
FIGURA 2 – Sítios de ligação funcionais SOX no promotor do <i>MAS1</i> .....	15
FIGURA 3 – Mecanismos similares de regulação dos promotores do <i>AGT</i> e <i>ACE2</i> por SRY e SOX3.....	16
FIGURA 4 – Análise da região promotora da <i>Renina</i> .....	18
FIGURA 5 – Regulação do promotor da <i>Renina</i> por proteínas SOX.....	20
FIGURA 6 – Perfil de expressão do <i>Sry</i> e <i>Sox3</i> em ratos Fisher com dados do <i>Rat</i> <i>BodyMap</i> .....	22

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – <i>Primers</i> utilizados durante a mutagênese dos promotores de luciferase.....	8
---	---

## 1. Introdução

O sistema renina-angiotensina (RAS) é um dos sistemas hormonais mais importantes para a regulação da pressão arterial (PA) sistêmica por meio de mecanismos renais e não renais, e uma desregulação do primeiro é considerada um dos principais fatores no desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica (HAS) e outras doenças cardiovasculares ([Chappell, 2012](#)). Geralmente, o RAS é subdividido em dois eixos principais que funcionam em equilíbrio para manter a homeostase, sendo que cada tecido ou sistema possui uma combinação única destes ([Dzau \*et al.\*, 1987](#)). O primeiro eixo descrito, ligado a vasoconstrição e proliferação celular, é composto primariamente pela enzima conversora da angiotensina I (ACE), angiotensina II (Ang II) e o receptor angiotensinérgico subtipo 1 (AGTR1); e o segundo eixo, responsável por ações vasodilatadoras e anti-proliferativas, consiste da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] e o receptor MAS1. Atualmente, aceita-se que os dois eixos participem na regulação da PA, do metabolismo celular e principalmente da patogênese de doenças cardiovasculares, renais e metabólicas ([Santos \*et al.\*, 2013](#)). Estudos apontados em uma revisão sobre o RAS ([Reckelhoff, 2001](#)) indicaram diferenças entre machos e fêmeas para alguns componentes do RAS como atividade plasmática da renina e níveis de angiotensinogênio (AGT) tanto em humanos quanto em roedores. No entanto, poucos estudos foram elaborados para analisar as diferenças sexuais na regulação e balanço dos dois eixos do RAS ([Hilliard \*et al.\*, 2013](#)).

Ratos consômicos para o cromossomo Y sugeriram uma contribuição específica desse cromossomo para a elevação da pressão arterial em machos ([Ely e Turner, 1990](#)). Cruzamentos dos ratos consômicos e ratos feminilizados com testículo sugeriram uma regulação recíproca entre genes do cromossomo Y e a sinalização androgênia ([Ely \*et al.\*, 1993](#)). A dissecação do cromossomo Y indicou o gene *Sry* como um candidato para elevar a pressão arterial no rato ([Woodman \*et al.\*, 2006](#); [Turner \*et al.\*, 2009](#)). Parte da elevação na pressão arterial sanguínea

do rato foi devida a mudanças no sistema renina-angiotensina ([Milsted et al., 2010](#); [Ely et al., 2011](#)), uma regulação que também foi observada pela ação do SRY humano nos promotores do RAS humano ([Prokop, Watanabe, et al., 2012](#); [Prokop et al., 2014](#)). A eletroporação do *Sry* nos rins de ratos normotensos eleva a atividade plasmática da renina ([Ely et al., 2011](#)). Vale ressaltar que a atividade plasmática da renina também é elevada nos homens quando comparados às mulheres ([James et al., 1986](#)). As evidências apontam para uma combinação de hormônios sexuais e SRY na regulação diferenciada da atividade promotora dos genes do RAS, com conseqüente elevação do eixo ACE/Ang II/ AGTR1 e depressão do eixo ACE2/Ang-(1-7)/MAS1 ([Fischer et al., 2002](#); [Milsted et al., 2010](#); [Ely et al., 2011](#); [Maric-Bilkan e Manigrasso, 2012](#); [Prokop, Watanabe, et al., 2012](#); [Prokop et al., 2014](#)). Como o SRY é primariamente conhecido por seu papel na determinação testicular ([Berta et al., 1990](#)), sua ação sobre o RAS e a pressão arterial sanguínea não era inicialmente esperada.

O SRY é um membro da família de fatores de transcrição SOX que desempenham papéis importantes na regulação da especialização e diferenciação celulares ([Kamachi e Kondoh, 2013](#)). A família de proteínas SOX [*SRY (sex determining region Y)-box*] é composta por 20 fatores de transcrição humanos, todos compartilhando um domínio HMG-box (*high mobility group*) que foi primariamente descoberto no fator de determinação testicular (SRY) presente no cromossomo Y ([Bowles et al., 2000](#)). Os membros desta família estão organizados em vários subgrupos (A-H) de acordo com a identidade estrutural encontrada nestes ([Kiefer, 2007](#)). O domínio HMG-box dos fatores de transcrição SOX liga-se a sequências específicas de DNA causando o recrutamento de outros fatores de transcrição ([Prokop et al., 2014](#)) e modificações estruturais ao induzir desvios nas fitas de DNA ([Phillips et al., 2006](#)).

O *Sry* evoluiu do gene *Sox3* ([Collignon et al., 1996](#); [Sato et al., 2010](#)), o qual é encontrado no cromossomo X humano. Portanto, o *Sry* pode ter herdado a regulação do sistema renina-angiotensina do *Sox3* ou ganhado esta função de

*novo*. Com a recente elucidação de genes críticos conservados no cromossomo Y ([Bellott et al., 2014](#)), incluindo o *Sry*, torna-se muito importante entender as diferenças e similaridades dos genes do cromossomo Y e de seus homólogos no cromossomo X para diferentes fenótipos patológicos. A hipótese deste trabalho é que existe uma regulação preservada na região promotora de genes do RAS via fatores de transcrição SRY e SOX3, com possíveis diferenças entre sexos e consequente efeito sobre a pressão arterial sistêmica.

## 2. Objetivos

Objetivos gerais:

1. Análise evolutiva das sequências dos genes *Sry* e *Sox3* e da estrutura proteica de seus produtos (SRY e SOX3);
2. Análise da região promotora dos genes *AGT*, *REN*, *ACE2* e *MAS1* do RAS e sua regulação pelos fatores de transcrição homólogos sexuais SRY e SOX3.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a conservação funcional do SRY e SOX3 em diferentes espécies;
2. Analisar a região promotora do *MAS1* para regiões evolutivamente conservadas e sítios de ligação a fatores de transcrição SOX;
3. Investigar a modulação *in vitro* do promotor do *MAS1* por fatores de transcrição SOX;
4. Investigar os mecanismos de regulação *in vitro* da região promotora do *AGT* e *ACE2* por SRY e SOX3;
5. Analisar da região promotora da *Renina* para regiões evolutivamente conservadas e sítios de ligação a fatores de transcrição;
6. Testar a regulação da região promotora da *Renina* por proteínas da família SOX;
7. Mapear a expressão de *Sry* e *Sox3* em diferentes tecidos de rato com dados do projeto *Rat BodyMap*.

### 3. Material e métodos

#### 3.1 Comparações *in silico* dos genes *Sry* e *Sox3*

Sequências do *Sry* (321 espécies de mamíferos) e do *Sox3* (34 sequências de vertebrados – de zebrafish a humano) foram obtidas na plataforma NCBI Nucleotide e seus códons alinhados com a ferramenta ClustalW no programa MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis v5) ([Tamura et al., 2011](#)). O maior número de sequências SRY em comparação com o SOX3, é consequência de muitos investimentos em sequenciamentos *Sry* Sanger de mamíferos primariamente para investigações filogenéticas no cromossomo Y, enquanto as poucas sequências SOX3 resultam do sequenciamento completo do genoma destas espécies. O conjunto dos códigos de acesso utilizados nesta análise são apresentados no Apêndice 1. Análises filogenéticas foram realizadas com todas as sequências de *Sry* e *Sox3* para confirmar que nenhuma das sequências do *Sry* situava-se dentro das sequências do *Sox3*. Os valores normalizados de dN-dS para *Sox3* foram calculados para cada códon, estimando o número de substituições sinônimas (s) e não-sinônimas (n) presentes, juntamente com o número de sítios que estima-se serem sinônimos (S) e não sinônimos (N). Estas estimativas são calculadas a partir de reconstruções de estados ancestrais usando o Joint Maximum Likelihood no modelo Muse-Gaut para substituição de códons ([Muse e Gaut, 1994](#)) e o modelo de Tamura-Nei para substituição de nucleotídeos ([Tamura e Nei, 1993](#)). O teste estatístico dN-dS é utilizado para detectar códons que sofreram seleção natural positiva, onde dN é o número de substituições não-sinônimas por sítio (n/N) e dS é o número de substituições sinônimas por sítio (s/S). Um valor positivo para o teste estatístico indica uma abundância de substituições não-sinônimas. Baseado no alinhamento das sequências, aqueles aminoácidos conservados em todas as sequências do SRY e SOX3 foram realçados de vermelho, enquanto aqueles conservados somente no SOX3 foram destacados de ciano na estrutura SRY-DNA (pdb 1j46).

Para estudar a dinâmica molecular do SRY versus SOX3, os aminoácidos do HMG-box do SRY foram trocados por aqueles do SOX3 na estrutura pdb 1j46. As estruturas do SRY e SOX3 interagindo com o DNA foram então energeticamente minimizadas com o campo de força AMBER03 em um pKa de 7,4, com água na densidade de 0,997 g/mL e 0,9% de fração de massa. As simulações de dinâmica molecular foram realizadas com a duração de 3,25 nanossegundos e utilizando o programa YASARA.

### **3.2 Análise das regiões promotoras, regiões evolutivamente conservadas (ECR) e sítios de ligação dos fatores de transcrição**

Os potenciais sítios de ligação de cada região promotora dos genes do RAS foram detectados com a ferramenta Genomatix MatInspector ([Cartharius et al., 2005](#)). Todos os promotores clonados, exceto o da ACE, continham sítios de ligação com alto potencial para ligação às proteínas da família SOX. A análise das ECRs foi realizada com o *ECR Browser* ([Ovcharenko et al., 2004](#)) utilizando os parâmetros listados nas legendas das FIGS. 2 e 4 para *REN* e *MASI* respectivamente. As ECRs encontradas foram estudadas com a ferramenta rVISTA ([Loots e Ovcharenko, 2004](#)) visando detectar potenciais sítios de ligação para fatores de transcrição presentes em vertebrados.

### **3.3 Clonagem**

Vetores efetores contendo SRY, SOX2, SOX3, SOX4, SOX5, SOX6, SOX9, SOX14, SOX15, SOX17 ou SOX30, foram elaborados a partir do vetor molde pEF1. Também foram produzidos vetores de expressão contendo promotores humanos para *REN*, *AGT*, *ACE*, *ACE2*, *AGTR2* ou *MASI* a partir do vetor molde firefly luciferase pGL3.

Para avaliar os sítios de ligação SOX, foram efetuadas mutações nos vetores de expressão pGL3 originais. Começando com o vetor *REN*(-1444/+8),



os três sítios de ligação SOX foram removidos sequencialmente, o que resultou no vetor *REN(-1444/+8) SOX mut*, isto é, o primeiro sítio foi removido e confirmado por sequenciamento, depois o segundo sítio e finalmente o último sítio. Essa etapa foi executada utilizando-se *primers* fosforilados que flanqueavam cada sítio de ligação SOX (TABELA 1), seguida de uma PCR com a polimerase de alta fidelidade *Phusion Hot Start II* (Fermentas) e recircularização do vetor com a ligase T4. No caso do *MASI*, os sítios de ligação foram avaliados com duas estratégias diferentes: 1) variando o tamanho do promotor por diferentes clivagens; ou 2) inserindo mutações pontuais em um ou mais sítios de ligação SOX. Ambas foram realizadas usando mutações *primer site directed* (TABELA 1). Todos os vetores foram sequenciados pela técnica BigDye (Sanger) em um analisador genético ABI 3130xl (Applied Biosystems), e suas sequências confirmadas. O ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA) para SRY-*MASI* foi executado como previamente descrito por Prokop *et al* ([2014](#)).

**TABELA 1**

*Primers* utilizados durante a mutagênese dos promotores luciferase

<b>Gene</b>	<b>Identificação</b>	<b>Sequência dos primers</b>
<b>Renin</b>	R1-RenSoxdel	5'-CAT CAG GTT TGA CTT ACA GG-3'
<b>SOXdel1</b>	L1-RenSoxdel	5'-CTT GAA TGT AAT CAG ACA CAG-3'
<b>Renin</b>	R2-RenSoxdel	5'- TGT TAA AGA TGT ATA GGA AC-3'
<b>SOXdel2</b>	L2-RenSoxdel	5'- TGT CTG TAT ATT TCC TTA TC-3'
<b>Renin</b>	R3-RenSoxdel	5'- TGA AAC CCC ATC TCC ACT AA-3'
<b>SOXdel3</b>	L3-RenSoxdel	5'- AGG CTG GTC TGG AAC T-3'
<b>MAS</b>	R-MAScleavage	5'-GGC TAG CAC GCG TAA GAG CTC G-3'
<b>(-1123/+4)</b>	L3-MAScleavage	5'-GGA GTT CAA GAC CAG CCT CAC CAA CA-3'
<b>MAS</b>	R-MAScleavage	5'-GGC TAG CAC GCG TAA GAG CTC G-3'
<b>(-377/+4)</b>	L1-MAScleavage	5'-AGA ACT GGA AAT GGG TCC CGC ACA-3'
<b>MutSOX</b>	R-MASSoxdel1	5'-CAA <b>CGG CCC</b> TCA AAC TGA TGT CAG TGC GTG AA-3'
<b>-1855</b>	L-MASSoxdel1	5'-CTG <b>TTG CCG CAT</b> TTT GCT TGA CTG CCT CCC TAC-3'
<b>MutSOX</b>	R-MASSoxdel7	5'-AAA GGG AGA AAT TCA GCT ATA AAT CAT AAT CTT CAT G-3'
<b>-86</b>	L-MASSoxdel7	5'-TAT TCC AAT <b>TCG GCG ATT</b> TTC ATG GCT TTT TGT GTT TGT T-3'
<b>RecSOX</b>	R-MASSoxdel7W	5'-AAA GGG AGA AAT TCA GCT ATA AAT CAT AAT CTT CAT G -3'
<b>-86</b>	L-MASSoxdel7W	5'-TAT TCC AAT <b>TCACA ATT</b> TTC ATG GCT TTT TGT GTT TGT T-3'
<b>Mut2SOX</b>	R-MASSoxdel8	5'-AAA GGG AGA AAT TCA GCT ATA AAT CAT AAT CTT CAT G-3'
<b>-86</b>	L-MASSoxdel8	5'-TAT TCC AAT <b>TCAACT TGT</b> TTC ATG GCT TTT TGT GTT TG-3'

Os *primers* utilizados na construção de cada um dos promotores com mutações estão descritos nesta tabela. A primeira coluna mostra o nome utilizado, a segunda coluna o nome dos primers individuais e a terceira coluna a sequência dos *primers*. Para as mutações, o sítio de ligação SOX está sublinhado e em negrito com as bases de DNA mutadas em vermelho.

### 3.4 Co-transfecção e ensaios funcionais de luciferase em células CHO

Vinte e quatro horas antes da co-transfecção, células CHO-K1 (ATCC) eram semeadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células por poço em placas (COSTAR) com 24 poços. Estas eram mantidas em meio de cultura HAM's F12K (Sigma) suplementado com 10 mmol/L HEPES e soro bovino fetal 10% (Atlanta Biologicals) em uma atmosfera artificial umidificada (95%), a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, as células eram temporariamente co-transfectadas com 50 ng do vetor efector (pEF1), 500 ng do vetor de expressão (pGL3), 500 ng do vetor controle Renilla, 2 µL de TurboFect (Fermentas) e meio de cultura sem soro HAMs-F12K para 100 µL. As Transfecções com SRY e SOX3 juntos continuam

25 ng de cada (50 ng no total). Após 24 horas, as células eram lisadas e a intensidade da luz medida com o sistema *Dual-Luciferase Reporter Assay* (Promega). Esses experimentos foram realizados nos laboratórios de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Akron, OH, EUA.

### 3.5 Perfil de expressão dos genes *Sry* e *Sox3* no rato

Os trabalhos iniciais no projeto *Fisher 344 Rat BodyMap* ([Yu et al., 2014](#)) não anotaram os transcritos de *Sry* ou *Sox3*. Portanto, utilizando as sequências genômicas do rato para *Sry* (EU984075.1) e *Sox3* (XM\_006227591.2) foi feita uma pesquisa BLAST (ferramenta básica de alinhamento local de sequências) com os vários grupos de dados do *Sequence Read Archive* (SRA) do projeto *Rat BodyMap* ([Leinonen et al., 2011](#)). A relação dos códigos de acesso utilizados nesta análise são apresentados no Apêndice 2. A pesquisa BLAST foi executada utilizando-se somente leituras com 98% de homologia e valor esperado (*E-value*) maior que  $1e-20$ . O número de leituras positivas foi convertido para RPKM (leituras por quilobase por milhão) através do seguinte cálculo: [(número de leituras mapeadas)/(comprimento do transcrito em quilobases)/(milhão de leituras mapeadas)]. Para o mapeamento global de expressão, todos os arquivos *SRA* dos tecidos analisados (16 no total) foram agrupados para a pesquisa BLAST e categorizados somente pelo sexo do animal (macho versus fêmea). Três tecidos foram selecionados (testículo, cérebro e rim) para a avaliação do erro padrão da média entre os animais (n=4) em cada uma das quatro idades estudadas (2, 6, 21 e 104 semanas de idade). Sequências *Sry* de primatas (NM\_003140.2, KP141769.1, NM\_001032836.1, DQ977342.1 e EU294189.1) e *Sox3* (NM\_005634.2, XM\_004065361.1, NM\_001193752.1, XM\_001143467.3 e XM\_005227560.1) foram convertidas para RPKM utilizando-se dados *SRA* do rim (SRX081994, SRX081951, SRX081930, SRX081966 e SRX196347) e testículo (SRX081999, SRX081954, SRX081933, SRX081969 e SRX358238).

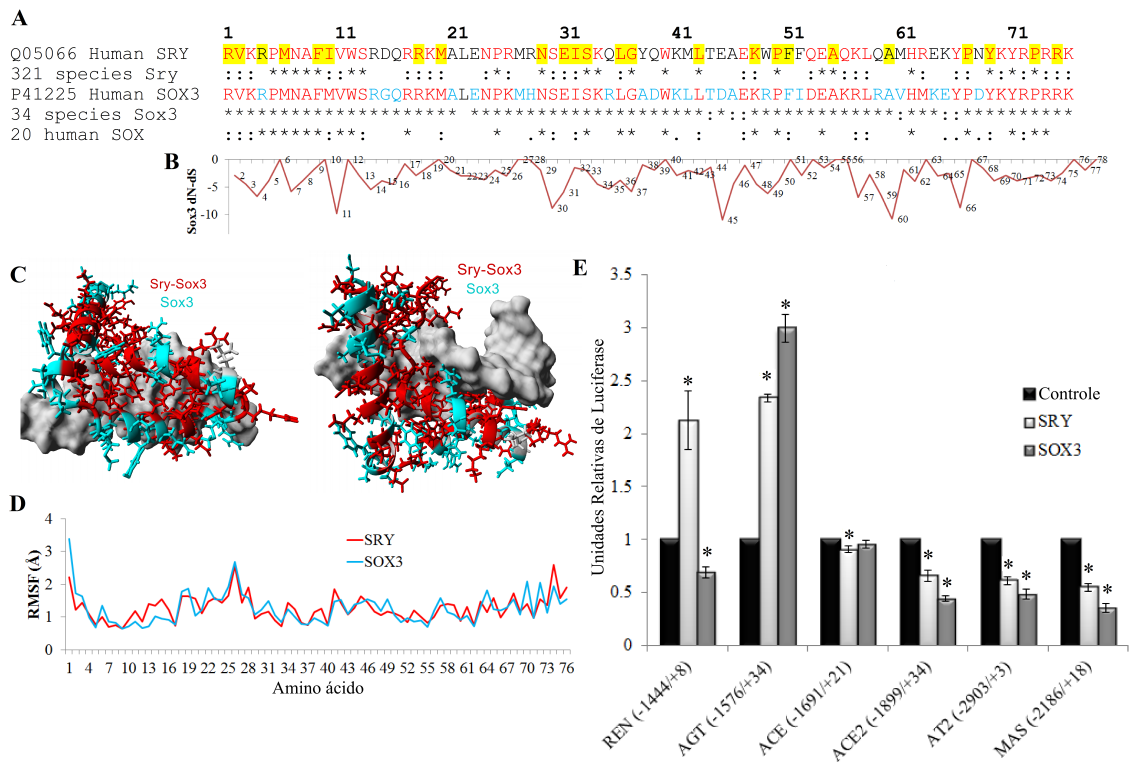
### **3.6 Análise estatística dos dados**

Os resultados para cada promotor foram analisados com o programa JMP (SAS) por meio de comparações da intensidade relativa a um vetor de controle vazio pEF-1 ou o respectivo vetor sem mutação. Todas as análises de variância (ANOVA) que demonstraram significância ( $p \leq 0,05$ ) foram submetidas ao teste *t* de Student com correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Para todos os ensaios de luciferase  $n = 3$  a  $4$ , cada  $n$  representa um experimento individual de duas medidas com duplicatas de poços. As barras de erro representam o erro padrão da média (SEM).

#### 4. Resultados

O SRY evoluiu rapidamente do SOX3, resultando em diferenças em todos os domínios fora do domínio HMG-box de ligação ao DNA. Nas sequências de 34 espécies de uma ampla seleção de vertebrados encontradas para o HMG-box do SOX3, somente um dos 76 aminoácidos não era conservado (FIG. 1A). No entanto, nas 321 sequências do SRY encontradas somente em mamíferos e não em todos os vertebrados, 26 aminoácidos não eram conservados. Para avaliar se a capacidade de ligação do SRY e do SOX3 ao DNA são semelhantes, códons do *Sox3* que estão sob pressão seletiva (dN-dS mais negativo, FIG. 1B) foram identificados. Todos os aminoácidos 11, 30, 45, 60 e 66 têm um dN-dS em torno de -10 e são conservados em todas ou na maioria das sequências do SRY. Quando as sequências do SRY e SOX3 foram mapeadas para a estrutura proteica, estas revelaram uma região de contato com o DNA altamente conservada (FIG. 1C), sugerindo que as duas proteínas ligariam ao DNA de modo semelhante. Finalmente, o modelamento da proteína SOX3 revela uma dinâmica molecular similar entre os aminoácidos do SRY e SOX3 (FIG. 1D).

Com o uso de vetores de expressão desenvolvidos para analisar a região promotora dos genes do RAS, o SRY e SOX3 foram testados como reguladores dos promotores dos primeiros (FIG. 1E). A região promotora do *AGT* foi estimulada por SRY e SOX3, enquanto as regiões promotoras de *ACE2*, *AT2* e *MAS1* foram inibidas por SRY e SOX3. A única região promotora que foi regulada de modo alternado foi aquela da *REN*, a qual foi estimulada pelo SRY e inibida pelo SOX3.



**FIGURA 1 – Conservação funcional do SRY e SOX3.**

**A)** Alinhamento das seqüências do HMG-box humano para SRY e SOX3 e a conservação em relação a múltiplas espécies. Os sítios com um \* são 100% conservados em todas as espécies e aqueles com : são funcionalmente conservados. Os aminoácidos em vermelho são conservados em todos os SRY e SOX3 enquanto aqueles em ciano são conservados apenas no SOX3. Aminoácidos destacados com amarelo representam mutações conhecidas no SRY e associadas a reversão do sexo (Prokop, Leeper, *et al.*, 2012). **B)** Valores normalizados para cada aminoácido (eixo X) subtraindo-se a taxa de trocas sinônimas (dS) da taxa de trocas não-sinônimas (dN) para as seqüências de 34 espécies do SOX3. Valores mais negativos sugerem seleção de códons. **C)** Estrutura conhecida do SRY ligada ao DNA (cinza, arquivo pdb 1j46) destacando de vermelho os aminoácidos conservados entre todas as seqüências do SRY e SOX3 e de ciano somente aqueles conservados em todos os SOX3. O DNA apresenta-se na cor cinza. **D)** Simulação de dinâmica molecular da estrutura conhecida do SRY (vermelho) e SOX3 (modelada, ciano) com os valores de flutuação média da raiz quadrada (RMSF) para cada aminoácido em um período de 3,25 nano-segundos. **E)** Transfecção dos vetores efetores pEF1 para SRY (cinza claro) e SOX3 (cinza escuro) humanos juntamente com vetores de expressão luciferase pGL3 contendo o promotor de genes do RAS. Cada amostra foi normalizada em relação ao vetor efetor controle pEF1 (preto). As barras de erro são apresentadas como erro padrão da média (SEM) e comparadas com as amostras controle de cada promotor. Aquelas marcadas com \* mostraram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

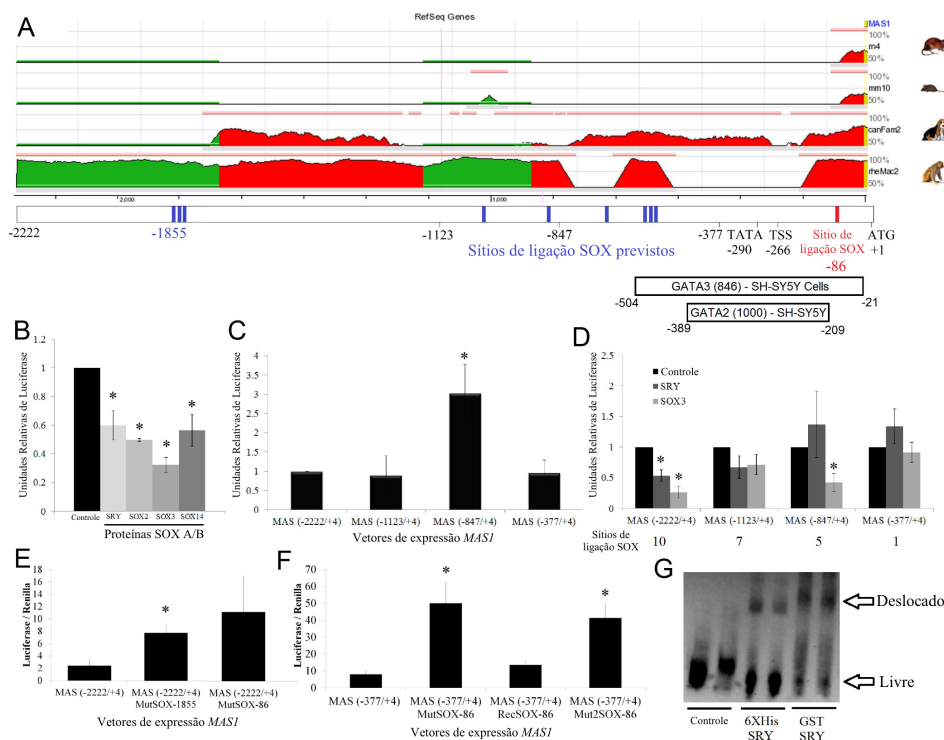
O promotor do *MASI* foi previamente testado e comprovadamente regulado por múltiplos membros das subfamílias SOX (Prokop *et al.*, 2014). Por esta razão, foram avaliados os sítios de ligação compartilhados entre SRY e SOX3 nesse promotor. Como esse não possui ECRs e apresenta divergência de

sequências em todas as espécies na região promotora e na 5'UTR (FIG. 2A), o uso de genômica evolutiva para decifrar os sítios de ligação moleculares é limitado. Portanto, os sítios de ligação ao SOX foram testados com duas técnicas diferentes: 1) uma série de clivagens resultando em promotores com tamanhos decrescentes, e 2) mutações pontuais em dois dos sítios de ligação SOX. O promotor mais longo utilizado MAS(-2222/+4) continha 10 sítios potenciais de ligação SOX. Este vetor foi regulado por todos os membros da família SOX A/B (FIG. 2B). A clivagem de parte deste promotor gerou uma versão intermediária MAS(-1123/+4) com 7 sítios de ligação e também uma versão mais curta MAS(-377/+4) que apresentava somente um sítio de ligação SOX. Nos dois casos, houve pequeno efeito sobre atividade luciferase (FIG. 2C), com exceção do vetor MAS(-874/+4) que apresentou significativo aumento da atividade luciferase. A adição de SRY ou SOX3 as células tratadas com os variados vetores mostrou uma completa perda da repressão SRY/SOX3 somente no vetor mais curto MAS(-377/+4) (FIG. 2D), sugerindo que o grupo de sítios de ligação SOX entre as posições -847 e -377 seriam importantes na regulação do promotor.

Para avaliar se os sítios de ligação fora da região de -847 a -377 também eram críticos a regulação do promotor do *MASI*, mas complexos de serem analisados em razão do modo como as clivagens tinham sido realizadas, foram realizadas mutações no sítio de ligação triplo SOX distal (-1855) e no sítio SOX proximal (-86). As mutações resultaram em uma maior estimulação do promotor *MASI* em células CHO, com diferenças significativas na região -1855 e uma tendência em -86 (FIG. 2E). Para validar ainda mais estes resultados *in vitro*, foi realizada uma mutação no sítio de ligação SOX do vetor de expressão MAS(-377/+4), com recuperação desta a seguir e finalmente uma segunda mutação para outra sequência diferente da primeira (FIG. 2F). As mutações (MutSOX-86 e Mut2SOX-86) do sítio de ligação SOX resultaram em um aumento aproximado de 5 vezes da ativação do promotor *MASI*, enquanto a recuperação da mutação (RecSOX-86) levou a valores similares aos do controle. Sondas de DNA para o promotor do *MASI* contendo o sítio de ligação conseguem se ligar a proteína

SRY contendo caudas 6X His ou GST (FIG. 2G). Estes dados indicam que o SRY e o SOX3 regulariam o promotor do *MASI* em *cis* através de uma combinação de sítios de ligação múltiplos. Dados da plataforma ENCODE que mostram uma regulação do promotor do *MASI* pelos fatores de transcrição GATA 2/3, reafirmam nossos resultados já que muitos promotores demonstraram mecanismos competitivos de regulação SOX e GATA ([Murakami et al., 2004](#); [Krieger et al., 2009](#); [Montserrat et al., 2013](#)).

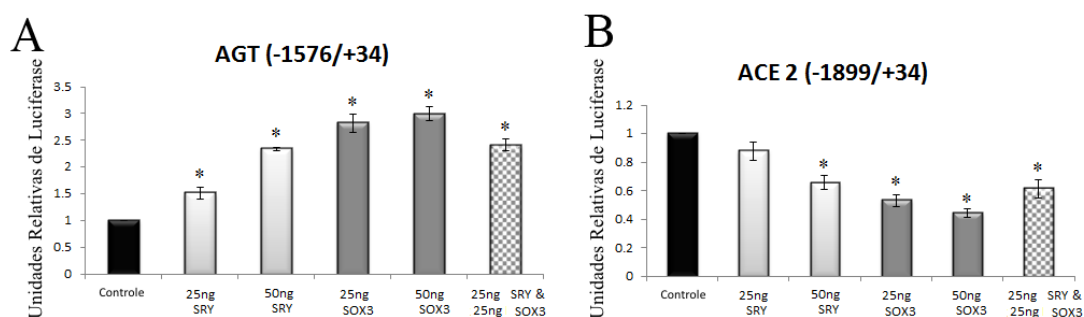




**FIGURA 2 – Sítios de ligação funcionais SOX no promotor do *MASI*.**

**A)** Análise no *ECR Browser* para o vetor de expressão pGL3 *MASI* em relação às seguintes espécies: rato (rn4), camundongo (mm10), cão (canFam2) e macaco (rh2Mac2). Regiões em vermelho (intergênicas) e verde (elementos de transposição e repetições simples) representam segmentos com  $\geq 20$  bp e que têm  $\geq 50\%$  de homologia com a sequência humana. Abaixo estão localizados vários pontos de referência do promotor como os pontos de clivagem (-2222, -1123 e -377), sítios de ligação potenciais SOX (azul), sítio de ligação SOX confirmado *in vitro* (vermelho), localização do TATA box (-290), sítio de início da transcrição (TSS, -266), sítio de início de tradução (ATG, +1) e os índices relativos derivados do ENCODE dos sítios de ligação GATA 2/3 com as linhagens celulares testadas. **B)** O promotor *MASI* humano tratado com várias proteínas SOX A/B, no qual todas reprimem o promotor significativamente. **C)** Atividade luciferase dos quatro vetores com promotores *MASI* de diferentes extensões em relação a atividade do vetor com promotor *MASI* mais longo (-2222/+4). **D)** Análise da atividade luciferase para 4 vetores com promotores *MASI* diferentes co-transfectados com vetores efetores controle (preto), SRY (cinza claro) ou SOX3 (cinza escuro). O número total de sítios de ligação SOX em cada vetor é indicado abaixo do gráfico. **E)** Mutações no vetor de expressão MAS(-2222/+4) em dois dos dez sítios (-1855 ou -86) aumentam a atividade do promotor em células CHO. Os dados são mostrados como a taxa absoluta luciferase:Renilla. **F)** Como o vetor mutado MAS(-2222/+4) MutSOX-86 demonstrou uma tendência de alteração na regulação e já foi previamente demonstrado *in vitro* ser um sítio de ligação para o SRY (Prokop *et al.*, 2014), o sítio foi investigado com o vetor menor MAS(-377/+4). O sítio de ligação SOX foi mutado para duas sequências diferentes, MAS(-377/+4) MutSOX-86 e MAS(-377/+4) Mut2SOX-86, o que resultou em um aumento da atividade da região promotora. Uma das mutações foi alterada para recuperar o sítio de ligação SOX, MAS(-377/+4) RecSOX-86 e confirmou que somente este sítio havia sido alterado anteriormente. **G)** A sequência do sítio de ligação SOX na posição (-86) foi sintetizada com um cauda de biotina. A seguir, ensaios de EMSA foram executados com proteínas SRY contendo caudas 6XHis ou GST e confirmaram a capacidade de ligação de proteínas SOX a esta sequência. As barras de erro são apresentadas como erro padrão da média (SEM) e comparadas com as amostras controle de cada promotor. Aquelas marcadas com \* mostraram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

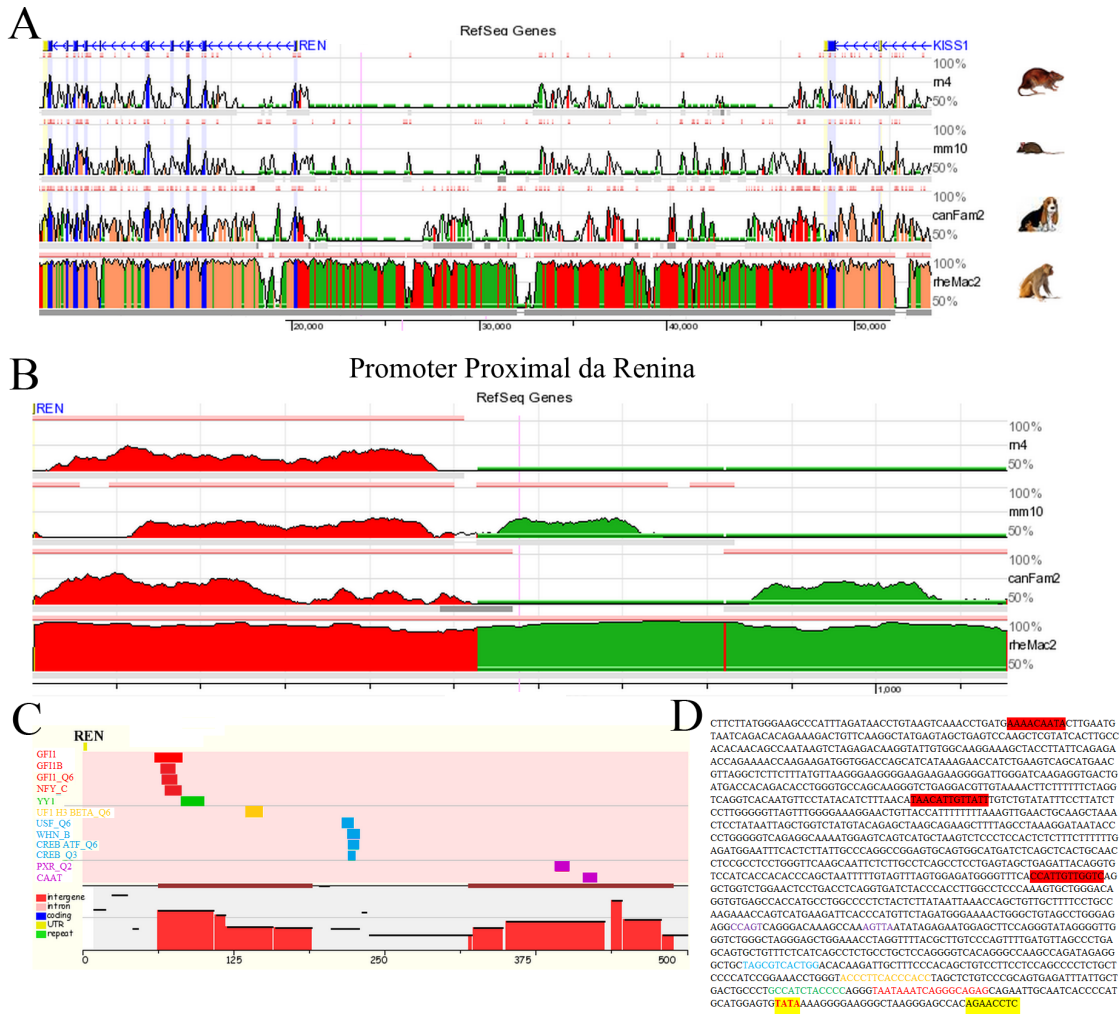
Avançando do *MASI* para outros promotores do sistema renina angiotensina, investigou-se as duas regiões promotoras (*AGT* e *ACE2*) que foram similarmente reguladas pelo SRY e SOX3. O próximo passo foi determinar se as proteínas operavam por meio do mesmo mecanismo ou por um mecanismo aditivo ou sinérgico. O promotor do *AGT* teve uma ativação concentração-dependente pelo SRY e SOX3, sendo que a administração simultânea de SRY e SOX3 resultou em uma estimulação similar à do SRY ou SOX3 sozinhos (FIG. 3A). O promotor da *ACE2* também apresentou uma supressão concentração-dependente, sendo que a combinação de SRY e SOX3 apresenta um resultado similar ao do SRY ou SOX3 sozinhos (FIG. 3B). Ambos sugerem que o SRY e o SOX3 tenham uma regulação dos promotores por mecanismos similares e sobrepostos.



**FIGURA 3 – Mecanismos similares de regulação dos promotores do *AGT* e *ACE2* por SRY e SOX3.**  
**A)** Ativação do promotor do *AGT* após transfecção do SRY (cinza claro) e SOX3 (cinza escuro) com concentrações crescentes. A transfecção dupla com SRY e SOX3 (xadrez) não demonstrou uma ativação aditiva sugerindo mecanismos compartilhados de controle do promotor. **B)** Repressão do promotor da *ACE2* após transfecção do SRY (cinza claro) e SOX3 (cinza escuro) com concentrações crescentes. A transfecção dupla com SRY e SOX3 (xadrez) não demonstrou uma repressão aditiva sugerindo mecanismos compartilhados de controle do promotor. As barras de erro são apresentadas como erro padrão da média (SEM) e comparadas com as amostras controle de cada promotor. Aquelas marcadas com \* mostraram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Para avaliar possíveis diferenças na regulação da região promotora da *REN* pelo SRY e SOX3, uma análise dos sítios de ligação conservados para fatores de transcrição foi realizada visando determinar se havia sequências específicas (*consensus*) do SOX (FIG. 4). A região 5' do gene *REN* está localizada a aproximadamente 30 kB do gene *syntenic KISS1* com poucas ECRs

localizadas no espaço inter-gênico (FIG. 4A). A análise do promotor proximal da *REN* mostrou uma região com aproximadamente 500 bp de ECR (FIG. 4B) e a existência de 12 sítios de ligação conservados para alguns fatores de transcrição (FIG. 4C), dos quais nenhum era um elemento de ligação potencial às proteínas da família SOX. O vetor de expressão luciferase do promotor da *REN*(-1444/+8) continha 3 sítios de ligação SOX localizados a mais de 1 kB do sítio de início de transcrição (TSS) (FIG. 4D). Um TATA box está localizado a 29 pares de bases do TSS (FIG. 4D).



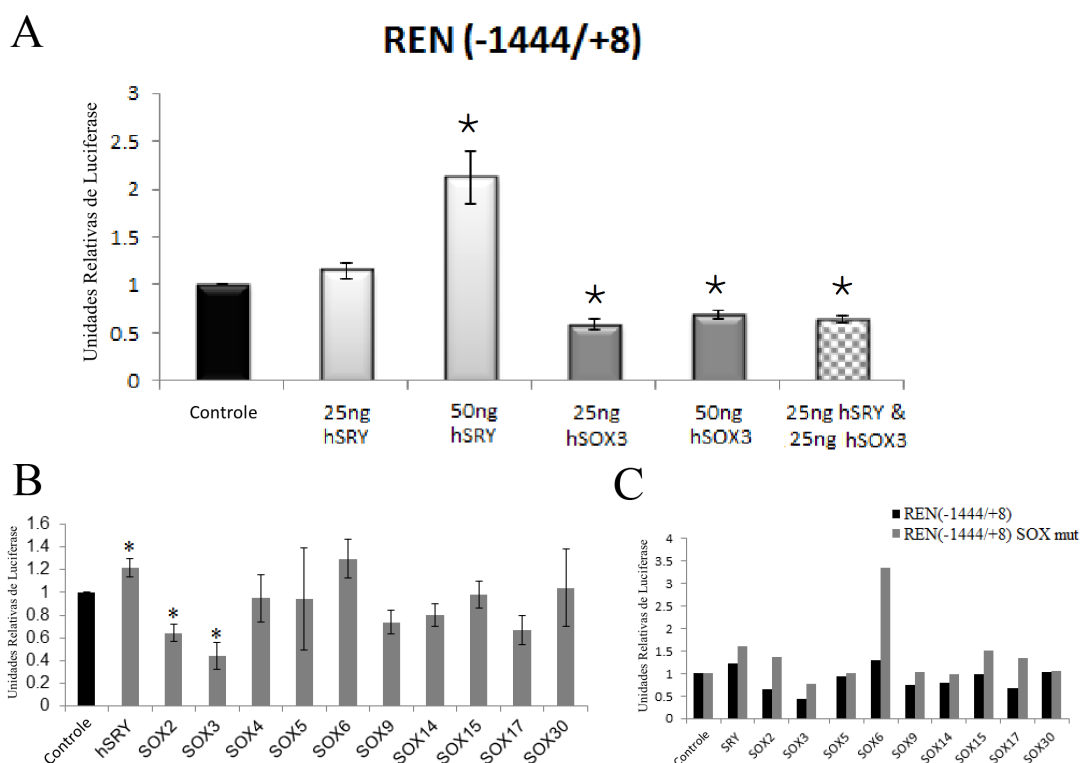
**FIGURA 4 – Análise da região promotora da *Renina*.**

**A)** Análise via *ECR Browser* do espaço inter-gênico (aproximadamente 30 kB) entre o gene *REN* e o gene *syntenic* supressor de metástases *KiSS-1* (*KISS1*). A sequência humana foi comparada com as seguintes espécies: rato (rn4), camundongo (mm10), cão (canFam2) e macaco (rh2Mac2). As regiões em azul representam exons, em amarelo as UTRs e em vermelho e verde aquelas conservadas em relação à sequência humana com segmentos  $\geq 20$  bp e  $\geq 90\%$  de homologia. **B)** Análise da região promotora proximal da *REN* com as regiões vermelhas e verdes conservadas em segmentos com  $\geq 50$  bp e com  $\geq 50\%$  de homologia. **C)** Análise da ECR no promotor proximal da *REN* para sítios de ligação a todos os fatores de transcrição (TF) possíveis e compartilhados entre humanos e ratos utilizando o programa rVISTA. **D)** Sequência do vetor pGL3 com promotor *REN*(-1444/+8) onde são identificados o TATA box (vermelho, fundo amarelo) localizado a uma distância esperada da 5'UTR (grifado de amarelo). Os sítios de ligação conservados para os TFs estão destacados conforme as cores apresentadas no painel C. Os três sítios de ligação potencias para SOX (grifados em vermelho) estão localizados fora da ECR.

A administração de 50 ng de SRY, e não 25 ng, estimulou significativamente a região promotora da *REN*, enquanto as duas concentrações de SOX3 inibiram significativamente o promotor da *REN* (FIG. 5A). Surpreendentemente, a administração concomitante de SRY e SOX3 resultou em

uma supressão similar à do SOX3 sozinho (FIG. 5A), sugerindo que os mecanismos de regulação do promotor da *REN* diferem entre o SRY e SOX3.

Para tentar entender melhor esta diferença, o vetor de expressão *REN*(-1444/+8) foi testado com membros de cada subfamília SOX (FIG. 5B). Este foi significativamente regulado somente por SRY (estimulado), SOX2 (inibido) e SOX3 (inibido). Deve ser lembrado que o SOX2 e SOX3 pertencem à subfamília SOXB1, com alta conservação de sequências e funções ([Kiefer, 2007](#)). A remoção dos três sítios de ligação SOX neste promotor resultou no aumento da estimulação deste por todos os membros testados, exceto o SOX30, e levou a perda da repressão por SOX2 e SOX3 nas células tratadas (FIG. 5C). Isto sugere uma repressão em *cis* para SOX2 e SOX3 e uma ativação em *trans* pelo SRY do promotor *REN*.

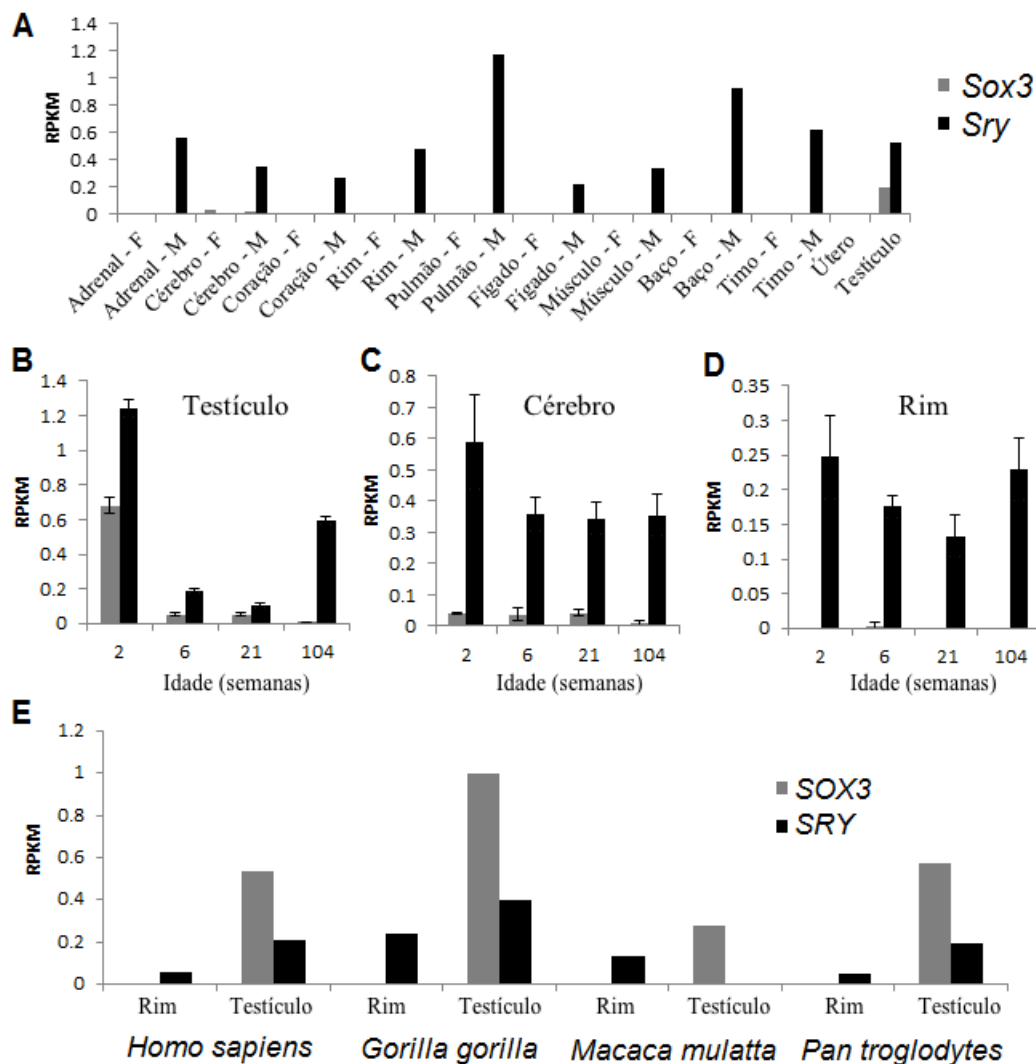


**FIGURA 5 – Regulação do promotor da *Renina* por proteínas SOX.**

**A)** Ativação do promotor *REN* após transfecção do SRY com concentrações crescentes (cinza claro) ou repressão por concentrações crescentes de SOX3 (cinza escuro). A transfecção dupla com SRY e SOX3 (xadrez) mostrou uma supressão do promotor similar àquela das células transfectadas com SOX3. **B)** Co-transfecção de células CHO com vetor controle pEF1 (preto) ou um dos vetores efetores SOX (cinza) e o vetor luciferase pGL3 *REN(-1444/+8)*. As barras de erro são apresentadas como erro padrão da média (SEM) e comparadas com as amostras controle de cada promotor. Aquelas marcadas com \* mostraram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). **C)** O vetor *REN(-1444/+8)* foi mutado para a remoção dos três sítios de ligação SOX3 e renomeado para *REN(-1444/+8) SOX mut*. O vetor mutante pGL3 (cinza) foi transfectado com cada um dos vetores efetores SOX e em todos os experimentos houve aumento da atividade luciferase em relação ao controle (preto), exceto para o SOX30.

Para estender o conhecimento da regulação do RAS no contexto do SRY e SOX3, uma análise da expressão tecidual foi realizada no rato, um organismo com extensivos estudos realizados para caracterizar o perfil proteico do RAS neste (51). Com o uso de dados do projeto *Rat BodyMap* não anotados para *Sry* e *Sox3*, foi feito um mapeamento de 10 tecidos de fêmeas e machos de 344 ratos Fisher utilizando dados de 320 experimentos de RNAseq (FIG. 6). A expressão global identificou transcritos do *Sry* em todos os tecidos dos machos, no entanto, transcritos do *Sox3* foram detectados somente no cérebro de machos e fêmeas e no testículo de machos (FIG. 6A). O testículo (FIG. 6B) e o cérebro (FIG. 6C)

tiveram uma expressão de *Sry* e *Sox3* nas quatro idades avaliadas dos machos, enquanto no rim, somente transcritos de *Sry* foram detectados (FIG. 6D). O rim é a fonte primária de renina encontrada no sangue, e por isso, de maior interesse no controle da pressão arterial sanguínea. O perfil de expressão do *Sox3* do rato é muito similar ao perfil de expressão humano para *SOX3* (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000134595-SOX3/tissue>). Em algumas das amostras de expressão humana para RNA e proteína, o *SRY* foi detectado no rim (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000184895-SRY/tissue/kidney#img>). Com base nesses dados, avaliou-se também a expressão de *SRY* e *SOX3* em primatas disponíveis nos bancos de dados públicos SRA para RNAseq de rim e testículo. Enquanto *SRY* e *SOX3* foram detectados no testículo de primatas, o *SRY* pode ser detectado somente no rim (FIG. 6E).



**FIGURA 6 – Perfil de expressão do *Sry* e *Sox3* em ratos Fisher e em primatas**

**A)** Perfil de expressão dos dados de RNAseq para *Sox3* (cinza) e *Sry* (preto) nas fêmeas (F) e machos (M) em 10 tecidos de 344 ratos Fisher (dados do *Rat BodyMap*). Cada tecido representa uma coleção de 16 experimentos de RNAseq (quatro animais em quatro idades). **B e C)** Expressão ampla do *Sry* nos machos e menor do *Sox3* no testículo e cérebro, ambos em todas as idades. **D)** O rim apresentou expressão do *Sry* em todas as idades mas sem expressão significativa para *Sox3*. **E)** Expressão de *SOX3* (cinza) e *SRY* (preto) no rim e testículo de primatas (*Homo sapiens*, *Gorilla gorilla*, *Macaca mulatta* e *Pan troglodytes*). Houve expressão de ambos no testículo e somente *SRY* no rim. Todos os dados são apresentados em RPKM (leituras por quilobase por milhão) e as barras de erro (B-D) são apresentadas como erro padrão da média (SEM) para cada idade.



## 5. Discussão

Existem diferenças sexuais na prevalência de várias doenças cardiovasculares, respiratórias (asma), autoimunes, congênitas, neurológicas e tumores ([Ober et al., 2008](#)). Dentre elas, alterações do RAS com quadros cardiovasculares, respiratórios, neurológicos, reprodutivos, imunológicos e tumorais foram previamente relatadas ([Ramser et al., 2005](#); [Irani e Xia, 2008](#); [Gard, 2010](#); [Mitchell e Pearce, 2012](#); [Wegman-Ostrosky et al., 2013](#)). Transcritos e proteínas SRY foram identificados em todos estes tecidos no rato e no ser humano ([Uhlen et al., 2010](#); [Turner et al., 2011](#)). Algumas das variações sexuais estão ligadas a diferentes perfis hormonais ([Rossouw, 2002](#)), mas evidências adicionais apontam para contribuições importantes de proteínas extra-gonadais codificadas pelos cromossomos sexuais ([Charchar et al., 2002](#); [Shankar et al., 2007](#); [Charchar et al., 2012](#)).

Estudos anteriores com modelos animais (ratos) estabeleceram o papel do cromossomo Y no aumento da pressão arterial sistêmica em machos ([Ely e Turner, 1990](#)), alterações do comportamento ([Toot et al., 2004](#); [Dickey et al., 2012](#)), sendo o gene *Sry* o principal regulador do RAS ([Ely et al., 2011](#)) e da tirosina hidroxilase ([Ely et al., 2009](#)). Esses achados permitiram questionar se as funções do SRY no controle da PA estariam preservadas no cromossomo X através do SOX3 ou se seriam exclusivas do SRY.

Genes no cromossomo Y evoluem mais rapidamente do que seus pares homólogos no cromossomo X ou autossomos devido a perda da permutação (*crossover*), efeito fundador e aumento da mutagênese testicular ([Graves, 2006](#)). Essas observações são confirmadas nos resultados deste trabalho com o alto grau de conservação do HMG-box em vertebrados para o SOX3 e a divergência mais alta no HMG-box do SRY em um pequeno grupo de vertebrados (mamíferos) (FIG. 1). No entanto, a avaliação estrutural e funcional dessas variações mostrou que os pontos de contato do DNA com o HMG-box são similares para o SRY e

SOX3, com a manutenção de aminoácidos críticos para o contato e estrutura tridimensional (*folding*) das proteínas.

Com um grande número de estudos mostrando diferenças sexuais na modulação do RAS ([Hilliard et al., 2013](#)) e dados prévios da regulação de genes do RAS pelo SRY tanto *in vivo* ([Ely et al., 2011](#)) quanto *in vitro* ([Milsted et al., 2010](#); [Prokop, Watanabe, et al., 2012](#)), este trabalho testou a hipótese de que existiriam diferenças na regulação dos promotores dos genes do RAS pelos fatores de transcrição SRY e SOX3. O promotor do *AGT* foi estimulado por SRY e SOX3, enquanto os promotores do *ACE2*, *AT2* e *MAS1* foram inibidos por SRY e SOX3. O único promotor diferencialmente regulado foi o da *REN*, sendo estimulado pelo SRY ([Prokop, Watanabe, et al., 2012](#)) e inibido pelo SOX3. Isso sugere que o SRY pode ter adquirido um novo papel em comparação com seu homólogo, SOX3, ao regular de modo *trans* a *REN* enquanto manteve sem alterações a regulação do *AGT*, *ACE2*, *AT2* e *MAS1*.

Como muitos dos resultados deste trabalho são baseados em experimentos de atividade da luciferase com seus vetores de expressão e efetores, características como o tamanho desses podem ter influenciado os resultados da regulação via SRY/SOX3, excluindo outros potenciais reguladores. No entanto, os modelos de vetores utilizados e os resultados obtidos são compatíveis com aqueles obtidos em experimentos *in vivo* de eletroporação renal em ratos ([Ely et al., 2011](#)) e portanto, provavelmente com a presença da mesma regulação do SRY. Também é possível que regiões fora do HMG-box do SRY e SOX3 sejam responsáveis pelo controle diferencial de SRY e SOX3 na *REN*. A renina, produzida primariamente nos rins, é o passo limitante do RAS e assim, a ativação via SRY que é expresso no rim, poderia contribuir para o aumento da pressão arterial sistêmica, específico dos machos, através de níveis mais elevados da Ang II.

Uma diminuição da atividade do eixo Ang-(1-7) do RAS induzida por SRY e SOX3 concomitante ao aumento específico no macho da atividade do eixo da Ang II sugere que o controle da PA seja influenciado pelo SRY. A

inibição da renina pelo SOX3 pode ser uma indicação adicional da modulação sexual diferencial do RAS, pois levaria a uma diminuição de atividade do eixo Ang II do RAS. Finalmente, é conhecido que o receptor de androgênio (AR) consegue ligar-se diretamente ao SRY e regular a região promotora de genes responsivos aos androgênios ([Yuan et al., 2001](#)), sugerindo um efeito sinérgico entre o Sry e a sinalização androgênica que contribuiria para as diferenças sexuais na pressão arterial sanguínea.

O rato é um modelo animal bem estabelecido para o estudo da contribuição do cromossomo Y no controle de fenótipos. Há cerca de 25 anos, cruzamentos entre o cromossomo Y de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) ([Ely e Turner, 1990](#)) e ratos SHR predispostos a derrame cerebral (SHRSP) ([Davidson et al., 1995](#)) com ratos WKY normotensos resultaram no aumento da pressão arterial sanguínea dos ratos WKY, enquanto os cruzamentos recíprocos reduziram a pressão arterial sanguínea em ratos SHR. Cruzamentos do cromossomo Y do rato normotenso Brown Norway (BN) com ratos SHR também foram capazes de reduzir a PA nos ratos SHR ([Kren et al., 2001](#)). Recentemente, cruzamentos do cromossomo Y de ratos Dahl normotensos sensíveis ao sal (SS), que aumentam a PA após ingestão de sal, com os ratos BN alteraram a função renal desses ([Mattson et al., 2008](#)).

Estes modelos animais de ratos consômicos foram importantes na tradução da literatura que evidencia o papel do cromossomo Y humano no controle da PA ([Ellis et al., 2000](#); [Charchar et al., 2002](#); [Shankar et al., 2007](#)) mas ainda faltavam os detalhes moleculares que explicassem esta nova função do cromossomo Y. Os resultados apresentados nesse trabalho proveram os primeiros mecanismos moleculares que explicariam as diferenças sexuais na regulação da PA via fatores de transcrição homólogos SRY e SOX3, encontrados nos cromossomos Y e X, respectivamente.

O *Sry* é expresso vários tecidos humanos e do rato, incluindo testículo, cérebro, coração e rins ([Turner et al., 2011](#)). Em relação ao *Sox3*, a expressão parece ser limitada ao testículo com participação no desenvolvimento deste

([Weiss et al., 2003](#)) e cérebro, particularmente no desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) ([Rizzoti et al., 2004](#); [Neves et al., 2007](#); [Alatzoglou et al., 2009](#)). Estudos com o RAS demonstraram a contribuição de proteínas desse na regulação do eixo HPA ([Liebl et al., 2009](#)), um eixo com conhecidas diferenças entre machos e fêmeas ([Kudielka e Kirschbaum, 2005](#); [Uhart et al., 2006](#)). O eixo ACE/Ang II/AGTR1 está ativo na hipófise causando a liberação de vasopressina e ACTH, enquanto o eixo ACE2/Ang-(1-7)/MAS1 está suprimido ([Dzau et al., 1987](#)). É interessante notar que os modelos consômicos de ratos para o cromossomo Y apresentaram alterações comportamentais nos machos ([Dickey et al., 2012](#)). Com o envolvimento do RAS em etapas do desenvolvimento cerebral ([Murck et al., 2006](#); [Bodiga e Bodiga, 2013](#)) e as alterações de retardo mental congênitas nos filhos de mães que fizeram uso de inibidores do RAS durante a gravidez ([Bullo et al., 2012](#)), nossos resultados do mapeamento da expressão do *Sry* e *Sox3* no cérebro sugerem uma função sexo-específica desses no desenvolvimento cerebral através da modulação do RAS.

## 6. Conclusões

O alinhamento e avaliação das várias sequências do SRY e SOX3 mostrou um alto grau de conservação nos aminoácidos de contato do HMG-box com o DNA e uma maior divergência nos outros domínios, o que poderia ser responsável por diferenças sexuais na regulação dos genes do RAS.

O estudo do promotor do *MAS1* evidenciou alguns sítios potenciais de ligação SOX. Os experimentos funcionais apresentaram resultados significativos para uma regulação via SRY e SOX3, em *cis*, de duas regiões no promotor do *MAS1*. Em conjunto, estes resultados sugerem que vários mecanismos de regulação do RAS são conservados e compartilhados entre o SRY e SOX3, mas também evidenciam uma diferença na regulação da renina, um ponto de controle importante entre os dois principais eixos do RAS.

A investigação dos mecanismos de regulação *in vitro* da região promotora do *AGT* e *ACE2* por SRY e SOX3 demonstrou mecanismos similares para ambos, sendo que o *AGT* foi estimulado e a *ACE2*, inibida. A análise da região promotora conservada evolutivamente da *REN* mostrou que potenciais sítios de ligação SOX estariam a montante desta e os testes funcionais desses sítios mostraram uma possível modulação do promotor da *REN* em *trans* pelo SRY e em *cis* pelo SOX3.

Finalmente, o mapeamento da expressão do *Sry* e *Sox3* no rato e primatas evidenciou a presença do *Sry* em vários tecidos. Em conjunto com os primatas, destacaram-se o testículo, cérebro e rins. O *Sox3* foi detectado no testículo de ratos e primatas e no cérebro dos ratos. Esse perfil de expressão reforça a hipótese da modulação via SRY/SOX3 sobre o RAS na pressão arterial sanguínea e no desenvolvimento cerebral, em especial o eixo HPA.

## 7. Referências

ALATZOGLOU, K. S.; KELBERMAN, D.; DATTANI, M. T. The role of SOX proteins in normal pituitary development. *J Endocrinol*, v. 200, n. 3, p. 245-58, 2009.

BELLOTT, D. W. et al. Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature*, v. 508, n. 7497, p. 494-9, 2014.

BERTA, P. et al. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, v. 348, n. 6300, p. 448-50, 1990.

BODIGA, V. L.; BODIGA, S. Renin Angiotensin System in Cognitive Function and Dementia. *Asian Journal of Neuroscience*, v. 2013, p. 18, 2013.

BOWLES, J.; SCHEPERS, G.; KOOPMAN, P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, v. 227, n. 2, p. 239-55, 2000.

BULLO, M. et al. Pregnancy outcome following exposure to angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor antagonists: a systematic review. *Hypertension*, v. 60, n. 2, p. 444-50, 2012.

CARTHARIUS, K. et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, v. 21, n. 13, p. 2933-42, 2005.

CHAPPELL, M. C. Nonclassical renin-angiotensin system and renal function. *Compr Physiol*, v. 2, n. 4, p. 2733-52, 2012.

CHARCHAR, F. J. et al. Inheritance of coronary artery disease in men: an analysis of the role of the Y chromosome. *Lancet*, v. 379, n. 9819, p. 915-22, 2012.

CHARCHAR, F. J. et al. The Y chromosome effect on blood pressure in two European populations. *Hypertension*, v. 39, n. 2 Pt 2, p. 353-6, 2002.

COLLIGNON, J. et al. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development*, v. 122, n. 2, p. 509-20, 1996.

DAVIDSON, A. O. et al. Blood pressure in genetically hypertensive rats. Influence of the Y chromosome. *Hypertension*, v. 26, n. 3, p. 452-9, 1995.

- DICKEY, C. et al. The SHR Y chromosome increases cardiovascular, endocrine, and behavioral responses to stress compared to the WKY Y chromosome. *Physiol Behav*, v. 106, n. 2, p. 101-8, 2012.
- DZAU, V. J. et al. A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endocrinology*, v. 120, n. 6, p. 2334-8, 1987.
- ELLIS, J. A.; STEBBING, M.; HARRAP, S. B. Association of the human Y chromosome with high blood pressure in the general population. *Hypertension*, v. 36, n. 5, p. 731-3, 2000.
- ELY, D. et al. The Sry3 Y chromosome locus elevates blood pressure and renin-angiotensin system indexes. *Gend Med*, v. 8, n. 2, p. 126-38, 2011.
- ELY, D. et al. Delivery of sry1, but not sry2, to the kidney increases blood pressure and sns indices in normotensive wky rats. *BMC Physiol*, v. 9, p. 10, 2009.
- ELY, D. L. et al. The hypertensive Y chromosome elevates blood pressure in F11 normotensive rats. *Hypertension*, v. 21, n. 6 Pt 2, p. 1071-5, 1993.
- ELY, D. L.; TURNER, M. E. Hypertension in the spontaneously hypertensive rat is linked to the Y chromosome. *Hypertension*, v. 16, n. 3, p. 277-81, 1990.
- FISCHER, M.; BAESSLER, A.; SCHUNKERT, H. Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, v. 53, n. 3, p. 672-7, 2002.
- GARD, P. R. Implications of the angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in health and disease: a snapshot review. *Int J Mol Epidemiol Genet*, v. 1, n. 2, p. 145-57, 2010.
- GRAVES, J. A. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell*, v. 124, n. 5, p. 901-14, 2006.
- HILLIARD, L. M. et al. The "his and hers" of the renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep*, v. 15, n. 1, p. 71-9, 2013.
- IRANI, R. A.; XIA, Y. The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. *Placenta*, v. 29, n. 9, p. 763-71, 2008.
- JAMES, G. D. et al. Renin relationship to sex, race and age in a normotensive population. *J Hypertens Suppl*, v. 4, n. 5, p. S387-9, 1986.

- KAMACHI, Y.; KONDOH, H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*, v. 140, n. 20, p. 4129-44, 2013.
- KIEFER, J. C. Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn*, v. 236, n. 8, p. 2356-66, 2007.
- KREN, V. et al. Y-chromosome transfer induces changes in blood pressure and blood lipids in SHR. *Hypertension*, v. 37, n. 4, p. 1147-52, 2001.
- KRIEGER, E. et al. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins*, v. 77 Suppl 9, p. 114-22, 2009.
- KUDIELKA, B. M.; KIRSCHBAUM, C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. *Biol Psychol*, v. 69, n. 1, p. 113-32, 2005.
- LEINONEN, R. et al. The sequence read archive. *Nucleic Acids Res*, v. 39, n. Database issue, p. D19-21, 2011.
- LIEBL, C. et al. Gene expression profiling following maternal deprivation: involvement of the brain Renin-Angiotensin system. *Front Mol Neurosci*, v. 2, p. 1, 2009.
- LOOTS, G. G.; OVCHARENKO, I. rVISTA 2.0: evolutionary analysis of transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res*, v. 32, n. Web Server issue, p. W217-21, 2004.
- MARIC-BILKAN, C.; MANIGRASSO, M. B. Sex differences in hypertension: contribution of the renin-angiotensin system. *Gend Med*, v. 9, n. 4, p. 287-91, 2012.
- MATTSON, D. L. et al. Chromosome substitution reveals the genetic basis of Dahl salt-sensitive hypertension and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, v. 295, n. 3, p. F837-42, 2008.
- MILSTED, A. et al. Regulation of multiple renin-angiotensin system genes by Sry. *J Hypertens*, v. 28, n. 1, p. 59-64, 2010.
- MITCHELL, A. L.; PEARCE, S. H. Autoimmune Addison disease: pathophysiology and genetic complexity. *Nat Rev Endocrinol*, v. 8, n. 5, p. 306-16, 2012.
- MONTERRAT, N. et al. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotency with lineage specifiers. *Cell Stem Cell*, v. 13, n. 3, p. 341-50, 2013.



MURAKAMI, A. et al. SOX7 and GATA-4 are competitive activators of Fgf-3 transcription. *J Biol Chem*, v. 279, n. 27, p. 28564-73, 2004.

MURCK, H. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system, HPA-axis and sleep-EEG changes in unmedicated patients with depression after total sleep deprivation. *Pharmacopsychiatry*, v. 39, n. 1, p. 23-9, 2006.

MUSE, S. V.; GAUT, B. S. A likelihood approach for comparing synonymous and nonsynonymous nucleotide substitution rates, with application to the chloroplast genome. *Mol Biol Evol*, v. 11, n. 5, p. 715-24, 1994.

NEVES, J. et al. Differential expression of Sox2 and Sox3 in neuronal and sensory progenitors of the developing inner ear of the chick. *J Comp Neurol*, v. 503, n. 4, p. 487-500, 2007.

OBER, C.; LOISEL, D. A.; GILAD, Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat Rev Genet*, v. 9, n. 12, p. 911-22, 2008.

OVCHARENKO, I. et al. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res*, v. 32, n. Web Server issue, p. W280-6, 2004.

PHILLIPS, N. B. et al. SRY and human sex determination: the basic tail of the HMG box functions as a kinetic clamp to augment DNA bending. *J Mol Biol*, v. 358, n. 1, p. 172-92, 2006.

PROKOP, J. W. et al. Amino acid function and docking site prediction through combining disease variants, structure alignments, sequence alignments, and molecular dynamics: a study of the HMG domain. *BMC Bioinformatics*, v. 13 Suppl 2, p. S3, 2012.

PROKOP, J. W. et al. MAS promoter regulation: a role for Sry and tyrosine nitration of the KRAB domain of ZNF274 as a feedback mechanism. *Clin Sci (Lond)*, v. 126, n. 10, p. 727-38, 2014.

PROKOP, J. W. et al. From rat to human: regulation of Renin-Angiotensin system genes by sry. *Int J Hypertens*, v. 2012, p. 724240, 2012.

RAMSER, J. et al. A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. *Hum Mol Genet*, v. 14, n. 8, p. 1019-27, 2005.

RECKELHOFF, J. F. Gender Differences in the Regulation of Blood Pressure. *Hypertension*, v. 37, n. 5, p. 1199-1208, 2001.

RIZZOTI, K. et al. SOX3 is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. *Nat Genet*, v. 36, n. 3, p. 247-55, 2004.

ROSSOUW, J. E. Hormones, genetic factors, and gender differences in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, v. 53, n. 3, p. 550-7, 2002.

SANTOS, R. A. et al. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol*, v. 216, n. 2, p. R1-R17, 2013.

SATO, Y. et al. The male-determining gene SRY is a hybrid of DGCR8 and SOX3, and is regulated by the transcription factor CP2. *Mol Cell Biochem*, v. 337, n. 1-2, p. 267-75, 2010.

SHANKAR, R. R. et al. Studies of an association in boys of blood pressure and the Y chromosome. *Am J Hypertens*, v. 20, n. 1, p. 27-31, 2007.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, v. 10, n. 3, p. 512-26, 1993.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, v. 28, n. 10, p. 2731-9, 2011.

TOOT, J. et al. The SHR Y-chromosome increases testosterone and aggression, but decreases serotonin as compared to the WKY Y-chromosome in the rat model. *Behav Genet*, v. 34, n. 5, p. 515-24, 2004.

TURNER, M. E. et al. Sry, more than testis determination? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 301, n. 3, p. R561-71, 2011.

TURNER, M. E. et al. Which Sry locus is the hypertensive Y chromosome locus? *Hypertension*, v. 53, n. 2, p. 430-5, 2009.

UHART, M. et al. Gender differences in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis reactivity. *Psychoneuroendocrinology*, v. 31, n. 5, p. 642-52, 2006.

UHLEN, M. et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol*, v. 28, n. 12, p. 1248-50, 2010.

WEGMAN-OSTROSKY, T. et al. The renin-angiotensin system meets the hallmarks of cancer. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2013.

WEISS, J. et al. Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol Cell Biol*, v. 23, n. 22, p. 8084-91, 2003.

WOODMAN, Z. L. et al. Homologous substitution of ACE C-domain regions with N-domain sequences: effect on processing, shedding, and catalytic properties. *Biol Chem*, v. 387, n. 8, p. 1043-51, 2006.

YU, Y. et al. A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages. *Nat Commun*, v. 5, p. 3230, 2014.

YUAN, X. et al. SRY interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity. *J Biol Chem*, v. 276, n. 49, p. 46647-54, 2001.

## 8. Apêndice 1 – Códigos de acesso do NCBI Nucleotide para *Sry* e *Sox3* utilizados nas comparações *in silico*

Códigos de acesso das sequências de *Sry*:

NM\_011564.1, NM\_003140.1, NM\_001014385.1, , NM\_214452.3,  
NM\_001081810.1, NM\_001171148.1, AB292070.1, NM\_001032836.1,  
AF338374.1, EF100134.1, EF100132.1, EF100133.1, EF100131.1, AF338391.1,  
AF338389.1, AF338387.1, AF338385.1, AF338383.1, AF338381.1,  
AF338379.1, AF338377.1, AF338375.1, AF338372.1, AF338370.1,  
AF338390.1, AF338388.1, AF338382.1, AF338380.1, AF338378.1,  
AF338376.1, AF338371.1, FJ373272.1, DQ119747.1, X86383.1, X86384.1,  
X86381.1, X86382.1, HQ018928.1, HQ018926.1, HQ018925.1, HQ018923.1,  
EF062567.1, EF062549.1, EF062547.1, DQ888700.1, DQ888696.1,  
DQ888694.1, DQ888690.1, DQ888688.1, DQ888686.1, DQ888684.1,  
DQ888682.1, DQ888701.1, DQ888695.1, DQ888693.1, DQ888691.1,  
DQ888689.1, DQ888687.1, DQ888685.1, DQ888683.1, DQ888681.1,  
AY224240.1, AY224238.1, AY224239.1, AY048075.1, AY048073.1,  
AY048071.1, AY048069.1, AY048067.1, AF284332.2, AF284330.2,  
AF284328.2, AF284326.2, AF284324.2, AF284322.2, AF284320.2,  
AF284318.2, AF284306.2, AF284304.2, AF284296.2, AF284294.2,  
AF284288.2, AF284286.2, AF284282.2, AF284331.2, AF284329.2,  
AF284319.2, AF284307.2, AF284283.2, AF454968.1, AF454966.1,  
AY357219.1, AY357218.1, HM115990.1, FJ614567.1, FJ614533.1,  
EU004469.1, EU004465.1, EU004463.1, EU004461.1, EU004459.1,  
EU004468.1, EU004466.1, EU004462.1, EU004460.1, FN547817.1,  
FN547813.1, FN547818.1, AF337049.1, HM071766.1, HM071764.1,  
DQ888698.1, DQ888699.1, DQ888697.1, DQ336534.2, DQ336530.2,  
DQ336528.2, DQ336533.2, DQ336529.2, DQ336527.2, AY665642.1,  
AY665632.1, MSU70659, AB108527.2, AB108509.2, AB108511.2,

AB108513.2, AB108515.2, AB108517.2, AB108519.2, AB108521.2,  
AB108523.2, AB108525.2, AB108528.2, AB108510.2, AB108512.2,  
AB108514.2, AB108516.2, AB108518.2, AB108520.2, AB108522.2,  
AB108524.2, AB108526.2, AF107021.1, AY424660.1, AY079141.3,  
AY244496.1, AY244501.1, AY424645.1, AY424650.1, AY424652.1,  
AY424655.1, AY424657.1, AY424659.1, AY424662.1, AY424664.1,  
AY424667.1, AY429652.1, AY424666.1, AB046700.1, AY244498.1,  
AY424649.1, AY424651.1, AY424654.1, AY424656.1, AY424658.1,  
AY424661.1, AY424663.1, AY424665.1, AY424668.1, AY429653.1,  
MMU70657, MHU70658, PXU76516, PSU76521, PMU76513, PIU76520,  
PGU76522, PBU76511, PAU76515, PXU76512, PPU76518, PLU76517,  
PHU76519, PCU76514, PBU76510, L29548.1, L29552.1, L29549.1, L29547.1,  
FN433496.1, FN433498.1, FN433494.1, FN433492.1, FN433490.1,  
FN433488.1, FN433499.1, FN433497.1, FN433495.1, FN433493.1,  
FN433491.1, FN433489.1, JF715297.1, HQ384295.1, DQ095194.1,  
DQ095192.1, DQ095190.1, DQ095186.1, DQ095184.1, DQ095182.1,  
DQ095180.1, DQ095178.1, DQ095176.1, DQ095174.1, DQ095172.1,  
DQ095170.1, DQ095168.1, DQ095166.1, DQ095164.1, DQ095162.1,  
DQ095160.1, DQ095195.1, DQ095193.1, DQ095191.1, DQ095189.1,  
DQ095187.1, DQ095185.1, DQ095183.1, DQ095181.1, DQ095179.1,  
DQ095177.1, DQ095175.1, DQ095173.1, DQ095171.1, DQ095169.1,  
DQ095167.1, DQ095165.1, DQ095163.1, DQ095161.1, AY244499.1,  
AY244500.1, AB247628.1, AB247629.1, AB247627.1, EU240941.1,  
EU240939.1, EU240942.1, EU240940.1, JN992677.1, JN992675.1, JQ821868.1,  
JN992657.1, JQ821866.1, JQ821864.1, JQ821867.1, JQ821862.1, JQ821865.1,  
AB539135.1, AB539133.1, AB539131.1, AB491589.1, AB491587.1,  
AB491585.1, AB491583.1, AB292068.1, AB292066.1, AB292064.1,  
AB491590.1, AB491586.1, AB491584.1, AB292069.1, AB292067.1,  
AB292065.1, JF293189.1, JF293185.1, JF293183.1, JF293190.1, JF293188.1,  
JF293184.1, JF293182.1, FN186129.2, FN186128.1, FN186126.1, FN186127.1,

FN186125.1, EF517798.1, FN568524.1, FN568497.1, FN568495.1, FJ811537.1, FJ811535.1, FJ811531.1, FJ811536.1, DQ875683.1, DQ875675.1, AY450889.1, AY450883.1, AY424653.1, GQ259331.1, AB275400.1, AB275398.1, AB275396.1, AB275394.1, AB275392.1, AB275390.1, AB275399.1, AB275397.1, AB275395.1, AB275393.1, AB275391.1, AY148965.1, AY897617.1, JN992673.1, JN992669.1, JN992661.1, EU371737.1, EU371738.1, EU371736.1, AY007301.1, EU984075 e AB548699.1

Códigos de acesso das sequências de *Sox3*:

NM\_009237.2, NM\_005634.2, NM\_001001811.2, NM\_001090679.1, NM\_204195.1, NM\_001007501.1, NM\_001193752.1, XM\_847841.3, XM\_002832196.1, XM\_003464706.1, XM\_003360464.2, XM\_003272598.2, XM\_008155221.1, XM\_007992866.1, XM\_007555118.1, XM\_007472169.1, XM\_006874971.1, XM\_005404612.1, XM\_005358519.1, XM\_005325190.1, XM\_005086487.1, XM\_004862301.1, XM\_004773679.1, XM\_004653826.1, XM\_004405905.1, XM\_004278707.1, XM\_004065361.1, XM\_003940754.1, XM\_005614947.1, XM\_002199626.2, XM\_006993895.1, XM\_005294617.1, XM\_004587804.1 e XM\_004441660.1

**9. Apêndice 2 – Códigos de acesso do Rat BodyMap utilizados no mapeamento da expressão dos genes *Sry* e *Sox3* no rato**

<b>Idade*</b>	<b>Testículo – M</b>	<b>Útero – F</b>	<b>Adrenal – F</b>	<b>Adrenal – M</b>
2	SRX471656	SRX471672	SRX471368	SRX471384
2	SRX471657	SRX471673	SRX471369	SRX471385
2	SRX471658	SRX471674	SRX471370	SRX471386
2	SRX471659	SRX471675	SRX471371	SRX471387
6	SRX471660	SRX471676	SRX471372	SRX471388
6	SRX471661	SRX471677	SRX471373	SRX471389
6	SRX471662	SRX471678	SRX471374	SRX471390
6	SRX471663	SRX471679	SRX471375	SRX471391
21	SRX471664	SRX471680	SRX471376	SRX471392
21	SRX471665	SRX471681	SRX471377	SRX471393
21	SRX471666	SRX471682	SRX471378	SRX471394
21	SRX471667	SRX471683	SRX471379	SRX471395
104	SRX471668	SRX471684	SRX471380	SRX471396
104	SRX471669	SRX471685	SRX471381	SRX471397
104	SRX471670	SRX471686	SRX471382	SRX471398
104	SRX471671	SRX471687	SRX471383	SRX471399

\*Semanas; F = fêmea; M = macho.

<b>Idade*</b>	<b>Cérebro – F</b>	<b>Cérebro – M</b>	<b>Coração – F</b>	<b>Coração – M</b>
2	SRX471400	SRX471416	SRX471432	SRX471448
2	SRX471401	SRX471417	SRX471433	SRX471449
2	SRX471402	SRX471418	SRX471434	SRX471450
2	SRX471403	SRX471419	SRX471435	SRX471451
6	SRX471404	SRX471420	SRX471436	SRX471452
6	SRX471405	SRX471421	SRX471437	SRX471453
6	SRX471406	SRX471422	SRX471438	SRX471454
6	SRX471407	SRX471423	SRX471439	SRX471455
21	SRX471408	SRX471424	SRX471440	SRX471456
21	SRX471409	SRX471425	SRX471441	SRX471457
21	SRX471410	SRX471426	SRX471442	SRX471458
21	SRX471411	SRX471427	SRX471443	SRX471459
104	SRX471412	SRX471428	SRX471444	SRX471460
104	SRX471413	SRX471429	SRX471445	SRX471461
104	SRX471414	SRX471430	SRX471446	SRX471462
104	SRX471415	SRX471431	SRX471447	SRX471463

\*Semanas; F = fêmea; M = macho.

<b>Idade*</b>	<b>Rim – F</b>	<b>Rim – M</b>	<b>Pulmão – F</b>	<b>Pulmão – M</b>
2	SRX471464	SRX471480	SRX471496	SRX471512
2	SRX471465	SRX471481	SRX471497	SRX471513
2	SRX471466	SRX471482	SRX471498	SRX471514
2	SRX471467	SRX471483	SRX471499	SRX471515
6	SRX471468	SRX471484	SRX471500	SRX471516
6	SRX471469	SRX471485	SRX471501	SRX471517
6	SRX471470	SRX471486	SRX471502	SRX471518
6	SRX471471	SRX471487	SRX471503	SRX471519
21	SRX471472	SRX471488	SRX471504	SRX471520
21	SRX471473	SRX471489	SRX471505	SRX471521
21	SRX471474	SRX471490	SRX471506	SRX471522
21	SRX471475	SRX471491	SRX471507	SRX471523
104	SRX471476	SRX471492	SRX471508	SRX471524
104	SRX471477	SRX471493	SRX471509	SRX471525
104	SRX471478	SRX471494	SRX471510	SRX471526
104	SRX471479	SRX471495	SRX471511	SRX471527

\*Semanas; F = fêmea; M = macho.

<b>Idade*</b>	<b>Fígado – F</b>	<b>Fígado – M</b>	<b>Músculo – F</b>	<b>Músculo – M</b>
2	SRX471528	SRX471544	SRX471560	SRX471576
2	SRX471529	SRX471545	SRX471561	SRX471577
2	SRX471530	SRX471546	SRX471562	SRX471578
2	SRX471531	SRX471547	SRX471563	SRX471579
6	SRX471532	SRX471548	SRX471564	SRX471580
6	SRX471533	SRX471549	SRX471565	SRX471581
6	SRX471534	SRX471550	SRX471566	SRX471582
6	SRX471535	SRX471551	SRX471567	SRX471583
21	SRX471536	SRX471552	SRX471568	SRX471584
21	SRX471537	SRX471553	SRX471569	SRX471585
21	SRX471538	SRX471554	SRX471570	SRX471586
21	SRX471539	SRX471555	SRX471571	SRX471587
104	SRX471540	SRX471556	SRX471572	SRX471588
104	SRX471541	SRX471557	SRX471573	SRX471589
104	SRX471542	SRX471558	SRX471574	SRX471590
104	SRX471543	SRX471559	SRX471575	SRX471591

\*Semanas; F = fêmea; M = macho.



<b>Idade*</b>	<b>Baço – F</b>	<b>Baço – M</b>	<b>Timo – F</b>	<b>Timo – M</b>
<b>2</b>	SRX471592	SRX471608	SRX471624	SRX471640
<b>2</b>	SRX471593	SRX471609	SRX471625	SRX471641
<b>2</b>	SRX471594	SRX471610	SRX471626	SRX471642
<b>2</b>	SRX471595	SRX471611	SRX471627	SRX471643
<b>6</b>	SRX471596	SRX471612	SRX471628	SRX471644
<b>6</b>	SRX471597	SRX471613	SRX471629	SRX471645
<b>6</b>	SRX471598	SRX471614	SRX471630	SRX471646
<b>6</b>	SRX471599	SRX471615	SRX471631	SRX471647
<b>21</b>	SRX471600	SRX471616	SRX471632	SRX471648
<b>21</b>	SRX471601	SRX471617	SRX471633	SRX471649
<b>21</b>	SRX471602	SRX471618	SRX471634	SRX471650
<b>21</b>	SRX471603	SRX471619	SRX471635	SRX471651
<b>104</b>	SRX471604	SRX471620	SRX471636	SRX471652
<b>104</b>	SRX471605	SRX471621	SRX471637	SRX471653
<b>104</b>	SRX471606	SRX471622	SRX471638	SRX471654
<b>104</b>	SRX471607	SRX471623	SRX471639	SRX471655

\*Semanas; F = fêmea; M = macho.

## 10. Anexo 1 – Artigos publicados

Artigo produzido durante o doutorado em colaboração para o desenvolvimento desta tese e publicado no periódico *Clinical Science* (2014) 126, 727–738, doi: 10.1042/CS20130385.

**Título:** *MAS promoter regulation: a role for Sry and tyrosine nitration of the KRAB domain of ZNF274 as a feedback mechanism.*

**Autores:** Jeremy W. Prokop, Frank J. Rauscher III, Hongzhuang Peng, Yuanjie Liu, **FABIANO C. ARAUJO**, Ingrid Watanabe, Fernando M. Reis e Amy Milsted.

Artigo produzido durante o doutorado em colaboração para o desenvolvimento desta tese e publicado no periódico *General and Comparative Endocrinology* (2014) pii: S0016-6480(14)00367-0, doi: 10.1016/j.ygcen.2014.09.010.

**Título:** *Structural libraries of protein models for multiple species to understand evolution of the renin-angiotensin system.*

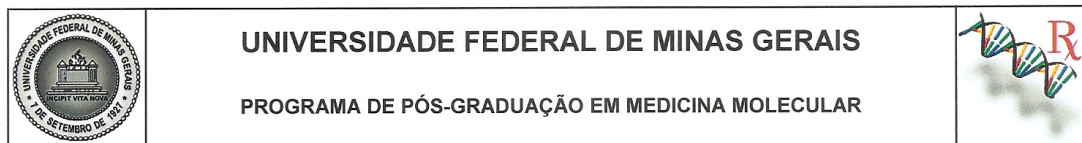
**Autores:** Jeremy W. Prokop, Victoria Petri, Mary E. Shimoyama, Ingrid K. Watanabe, Dulce E. Casarini, Thomas C. Leeper, Stephanie M. Bilinovich, Howard J. Jacob, Robson A. Santos, Almir S. Martins, **FABIANO C. ARAUJO**, Fernando M. Reis e Amy Milsted.

Artigo submetido e publicado com os resultados obtidos durante o doutorado no periódico *Physiological Genomics* (2015) 47, doi: 10.1152/physiolgenomics.00138.2014.

**Título:** *Similarities and differences of X and Y chromosome homologous genes, SRY and SOX3, in regulating the renin-angiotensin system promoters.*

**Autores:** **FABIANO C. ARAUJO**, Amy Milsted, Ingrid K. Watanabe, Helen L. Del Puerto, Robson A. Santos, Josef Lazar, Fernando M. Reis e Jeremy W. Prokop.

## 11. Anexo 2 – Ata da Defesa



### ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO **FABIANO CONDE ARAUJO - 2011704000**

Realizou-se, no dia 01 de abril de 2015, às 10:00 horas, Faculdade de Medicina, sala 029, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada **Regulação da região promotora de genes do sistema renina-angiotensina pelas proteínas SRY e SOX3**, apresentada por FABIANO CONDE ARAUJO, número de registro 2011704000, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. FERNANDO MARCOS DOS REIS - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais UFMG), Prof(a). HELEN LIMA DEL PUERTO (Centro Universitário UNA), Prof. ALMIR DE SOUSA MARTINS (Universidade Federal de Minas Gerais UFMG), Prof. SÉRGIO VELOSO BRANT PINHEIRO (Universidade Federal de Minas Gerais UFMG), Prof(a). WALQUÍRIA N. OLIVEIRA SAMPAIO (Universidade de Itaúna UIT), Prof(a). ANDREIA CARVALHO ALZAMORA (Universidade Federal de Ouro Preto UFOP).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

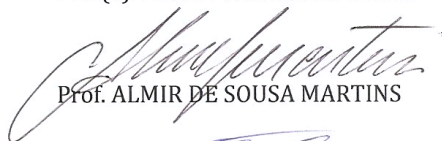
Belo Horizonte, 01 de abril de 2015.



Prof. FERNANDO MARCOS DOS REIS



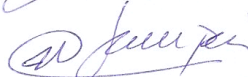
Prof(a). HELEN LIMA DEL PUERTO



Prof. ALMIR DE SOUSA MARTINS



Prof. SÉRGIO VELOSO BRANT PINHEIRO

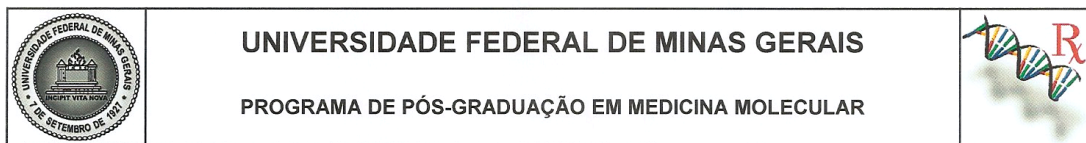


Prof(a). WALQUÍRIA N. OLIVEIRA SAMPAIO



Prof(a). ANDREIA CARVALHO ALZAMORA

## 12. Anexo 3 – Folha de Aprovação



### FOLHA DE APROVAÇÃO

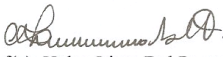
**Regulação da região promotora de genes do sistema renina-angiotensina pelas proteínas SRY e SOX3**

#### FABIANO CONDE ARAUJO

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 01 de abril de 2015, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Fernando Marcos dos Reis - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Helen Lima Del Puerto  
UNA

  
Prof(a). ALMIR DE SOUSA MARTINS  
UFMG

  
Prof(a). SÉRGIO VELOSO BRANT PINHEIRO  
UFMG

  
Prof(a). WALQUÍRIA N. OLIVEIRA SAMPAIO  
UIT

  
Prof(a). ANDREIA CARVALHO ALZAMORA  
UFOP

Belo Horizonte, 1 de abril de 2015.