JANAÍNA SENA DE SOUZA

Efeito da suplementação e restrição de ferro (Fe^{2+}) na regulação da expressão gênica e protéica da mioglobina (Mb), em músculo esquelético e cardíaco de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Fisiologia Humana).

São Paulo
2009

JANAÍNA SENA DE SOUZA

Efeito da suplementação e restrição de ferro (Fe^{2+}) na regulação da expressão gênica e protéica da mioglobina (Mb), em músculo esquelético e cardíaco de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Fisiologia Humana).

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof^a. Maria Tereza Nunes

São Paulo
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Sena-Souza, Janaina.

Efeito da suplementação e restrição de Ferro (Fe^{2+}) na regulação da expressão gênica e protéica da mioglobina (Mb), em músculo esquelético e cardíaco de ratos / Janaina Sena-Souza. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Maria Tereza Nunes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Metabolismo do Ferro.

Versão do título para o inglês: Effect of iron supplementation and restriction on the regulation of myoglobin (Mb) gene and protein expression in skeletal and cardiac muscles of rats.

Descritores: 1. Mioglobina 2. Ferro 3. Suplementação e Restrição de Ferro 4. Músculo esquelético 5. Músculo cardíaco 6. Regulação da expressão gênica I. Nunes, Maria Tereza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0242/2009

RESUMO

SENA-SOUZA, J. **Efeito da suplementação e restrição de ferro (Fe^{2+}) na regulação da expressão gênica e protéica da mioglobina (Mb), em músculo esquelético e cardíaco de ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O ferro (Fe) é um oligoelemento capaz de aceitar e doar elétrons. Tal propriedade o torna extremamente útil em diversos componentes importantes ao bom funcionamento do organismo e da célula. O Fe está associado a algumas proteínas, está presente em citocromos, em moléculas que se ligam ao oxigênio (hemoglobina e mioglobina) e em uma grande variedade de enzimas. O aumento e a diminuição da sua oferta levam a alterações na expressão de RNAs mensageiros e proteínas responsáveis pela sua própria homeostase. Sabe-se que a expressão de vários genes envolvidos no metabolismo do Fe é regulada pós-transcricionalmente, por meio de mecanismo que é desencadeado por sua ligação em regiões não traduzíveis presentes em mRNAs específicos, o que interfere no seu grau de poliadenilação, e por conseguinte, na estabilidade e na tradução do transcrito. A Mb é uma heme-proteína de 18,8 kDa, altamente expressa no tecido muscular esquelético e cardíaco, e que pertence a mesma família da hemoglobina. Sabendo-se que cerca de 15% do Fe existente no organismo está presente nos músculos, no presente trabalho avaliamos se a suplementação e restrição de Fe, a curto e longo prazo, alteram a expressão gênica da Mb no músculo oxidativo Soleus (S), glicolítico Extensor Digital Longo (EDL) e no cardíaco. Observamos que a restrição de Fe, a longo prazo, provocou um aumento na expressão gênica e protéica da Mb, apenas no músculo Soleus, sem alterar o grau de poliadenilação do transcrito, enquanto a suplementação não alterou os parâmetros avaliados em nenhum dos tecidos. A administração aguda de Fe não alterou a expressão gênica e protéica da Mb, nem o grau de poliadenilação do transcrito em nenhum dos tecidos estudados. Estes resultados sugerem que a regulação da expressão da Mb pelo Fe se dá apenas transcricionalmente, e de maneira tecido específica.

Palavras-chave: Mioglobina. Ferro. Suplementação e Restrição de Ferro. Músculo esquelético. Músculo cardíaco. Regulação da expressão gênica.

ABSTRACT

SENA-SOUZA, J. **Effect of iron supplementation and restriction on the regulation of myoglobin (Mb) gene and protein expression in skeletal and cardiac muscles of rats.** Dissertation (Master of Science) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Iron is a trace element that can accept and donate electrons. This property makes iron extremely important to several components involved with the proper functioning of the organism and cells. Iron is associated with some proteins, is present in cytochromes, molecules that bind to oxygen (hemoglobin and myoglobin) and a variety of enzymes. The increase and decrease of its offer lead to changes in the expression of mRNAs and proteins responsible for their own homeostasis. It is known that the expression of several genes involved in the metabolism of iron is regulated post-transcriptionally through a mechanism that is triggered by its binding in non-translatable regions of specific mRNAs, which interferes with their polyadenylation, and as a consequence, with the stability and translation of the transcripts. Mb is a heme-protein with 18,8 kDa, highly expressed in skeletal and cardiac muscle, and it belongs to the same family of hemoglobin. About 15% of iron in the body is present in muscle tissue. Thus, this study aimed to investigate if long- and short-term Fe supplementation and restriction affect Mb gene expression in the oxidative Soleus (S), glycolytic Extensorum Digitalis Longus (EDL), and cardiac muscles. It was shown that long- term Fe restriction increased Mb mRNA and protein expression only in S muscle, without interfering in the transcript polyadenylation, whereas Fe supplementation did not alter any parameter evaluated in the three tissues. The short-term iron administration did not change the Mb mRNA, polyadenylation and protein expression in any of the tissues studied. The present results indicate that the regulation of Mb gene expression by iron occurs only at transcriptional level and in a tissue specific manner.

Key words: Myoglobin. Iron. Iron Supplementation. Iron restriction. Skeletal muscle. Cardiac muscle. Gene expression regulation.

INTRODUÇÃO

O ferro (Fe) é um elemento traço capaz de aceitar e doar elétrons. Tal propriedade o torna extremamente útil em diversos componentes importantes ao bom funcionamento do organismo e das células. O Fe está associado a algumas proteínas, está presente em citocromos, em moléculas que se ligam ao oxigênio (hemoglobina e mioglobina) e em uma grande variedade de enzimas (ANDERSON *et al.*, 2007; ANDREWS, 2000; BEUTLER, 1959; CONRAD e UMBREIT, 2000; LI e STOCKER, 2009).

A deficiência de Fe é um dos maiores problemas nutricionais na atualidade, afetando cerca de 15% da população mundial. É uma das causas da anemia, enfermidade que provoca deficiência na termorregulação, durante a exposição ao frio, no desenvolvimento psicomotor e na capacidade de trabalho, dentre outras, o que vem sendo demonstrado tanto em humanos quanto em animais de experimentação (BEARD *et al.*, 1998; FINCH *et al.*, 1976; GERA e SACHDEV, 2002; HASS e BROWNLIE, 2001; HE, *et al.*, 2008; HEGDE *et al.*, 2006; MOY e EARLY, 1999; PAIVA; RONDO E GUERRA-SHINOHARA, 2000; ROSENZWEIG e VOLPE, 1999; TORRES; SATO E QUEIROZ, 1994; TORRES *et al.*, 1994; ZIMMERMANN; CHAOUKI e HURRELL, 2005).

Na deficiência de Fe, a síntese de heme não se completa, de modo que os seus precursores, como a protoporfirinas e outras profirinas, se acumulam nas células provocando efeitos tóxicos (MENSE e ZHANG, 2006).

Por outro lado, o ferro, quando em excesso, pode reagir com H_2O_2 e dar origem a radicais hidroxila, altamente reativos, cujos efeitos deletérios sobre vários componentes celulares, como membranas e DNA, são bem conhecidos (HENTZE e KÜHN, 1996).

Dessa forma, é de fundamental importância, tanto para a célula quanto para o organismo, a manutenção da homeostase do Fe, não só para assegurar o suprimento deste íon para garantir as suas funções essenciais, mas também para prevenir o seu acúmulo nos tecidos (GERA e SACHDEV, 2002; CONRAD e

UMBREIT, 2000; HENTZE e KÜHN, 1996; NICOLAS *et al.*, 2002; NIEDERKOFLER; SALLE e ARBER, 2005; PAIVA; RONDO e GUERRA-SHINOHARA, 2000; RUTHERFORD e BIRD, 2004). Para evitar-se danos teciduais o ferro precisa estar ligado à uma proteína (CONRAD *et al.*, 1999).

Homeostase do Fe

O Fe é adquirido através da alimentação; ele está presente em alimento de origem animal (heme) e em vegetais. O processo de regulação da absorção de Fe intestinal, pelos enterócitos é de fundamental importância para que a homeostase do ferro seja mantida, e esta absorção é muito bem controlada, pois tem que ser prevenido o excesso e também a deficiência do mesmo (ANDERSON; FRASER e McLAREN, 2009). O controle da absorção pode ser de dois modos: (1) relacionada com o Fe da dieta: por exemplo, quando há excesso deste elemento na alimentação ocorre redução da sua captação pelo enterócito; (2) relacionada com o estoque de Fe no organismo: a ação é no nível das células da cripta duodenal que, em função do estoque, atuam de forma a estabelecer a capacidade de absorção do Fe (ANDREWS, 2000).

A vitamina C tem um importante papel na absorção de ferro no intestino: (1) ela ajuda a evitar a formação de componentes de Fe insolúveis e que não são absorvíveis pelos enterócitos e; (2) ajuda na redução de Fe^{+3} em Fe^{+2} , em um ambiente ácido, para assim ser absorvido de forma eficaz pelas células da mucosa intestinal (HALLBERG; BRUNE e ROSSANDER, 1989). Ainda, segundo Mackenzie e Garrick (2005), o ascorbato aumentado serve como doador de elétrons para a Dcytb (proteína citocromo b duodenal) ajudando na absorção de Fe.

Existem diversas proteínas envolvidas com a homeostase do Fe, desde a sua absorção até a sua estocagem.

O organismo sinaliza para o intestino alterações no nível do Fe, provavelmente por um peptídeo anti-microbial conhecido como hepcidina, produzido

exclusivamente pelo fígado e que tem sua expressão aumentada quando o estoque de Fe está elevado (ANDERSON; FRASER e McLAREN , 2009; NIEDERKOFLE; SALLE e ARBER, 2005; ROSSI, 2005). A hepcidina vai agir nas suas células-alvo, enterócitos, macrófagos e hepatócitos, diminuindo a liberação de Fe, por estas células, para o plasma. Por exemplo, nos enterócitos ela se liga a ferroportina impedindo que esta transporte o ferro na membrana basolateral para a circulação (ANDERSON; FRASER e McLAREN, 2009).

Para ocorrer a absorção de Fe pelos enterócitos duodenais o ambiente precisar estar, preferencialmente, com o pH baixo, que facilita liberação de Fe^{3+} dos ânions aos quais está ligado e impede a reconstituição dele com outros ânions, este pH ácido é propiciado pelo fluido gástrico e pelo ácido ascórbico (ANDERSON *et al.*, 2002; ANDREWS, 2000). Nos enterócitos da borda em escova, na região apical, o Fe não heme é transportado com o auxílio de uma proteína transportadora de metal divalente 1 (DMT1), presente na borda em escova. Ela é um transportador endossomal, que medeia o transporte de diversos metais divalentes. O DMT1 responde a quantidade de Fe ingerido e/ou o estoque deste; assim, quando há deficiência de Fe há aumento da expressão de DMT1 nos enterócitos, regulação esta que ocorre na região não traduzível do mRNA responsável pela sua expressão (ANDERSON; FRASER e McLAREN, 2009; ANDREWS, 2000).

Como a maioria do Fe adquirido na alimentação está na forma férrica (Fe^{+3}) é necessária uma enzima presente nesta região conhecida como Dcytb, que tem atividade redutase de Fe para garantir que ele seja absorvido na forma ferrosa (Fe^{+2}) (ANDERSON; FRASER e McLAREN, 2009).

Temos ainda a Hepaestina, que é uma ferroxidase ligada à membrana basolateral e a proteína ferroportina (FPN), que está relacionada à transferência basolateral de Fe para a circulação (ANDERSON; FRASER e McLAREN, 2009). Estas moléculas têm sua expressão estimulada de acordo com a disponibilidade de Fe (ANDERSON; FRASER e McLAREN, 2009; ANDERSON *et al.*, 2002; ROLFS e HEDIGER, 2001).

O transporte de heme proteína ainda não está totalmente elucidado, sendo uma forte candidata pelo transporte de heme pelos enterócitos a proteína carregadora de heme (HPC1) (ANDERSON; FRASER e McLAREN, 2009).

Outra proteína, a ferritina, se liga ao ferro, e está presente em diversos tecidos, sendo o fígado o seu principal produtor. Ela representa a maior reserva deste íon (BARBEITO *et al.*, 2009); nas células epiteliais intestinais ela se liga ao Fe de tal forma a evitar um possível excesso deste íon no organismo, e, quando há esfoliação do epitélio intestinal, este Fe é eliminado com as fezes. O Fe ligado à ferritina não está disponível para o transporte no sangue. Quando a concentração de ferro na circulação encontra-se reduzida, o mRNA da ferritina não é traduzido (THEIL, 1994; HENTZE e KÜHN, 1996). Acredita-se que uma chaperona transporte o ferro até a ferritina no interior dos enterócitos (ANDERSON; FRASER e McLAREN, 2009).

O ferro é transportado pelo plasma do seu sítio de absorção, deposição e armazenamento por uma proteína específica armazenadora de ferro, a transferrina (CONRAD e UMBREIT, 2000; IDZERDA *et al.*, 1989; JANDL e KATZ, 1963). Cada molécula de transferrina abriga dois átomos de ferro formando uma estrutura estável, e o local onde há maior produção dessa proteína é o fígado (ANDERSON *et al.*, 2007; CONRAD e UMBREIT, 2000; IDZERDA *et al.*, 1989; JANDL e KATZ, 1963).

Apesar da grande afinidade da transferrina pelo ferro, o metal é doado para as células vermelhas imaturas da medula óssea com grande eficiência e rapidez (JANDAL e KATZ, 1963).

Nas células alvo, a transferrina ligada ao ferro é captada pelas células se ligando ao receptor de transferrina 1 (TfR1) (ANDERSON *et al.*, 2007). Quanto maior a necessidade de ferro do organismo maior é a expressão do TfR1. O receptor de transferrina 2 (TfR2) também é altamente expresso pelos hepatócitos e pode ser regulado pela hepcidina, e é capaz de captar a transferrina ligada ao ferro e endocitar este complexo (ANDERSON *et al.*, 2007).

Enquanto a captação de Fe pelas células é controlada pela quantidade de Fe intracelular, a liberação de ferro por células que o estocam, como hepatócitos e também pelos enterócitos é controlado por sinalização sistêmica.

O Fe também está diretamente envolvido com a síntese de heme, por mecanismos transcricionais ainda pouco conhecidos. Sabe-se ainda que, em vertebrados, a expressão de algumas proteínas-chave do metabolismo do Fe, como a ferritina (que tampona o Fe livre intracelular) e o receptor de transferrina (que favorece a entrada de Fe para o interior das células), é controlada pós-transcricionalmente pelo nível intracelular desse íon. Assim, quando há elevação da concentração de Fe no citosol, este interage com proteínas responsivas ao Fe (Iron Responsive Proteins – IRP) que se deslocam de regiões específicas (Elementos Responsivos ao Ferro – IRE) da porção 3' do mRNA que codifica o receptor de transferrina, levando à redução da sua estabilidade e da sua taxa de tradução. O resultado é uma diminuição da síntese do receptor de transferrina, o que previne que mais Fe seja transferido para o interior das células, evitando-se assim a produção de radicais hidroxila, que são extremamente reativos e exercem uma variedade de efeitos tóxicos nas células. Nessa mesma condição, ocorre o contrário com o mRNA da ferritina, cuja estabilidade é aumentada como resultado da formação de um complexo, entre Fe e proteínas citosólicas, o qual se liga à porção 5' do transcrito, situação em que a sua taxa de tradução aumenta, elevando-se assim o conteúdo intracelular de ferritina (BUTT *et al.*, 1996; HENTZE e KÜHN, 1996; CALTAGIRONE, A.; WEISS, G. e PANTOPOULOS, 2001; ERLITZKI; LONG e THEIL, 2002). O mesmo tipo de controle ocorre com DMT1 e FPN (Ferroportina), que possuem elementos responsivos ao ferro, o primeiro possui IRE na região 3' UTR e fica estabilizado quando IRP 1 e IRP 2 se ligam a ele; já a FPN possui IRE na região 5' UTR, mas este dado ainda precisa ser mais estudado (ANDERSON; FRASER e McLAREN, 2009).

Mioglobina

Surpreendentemente, a musculatura esquelética, que corresponde à cerca de 40% do peso corporal e contém 10 a 15% do ferro do organismo, presente na porção heme da mioglobina (Mb) e dos citocromos, tem recebido pouca atenção quanto à sua participação no controle do metabolismo do Fe, o qual é um componente chave para os reconhecidos papéis que a Mb e citocromos desempenham nos processos de armazenamento, transporte e utilização de O₂ (ROBACH *et al.*, 2007; ROBACH *et al.*, 2009).

A Mb é uma heme-proteína de 18,8 kDa (PLOTNIKOV *et al.*, 2009), altamente expressa no tecido muscular esquelético (principalmente nos de contração lenta e oxidativos) e cardíaco, e que pertence a mesma família da hemoglobina (Hb) (HASS e BROWNLIE, 2001; ORDWAY e GARRY, 2004; SHIKAMA, 2005).

Sua afinidade pelo O₂ é muito maior que a da Hb, em todas as pressões deste gás, o que garante uma transferência eficiente de O₂ do sangue ao tecido muscular. Em condições basais fica em um estado muito oxigenado, servindo como estoque de oxigênio durante a hipóxia transitória (FLÖGEL *et al.*, 2001; GÖDECKE *et al.*, 1999; ORDWAY e GARRY, 2004; SEIYAMA, 2006; TAKAHASHI; ENDOH e DOI, 2000; WELLER *et al.*, 1984; WITTENBERG e WITTENBERG, 1987). A Mb também exerce a função de transportar O₂ até a mitocôndria, sítio de fosforilação oxidativa, formando um sistema integrado de suprimento de O₂ que gera ATP aerobicamente para o trabalho muscular esquelético e cardíaco, além de servir como um estoque de O₂ no músculo, conforme apontado (ASTRAND *et al.*, 1960; FRAUENFELDER; MCMAHON e FENIMORE, 2001; JACQUEZ, 1984; JELICKS e WITTEMBERG, 1995; WAGNER, 2000; WITTEMBERG, 1970; WITTEMBERG e WITTEMBERG, 1989; WITTEMBERG e WITTEMBERG, 2003). Ela aumenta a difusão do oxigênio em locais onde a PO₂ é alta o suficiente para saturá-la e o libera onde a PO₂ é baixa (JÜRGENS; PETERS e GROS, 1994).

Adicionalmente, realiza a importante função de remover espécies reativas de O₂ e N₂ (RONS), cuja produção se eleva sob alta demanda energética, o que é

altamente deletério para a função celular. Ainda, a Mb, atuando como um acceptor intracelular de óxido nítrico (NO), protege a atividade da cadeia respiratória, auxiliando na respiração celular (DOWD; MURALI e SEAGRAVE, 1991; FLÖGEL *et al.*, 2001; FRASER *et al.*, 2006; GÖDECKE *et al.*, 1999; MAMMEN *et al.*, 2003; MERX *et al.*, 2001; ORDWAY e GARRY, 2004; SALATHÉ e KOLKKA, 1986; SEIYAMA, 2006; SHIKAMA, 2005; TAKAHASHI; ENDOH e DOI, 2000; WANG *et al.*, 1997; WELLER *et al.*, 1986; 1975; WITTENBERG e WITTENBERG, 2003).

Segundo FLÖGEL *et al.* (2001) a Mb é um importante acceptor de NO, evitando que o seu excesso prejudique o tecido. Em experimentos com camundongos selvagens e *knockout* para Mb foi mostrado que estímulos com NO endógeno e exógeno tornaram o coração mais sensível tendo uma resposta vasodilatadora, depressão na contratilidade e alterações nos parâmetros energéticos comparado com o animal selvagem. Esses achados mostram a importância da Mb como acceptora do NO.

Devido a importância funcional da Mb, vários estudos foram desenvolvidos com a finalidade de se conhecer os fatores que regulam a sua expressão.

A hipóxia é um dos indutores mais conhecidos da expressão gênica da Mb (FRASER *et al.*, 2006; ORDWAY e GARRY, 2004), já que provoca a elevação da concentração intracelular de HIF (fator transcricional induzido pela hipóxia), o qual interage com regiões específicas da região promotora desse gene, ativando sua transcrição. Aumento do conteúdo de Mb e da capacidade oxidativa também ocorre no músculo esquelético em resposta ao treinamento físico e à manutenção, por períodos de tempo relativamente longos, em elevadas altitudes (BEYER e FATTORE, 1984; HURTADO *et al.*, 1937 apud GRABER e WOODWORTH, 1986; McDONALD *et al.*, 1984; PATTENGAL e HOLLOSZY, 1967; REYNAFARJE, 1962).

O hormônio tireoideano também aumenta a expressão gênica da Mb na musculatura esquelética e cardíaca (Dos SANTOS; GIANNOCO e NUNES, 2001; GIANNOCO; DOS SANTOS e NUNES, 2004), o que, no hipertireoidismo, resulta na elevação das reservas, bem como na maior oferta e utilização de O₂ pelos tecidos, cujas necessidades energéticas encontram-se aumentadas. Sob alta demanda energética, a produção de ROS também aumenta, condição em que o

conteúdo elevado de Mb pode ser altamente benéfico, uma vez que ela atua como aceptora de ROS (espécie reativa de oxigênio).

Apesar do Fe ser essencial para a função da Mb, poucos estudos foram desenvolvidos focando o papel do íon na regulação da sua expressão, ao contrário do que ocorreu com relação à Hb. Sabe-se que a redução da oferta de Fe leva à anemia ferropriva, sendo sintomas dessa enfermidade, a diminuição da atividade motora e fraqueza muscular, dentre outros. Há evidências de que o ferro controla a atividade transcricional do HIF-1 alfa (FUJITA; NISHITANI e NAKAJIMA, 2003), o qual, conforme já comentado, pode atuar na região promotora do gene da Mb estimulando a sua expressão.

Acredita-se que o Fe e/ou heme participem de forma significativa do controle transcricional e/ou pós-transcricional da expressão de genes relacionados às proteínas que exercem funções a ele relacionadas, as quais, de forma direta ou indireta, auxiliam na manutenção da sua homeostase.

Dessa forma considerando: (a) a elevada expressão da Mb como fundamental para a manutenção das reservas intracelulares de O_2 e para o seu transporte para a mitocôndria; (b) o seu papel como aceptora de espécies reativas de O_2 , N_2 e NO e; (c) que cerca de 15% do Fe do organismo encontra-se estocado no músculo, sendo que está principalmente na Mb, foi de interesse do nosso laboratório investigar se este íon também participa do controle da expressão gênica da Mb, o que, além de trazer uma contribuição adicional sobre os mecanismos envolvidos na regulação desta proteína, a colocaria ao lado daquelas tradicionalmente relacionadas ao controle da homeostase intracelular do Fe.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo nos permitem supor que em períodos de tempo de aproximadamente 30 dias de redução da oferta de Fe, ocorre aumento da expressão gênica e protéica da Mb, o que pode ter sido desencadeado por ação do HIF – 1, ação que pode ter se estendido a alguns parâmetros hematológicos como número de células e dosagem de Hb, garantindo assim a homeostase do organismo. Também podemos observar que a regulação da expressão do mRNA e da Mb é tecido específica, e que não é devida a um aumento do comprimento da cauda poli A do transcrito, que poderia aumentar a estabilidade do mesmo e o seu conteúdo intracelular; portanto, esse efeito parece decorrer de uma ativação da transcrição do gene da Mb. A administração de Fe a curto prazo (até 24 h) tampouco alterou a expressão gênica, proteica e o comprimento da cauda poli-A do transcrito, apontando que o Fe, ao contrário do que desencadeia nos transcritos da ferritina e receptor da transferrina, não regula pós transcricionalmente a expressão da Mb.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AFSANA, K. *et al.* Reducing effect of ingesting tannic acid on the absorption of iron, but not of zinc, copper and manganese by rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, n. 3, p. 584-592, 2004.

AKASE, T. *et al.* A comparative study of laboratory parameters and symptoms effected by *Toki-shakuyaku-san* and an iron preparation in rats with irons-deficiency anemia. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 6, p. 871-878, 2004.

ANDERSON, G.J.; FRASER, D.M.; McLAREN, G.D. Iron absorption and metabolism. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 25, p. 129-135, 2009.

ANDERSON, G.J. *et al.* Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in irons demand. **Biometals**, v. 20, p. 665-674, 2007.

ANDREWS, N. Iron metabolism: Iron deficiency and iron overload. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 01, p. 75-98, 2000.

ASTRAND, I.P. *et al.* Myoglobin as an oxygen-store in man. **Acta Physiol. Scand.**, n. 48, p. 454-460, 1960.

AUSUBEL, F.M. *et al.* **Current protocols in molecular biology**. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1995.

BARBEITO, A.G. *et al.* Abnormal iron metabolism and oxidative stress in mice expressing a mutant form of the ferritin light polypeptide gene. **J. Neurochem.**, v.109, n. 4, p. 1067-1078, 2009.

BEARD, J.L. *et al.* Plasma Thyroid Hormone Kinetics are Alteres in Iron-Deficient Rats. **J. Nutr.**, v. 128, n. 8, p. 1401-1408, 1998.

BERGER, S.L.; KIMMERL, A.R. **Guide to molecular cloning techniques. Methods in Enzymology**. San Diego: Academic Press, 1987. p. 393.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEUTLER, E. Iron enzymes in iron deficiency: Aconitase activity and citrate metabolism. **J. Clin. Invest.**, v.38, p. 1605-1616, 1959.

BEYER, R.E; FATTORE, J.E. The influence of age and endurance exercise on the myoglobin of skeletal muscle of rat. **J. Gerontol.**, v. 39, n. 5, p. 525-530, 1984.

BLAYNEY, L. *et al.* The effects of iron deficiency on the respiratory function and cytochrome content of rat heart mitochondria. **Circ. Res.**, v.39, p. 744-748, 1976.

BUTT, J. *et al.* Differences in the RNA binding sites of iron regulatory proteins and potential target diversity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 4345-4349, 1996.

CALTAGIRONE, A.; WEISS, G.; PANTOPOULOS, K. Modulation of cellular iron metabolism by hydrogen peroxide: Effects of H₂O₂ on the expression and function of iron-responsive element-containing mRNAs in B6 fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 23, p. 19738-19745, 2001.

CARDOSO, M.A. *et al.* Dietary iron supplementation does not aggravate experimental malaria in young rats. **J. Nutr.**, v. 126, p. 467-475, 1996.

CERVEN, D.; DeGEORGE, G.; BETHELL, D. 28-Day repeated dose oral toxicity of recombinant human holo-lactoferrin in rats. **Reg. Toxic. Pharm.**, v. 52, p. 174-179, 2008.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156-159, 1987.

CHONG, T. W. *et al.* A mycobacterial iron chelator, desferri-exochelin, induces hypoxia-inducible factors 1 and 2, NIP3, and vascular endothelial growth factor in cancer cell lines. **Cancer Res.**, v. 62, p. 6924-6927, 2002.

CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N. Iron absorption and transport – An update. **Am. J. Hemat.**, v. 64, p. 287-298, 2000.

CONRAD, M.E. *et al.* Iron absorption and transport. **Am. J. Med. Sci.**, v. 318, n. 4, p. 213- , 1999.

DALLMAN, P.R.; REFINO, C.; YLAND, M.J. Sequence of development of iron deficiency in rat. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 35, p. 671-677, 1982.

DALLMAN, P.R.; SIIMES, M.A.; STEKEL, A. Iron deficiency in infancy and childhood. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 33, p. 86-118, 1980.

DALLMAN, P.R.; SCHWARTZ, H.C. Myoglobin and cytochrome response during repair of iron deficiency in the rat. **J. Clin. Invest.**, v. 44, n. 10, 1965.

Dos SANTOS, R.A.; GIANNOCO, G.; NUNES, M.T. Thyroid hormone stimulates myoglobin gene expression in soleus and extensorum digitalis longus muscle of rats: concomitant alterations in the activities of Krebs cycle oxidative enzymes. **Thyroid**, v. 11, n. 6, p. 545-550, 2001.

DOWD, M.K.; MURALI, R.; SEAGRAVE, R.C. Effect of temperature on the myoglobin-facilitated transport of oxygen in skeletal muscle. **Biophys. Soc.**, v. 60, p. 160-171, 1991.

ERLITZKI, R.; LONG, J.C.; THEIL, E.C. Multiple, conserved iron-responsive elements in the 3'- untranslated region of transferrin receptor mRNA enhance binding of iron regulatory protein 2. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 45, p. 42579-42587, 2002.

FINCH, C.A. *et al.* Iron deficiency in rats: physiological and biochemical studies of muscle dysfunction. **J. Clin. Invest.**, v. 58, p. 447-453, 1976.

FLÖGEL, U. *et al.* Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. **PNAS**, v. 98, n. 2, p. 735-740, 2001.

FRASER, J. *et al.* Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. **PNAS**, v. 103, n. 8, p. 2977-2981, 2006.

FRAUENFELDER, H.; McMAHON, B.H.; FENIMORE, P.W. The role of structure, energy landscape, dynamics, and allostery in the enzymatic function of myoglobin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 5, p. 2370-4, 2001.

FUJITA, H.; NISHITANI, C.; NAKAJIMA, M. Molecular biology of iron in nutritional science. **Nippon Eiseigaku Zasshi**, v. 58, n. 2, p. 248-253, 2003.

GERA, T.; SACHDEV, H.P.S. Effect of iron supplementation on incidence of infectious illness in children: systematic review. **Brit. Med. J.**, v. 325, p. 1142-1152, 2002.

GIANNOCO, G.; Dos SANTOS, R.A.; NUNES, M.T. Thyroid hormone stimulates gene expression in rat cardiac muscle. **Mol. Cel. Endocrinol.**, v. 226, p. 19-26, 2004.

GÖDECKE, A. *et al.* Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p.10495-500, 1999.

GRABER, S.G.; WOODWORTH, R.C. Myoglobin expression in L6 muscle cells. Role of differentiations and heme. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 20, p. 9150-9154, 1986.

HAGLER, L. *et al.* Influence of dietary iron deficiency on hemoglobin, myoglobin, their respective reductases and skeletal muscle mitochondrial respiration. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 34, p. 2169-2177, 1981.

HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ROSSANDER, L. The role of vitamin C in iron absorption. **Int. J. Vitam. Nutri. Res. Suppl.**, v. 30, p. 103-108, 1989.

HASS, J.D.; BROWNLIE, T. Iron deficiency and reduced work capacity: A critical review of the research to determine a casual relationship. **J. Nutr.**, p. 676-690, 2001.

HE, W.L. *et al.* Comparison of iron uptake from reduced iron powder and FeSO₄ using the Caco-2 cell model: effects of ascorbic acid, phytic acid, and pH. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 2637-2642, 2008.

HENTZE, M.W.; KÜHN, L.C. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 8175-8182, 1996.

IDZERDA, R.L. *et al.* Expression from the transferrin gene promoter in transgenic mice. **Mol. Cel. Biol.**, v. 9, n. 11, p. 5154-5162, 1989.

JACQUEZ, JA. The physiological role of myoglobin: more than a problem in reaction-diffusion kinetics. **Math. Biosci.**, v. 68, p. 57-97, 1984.

JANDL, J.H; KATZ, J.H. The plasma-to-cell cycle of transferrin. **J. Clin. Invest.**, v. 42, n. 3, p. 314-326, 1963.

JELICKS, L.A.; WITTENBERG, B.A. H nuclear magnetic resonance studies of sarcoplasmic oxygenation in the red cell-perfused rat heart. **Biophys. J.**, v. 68, p. 2129-36, 1995.

JÜRGENS, K.D.; PETERS, T.; GROS, G. Diffusivity of myoglobin in intact skeletal muscle cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 3829-3833, 1994.

LI, C.; STOCKER, R. Heme oxygenase and iron: from bacteria to humans. **Redox Report**, v. 14, n. 3, p. 95-101, 2009.

MACKENZIE, B.; GARRICK, M.D. Iron imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 289, p. 981-986, 2005.

MAMMEN, P.P.A. *et al.* Hypoxia-induced left ventricular dysfunction in myoglobin-deficient mice. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 285, p. 2132-2141, 2003.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. (Ed.). **Molecular cloning- a laboratory manual**. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Vol. 1,2, 3.

McDONALD, R. *et al.* Effects of iron deficiency and exercise on myoglobin in rats. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, v. 52, n. 4, p. 414-419, 1984.

MENSE, S.H.; ZHANG, L. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. **Cell. Res.**, p. 681-692, 2006.

MERX, M.W. *et al.* Myoglobin facilitates oxygen diffusion. **FASEB J.**, v. 15, p. 1077-1079, 2001.

MOY, R.J.D.; EARLY, A.R. Iron deficiency in childhood. **J. Royal Soc. Med.**, v. 92, p. 234-236, 1999.

NICOLAS, G. *et al.* Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 7, p. 4596-4601, 2002.

NIEDERKOFER, V.; SALLE, R.; ARBER, S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 8, p. 2180-2186, 2005.

ONODERA, H. *et al.* Study on the carcinogenicity of tannic acid F344 rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 32, n. 12, p. 1101-1106, 1994.

ORDWAY, G.A.; GARRY, D.J. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 3441-3446, 2004.

PAIVA, A.A.; RONDO, P.H.C.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **Rev. Saude Publica**, v. 34, n. 4, p. 421-426, 2000.

PATTENGAL, P.K.; HOLLOSZY, J.O. Augmentation of skeletal muscle myoglobin by a program of treadmill running. **Am. J. Physiol.**, v. 213, n. 3, p. 783-785, 1967.

PLOTNIKOV, E.Y. *et al.* Myoglobin causes oxidative stress, increase of NO production and dysfunction of kidney's mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1792, p. 796-803, 2009.

REARDON, T.F.; ALLEN, D.G. Iron injections in mice increase skeletal muscle iron content, induce oxidative stress and reduce exercise performance. **Exp. Physiol.**, v. 94, n. 6, p. 720-730, 2009.

REYNAFARJE, B. Myoglobin content and enzymatic activity of human skeletal muscle: their relation with the process of adaptation to high altitude. **Tech. Doc. Rep. SAMTDR USAF Sch. Aerosp. Med.**, p. 62-89, 1962.

ROBACH, P. *et al.* Strong iron demand during hypoxia-induced erythropoiesis is associated with down-regulation of iron-related proteins and myoglobin in human skeletal muscle. **Blood**, v. 109, p. 4724-4731, 2007.

ROBACH, P. *et al.* Alterations of systemic and muscle iron metabolism in humans subjects treated with low-dose recombinant erythropoietin. **Blood J.**, v. 113, p. 6707-6715, 2009.

RODRIGUEZ, A. *et al.* Effects of iron loading on muscle: genome-wide mRNA expression profiling in the mouse. **BMC Genomics**, v. 8, p. 379-394, 2007.

ROLFS, A.; HEDIGER, M.A. Intestinal iron absorption: an update. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 17, n. 2, p. 177-183, 2001.

ROSENZWEIG, P.H.; VOLPE, S.L. Iron, thermoregulation, and metabolic rate. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 39, n. 2, p. 131-148, 1999.

ROSSI, E. Hepcidin – the iron regulatory hormone. **Clin. Biochem. Rev.**, v. 26, p. 47-49, 2005.

RUTHERFORD, J.C.; BIRD, A.J. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc and copper homeostasis in eukaryotic cells. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 3, p. 1-13, 2004.

SALATHÉ, E.P.; KOLKKA, R.W. Reduction of anoxia through myoglobin-facilitated diffusion of oxygen. **J. Biophys. Soc.**, v. 50, p. 885-904, 1986.

SALLÉS, F.J.; RICHARDS, W.G., STRICKLAND, S. Assaying the polyadenylation state of mRNAs. **Methods**, v. 17, p. 38-45, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring, Cold Spring Harbor Press, 1989. vol. 1, 2, 3.

SEIYAMA, A. Virtual cooperativity in myoglobin oxygen saturation curve in skeletal muscle *in vivo*. **Dyn. Med.**, v. 5, n. 3, 2006.

SERRANO-NASCIMENTO, C. **Efeito da administração aguda de iodo na regulação da expressão do co-transportador de sódio-iodeto (NIS) - Estudos *in vivo* e *in vitro***. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SERRANO-NASCIMENTO, C.; NUNES, M.T. Post-transcriptional regulation of sodium iodide symporter (NIS) expression by acute iodine administration: *in vivo* and *in vitro* studies. **Thyroid**, v. 17, p. S111, 2007. Suppl. 1. Apresentado no Annual Meeting of the American Thyroid Association, 78., 2007, New York.

SHIKAMA, K. Nature of the FeO₂ bonding in myoglobin and hemoglobin: A new molecular paradigm. **ELSEVIER**, p. 1-80, 2005.

SRINIVAS, V. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF -1 α) is a non-heme iron protein. Implications for oxygen sensing. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 29, p. 18019-18022, 1998.

TAKAHASHI, E.; ENDOH, H.; DOI, K. Visualization of myoglobin-facilitated mitochondrial O₂ delivery in a single isolated cardiomyocyte. **Biophys. J.**, v. 78, p. 3252-3259, 2000.

THEIL, E.C. Iron Regulatory elements (IREs): a family of mRNA non-coding sequences. **Biochem. J.**, v. 304, p. 1-11, 1994.

TORRES, M.A.A. *et al.* Terapêutica com doses profilática de sulfato ferroso no combate à carência de ferro em crianças atendidas em unidades básicas de saúde. **Rev. Saude Publica**, v. 28, n. 6, p. 410-415, 1994.

TORRES, M.A.A.; SATO, K.; QUEIROZ, S.S. Anemia em crianças menores de dois anos atendidas na unidades básicas de saúde no Estado de São Paulo, brasil. **Rev. Saude Publica**, v. 28, n. 4, p. 290-294, 1994.

VOGT, M. *et al.* Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, p. 173-182, 2001.

WAGNER, P.D. Diffuse resistance to O₂ transport in muscle **Acta Physiol. Scand.**, v. 168, p. 609-14, 2000.

WANG, D. *et al.* Myoglobin and hemoglobin rotational diffusion in the cell. **Biophys. J.**, v. 73, p. 2764-2770, 1997.

WANG, G.L.; SEMENZA, G.L. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. **Blood**, v. 82, p. 3610-3615, 1993.

WELLER, P.A. *et al.* Organization of the human myoglobin gene. **EMBO J.**, v. 3, n. 2, p. 439-446, 1984.

WENGER, R.H. Mammalian oxygen sensing, signaling and gene regulation. **J. Exp. Biol.**, v. 203, p. 1253-1263, 2000.

WITTEMBERG, J.B. Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: Role of myoglobin in oxygen entry into muscle. **Physiol. Rev.**, v. 50, n. 4, p. 559-636, 1970.

WITTENBERG, B.A.; WITTENBERG, J.B. Myoglobin-mediated oxygen delivery to mitochondria of isolated cardiac myocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 7503-7507, 1987.

WITTENBERG, B.A.; WITTENBERG, J.B. Transport of oxygen in muscle. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 51, p. 857-78, 1989.

WITTENBERG J.B.; WITTENBERG B.A. Myoglobin function reassessed. **J. Exp. Biol.**, 206, 2011-20, 2003.

ZIMMERMANN, M.B.; CHAOUKI, N.; HURRELL, R.F. Iron deficiency due to consumption of a habitual diet low in bioavailable iron: a longitudinal cohort study in Moroccan children. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, p. 115-121, 2005.