



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Instituto Biomédico
Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular

Efeito da Lactoferrina Bovina em Linhagens Celulares Tumorigênicas da Próstata Humana

Vanessa Pimenta Rocha

Orientador: Rafael Braga Gonçalves
Co-orientador: Anderson Junger Teodoro

Rio de Janeiro,
27 de março de 2019

Vanessa Pimenta Rocha

**Efeito da Lactoferrina Bovina em Linhagens Celulares
Tumorigênicas da Próstata Humana**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Orientador: Rafael Braga Gonçalves
Co-orientador: Anderson Junger Teodoro

Rio de Janeiro,
27 de março de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Vanessa Pimenta.

Efeito da Lactoferrina Bovina em Linhagens Celulares Tumorigênicas da Próstata Humana / Vanessa Pimenta Rocha – Rio de Janeiro 2019.

97

Orientador: Rafael Braga Gonçalves.

Coorientador: Anderson Junger Teodoro

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular), 2019..

1. Atividade anticancerígena 2. Lactoferrina Bovina 3. Câncer de próstata.

I. Gonçalves, Rafael Braga, orient. II. Teodoro, Anderson Junger, coorient.
III. Título

Vanessa Pimenta Rocha

**Efeito da Lactoferrina Bovina em Linhagens Celulares
Tumorigênicas da Próstata Humana**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Banca Examinadora:

- Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque (Doutor em Biologia - Biociências Nucleares) UNIRIO
- Gabriela Nestal de Moraes (Doutora em Oncologia) INCA
- Danielly Cristiny Ferraz da Costa (Doutora em Química Biológica) UERJ
- Pablo Trindade (Doutor em Ciências Biológicas - Biofísica) UNIRIO

“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido ficar crianças toda a vida.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ter me proporcionado tantas coisas boas na vida. Aos meus pais, Joper e Vânia, que se não fosse pelo carinho, apoio e esforço deles eu não teria chegado tão longe. Além de meus pais eles são meus amigos, são os que mais torcem por mim. Me apoiaram a todo o momento dessa jornada. Até no final, quando minha mãe se propôs a ler meu trabalho para corrigir os erros de português.

Aos meus avós, que sempre acreditaram no meu potencial. Mesmo quando não entendiam muito bem o que eu estava fazendo, sempre tiveram muito orgulho de mim e me apoiaram para o que fosse preciso.

Ao Samir Campos, meu namorado e companheiro. Pela ajuda com os experimentos e as discussões, em todo o meu mestrado. E em tudo que precisei. Sei que sempre posso contar com você. Além dos momentos felizes que me proporcionou e me distraíram das dificuldades de estar na pesquisa atualmente. Tenho muito orgulho de você, de tudo que conseguiu e dá ótima pessoa que é. Acredite que você vai conseguir tudo o que sonhou!

À minha família e amigos que sempre estiveram comigo. E que, na maior parte das vezes, entenderam o porquê eu tive que me ausentar em algumas ocasiões, e ficar pouco tempo em outras. Sei que posso contar com cada um de vocês pro que eu precisar.

À família do Samir, por sempre serem gentis comigo e se preocuparem se eu estava bem. Sempre me senti muito confortável perto de vocês. Por me aturarem na casa deles nessa fase final, quando meu computador estragou. Pela minha cunhada, por todos os presentes e por ter corrigido meu resumo.

À minha amiga de infância, Ignez Merly, por sempre estar ao meu lado, mesmo longe. E que sempre se preocupa comigo. Por estar desde janeiro me perguntando como pode me ajudar na minha dissertação e pedindo para apresentar pra ela a defesa para treinar. Isso mesmo sendo engenheira e sem entender muito bem o que faço no mestrado.

À minha grande amiga, Caroline Barros, que vem me acompanhando desde o primeiro período da faculdade, compartilhando alegrias e tristezas. Além disso, trabalha comigo no laboratório e por muitas vezes me ajudou com os experimentos

nessa fase final. É muito bom saber que posso contar com você, tanto para assuntos pessoais quanto no trabalho.

Quero agradecer aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica Estrutural (LBE), Matheus e Rafaella, por toda ajuda e descontração nas semanas mais difíceis. O LBE é realmente um laboratório de sorte. Quantas pessoas de bom coração passaram por lá! Espero que isso nunca mude. A todos que fazem parte dos laboratórios LIMIN, LIMIR e LMA, por toda alegria, ajuda e principalmente colaboração. A ciência não é feita sem ajuda.

Ào professor André e a professora Andrea, que gentilmente cederam um espaço no seu laboratório e por toda a ajuda com a Citômetria. Aos colegas e amigos do LTPV/LABEV/IBqM/UFRJ, além de serem muito prestativos, são todos ótimas pessoas, sempre proporcionando um ambiente agradável de descontração e amizade.

À Thais e Triciana do CENABIO/UFRJ, pela ajuda e compreensão com os experimentos de Citômetria.

Ao Grupo de Biomarcadores Neoplásicos do INCA, por me disponibilizarem as linhagens celulares que utilizei. Principalmente a Paula, por toda a sua ajuda.

À banca, por ter aceitado prontamente o meu convite.

Ao professor Anderson, por ter aceitado nosso convite para ser meu co-orientador e por ter me ajudado com a dissertação. Além disso, por seu trabalho ter inspirado a elaboração desse mestrado.

Quero agradecer ao meu orientador e amigo, o professor Rafael Braga. Te agradeço imensamente por todos os conselhos e ótimas conversas. Durante o tempo em que trabalhamos juntos, você foi muito importante para o meu crescimento pessoal e de profissional. Obrigada pela sua ajuda em tudo que precisei, durante essa importante fase da minha vida.

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1. Câncer	17
1.2. Câncer de Próstata	24
1.3. Lactoferrina	27
2. Objetivos	32
2.1. Objetivo Geral	32
2.2. Objetivos Específicos	32
3. Metodologia	33
3.1. Reagentes	33
3.2. Preparo de apo-lactoferrina bovina	33
3.3. Preparo de holo-lactoferrina bovina	33
3.4. Cultura de células	34
3.5. Análise da morfologia celular	34
3.6. Internalização da lactoferrina bovina	35
3.7. Ensaio de viabilidade celular	36
3.8. Ensaio de contagem por azul de tripan	37
3.9. Ensaio de proliferação celular	38
3.10. Ensaio de ciclo celular	38
3.11. Ensaio de apoptose	39
3.12. Ensaio com sondas para avaliação de estresse oxidativo e ativação de apoptose no Operetta High-Content Imaging System	40
3.13. Análises Estatísticas	41
4. Resultados e Discussão	42
4.1. Linhagem Celular DU-145	42
4.1.1. A influência da Lactoferrina bovina sobre a morfologia celular	42
4.1.2. Tráfego intracelular da Lactoferrina Bovina	47

4.1.3.	Efeito da Lactoferrina bovina sobre a viabilidade celular	49
4.1.3.1.	Ensaio de MTT	49
4.1.3.2.	Ensaio de contagem com azul de tripan	53
4.1.4.	Efeito da Lactoferrina bovina sobre a progressão do ciclo celular	56
4.1.5.	Efeito da Lactoferrina bovina sobre o processo de apoptose	61
4.1.6.	Ensaio com sondas para avaliação de estresse oxidativo e ativação de apoptose no Operetta High-Content Imaging System	65
4.2.	Linhagem Celular PC-3	77
4.2.1.	A influência da Lactoferrina bovina sobre a morfologia celular	77
4.2.2.	Efeito da Lactoferrina bovina sobre a viabilidade celular	82
4.2.2.1.	Ensaio de MTT	82
4.2.2.2.	Ensaio de contagem por azul de tripan	84
4.2.3.	Efeito da Lactoferrina bovina sobre a proliferação celular	86
4.2.4.	Efeito da Lactoferrina bovina sobre a progressão do ciclo celular	87
4.2.5.	Efeito da Lactoferrina bovina sobre o processo de apoptose	87
5.	Conclusão	91
6.	Referências bibliográficas	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Classificação de câncer com exemplificação de um tumor sólido.....	18
Figura 02: Transformação de células normais em um câncer.....	19
Figura 03: Metástase, o câncer se espalhando para outras partes do corpo.....	20
Figura 04: Estimativa das taxas de incidência mundial em 2018, em todo o mundo, para ambos os sexos, com idades entre 0-74 anos.....	21
Figura 05: Estimativas de morte e incidência para o Estados Unidos em 2018.....	22
Figura 06: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes.....	23
Figura 07: Estágios do câncer de próstata.....	25
Figura 08: Incidência de câncer de próstata no Brasil para 2018.....	26
Figura 09: Estrutura tridimensional da lactoferrina bovina.....	28
Figura 10: Estrutura tridimensional da lactoferrina.....	29
Figura 11: As principais funções da lactoferrina.....	30
Figura 12: Influência da apo-bLf sobre a morfologia da célula DU-145 em 24 horas...43	43
Figura 13: Influência da apo-bLf sobre a morfologia da célula DU-145 em 48 horas...44	44
Figura 14: Influência da holo-bLf sobre a morfologia da célula DU-145 em 24 horas...45	45
Figura 15: Influência da holo-bLf sobre a morfologia da célula DU-145 em 48 horas...46	46
Figura 16: Microscopia Confocal de Fluorescência por Escaneamento com Laser das células DU-145 incubadas com apo- e holo-bLf - FITC.....	48
Figura 17: Viabilidade celular por MTT em células DU-145 com concentrações de 0,5 até 40 mg/ml de apo-bLf.....	50
Figura 18: Viabilidade celular por MTT em células DU-145 com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo-bLf.....	51
Figura 19: Viabilidade celular por MTT em células DU-145 com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de holo-bLf.....	52
Figura 20: Viabilidade celular por contagem em células DU-145 com apo-bLf.....	54

Figura 21: Viabilidade celular por contagem em células DU-145 com holo-bLf.....	55
Figura 22: Ciclo celular em células DU-145 em 24 horas.....	58
Figura 23: Ciclo celular em células DU-145 em 48 horas.....	59
Figura 24: Quantificação do ciclo celular em células DU-145 em 24 horas.....	60
Figura 25: Quantificação do ciclo celular em células DU-145 em 48 horas.....	61
Figura 26: Ensaio de apoptose em células DU-145 com 24 horas de tratamento.....	62
Figura 27: Ensaio de apoptose em células DU-145 com 48 horas de tratamento.....	63
Figura 28: Quantificação de apoptose em células DU-145.....	64
Figura 29: Análise de ROS com Mitotrack em células DU-145.....	66
Figura 30: Análise de ROS com DHE em células DU-145.....	67
Figura 31: Análise de morte celular com Ethidium em células DU-145.....	69
Figura 32: análise de apoptose com caspases 3/7 em células DU-145.....	70
Figura 33: Imagens de morte celular em células DU-145 em 24 horas.....	71
Figura 34: Imagens de morte celular em células DU-145 em 48 horas.....	72
Figura 35: Imagens de estresse oxidativo em células DU-145 em 24 horas com apo-bLf.....	73
Figura 36: Imagens de estresse oxidativo em células DU-145 em 24 horas com apo-bLf.....	74
Figura 37: Imagens de estresse oxidativo em células DU-145 em 48 horas com apo-bLf.....	75
Figura 38: Imagens de estresse oxidativo em células DU-145 em 48 horas com holo-bLf.....	76
Figura 39: Influência da apo-bLf sobre a morfologia da célula PC-3 em 24 horas.....	79
Figura 40: Influência da apo-bLf sobre a morfologia da célula PC-3 em 48 horas.....	80
Figura 41: Influência da apo-bLf sobre a morfologia da célula PC-3.....	81

Figura 42: Viabilidade celular por MTT da célula PC-3 com concentrações de 1 até 40 mg/ml de apo-bLf.....	83
Figura 43: Viabilidade celular por MTT da célula PC-3.....	84
Figura 44: Viabilidade celular por contagem na célula PC-3.....	85
Figura 45: Proliferação celular da célula PC-3.....	86
Figura 46: Ciclo celular em células da linhagem PC-3.....	87
Figura 47: Ensaio de apoptose em células PC-3.....	88
Figura 48: Quantificação de apoptose em células PC-3.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Proteínas presentes no soro do leite.....	27
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C – Antes de Cristo

Abs - Absorbância

Apo-bLf – Apolactoferrina bovina

bLf - Lactoferrina bovina

CFSE - Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester

DHE - Dihydroethidium (Hydroethidine)

DMEM – Meio Dubellco modificado

FITC - Isoticianato de fluoresceína

GaGs - Glicosaminoglicanos

H₂O₂ – Peroxido de hidrogênio

Holo-bLf – Hololactoferrina bovina

HPA - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

KDa – KiloDalton

KH₂PO₄ – Fosfato Monopotássico

Lf – Lactoferrina

MTT - [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]

Na₂HPO₄ – Fosfato Dissódico

NaCl – Cloreto de Sódio

PBS - Tampão fosfato-salino

PE/ES – Penicilina/Estreptomicina

PSA - Antígeno Prostático Específico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RESUMO

O câncer de próstata é o segundo tipo mais frequente de câncer e a quarta maior causa de morte por câncer no mundo. Os processos celulares e moleculares subjacentes à patogênese, desenvolvimento e controle do câncer de próstata são pouco compreendidos. A lactoferrina bovina (bLf) é uma glicoproteína de 80 kDa da família da transferrinas, encontrada nos fluidos corporais. É uma proteína de ligadora de ferro, multifuncional, e que tem sido amplamente associada a efeitos imunológicos e atividade anticancerígena, além de outras funções. O objetivo do estudo foi de avaliar a influência da bLf em linhagens tumorigênicas de células da próstata humanas. Para isso, foram utilizadas as linhagens de câncer de próstata PC-3 e DU-145. As possíveis alterações morfológicas foram analisadas no microscópio óptico com a bLf em 24 e 48 horas. Os ensaios de MTT e contagem por azul de tripan foram utilizados para analisar a citotoxicidade da apo-bLf e da holo-bLf em concentrações de 0,5 a 40 mg/ml em 24 e 48 horas de tratamento. Utilizando a técnica de Citometria de fluxo foram feitos ensaios de proliferação, ciclo celular e apoptose para acompanhar a cinética do crescimento celular e neoplásico com e sem o tratamento com a bLf. A microscopia confocal com a FITC-bLf foi usada para observar internalização e dano celular em 24h de tratamento. Para uma avaliação geral e específica da morte celular e do aumento do estresse oxidativo (espécies reativas de oxigênio – ROS), as células foram fotografadas ao vivo usando o sistema de alta produtividade Operetta. A marcação fluorescente foi analisada com o software Harmony High-Content Analysis. Os resultados de morfologia celular e da viabilidade mostram que a bLf induziu morte celular de forma dose e tempo-dependente com o tratamento em células DU-145 e PC-3 em comparação ao controle. Foi possível observar que a FITC-bLf internaliza em células DU-145. A apo-bLf inibiu a proliferação celular, alterou o ciclo celular e aumentou a morte celular por necrose e apoptose na célula PC-3. Na linhagem DU-145, tanto a forma apo-bLf como a forma holo-bLf induziram um arresto no ciclo celular na fase G₀/G₁. Também aumentou o nível de caspases 3/7 ativadas e os níveis de estresse oxidativo. Nossos dados confirmam que o bLf, na sua forma apo- e holo-, induz a morte celular de maneira dependente do tempo e da dose nas linhagens PC-3 e DU-145. Parece ser um potente inibidor do crescimento celular e arresto no ciclo celular, através de indução de morte celular programada por apoptose. Sugerindo assim, a bLf tendo uma importante ação antitumoral nas linhagens celulares de câncer de próstata humano.

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most frequent type of cancer and the largest fourth cause of death by cancer worldwide. The cellular and molecular processes underlying the pathogenesis, development and controlling of prostate cancer are poorly understood. Bovine lactoferrin (bLf) is an 80 kDa glycoprotein from transferrin family, found in body fluids. It's an iron binding protein. It's a multifunctional protein that has been widely associated with immunologic effects and anticancer activity, besides other functions. The aim to evaluate the influence of bLf on tumorigenic human prostate cell lines. For this, the prostate cancer cell lines PC-3 and DU-145 were used. The possible morphological changes were analyzed in the optical microscope with bLf in 24 and 48 hours. MTT assays and trypan blue counts were used to analyze apo-bLf and holo-bLf cytotoxicity at concentrations of 0.5 to 40 mg/ml at 24 and 48 hours of treatment. Using flow cytometry, proliferation, cell cycle and apoptosis assays were performed to monitor cell and neoplastic growth kinetics with and without bLf treatment,. Confocal microscopy with FITC-bLf was used to observe internalization and cellular damage within 24 hours of treatment. For a general and specific evaluation of cell death and reactive oxygen species evaluation, cells were live-imaged using the high-throughput system Operetta. Fluorescent labeling was analyzed with Harmony High-Content Analysis software. The results of cell morphology and viability demonstrated that bLf induced cell death in a dose and time-dependent manner in DU-145 and PC-3 cells compared to control. It was possible to observe that FITC-bLf internalizes in DU-145 cells. Apo-bLf inhibited cell proliferation, altered cell cycle and increased cell death by necrosis and apoptosis in the PC-3 cell. In the DU-145 both apo-bLf form and the holo-bLf form induced cell cycle arrest in the G_0/G_1 phase. It also increased the level of activated caspases 3/7 and oxidative stress levels. Our data confirm that bLf, in its apo- and holo- form, induces cell death in a time and dose-dependent manner in PC-3 and DU-145 lines. It appears to be a potent inhibitor of cell growth and arrest in the cell cycle through induction of apoptosis-programmed cell death. Suggesting that bLf has an important antitumor action on human prostate cancer cell lines.

1. Introdução

1.1. Câncer

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, após doenças cardiovasculares. Aproximadamente um terço das pessoas nos Estados Unidos desenvolverão algum tipo de câncer ao longo de suas vidas. Atualmente no mundo muitos homens e mulheres estão precisando lidar com essa doença (Sudhakar, 2009). Devido ao crescimento e envelhecimento da população a incidência dessa doença vem aumentando, principalmente em países menos desenvolvidos. Alguns comportamentos e estilo de vida podem aumentar o risco de câncer como o tabagismo, dieta inadequada e inatividade física (Torre *et al*, 2015).

Essa doença afeta a humanidade a muitos anos e, relatos mais antigos tratam de tumores ósseos fossilizados em múmias do antigo Egito. Documentos que datam de 1500 a.C., são os registros mais antigos já encontrados e descrevem casos de câncer de mama, onde os tumores foram removidos de forma similar como é feito hoje. Além disso, esses registros, descrevem o câncer como uma doença que não tem cura, apenas tratamentos paliativos (Sudhakar, 2009).

No Egito antigo ainda não era utilizado o termo “câncer”. O termo foi criado em 460 a.C. na Grécia antiga por Hipócrates, conhecido como “Pai da Medicina”. Para descrever um tumor maligno ele utilizou a palavra grega ‘Karkinos’ (um gigantesco caranguejo mitológico) e, posteriormente o físico romano Celsus (28 – 50 a.C.) traduziu o termo para “*câncer*”, palavra em latim para caranguejo (Sudhakar, 2009; American Cancer Society, 2018).

Como definição, câncer é o conjunto de doenças que tem como característica em comum um aumento desordenado de células do corpo, que se multiplicam e invadem outros tecidos e órgãos de forma agressiva. Podem ser classificados como carcinomas, quando começam em tecidos epiteliais, e sarcomas se começam em tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem (INCA, 2018).

Em um organismo saudável as diversas células que compõe o corpo se dividem quando necessário. E, quando se tornam velhas ou sofrem algum tipo de dano entram em processo de morte natural. O balanço entre proliferação celular e morte está

alterado em células tumorais. Além disso, essas células se dividem de forma acelerada e incomum, e são mais difíceis de entrar em processo de morte mesmo que tenham sofrido algum dano (NIH, 2018).

Uma vez que as células tumorais não entram em processo de morte celular programada, as mesmas continuam em processo de divisão celular levando a hiperproliferação celular e conseqüentemente o desenvolvimento de um tumor. A maior parte dos cânceres são tumores sólidos, caracterizados como massas de tecidos e outros, como a leucemia, não formam tumores sólidos (Sudhakar, 2009).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer dos EUA (National Cancer Institute, NCI, 2015), células normais podem se tornar células de câncer passando por transformações no tecido. O primeiro estágio de classificação, para um câncer, que não se origina de células do sangue, é o câncer não invasivo (ou carcinoma *in situ*). Como mostra a **Figura 01**, nesse estágio as células de câncer se encontram somente na camada de tecido na qual elas se originaram. Os cânceres *in situ* podem progredir para a fase de câncer invasivo, porém antes disso são curáveis, em sua grande maioria (INCA, 2018).

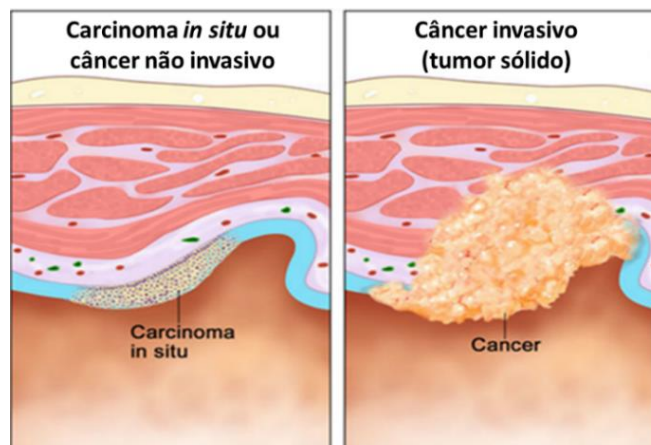


Figura 01: Classificação de câncer com exemplificação de um tumor sólido.

Esquema que ilustra como é um tumor sólido em um tecido. Comparando o câncer *in situ* invasivo de um não invasivo (Extraído e modificado de Terese Winslow LLC, acessado em 09 de janeiro de 2019).

Algumas transformações no tecido não são consideradas tumores, como a hiperplasia e a displasia. Porém, em alguns casos devem ser observadas ou tratadas para que não evoluam para um câncer invasivo (**Figura 02**). A hiperplasia ocorre

quando as células de um tecido proliferam de forma acelerada e anormal, mas não mudam suas características nem sua organização tecidual, além disso não invadem outros tecidos.

Já a displasia ocorre quando essas células não só se multiplicam, mas também mudam suas características e organização tecidual. Ainda assim, elas não invadem outros tecidos. A displasia necessita de um acompanhamento maior, já que é uma condição que pode rapidamente evoluir para um câncer. Quanto mais alterações celulares e disposição tecidual, maiores são as chances de evolução (National Cancer Institute, 2015).

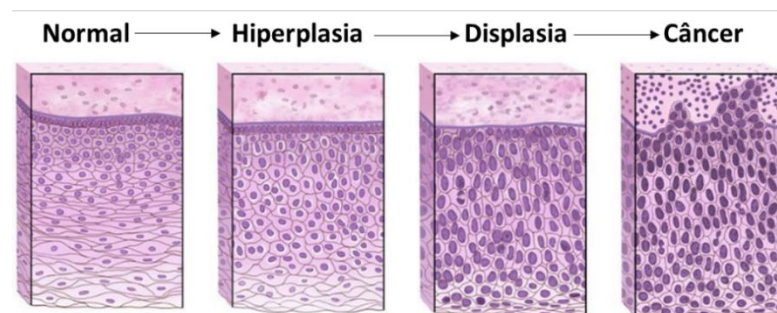


Figura 02: Transformação de células normais em um câncer.

Esquema que mostra as diferenças visuais de células normais, para células em hiperplasia, displasia e num câncer. Mostrando que pode ocorrer, ou não, essas transformações num tecido (Extraído e modificado de Terese Winslow LLC, acessado em 09 de janeiro de 2019).

A migração de células cancerígenas para outros tecidos e órgãos é denominada como metástase. Ocorre através de vasos linfáticos e da circulação sanguínea. Por exemplo, um tumor se origina no estômago e suas células viajam até o cérebro onde se instalam e proliferam, formando outros tumores e alterando outras células. Ainda assim, esse tumor é classificado como um câncer de estômago que sofreu metástase para o cérebro (Sudhakar, 2009). A **Figura 03** mostra e exemplifica definição de metástase.

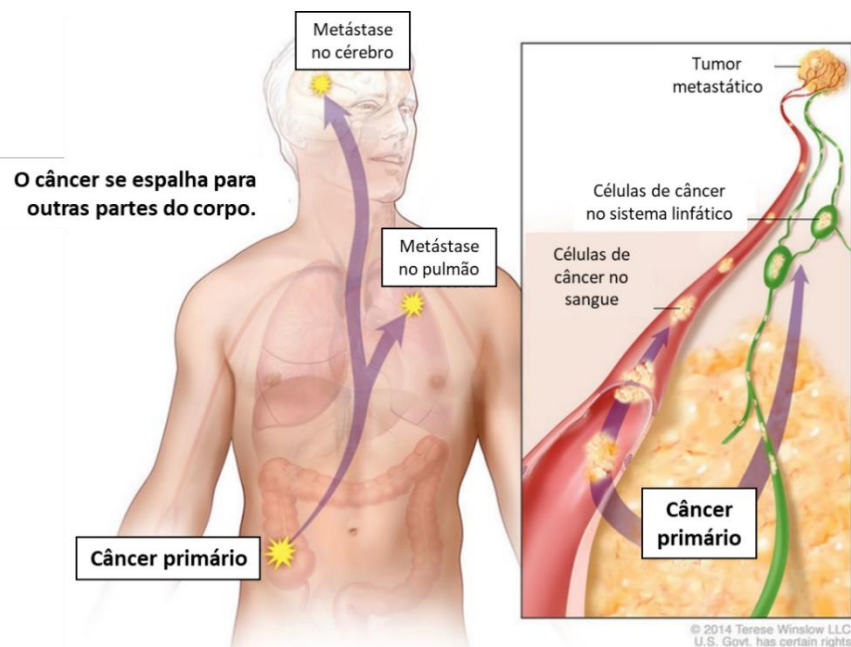


Figura 03: Metástase, o câncer se espalhando para outras partes do corpo.

Células de câncer migrando de seu local de origem através da corrente sanguínea e do sistema linfático para outras partes do corpo, o processo de metástase (Extraído e modificado de Terese Winslow LLC, acessado em 09 de janeiro de 2019).

O câncer é uma doença causada por mutações no DNA que afetam a forma que as células se comportam. Essas mutações podem surgir a partir de agentes externos, como a exposição à radiação solar, agentes químicos, tabagismo, entre outros. Podem também, surgir conforme o organismo envelhece e ocorrem erros celulares ou podem ser heranças genéticas (INCA, 2018).

Essas alterações genéticas são diferentes de uma pessoa para a outra, e mudam de acordo com o crescimento do tumor, ou seja, à medida que as células se proliferam. Isso prejudica muito o tratamento do câncer pois, um mesmo tipo de câncer tem células diferentes com alterações genéticas diferentes em seu microambiente (NCI, 2015).

Existem mais de 100 diferentes tipos de câncer e uma forma de classificá-los pode ser levando em consideração a localização primária do tumor, em órgãos ou tecidos. Podem também ser classificados de acordo com o tipo de célula, sendo células epiteliais ou escamosas. Surgem em qualquer parte do corpo, embora alguns órgãos sejam mais suscetíveis que outros (INCA, 2018).

A Organização Mundial de Saúde (2018) estima que ocorram cerca de 18 milhões de novos casos de câncer (incluindo câncer de pele não melanoma) no mundo por ano. A incidência de câncer de mama é a maior indicada para 2018, com cerca de 43 mil casos. E em segundo lugar, o câncer de próstata, com 22 mil casos (**Figura 04**).

As estatísticas de incidência para o mundo em 2018 mostram que o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres é o câncer de mama, sendo também o mais diagnosticado, seguido pelo câncer colorretal, de pulmão, do colo do útero, da tireoide, do corpo do útero, do estômago, do ovário, do fígado e linfoma não-Hodgkin. Enquanto nos homens o câncer de pulmão é o mais frequente e a principal causa de morte por câncer, seguido pelo câncer de próstata, colorretal, estômago, fígado, bexiga, esôfago, linfoma não-Hodgkin, leucemia e rim (GLOBOCAN, 2018).

As taxas estimadas de mortalidade mostram 9,6 milhões de mortes por câncer no mundo apenas em 2018. E quando analisados ambos os sexos juntos, o câncer de pulmão é a principal causa de morte, seguido pelo câncer de mama feminino, câncer de próstata e câncer colorretal (GLOBOCAN, 2018).

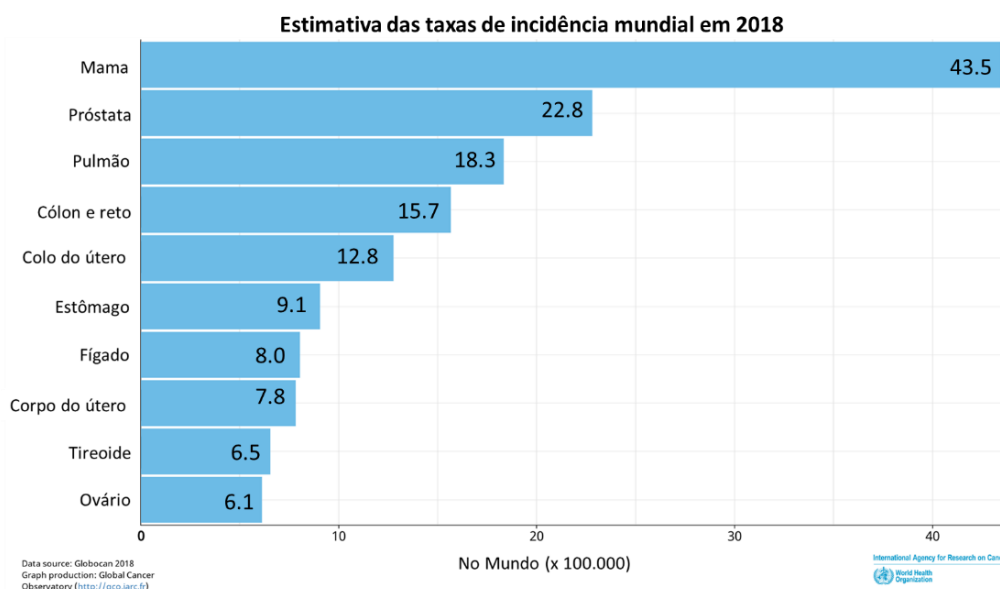


Figura 04: Estimativa das taxas de incidência mundial em 2018, em todo o mundo, para ambos os sexos, com idades entre 0-74 anos.

Estimativa das taxas de incidência de câncer mundial em 2018, em todo o mundo, para ambos os sexos e com idades entre 0-74 anos. Excluindo o câncer de pele não melanoma. (Extraído e modificado de Globocan 2018).

Nos Estados Unidos a mortalidade por câncer em 2018 foi estimada em 600 mil americanos. Isso significa quase 1700 mortes por dia. Os tipos de câncer mais frequentes são o câncer de pulmão, de próstata (para homens), de mama (para mulheres) e colorretal (**Figura 05**). Esses quatro tipos significam cerca de 45% de todas as mortes por câncer (Siegel, 2018).

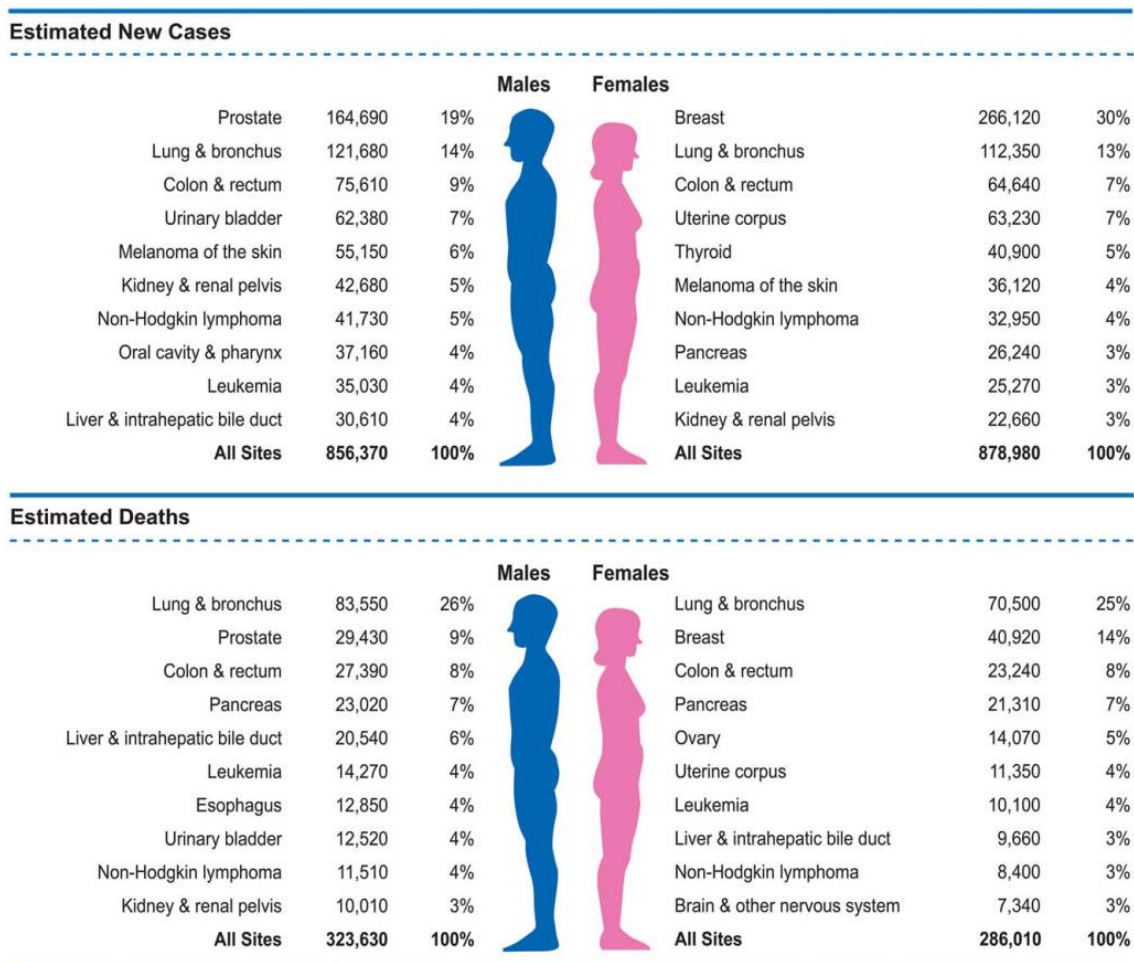


Figura 05: Estimativas de morte e incidência para o Estados Unidos em 2018.

Estimativa das taxas de incidência e morte por de câncer nos EUA em 2018, para ambos os sexos. (Extraído e modificado de Siegel, 2018).

No Brasil, estima-se que ocorram cerca de 68 mil novos casos de câncer de próstata e 60 mil de câncer de mama, esses serão os tipos mais frequentes (com exceção do câncer de pele não melanoma). Observando a **Figura 06** pode-se observar que os tipos de câncer mais incidentes em homens serão: próstata, pulmão,

intestino, estômago e cavidade oral. Nas mulheres, serão os cânceres de mama, intestino, colo do útero, pulmão e tireoide (INCA, 2018).

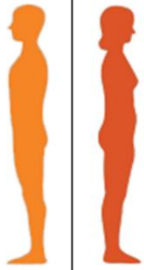
Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens		Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Figura 06: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes.

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, no Brasil, exceto o câncer de pele não melanoma. (Extraído e modificado de INCA, 2018).

Devido a sua alta incidência e mortalidade, os estudos para prevenção e tratamento do câncer são de suma importância e vem crescendo ao longo dos anos. O tipo de tratamento mais antigo seria a remoção cirúrgica do tumor (em caso de formação de um tumor sólido). Porém, sabe-se que apenas com a remoção cirúrgica, normalmente, há a reincidência do câncer.

Ao longo dos anos, foram desenvolvidos outros métodos para o tratamento do câncer como a quimioterapia (uso de fármacos), e a radioterapia, (uso de raios X). Na maior parte das vezes esses tratamentos são utilizados em conjunto com a remoção cirúrgica do tumor (Sudhakar, 2009).

O uso de drogas quimioterápicas resultou em um bom tratamento para alguns tipos de câncer. Todavia, são responsáveis por induzir diversos efeitos colaterais. Por isso, veem sendo desenvolvidos novas abordagens.

Dentre as novas abordagens, existe a supressão hormonal (em câncer de mama e de próstata), a combinação de fármacos, a terapia com anticorpos monoclonais e lipossomais, agentes quimioprotetores, hematopoética, transplante de células estaminais, agentes que superam a resistência a múltiplas drogas e biofármacos (Sudhakar, 2009; INCA, 2018).

1.2. Câncer de Próstata

A próstata é uma glândula masculina que está localizada abaixo da bexiga e na frente do reto. É um pequeno órgão com o formato que lembra uma maçã. Fica em volta da porção inicial da uretra. E é nessa glândula que é produzido parte do líquido seminal (INCA, 2018).

As condições fisiopatológicas mais comuns que ocorrem na glândula da próstata são a hiperplasia prostática benigna, que é o crescimento excessivo de células não-tumorais, e o câncer de próstata (Nunzio *et al.*, 2011). Essas patologias podem ser encontradas coexistindo, assim como com células que apresentam padrão de crescimento normal (Srougi & Simon, 1996).

O primeiro relato cirúrgico de câncer de próstata foi em 1817 por George Langstaff. Já o primeiro caso histologicamente confirmado foi descrito por John Adams no Hospital de Londres em 1853. Porém, existem estudos paleontológicos que mostram casos dessa doença na pré-história (Ghabili *et al.*, 2016).

Cerca de 75% dos casos de câncer de próstata no mundo atingem homens a partir dos 65 anos, por isso é considerada uma doença da terceira idade. No Brasil, vem sendo observado um aumento nas taxas de incidência, o que pode ser explicado pela evolução dos métodos de diagnósticos, e sistemas de informação. Além do aumento na expectativa de vida dos brasileiros (INCA, 2018).

Alguns fatores agravam o risco de aparecimento do câncer de próstata tais como idade, fatores genéticos, hábitos alimentares, estilo de vida, o excesso de gordura corporal e exposições a agentes tóxicos (aminas aromáticas, arsênio, derivados do petróleo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), fuligem e dioxinas estão associadas ao câncer de próstata) (INCA, 2018).

O desenvolvimento do câncer de próstata é classificado por estágios. No primeiro estágio os tumores são bem pequenos e não se encontram fora da glândula da próstata. Nesse estágio há grandes chances do tumor não evoluir. No segundo estágio os tumores são maiores, podem ser mais de um e apresentam um maior risco de evolução, porém ainda não se encontram fora da próstata. No terceiro estágio, o tumor tem um crescimento fora da glândula da próstata, mas não atinge a bexiga ou o reto, não atingindo, portanto, a corrente sanguínea e se espalhando para outras

partes do corpo. No quarto e último estágio, o tumor alcança os órgãos próximos acessando a corrente sanguínea e os vasos linfáticos, podendo chegar a qualquer parte do corpo, em metástase. A maioria dos tumores nesse estágio não tem cura (**Figura 07**) (American Cancer Society, 2018).

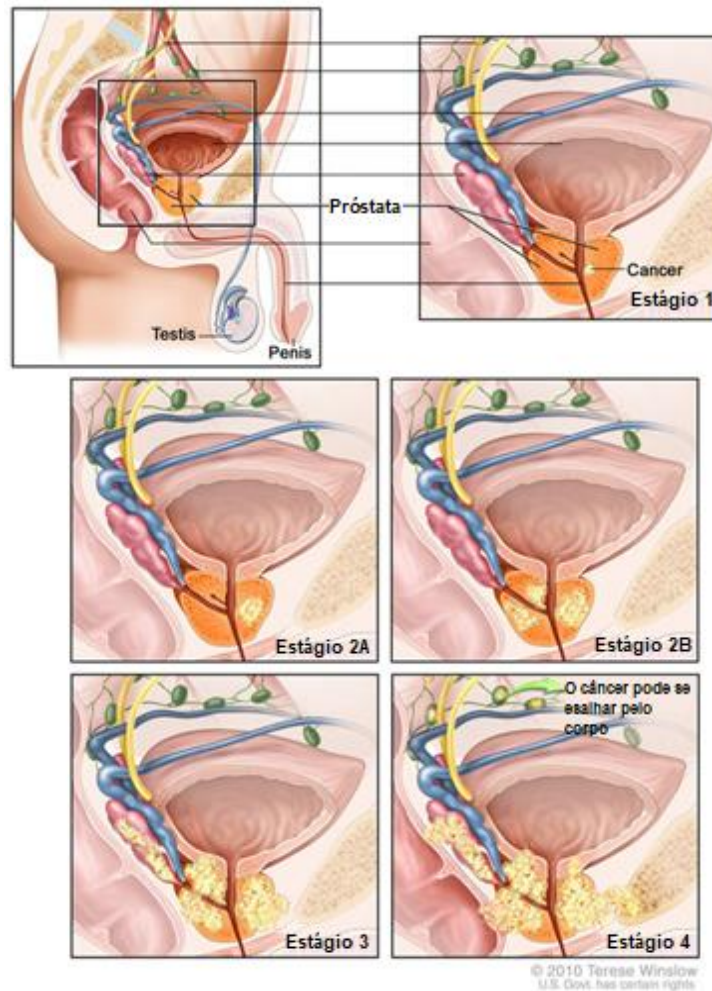


Figura 07: Estágios do câncer de próstata. (Winslow, 2010).

Evolução do câncer de próstata. Exemplificando cada estágio do desenvolvimento desse câncer. (Extraído e modificado de Terese Winslow LLC, acessado em 09 de janeiro de 2019).

Dentre os diversos tipos de câncer, o de próstata é a segunda maior causa de mortalidade por câncer em homens no mundo, e resultou em mais de 29.720 mortes apenas em 2013 (Siegel *et al.*, 2012). No Brasil, foi estimado para 2018 68 mil novos casos de câncer de próstata. Na distribuição geográfica a maior incidência será no sul e sudeste do país (**Figura 08**) (INCA, 2018).

Essa doença representa desafios significativos para o sistema de saúde em muitas partes do mundo. Contudo, os processos celulares e moleculares subjacentes

à patogênese e o desenvolvimento do câncer de próstata são pobremente compreendidos (Shen & Abate-Shen, 2010).

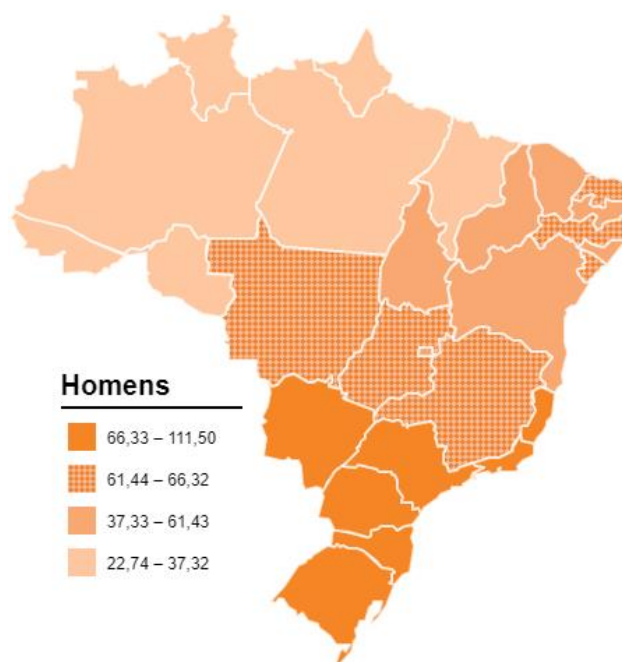


Figura 08: Incidência de câncer de próstata no Brasil para 2018.

Representação espacial das taxas de incidência de câncer de próstata no Brasil, por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2018. (Extraído e modificado de INCA, 2018).

Os sintomas mais comuns e iniciais dessa doença são alterações no padrão e frequência urinários, a presença de sangue na urina e a disfunção erétil. O diagnóstico inicial é feito com o exame do toque retal e a quantificação dos níveis do Antígeno Prostático Específico (PSA) (NICE, 2015).

O PSA é um importante marcador usado para detectar, monitorar e classificar o câncer de próstata. O aumento dos níveis de PSA é proporcional ao tamanho da próstata. Podendo detectar alterações como a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata. Já que o PSA é uma enzima órgão específica e não doença específica (Furini *et al*, 2016).

As linhagens celulares PC-3 e DU-145 são comumente utilizadas em estudos sobre essa doença. A PC-3 é uma linhagem de câncer de próstata que teve como origem uma metástase do osso de um adenocarcinoma da classe IV. A DU-145, teve como origem um adenocarcinoma com metástase no cérebro. Ambas as células foram

isoladas dos sítios metastáticos especificados. As duas linhagens são tumorigênicas (Stone et al, 1978 & Kaighn et al, 1979).

Diferente de outros tipos, no câncer de próstata, a quimioterapia não é o principal tratamento. É usada apenas quando a cirurgia e a terapia de supressão androgênica falharem. Porém, alguns estudos já mostram que a terapia de supressão androgênica está cada vez mais resultando no aparecimento de células tumorais altamente resistentes a hormônios. Isso limita o tratamento ao uso de drogas citotóxicas (Shankaranarayanan et al, 2016).

Por esse e outros motivos, é importante estudar e desenvolver novos biofármacos eficazes que possam causar morte celular específica (Shankaranarayanan et al, 2016).

1.3. Lactoferrina

A alimentação tem grande impacto para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas, assim como o câncer. Produtos lácteos, como a manteiga, queijo, o iogurte e o próprio leite, são componentes importantes na dieta humana. Particularmente no mundo ocidental, sendo o leite bovino o mais consumido (Tsuda et al, 2000).

O leite possui diversos tipos de proteínas em sua composição. A sua fração proteica é separada em dois grandes grupos: as caseínas e as proteínas do soro do leite (Lievore, 2013). A lactoferrina faz parte do segundo grupo, como mostra a **Tabela 01**.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Soro (%m/v)
Beta-lactoglobulina	18	0,29
Alfa-lactoalbumina	14	0,13
Caseína do soro	-	0,21
Imunoglobulinas	1000 - 1430	0,06
Albumina do soro bovino	66	0,06
Lactoferrina	80	0,02
Lactoperoxidase	78	0,04

Tabela 01: Proteínas presentes no soro do leite. (Modificado de LIEVORE, 2013)

O leite é a maior fonte de lactoferrina, variando de 5,0 a 6,7 mg/mL no colostro de leite humano e de 0,1 a 2,6 mg/mL no leite humano maduro (Queiroz *et al.*, 2013). No colostro do leite bovino, há apenas 0,83 mg/mL de lactoferrina enquanto no leite maduro cerca de 0,09 mg/mL (Lönnerdal & Iyer, 1995). A síntese de lactoferrina nas glândulas mamárias é controlada pelo hormônio prolactina (Green & Pastewka, 1978).

A Lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína globular. Faz parte da família das tranferrinas e é uma proteína ligadora de ferro, que está presente em diversas secreções exócrinas, como a lágrima, a saliva, o leite e o muco cervical (Wakabayashi *et al.*, 2006). Possui uma massa molecular de aproximadamente 80 kDa (Di Biase, 2003). Existe uma forma da Lf encontrada em bovinos, conhecida como bLf, que tem se mostrado um ótimo modelo para se estudar as atividades biológicas (Moore, 1997).

Em 1939, a lactoferrina bovina (bLf) foi fracionada como uma parte vermelha do leite de vaca (Soerensen & Soerensen, 1939). Em 1960, a chamada “proteína vermelha do leite” foi descrita como uma proteína pertencente à família das transferrinas (Tomita *et al.*, 2009). Desde então, crescentes estudos sobre a estrutura e função vêm sendo feitos, uma vez que a lactoferrina bovina desempenha um importante papel na saúde por ser uma proteína multifuncional (Baker & Baker, 2008) (**Figura 09**).

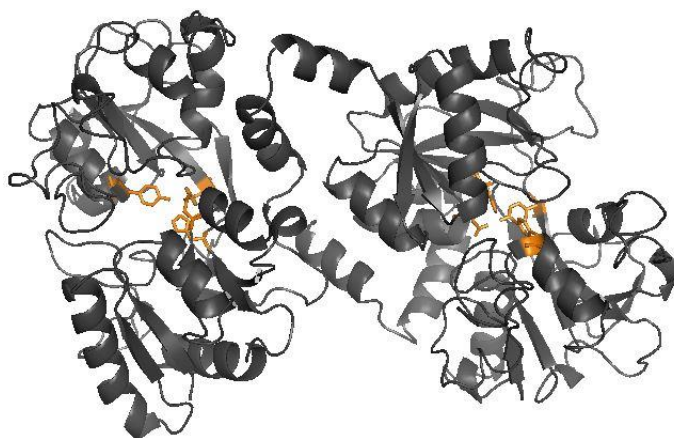


Figura 09: Estrutura tridimensional da lactoferrina bovina.

A lactoferrina possui dois lobos, N e C que são conectados por uma α -hélice. Os aminoácidos que participam da ligação de ferro nesta estrutura estão destacados em laranja (duas tirosinas, um aspartato e uma histidina). Essa estrutura foi criada utilizando o software PyMol, a partir de dados cristalográficos depositados no “Protein Data Bank” sob o código “1BLF” (MOORE *et al.*, 1997).

Essa proteína pode ser encontrada em dois estados conformacionais. O estado conformacional “apo-lactoferrina” (apo-Lf) representa a proteína que não está ligada a íons férricos e o estado conformacional “holo-lactoferrina” (holo-Lf), representa a proteína ligada a dois íons férricos (**Figura 10**).

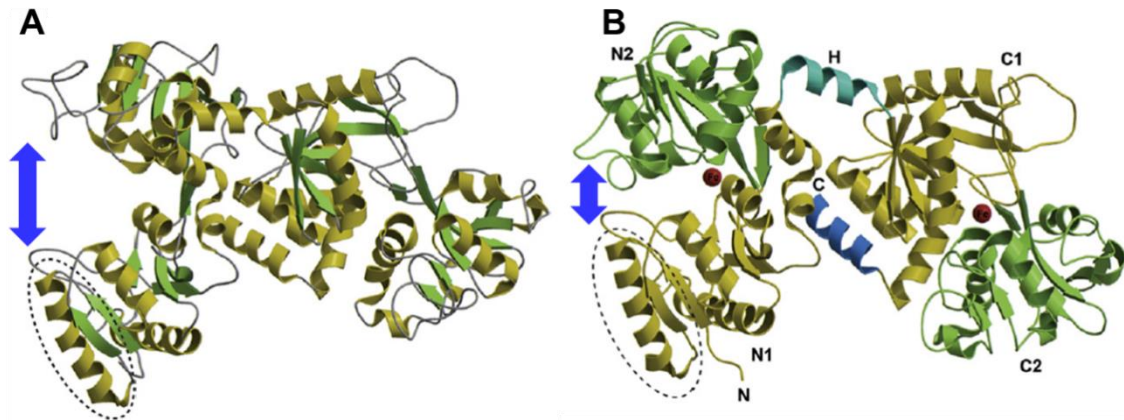


Figura 10: Estrutura tridimensional da lactoferrina

(A) Estrutura da apo-lactoferrina. (B) Estrutura da holo-lactoferrina com o íon ferro, representado pela esfera vermelha. As setas e azul indicam as diferenças de abertura entre os domínios nas duas formas da lactoferrina. A estrutura secundária alfa-hélice e folha- β estão representadas em amarelo e verde, respectivamente. (Extraído e modificado de BAKER & BAKER, 2008)

Muitos trabalhos discutem diversas funções biológicas atribuídas à lactoferrina bovina (**Figura 11**). Dentre elas: o transporte de ferro, a atividade imunomoduladora, anti-inflamatória, antitumoral, antiviral, estimulação do crescimento celular, antioxidante, entre outras (Gifford *et al.*, 2005; Wakabayashi *et al.*, 2006). Sendo assim, mais estudos envolvendo a lactoferrina são fundamentais para o entendimento das suas diversas funcionalidades.

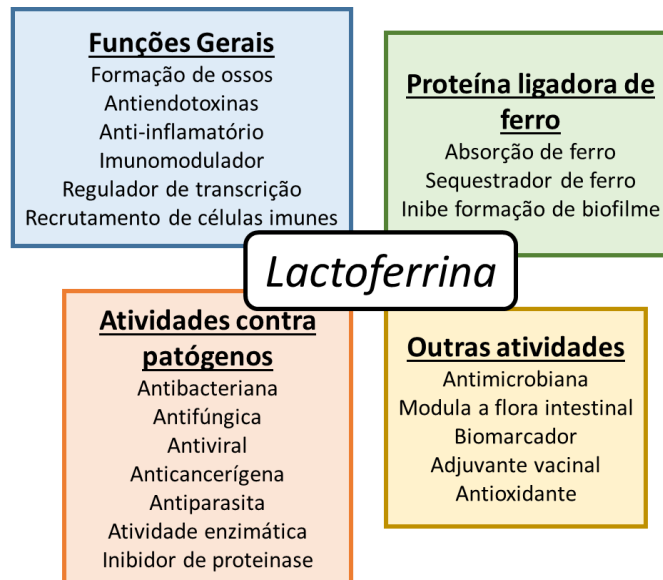


Figura 11: As principais funções da lactoferrina.

As principais funções biológicas da lactoferrina separadas por categorias, como atividades contra patógenos, proteína ligadora de ferro, funções gerais e outras (Modificado de Voguel et al., 2012).

Atualmente, grande atenção tem sido dada para estratégias que previnem o câncer. Compostos bioativos têm sido associados na modificação de processos carcinogênicos específicos (Ross & Davis, 2011).

Devido as suas funções biológicas, a lactoferrina bovina (bLf) tem sido amplamente associada ao reforço imunológico e propriedades anti-cancerígenas (Kanwar & Kanwar, 2013). Foi demonstrado que a bLf nativa (15-20% de ferro saturado) inibe o crescimento de células cancerígenas de cólon, pulmão, bexiga e mama e foi relatado induzir apoptose em células de câncer de cólon, pulmão, estômago e mama (Gibbons *et al*, 2015). Isso torna a lactoferrina bovina uma importante biomolécula para estudos contra o câncer.

Um trabalho sobre atividade antitumoral foi desenvolvido com um conjugando de lactoferrina bovina e doxorrubicina (fármaco já utilizado na quimioterapia do câncer) em linhagens de câncer de próstata. O conjugado se mostrou eficaz contra o desenvolvimento do câncer, aumentando a citotoxicidade e induzindo apoptose. Além de ter uma toxicidade menor em células normais quando comparado a doxorrubicina sozinha (Shankaranarayanan *et al*, 2016).

Outro importante trabalho mostra como a lactoferrina bovina inibe a proliferação, induz a apoptose, acidificação intracelular e perturba acidificação

lisossomal. Isso em linhagens de células de câncer de próstata altamente metastáticas. A linhagem PC-3 foi uma das utilizadas no estudo. Esse trabalho sugere que o mecanismo de ação da lactoferrina bovina seja na bomba de V-ATPase na membrana plasmática, dificultando sua atividade e diminuindo a acidez, e desta forma provavelmente limitará a progressão e metástase do tumor (Guedes *et al*, 2018). Claramente são necessários mais estudos com a atividade antitumoral da lactoferrina.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da lactoferrina bovina (bLf), nas suas formas apo e holo, em linhagens celulares e tumorigênicas da próstata humana.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar os efeitos da apo- e holo-bLf na viabilidade e proliferação celular em PC-3 e DU-145;
- Verificar modificações no ciclo celular em PC-3 e DU-145, pela ação da apo- e holo-bLf;
- Observar modificações no processo de morte celular em PC-3 e DU-145, pela ação da apo- e holo-bLf.

3. Metodologia

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. A água foi destilada e deionizada num sistema de purificação de água Millipore. A apo-lactoferrina bovina foi comprada na Life Extension (Flórida, USA). Para o preparo da holo-bLf, o ácido nitrilotriacético e nitrato férrico utilizados foram obtidos da Sigma Chemical Co.

3.2. Preparo de apo-lactoferrina bovina

A apo-lactoferrina bovina foi preparada a partir de cápsulas comercializadas pela empresa Life Extension (EUA). Cada cápsula contém 300 mg de bLf. Para a solubilização da proteína, foi colocado em um tubo cônico de 15 mL todo o conteúdo (pó) da cápsula e adicionado 3 mL de tampão PBS (140 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ e 1,8 mM KH₂PO₄ em pH 7,4) homogeneizando em um agitador. A cápsula continha celulose e, para separá-la da proteína, foram feitos quatro ciclos de centrifugação, de 10 minutos cada, a uma velocidade angular de 7000 rpm (12.052 x g) à 4 °C (centrífuga Eppendorf modelo 5430, rotor F-35-6-30). Em seguida a apo-bLf foi filtrada em uma membrana de nitrocelulose estéril com poro de 0,22 µm (Millipore, EUA) em uma cabine de biossegurança ESCO, alíquotada em microtubos de 500 µL e congelada a -20°C. Finalmente, a apo-bLf foi dosada em um espectrofotômetro por absorvância em comprimento de onda de 280 nm, utilizando um coeficiente de extinção molar de 1.27 (Shimazaki, 1998).

3.3. Preparo de holo-lactoferrina bovina

A holo-lactoferrina foi preparada a partir da apo-bLf com base em um protocolo desenvolvido por Bokkhim *et al* (2013). Partindo-se de uma concentração de 10 mg/mL, através da diluição do estoque de apo-bLf em tampão Tris 10 mM NaCl 75 mM e pH 7,2. Após a diluição, foi adicionada a ela uma solução FeNTA (9,9 mM de nitrato férrico e 8,5 mM de ácido nitrilotriacético, água deionizada) em uma proporção de 2:1. O pH foi ajustado para 7,0 utilizando solução a 1 M de bicarbonato de sódio.

Essa nova solução de apo-bLf foi incubada por uma hora a 4°C. Posteriormente, para retirar o ferro não ligado à proteína, a amostra foi dialisada contra um tampão com 25 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,5 a 4 °C por 48 horas. Foi utilizada uma membrana de diálise com “cutoff” de 10KDa e o tampão foi trocado a cada 5 horas. Em seguida, a holo-bLf foi filtrada em uma membrana de nitrocelulose estéril com poro de 0,22 µm (Millipore, EUA) em uma cabine de biossegurança ESCO, aliquotada em microtubos de 500 µL e congelada a -20°C. Finalmente a proteína foi então dosada em um espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 280 nm, com o coeficiente de extinção molar da holo-bLf de 1.51 (Groves, 1960). A presença de do íon ferro foi verificada a partir de leitura espectrofotométrica a 465 nm.

3.4. Cultura de células

As células utilizadas nesse trabalho foram as linhagens celulares de câncer de próstata humana, PC-3 e DU-145. Essas linhagens são derivadas de pacientes com câncer de próstata com metástase em osso e cérebro, respectivamente, sendo isoladas dos sítios metastáticos especificados. Ambas foram doadas pelo Grupo de Biomarcadores Neoplásicos do INCA. As células PC-3 e DU-145 foram crescidas em monocamadas utilizando frascos de cultura de 25 cm² (Greiner Bio-one) em meio DMEM alta glicose (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e tamponadas com 2g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), pH 7,4, sob atmosfera com 5% CO₂ a 37°C.

3.5. Análise da morfologia celular

A análise da morfologia celular foi feita através de imagens das células em cultura após 24 horas e 48 horas de tratamento com ambas as formas de bLf. As células foram colocadas em uma placa de 24 poços. Depois de chegarem a 90% de confluência, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com tampão PBS e incubadas com as concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo- e holo-bLf e 1, 10, 20 e 40 de apo-bLf. O período de tratamento foi de 24 horas e 48 horas. Após esse período as imagens foram obtidas, utilizando-se microscópio óptico EVOS (Thermo Fisher), seguindo a metodologia de três fotos por poço, sendo uma imagem do centro,

uma do quadrante superior direito e uma do quadrante inferior esquerdo (próximo do limite da placa). Foram feitos experimentos em triplicata. As imagens foram tratadas no “software” ImageJ e utilizadas para as comparações da morfologia celular.

3.6. Internalização da lactoferrina bovina

Para os ensaios de internalização celular de lactoferrina, realizamos a marcação da bLf com FITC - isotiocianato de fluoresceína - na razão molar de 1:10, durante uma hora a 4°C. Para a marcação, a lactoferrina foi colocada em tampão fosfato básico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,5%) NaH_2PO_4 (0,082%)) em pH 8. A lactoferrina utilizada se encontrava na sua forma apo e holo-bLf. Para a remoção de todo FITC livre, foram feitas sucessivas centrifugações contendo PBS (cerca de 5 vezes) em uma unidade filtrante Vivaspin (GE Health Care, EUA) com peso molecular de corte em 30 kDa. As proteínas foram ressuspensas em tampão PBS, verificando se o volume final era o mesmo que o inicial para não ocorrer mudanças de concentração das proteínas. As proteínas marcadas foram utilizadas no mesmo dia para o experimento. As células foram plaqueadas em uma placa comercial “CELLview™ Slide” (Greiner bio-one). Após confluência, as células foram lavadas com 100 µl de PBS e colocou-se as concentrações de 8 mg/mL e 16 mg/mL dos conjugados apo-bLf-FITC e holo-bLf-FITC, diluídas em DMEM, durante 24 horas. As células no controle não foram incubadas com FITC-bLf. Depois desse período as moléculas de lactoferrina não ligadas foram lavadas com PBS e as células fixadas com formaldeído a 3,7% em PBS, por 15 minutos, a 4°C. O estudo da localização da lactoferrina ocorreu mediante análise microscópica. A técnica de microscopia utilizada foi a microscopia confocal por escaneamento com laser e análise de fluorescência (LSCFM – Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscopy), o laser utilizado foi o laser de íons de argônio, com faixa de emissão selecionada em 488 nm e a emissão foi coletada utilizando filtro bandpass de 500 nm a 550 nm. As fatias ópticas analisadas possuíam espessura menor que 1 µm e utilizando uma objetiva plana-apocromática de imersão em óleo, com aumento de 63 vezes (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e sendo então observadas em microscópio de fluorescência Axio Observer.Z1 e lente objetiva Plan-Apochromat 40x/1.0 Oil Iris (Zeiss Inc.) e analisadas em microscópio de fluorescência LSM 510 Meta Confocal Microscope (Zeiss Inc, Oberkochen).

3.7. Ensaio de viabilidade celular

Conforme descrito por Mosmann (1983), a viabilidade celular foi determinada pelo teste colorimétrico MTT (Amresco, USA). Ao adicionar o composto MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] em uma cultura, as desidrogenases presentes em células metabolicamente viáveis clivam o anel de tetrazólio, transformando um composto inicialmente amarelo (MTT) em um composto azul escuro, o formazan [E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan] que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Portanto a quantificação da redução de MTT em formazan caracteriza uma detecção da atividade metabólica que está diretamente ligada a viabilidade celular (ATCC® 30-1010K). Para essa análise, placas de 96 poços foram preparadas utilizando $1,0 \times 10^4$ células/poço, mantidas com 100 μ L de meio DMEM alta glicose, suplementado com 10% de soro e 1% de Penicilina e Estreptomicina. As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por aproximadamente 24 horas. Após isto, as células foram lavadas com tampão PBS e 100 μ L de solução apo- e holo- bLf foram adicionadas nos poços. Em concentrações de apo-bLf e holo-bLf de 2, 4, 8 e 16 mg/mL e apo-bLf em concentrações de 1, 10, 20 e 40mg/ml (diluídas em meio de cultura). Como controle negativo foi utilizado meio DMEM, e, como controle positivo, foi utilizado Triton X-100 a 0,1%, ambos colocados no mesmo dia do tratamento com a bLf. Após 24 horas e 48 horas de incubação na estufa, a bLf foi retirada dos poços que foram lavados com PBS e então foi adicionado uma solução de 200 μ L MTT (Sigma) em concentração de 5 g/L diluído em PBS. A placa foi então incubada por 3 horas a 37°C. Após esse período, o MTT foi retirado gentilmente dos poços, evitando a suspensão dos cristais de formazan. Após isto, foi adicionado 200 μ L/poço de álcool isopropílico. O álcool isopropílico, usado para solubilizar os cristais formados, foi homogeneizado e 100 μ L desta solução resultante foi colocado em uma nova placa de 96 poços. Por fim, a placa foi analisada em um espectrofotômetro utilizando a absorbância a 570 nm e 650 nm. Os poços com o controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade celular. Este experimento foi repetido em triplicata com preparações independentes. A viabilidade celular foi calculada conforme a seguinte equação:

$$\% = \frac{(\text{abs } 570 \text{ nm}) - (\text{abs } 650 \text{ nm}) \text{ com bLf}}{(\text{abs } 570 \text{ nm}) - (\text{abs } 650 \text{ nm}) \text{ sem bLf}} \times 100$$

3.8. Ensaio de contagem de células por azul de Tripán

Esse ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar, através de contagem diferencial de células viáveis e mortas por coloração de Tripán, a viabilidade celular após o tratamento com a bLf em períodos de 24 e 48 horas. O experimento se baseia na permeabilidade seletiva das células que estão viáveis e não são coradas pelo azul de Tripán, já que as células que estão mortas sofrem alterações na membrana afetando a permeabilidade seletiva e permitindo a entrada do corante nas células, deixando-as com uma cor azul (Khosravi-Far, & Zakeri, 2008). Os ensaios foram realizados colocando as células em placas de 24 poços, mantidas com 500 µL de meio DMEM alta glicose com 10% de SFB e 1% de PE/ES por poço. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por aproximadamente 24 horas, para chegar a 90% de confluência. Em seguida, o meio foi removido e as células foram lavadas com 500mL de tampão PBS. No controle foi colocado o meio de cultura e nos outros poços as concentrações de apo-bLf e holo-bLf 2, 4, 8 e 16mg/ml, preparadas com o meio de cultura. Após o tratamento as células foram ressuspensas em 200 µL de meio DMEM alta glicose e 10 µL dessa suspensão foram retirados e misturados com 10 µL de solução 1% de Azul de Tripán em PBS (Gibco). Da última suspensão, 10 µL foram retirados e colocados na câmara de Neubauer, para a contagem de células. Foram contadas as células nos quatro quadrantes externos da câmara, distinguindo células vivas de mortas através da coloração. Por fim, foi calculada a concentração de células e feito um gráfico da porcentagem. Como o volume de cada quadrante da câmara é de 10⁻⁴ mL, multiplica-se o valor obtido por 10⁴, e por serem quatro quadrantes contados, divide-se o valor obtido por quatro. Além disso, as células foram diluídas duas vezes, então se multiplica o valor por dois. Dessa forma, obtemos a seguinte fórmula para o cálculo da concentração de células por mililitro:

$$C = \left(\frac{N}{4}\right) \times 2 \times 10^4$$

onde C é a concentração de células por mililitro e N é o número de células contadas nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer.

3.9. Ensaio de proliferação celular

Para o ensaio de proliferação celular foi utilizado o corante CFSE, Carboxyfluorescein succinimidyl ester, (Thermo Fisher). As células foram colocadas em uma placa de 6 poços e, após 24 horas, as células estavam com 90% de confluência. As células foram lavadas com 1 mL de PBS e incubadas por 20 minutos a 37°C com 400 ul por poço de uma solução de CFSE, preparada com PBS, a 5 µM. Decorridos os 20 minutos de incubação, a solução foi retirada, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e foi adicionado meio de cultura no controle negativo, e as concentrações de bLf nos tratamentos. As concentrações foram de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo-bLf e holo-bLf. As células ficaram incubadas com a bLf durante 24 e 48 horas. Após o período de tratamento, as células lavadas com 1 mL de PBS. Foi adicionado 400ul de tripsina, e a placa foi colocada na estufa a 37°C até soltarem, homogeneizadas com 400ul de meio DMEM alta glicose. Após a ressuspensão, as células foram contadas, como descrito anteriormente. Após a contagem, coletou-se 1×10^5 células e levadas para o citômetro. Foram analisados 20.000 eventos no canal do fluorocromo Alexa Fluor™ 488 (Filtro bandpass 530/30) no citômetro de fluxo FacsAria (BD Biosciences). Os dados foram adquiridos no software FACSDIVA e analisados pelo software Flow Jo (FlowJo, LLC).

3.10. Ensaio de ciclo celular

A análise de ciclo celular foi realizada utilizando ensaio com iodeto de propídio com a solução de Vindelov (Vindelov, 1977). As células foram plaqueadas em uma placa de 6 poços, e após 90% de confluência, aproximadamente 24 horas depois, as placas foram tratadas com 1,5 mL de apo-bLf e holo-bLf nas concentrações de 2, 4, 8, 16 mg/ml e de apo-bLf 1, 10, 20 e 40 mg/ml, no controle negativo foi colocado apenas meio de cultura. Após o tempo de tratamento, 24 horas e 48 horas, o meio foi removido e as células foram lavadas com 1mL de PBS. Foi adicionado 400ul de tripsina, e a placa foi colocada na estufa a 37°C até soltarem, homogeneizadas com 400ul de meio DMEM alta glicose e centrifugadas a 140 g por 5 minutos. Coletou-se então 1×10^5 células e colocadas em microtubos de 1,5mL. Nesses tubos foi adicionado de solução fria de Vindelov (Vindelov, 1977), contendo 0.1% Triton X-100, 0.1% RNase e 50 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma). Após incubação por 15

minutos protegidos da luz, a suspensão celular foi levada para o citômetro FACS Aria (BD Biosciences). Foram então analisados cerca de 20000 eventos no citômetro de fluxo no canal do fluorocromo PI (Filtro bandpass 616/23). Os dados foram analisados pelo software Flow Jo.

3.11. Ensaio de apoptose

O ensaio de apoptose foi realizado utilizando-se marcação com anexina V e iodeto de propídeo. A anexina-V liga-se a fosfatidilserina, um fosfolípido da camada interna da membrana celular que passa a ser exposto na camada extracelular da célula em apoptose. Já o iodeto de propídeo é um intercalante de DNA impermeável à membrana plasmática de células viáveis, portanto, apenas células em necrose permitem a entrada desse composto. Para sua indicação, utilizamos a anexina V humana conjugada à Alexa Fluor 488. Dessa forma, o complexo anexina V-Alexa Fluor 488 possui uma intensa fluorescência verde (ex/em \approx 488 nm/ \approx 540 nm). Assim, como os ensaios são realizados utilizando-se células viáveis não permeabilizadas, a marcação obtida é resultado do processo de externalização de fosfatidilserina. Excluímos a hipótese de estar ocorrendo ruptura de membrana com consequente exposição de PS da face interna à anexina V-FITC, através de ensaios com 10 μ g/mL de iodeto de propídeo (PI), presente no KIT, que é um marcador nuclear impermeável à membrana plasmática. As células foram, então, colocadas em placas de 6 poços contendo 1×10^5 células em 1,5 mL de meio, a 37°C e em uma atmosfera com 5% de CO₂. Realizamos as análises em dois tempos 24 horas e 48 horas. Nas concentrações de apo- e holo-bLf de 2, 4, 8 e 16 mg/ml e apo-bLf com 1 a 40 mg/ml. Após o período de tratamento, as amostras foram coletadas, ressuspensando todo o conteúdo dos poços e transferindo para um tubo de microcentrífuga. Após isso, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, foram centrifugadas a 140 g por 5 min, descartando o sobrenadante, e adicionando 100 μ L de PBS. Após o processo de lavagem, as células foram ressuspensadas em 50 μ L de annexin-binding buffer 1x, adicionando 1 μ L de Alexa Fluor® 488 annexin V contida no KIT e 0,25 μ L de solução de PI a 100 μ g/mL. As células foram, então, incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após o período de incubação, as células foram mantidas em gelo até a análise. Foram analisados 20.000 eventos no canal do fluorocromo

Alexa Fluor™ 488 (Filtro bandpass 530/30) e o PerCP (Filtro bandpass 675/20) no citômetro de fluxo FacsAria (BD Biosciences). Os dados foram adquiridos no software FACSDIVA e analisados pelo software Flow Jo (FlowJo, LLC).

3.12. O ensaio com sondas para avaliação de estresse oxidativo e ativação de apoptose no Operetta High-Content Imaging System

O ensaio com sondas para avaliação de estresse oxidativo e ativação de apoptose no Operetta High-Content Imaging System foi realizado com duas soluções diferentes de sondas. A primeira solução continha o reagente Dihydroethidium (Hydroethidine) (#D1168), o MitoTracker Green FM (MTG) (#M7514), e Hoechst 33342 (#H1399), com concentração final de 5 μ M, 0,15 μ M e 1 μ M, respectivamente. A segunda solução continha o reagente Ethidium homodimer (EthD-1) (#E1169), CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent (#C10423) e Hoechst 33342 (#H1399), com concentração final de 2 μ M, 2 μ M e 1 μ M. As células foram colocadas em duas placas (uma para cada solução de sonda) de 96 poços (placa #655090). Cada poço ficou com 2000 a 2500 células. Após 24 horas de crescimento celular, as placas foram tratadas com 100 μ l de apo-bLf e holo-bLf nas concentrações de 2, 4, 8, 16 mg/ml por um período de 24 horas e 48 horas. 60 minutos antes do término do período de incubação dos tratamentos, foi adicionado 5 μ L de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 4 mM, em cada poço do controle positivo, que continha 100 μ L de meio, dessa forma a concentração final de H₂O₂ ficou em 200 μ M. As células de controle positivo foram incubadas com solução de peróxido de hidrogênio por 30 min a 37 °C e 5% CO₂. Após esse período, retirou-se o meio com os compostos e foram adicionados 50 μ L das soluções de sondas, sendo cada solução em cada placa específica, diluídos com DMEM/F-12 sem vermelho de fenol. Após isso, as placas foram incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ por 30 min. posteriormente, as placas foram colocadas no equipamento e as imagens foram adquiridas no Operetta High-Content Imaging System (Perkin Elmer) com à temperatura 37 °C e 5 % CO₂. As imagens obtidas foram analisadas no software Columbus Image Data Storage and Analysis System (Perkin Elmer).

3.13. Análises Estatísticas

Os dados dos experimentos estão representados graficamente com média \pm desvio padrão da média e os valores de $p < 0,05$ são considerados significativos. Os dados seguem distribuição normal e o teste utilizado foi o teste *t-student* para dados pareados. As análises foram feitas no software GraphPrism versão 5.03.

4. Resultados e Discussão

4.1. Linhagem Celular DU-145

4.1.1. A influência da Lactoferrina bovina sobre a morfologia celular

A primeira abordagem experimental desta dissertação foi examinar a morfologia celular com o objetivo de verificar o efeito da lactoferrina bovina (bLf) nas linhagens celulares utilizadas. Para tanto, a linhagem celular DU-145 foi incubada com a lactoferrina bovina e imagens foram adquiridas utilizando aumento de 10 e 20x. Para estimar a visualização da cultura como um todo e para analisar as diferenças célula a célula.

O experimento foi realizado incubando a célula DU-145 com a apo e holo-bLf por 24 horas e 48 horas. Sendo assim, foi possível observar diferenças significativas entre as células do controle e as incubadas com bLf (**Figuras 12 e 13**). É possível perceber claramente que o tratamento com a apo-bLf alterou o formato das células. A partir da concentração de 4 mg/ml em 24 horas e a partir de 2 mg/ml em 48 horas, as células passaram a apresentar uma morfologia mais alongada. Além disso, é possível perceber um aumento da quantidade de grânulos intracelulares, o que pode ser verificado principalmente na concentração de 16 mg/ml no tempo de 24 horas e com 8 mg/ml no tempo de 48 horas. Outro ponto observado no aumento de 10x, aparentemente a quantidade de células está menor do que o controle, principalmente em 48 horas.

As **Figuras 14 e 15** que mostram o tratamento com a holo-bLf. De maneira similar ao que foi observado para a apo-bLf, alterações morfológicas também foram observadas nas células DU-145 incubadas com a holo-bLf. Importante ressaltar que essas alterações morfológicas foram mais pronunciadas e iniciaram em concentrações menores de holo-bLf. Além disso, foi observado uma maior quantidade de grânulos quando comparados com a apo-bLf.

O conjunto destes resultados demonstram que a bLf afeta a morfologia celular da linhagem DU-145 em comparação com o controle. Muito embora tanto a apo- quanto a holo-bLf causem efeitos morfológicos similares, dose e tempo-dependentes, o tratamento com holo-bLf mostrou ser mais drástico quando comparado a apo-bLf.

DU-145 24 horas

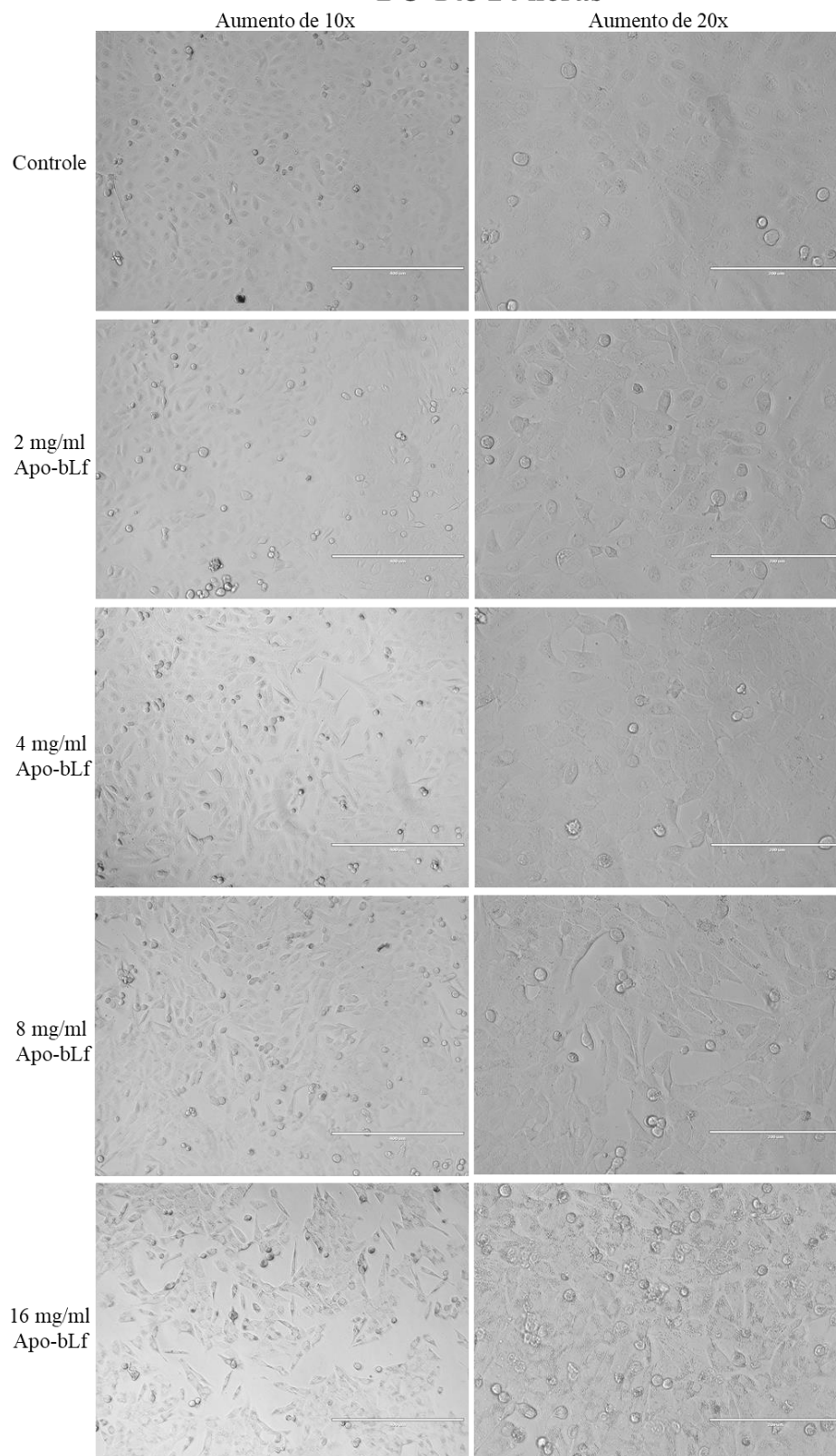


Figura 12: Influência da apo-bLf sobre a morfologia da célula DU-145 em 24 horas. Imagens selecionadas que foram tiradas pelo microscópio EVOS, nos aumentos de 10x e 20x. A linhagem DU-145 foi mantida com as concentrações 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo-bLf por 24 horas, o controle recebeu apenas meio de cultura.

DU-145 48 horas

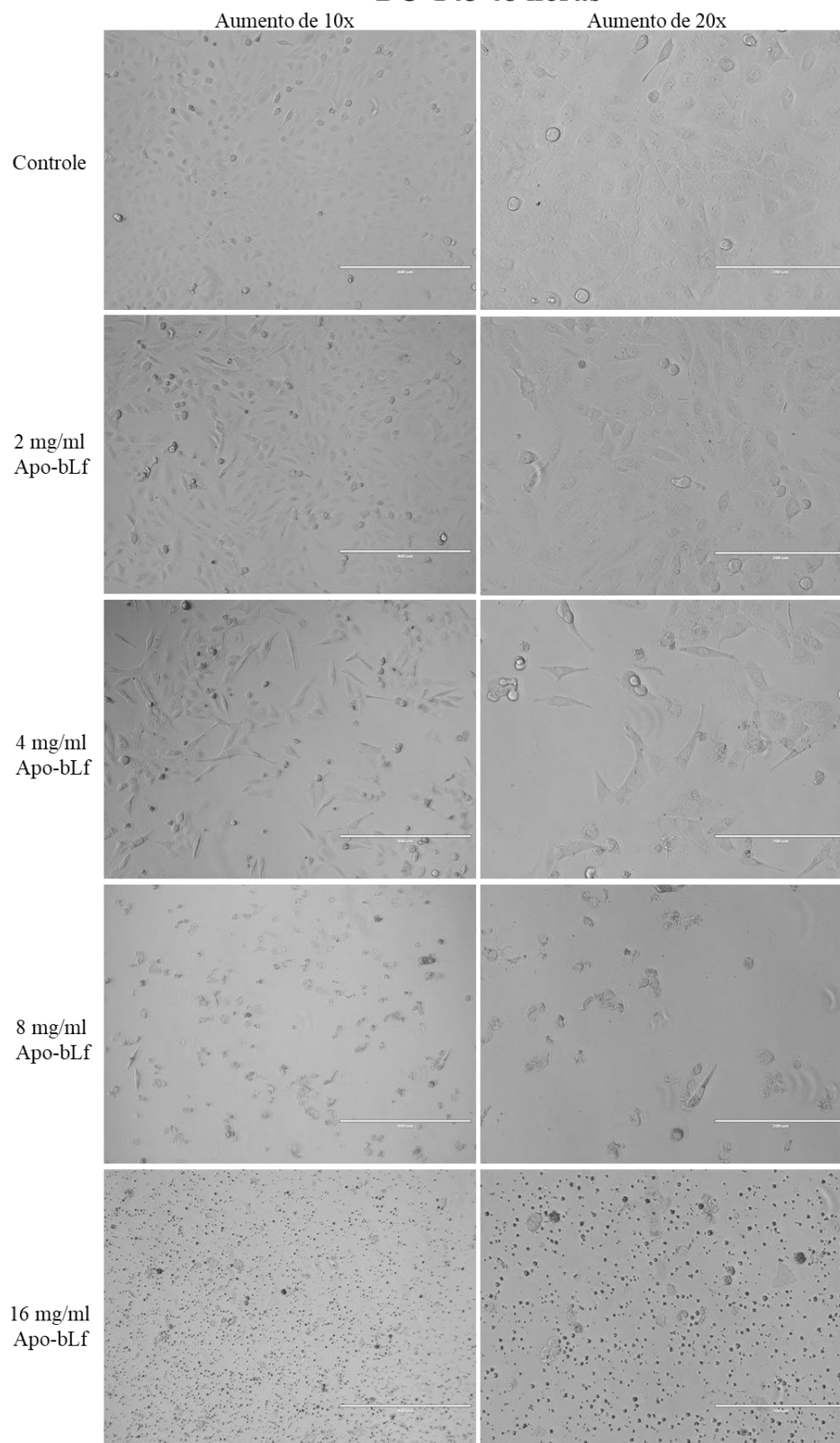


Figura 13: Influência da apo-bLf sobre a morfologia da célula DU-145 em 48 horas. Imagens selecionadas que foram tiradas pelo microscópio EVOS, nos aumentos de 10x e 20x. A linhagem DU-145 foi mantida com as concentrações 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo-bLf por 48 horas, o controle recebeu apenas meio de cultura.

DU-145 24 horas

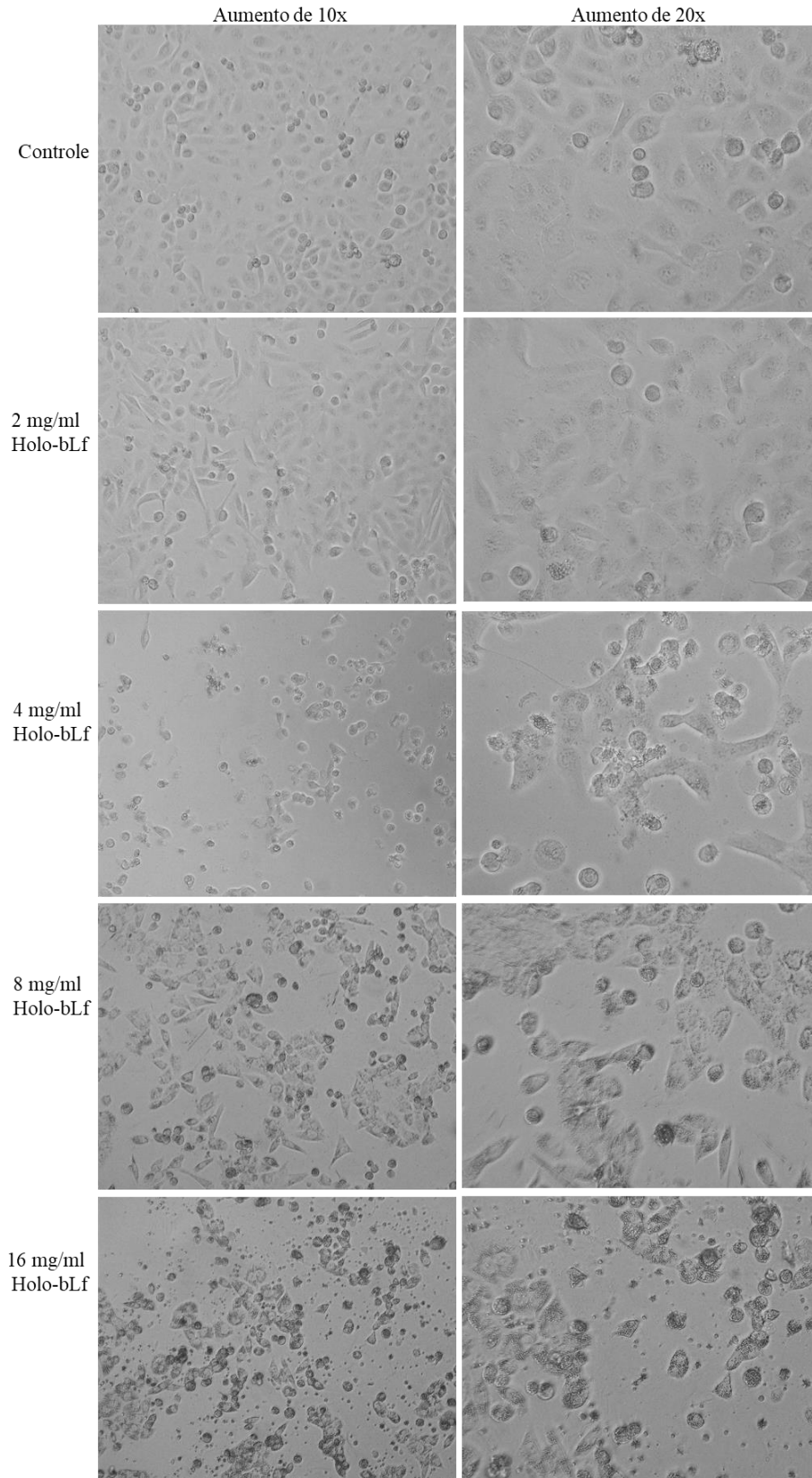


Figura 14: Influência da holo-bLf sobre a morfologia da célula DU-145 em 24 horas. Imagens selecionadas que foram tiradas pelo microscópio EVOS, nos aumentos de 10x e 20x. A linhagem DU-145 foi mantida com as concentrações 2, 4, 8 e 16 mg/ml de Holo-bLf por 24 horas, o controle recebeu apenas meio de cultura.

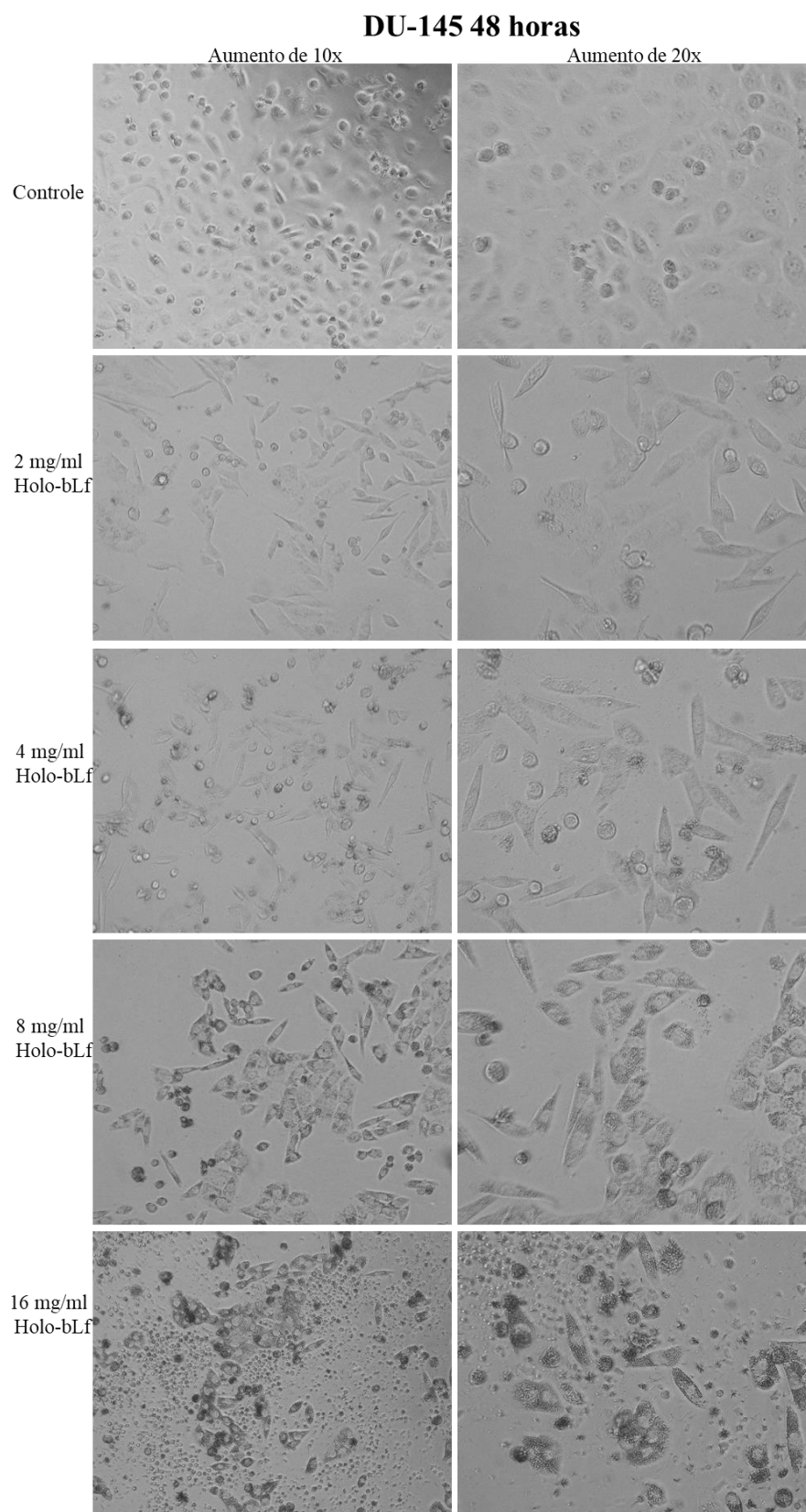


Figura 15: Influência da holo-bLf sobre a morfologia da célula DU-145 em 48 horas. Imagens selecionadas que foram tiradas pelo microscópio EVOS, nos aumentos de 10x e 20x. A linhagem DU-145 foi mantida com as concentrações 2, 4, 8 e 16 mg/ml de Holo-bLf por 48 horas, o controle recebeu apenas meio de cultura.

4.1.2. Tráfego intracelular da Lactoferrina Bovina

Uma vez que foram identificadas alterações morfológicas induzidas pela ação da bLf, decidimos avaliar a interação das formas apo- e holo-bLf com a célula DU-145. O objetivo deste experimento foi verificar se havia internalização da proteína nas formas apo- e holo-bLf na linhagem celular DU-145. As proteínas foram marcadas com FITC e as imagens foram adquiridas com um tratamento de 24 horas (**Figura 16**). Pode-se perceber pelas imagens que tanto a apo- como a holo-bLf são internalizadas pela linhagem DU-145. Muito embora a bLf tenha sido internalizada tanto na concentração de 8 mg/mL, quanto na de 16 mg/mL, a lactoferrina na maior concentração foi capaz de ser internalizadas de maneira mais efetiva.

Esse tipo de interação entre a célula DU-145 e a lactoferrina bovina pode explicada pelo fato dessa proteína ter uma carga positiva na região N-terminal que pode interagir com a carga negativa da heparina e de glicosaminoglicanos presentes na superfície celular (ANDERSEN *et al.*, 2004, CARVALHO *et al.*, 2014). Além disso, já se sabe que a lactoferrina pode se ligar a receptores lipoproteicos de baixa densidade e a proteína relacionada ao receptor de lipoproteínas de baixa densidade (CHIEN *et al.*, 2008).

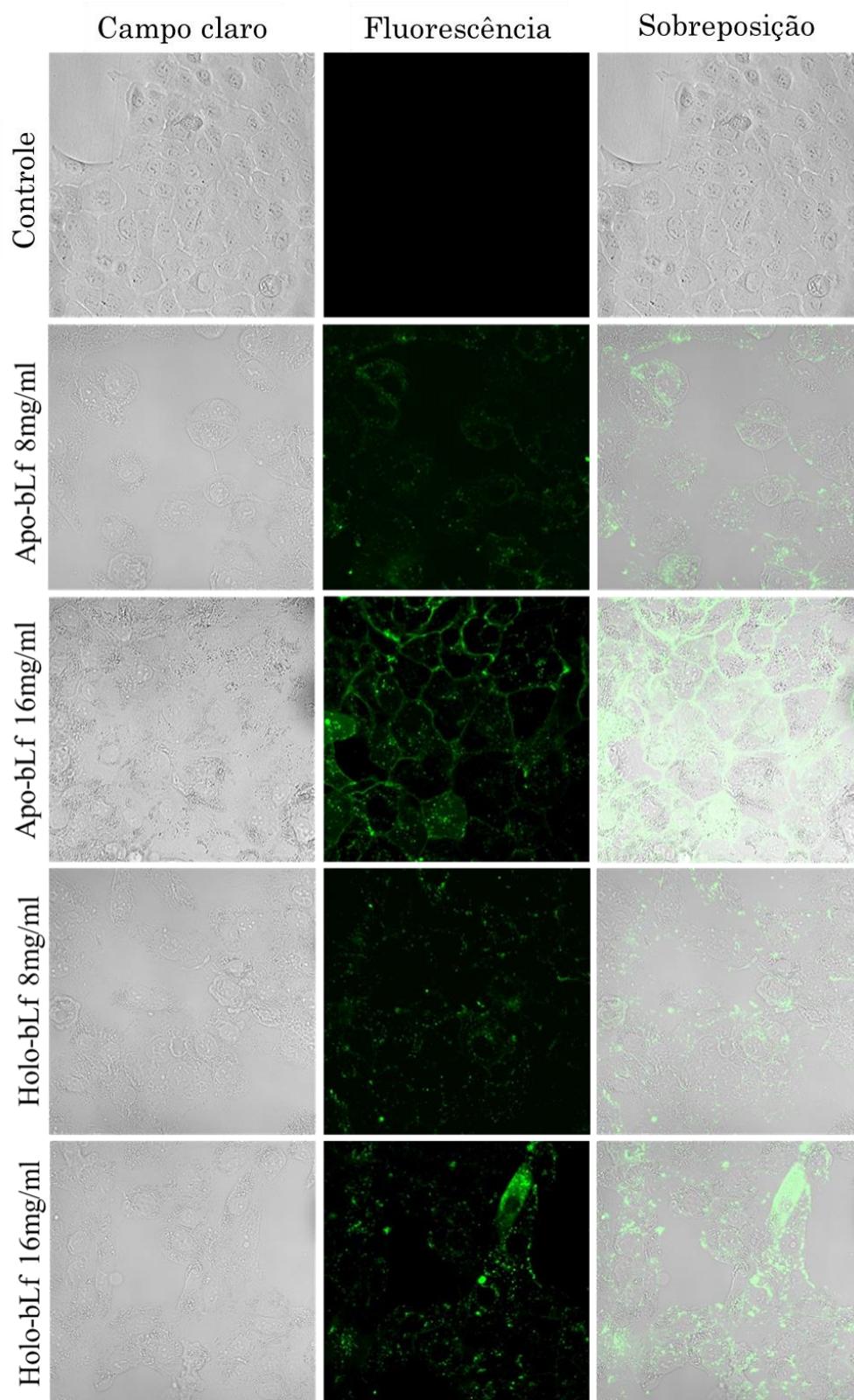


Figura 16: Microscopia Confocal de Fluorescência por Escaneamento com Laser das células DU-145 incubadas com apo- e holo-bLf - FITC.

Após conjugar moléculas de isotiocianato de fluoresceína (FITC) à lactoferrina bovina, administrou-se a solução contendo o conjugado à cultura de células DU-145 por 24 horas. A técnica utilizada foi a microscopia confocal de fluorescência com escaneamento a laser, utilizando, para tanto, laser composto por íons de argônio e analisando camadas menores de 1 micrômetro de espessura.

4.1.3. Efeito da Lactoferrina bovina sobre a viabilidade celular

Uma vez que foi demonstrado que a bLf, além de alterar a morfologia celular também é capaz de ser internalizada pela DU-145, decidiu-se investigar se tais proteínas seriam capazes de reduzir a viabilidade desta linhagem tumoral. Para endereçar melhor esta questão realizamos ensaios de viabilidade celular, o teste de MTT e o teste de contagem de células com coloração por azul de tripan.

4.1.3.1. Ensaio de MTT

O ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] tem como objetivo a quantificação da redução de MTT em formazan. Tal redução indica um incremento na atividade mitocondrial que está diretamente ligada a viabilidade celular. Tal método é largamente utilizado em diversos estudos para comprovar a atuação de compostos com efeitos danosos para as células, como a ação antitumoral.

Inicialmente foram realizados ensaios de 24 horas com a apo-bLf em concentrações de 0,5 até 40 mg/ml. Foi possível perceber uma diminuição na viabilidade celular a medida que aumentavam as concentrações da apo-bLf (**Figura 17**).

Segundo Guedes e colaboradores (2018), a bLf semi-saturada por ferro (com 21% de íons ferro) é um importante composto antitumoral, pois mata seletivamente a linhagem PC-3 de câncer de próstata na concentração de 14 mg/ml. Baseado nesse estudo, as concentrações utilizadas nesta dissertação foram ajustadas a fim de alcançar melhor o efeito antitumoral da bLf.

DU-145 24 hours

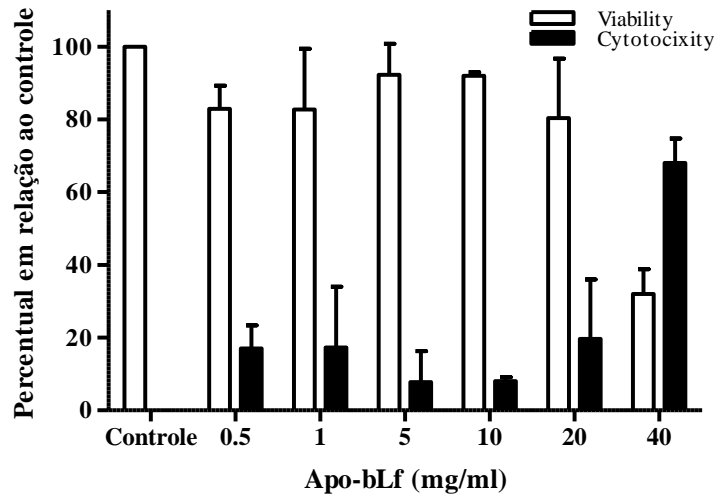


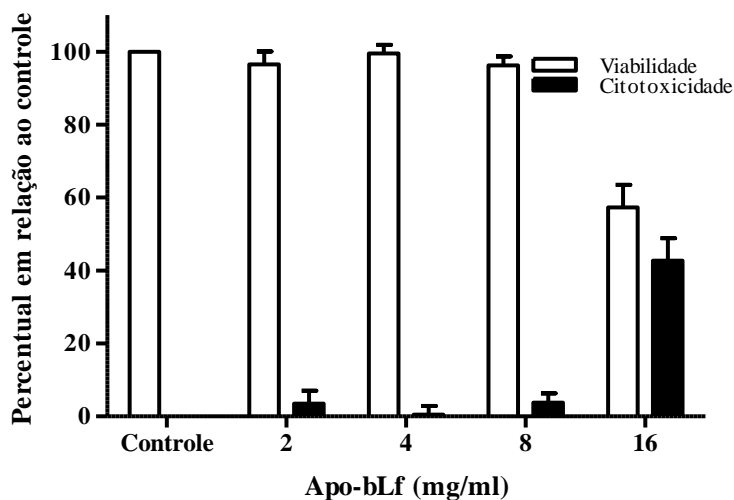
Figura 17: Viabilidade celular por MTT em células DU-145 com concentrações de 0,5 até 40mg/ml de apo-bLf.

As células da linhagem DU-145 foram tratadas durante 24 horas com concentrações de 0,5 até 40 mg/ml de apo-bLf. No controle negativo foi utilizado meio de cultura e no controle positivo triton X-100 a 0,1%. O gráfico foi feito de acordo com o percentual em relação ao controle negativo sendo 100%. Esse experimento foi realizado pelo menos 3 vezes. Para análise estatística dos dados, foi utilizado o desvio padrão da média.

Sendo assim, restringimos os testes de MTT com as concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml, com a proteína na forma apo- e holo- em dois tempos de tratamento, 24 e 48 horas. Na **Figura 18** pode-se observar que a apo-bLf na concentração de 16 mg/mL alcança mais de 40% do efeito citotóxico em 24 horas de tratamento. Já em 48 horas, a mesma concentração chega a mais de 60% de toxicidade.

Em contraste, a holo-bLf mostra ter um efeito citotóxico de, aproximadamente 50% na concentração de 16 mg/ml em apenas 24 horas de tratamento. Seu efeito citotóxico atinge mais de 90%, nessa mesma concentração, em 48 horas. Com apenas 4 mg/ml temos quase 40% de perda de viabilidade celular no maior tempo de tratamento (**Figura 19**).

DU-145 24 horas



DU-145 48 horas

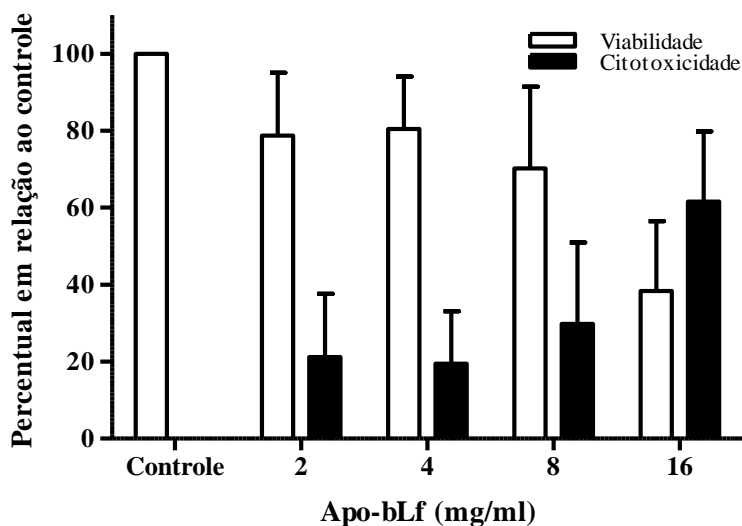
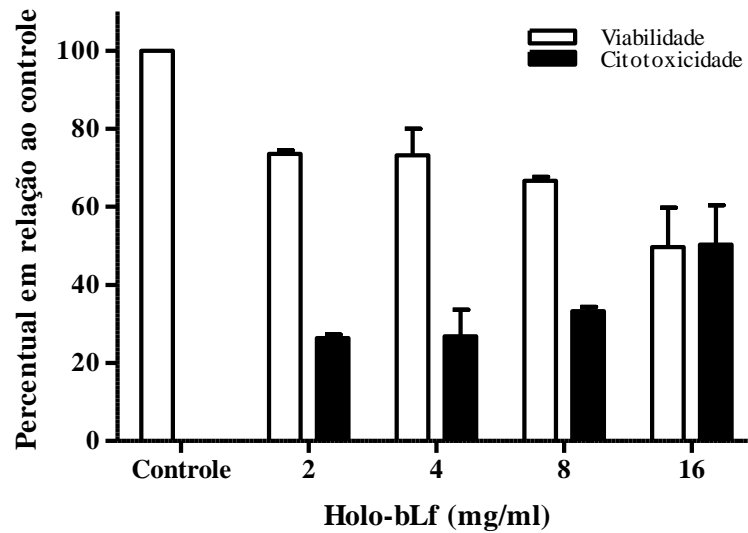


Figura 18: Viabilidade celular por MTT em células DU-145 com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de apo-bLf.

As células da linhagem DU-145 foram tratadas durante 24 e 48 horas com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de apo-bLf. No controle negativo foi utilizado meio de cultura e no controle positivo triton X-100 a 0,1%. O gráfico foi feito de acordo com o percentual em relação ao controle negativo sendo 100%. Esses experimentos foram realizados pelo menos 3 vezes. Para análise estatística dos dados, foi utilizado o desvio padrão da média.

DU-145 24 horas



DU-145 48 horas

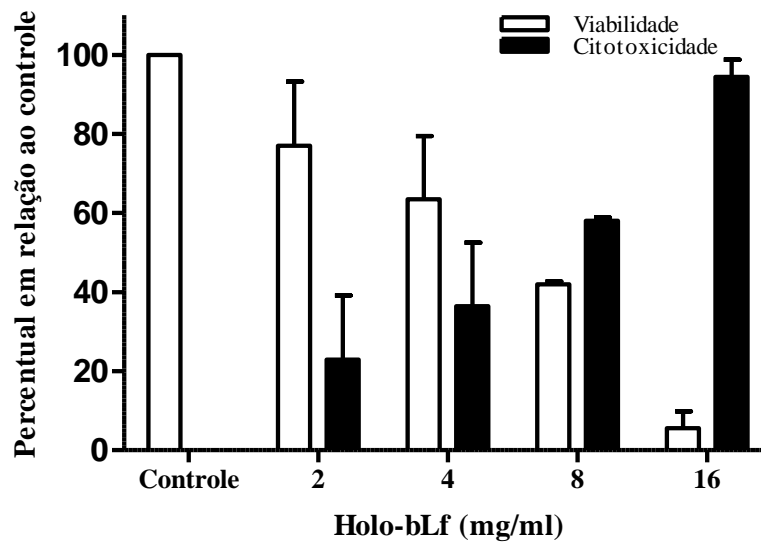


Figura 19: Viabilidade celular por MTT em células DU-145 com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de holo-bLf.

As células da linhagem DU-145 foram tratadas durante 24 e 48 horas com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de holo-bLf. No controle negativo foi utilizado meio de cultura e no controle positivo triton X-100 a 0,1%. O gráfico foi feito de acordo com o percentual em relação ao controle negativo sendo 100%. Esses experimentos foram realizados pelo menos 3 vezes. Para análise estatística dos dados, foi utilizado o desvio padrão da média.

A ação citotóxica da bLf apresentou efeito tempo e dose-dependente. Quando observamos os efeitos da holo-bLf na viabilidade celular por MTT podemos ver que é maior, comparado com o efeito da apo-bLf. E isso tudo corrobora o que foi visto na morfologia celular. Logo, os efeitos morfológicos devem ter ligação com os efeitos citotóxicos.

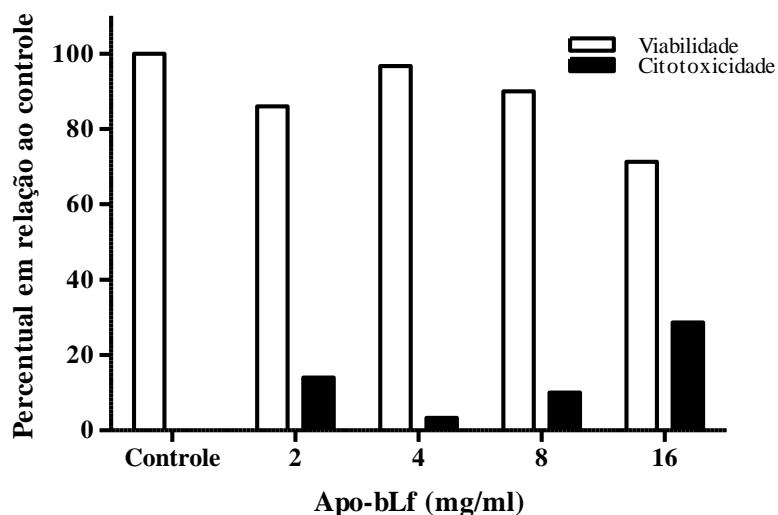
A diminuição da viabilidade celular observada por MTT parece indicar que a lactoferrina pode ter um efeito antitumoral sobre a linhagem de tumor de próstata DU-145. Um estudo que analisa o efeito da bLf na viabilidade celular por MTT mostra que, na concentração de 15 mg/ml, a mesma é citotóxica para células de câncer de pulmão, mas não apresenta atividade em células normais deste tecido (Tung *et al*, 2013). Corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho.

4.1.3.2. Ensaio de contagem com azul de tripan

Com o objetivo de corroborar os resultados da viabilidade por MTT, realizamos outro tipo de teste de viabilidade celular. O teste escolhido foi o de contagem com azul de tripan. Esse ensaio avalia através de contagem diferencial as células viáveis e mortas, uma vez que células mortas sofrem alterações na membrana permitindo a entrada do corante.

Assim como nos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade com MTT, os resultados encontrados por contagem com azul de tripan mostram que em 24 horas o maior efeito da apo-bLf ocorreu na concentração de 16 mg/ml. Esse efeito intensificou-se em 48 horas alcançando quase 80% de citotoxicidade com 16 mg/ml e, e quase 40% com 8 mg/ml (**Figura 20**).

DU-145 24 horas



DU-145 48 horas

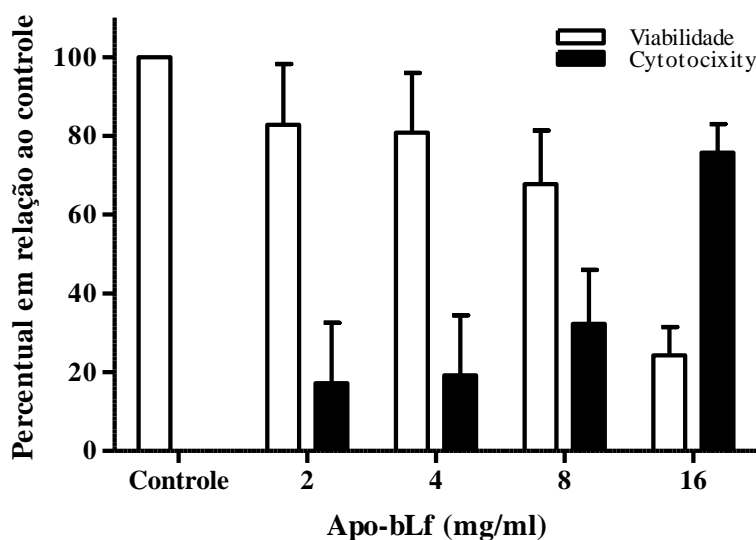
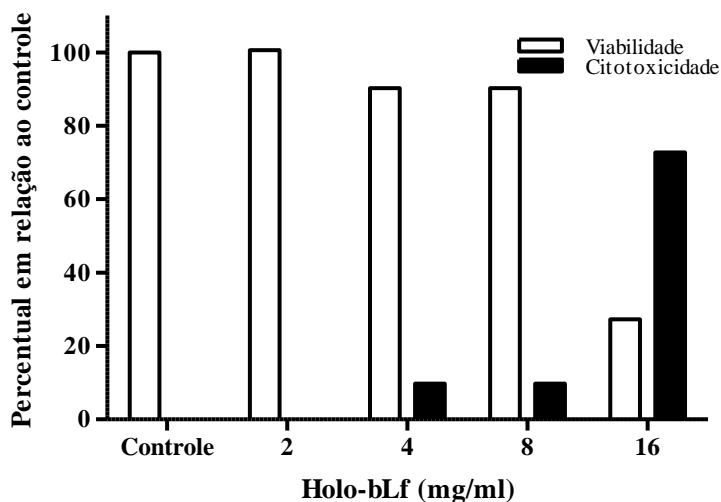


Figura 20: Viabilidade celular por contagem em células DU-145 com apo-bLf.

As células da linhagem DU-145 foram tratadas durante 24 e 48 horas com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de apo-bLf. No controle negativo foi utilizado meio de cultura e no controle positivo triton X-100 a 0,1%. O gráfico foi feito de acordo com o percentual em relação ao controle negativo sendo 100%. Esse experimento foi realizado pelo menos 3 vezes. Para análise estatística dos dados, foi utilizado o desvio padrão da média.

Analisando os resultados da holo-bLf, observa-se que com 16 mg/ml em apenas 24 horas, já temos mais de 60% de citotoxicidade. Mostrando mais uma vez que a atividade citotóxica da proteína ligada a ferro é maior e mais intensa quando comparada com a apo-bLf. Em 48 horas de tratamento vemos um efeito de 60% na concentração mais alta da proteína (**Figura 21**).

DU-145 24 horas



DU-145 48 horas

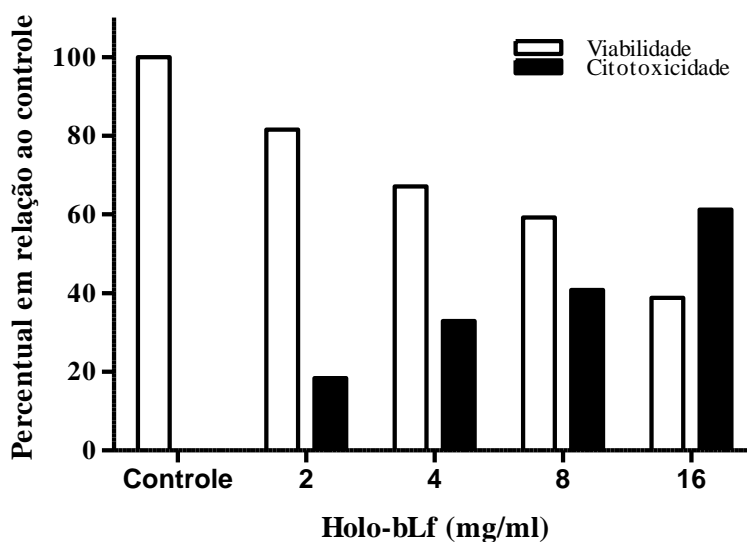


Figura 21: Viabilidade celular por contagem em células DU-145 com holo-bLf.

As células da linhagem DU-145 foram tratadas durante 24 e 48 horas com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de holo-bLf. No controle negativo foi utilizado meio de cultura e no controle positivo triton X-100 a 0,1%. O gráfico foi feito de acordo com o percentual em relação ao controle negativo sendo 100%.

Comparando os dois tempos de tratamento pode-se concluir que, em 48 horas, o efeito citotóxico da holo-bLf é maior em concentrações mais baixas, como 2, 4 e 8 mg/ml. Já em 16 mg/ml temos uma diminuição do efeito em 48 horas. Isso pode ser explicado por ser um resultado preliminar, já que quando analisamos o ensaio de viabilidade por MTT temos um aumento de toxicidade em 48 horas.

4.1.4. Efeito da Lactoferrina bovina sobre a progressão do ciclo celular

A análise sobre a progressão do ciclo celular se mostra uma importante ferramenta para identificar novos tratamentos antitumorais, já que uma droga que causa um arresto das células em qualquer fase do ciclo celular deixaria elas menos suscetíveis a divisão celular. A diminuição na divisão celular pode ocasionar uma parada no crescimento do tumor e um retardo no desenvolvimento do câncer. Muitos estudos que mostram possíveis tratamentos antitumorais observam, além de outros resultados, as células retidas na fase G_0/G_1 (Yu *et al*, 2017; Albayrak *et al*, 2018). Para monitorar a influência da lactoferrina bovina no ciclo celular, as células foram incubadas com apo-bLf e holo-bLf em concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml por 24 e 48 horas.

As **Figuras 22 e 23** mostram a representação do ciclo celular da linhagem DU-145 em 24 e 48 horas, respectivamente. Nessas imagens já é possível visualizar que o tratamento altera as quantidades de células nas fases do ciclo em relação ao controle, mas não é possível mensurar o quanto.

Para análise, foram quantificadas as porcentagens celulares nas diferentes fases do ciclo. A linhagem celular DU-145 mostrou um aumento de células retidas nas fases G_0/G_1 , seguido por um decréscimo de células nas fases G_2/M , quando tratadas por 24 horas. No tratamento com a apo-bLf isso ocorre na concentração de 16mg/ml. Já no tratamento com a holo-bLf podemos ver um aumento gradual de células em G_0/G_1 em todas as concentrações (**Figura 24**).

Uma característica principal das neoplasias é a alteração de vias normais de sinalização de crescimento. As células transformadas normalmente precisam de menos fatores de crescimento. Células tumorais tem uma vantagem de crescimento, já que os reguladores que governam a progressão da fase G_1 do ciclo celular são alvos naturais da oncogênese (Diehl, 2002).

Estudos anteriores mostram que a lactoferrina bovina induz uma retenção do ciclo celular nas fases G_0/G_1 em células de câncer de mucosa oral altamente metastática (Chea *et al*, 2018). Sabe-se que a perda da capacidade de regular o ciclo celular é característico nas células de câncer e resulta em uma incontrolável proliferação.

Por isso muitos trabalhos buscam encontrar alterações no ciclo celular. No presente trabalho pode-se observar essas mesmas características descritas na literatura sobre a ação da bLf. Comprovando que ela afeta o ciclo celular de células de câncer.

DU-145 24 horas

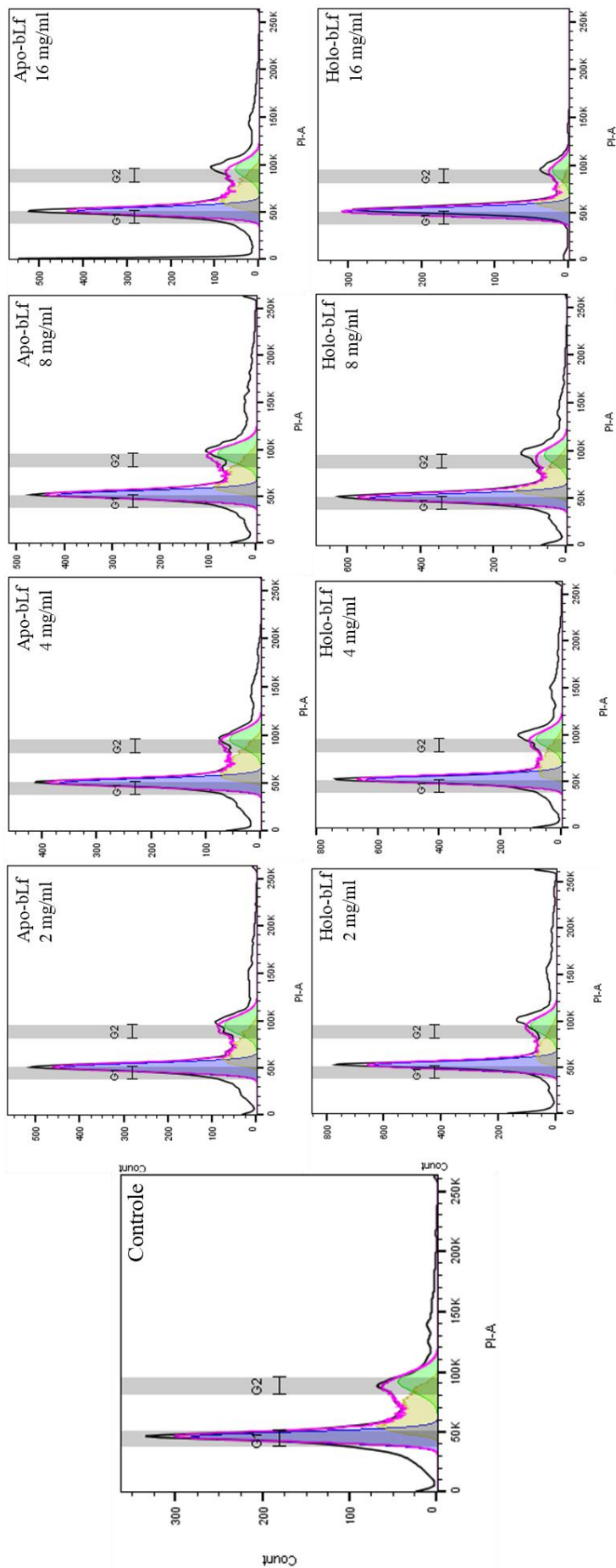


Figura 22: Ciclo celular em células DU-145 em 24 horas.

Representação do ciclo celular. As células da linhagem DU-145 foram tratadas durante 24 horas com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo- e holo-bLf. No controle foi utilizado meio de cultura. As células foram marcadas com a solução de Vindelov e analisadas através de Citometria de fluxo. O pico em roxo mostra as células na fase G₂, o pico amarelo as células na fase S e o pico verde na fase G₁. A linha rosa que circula os picos mostra a junção desses picos, logo, o ciclo celular.

DU-145 48 horas

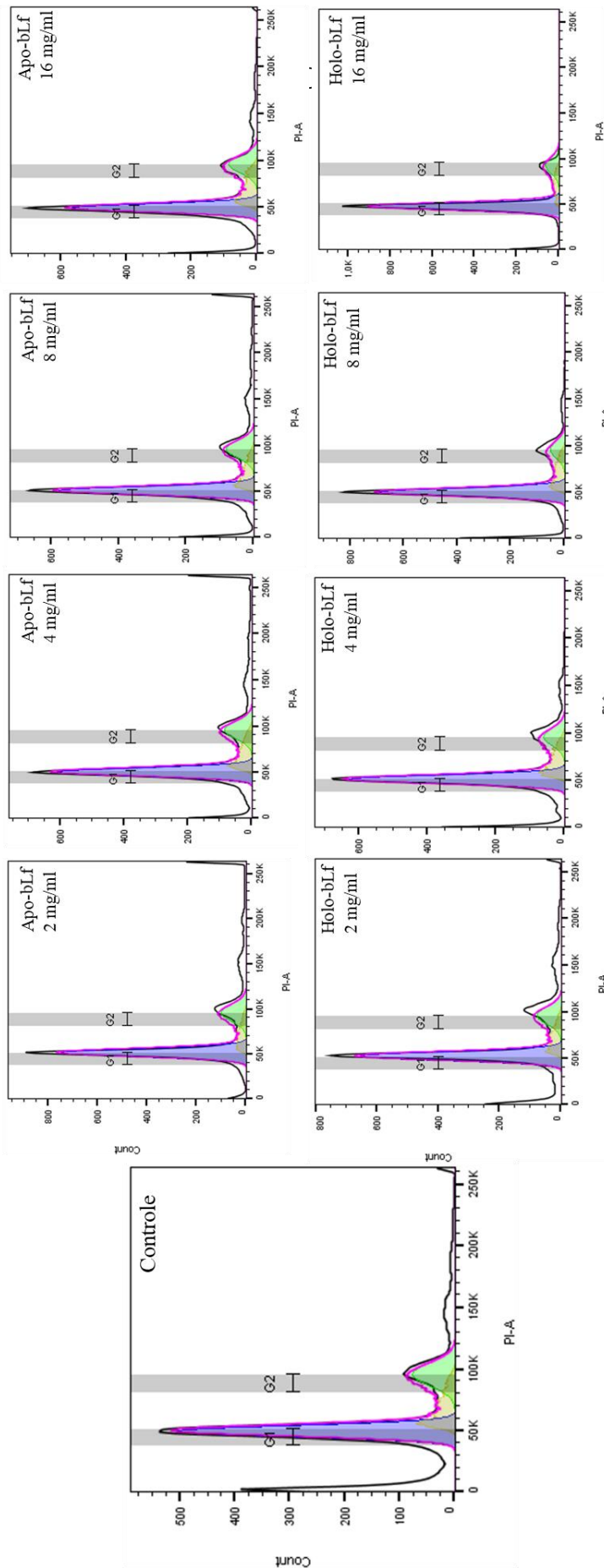


Figura 23: Ciclo celular em células DU-145 em 48 horas.

Representação do ciclo celular. As células da linhagem DU-145 foram tratadas durante 48 horas com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo- e holo-bLf. No controle foi utilizado meio de cultura. As células foram marcadas com a solução de Vindelov e analisadas através de Citometria de fluxo. O pico em roxo mostra as células na fase G₁, o pico amarelo as células na fase S e o pico verde na fase G₂. A linha rosa que circula os picos mostra a junção desses picos, logo, o ciclo celular.

DU-145 24 horas

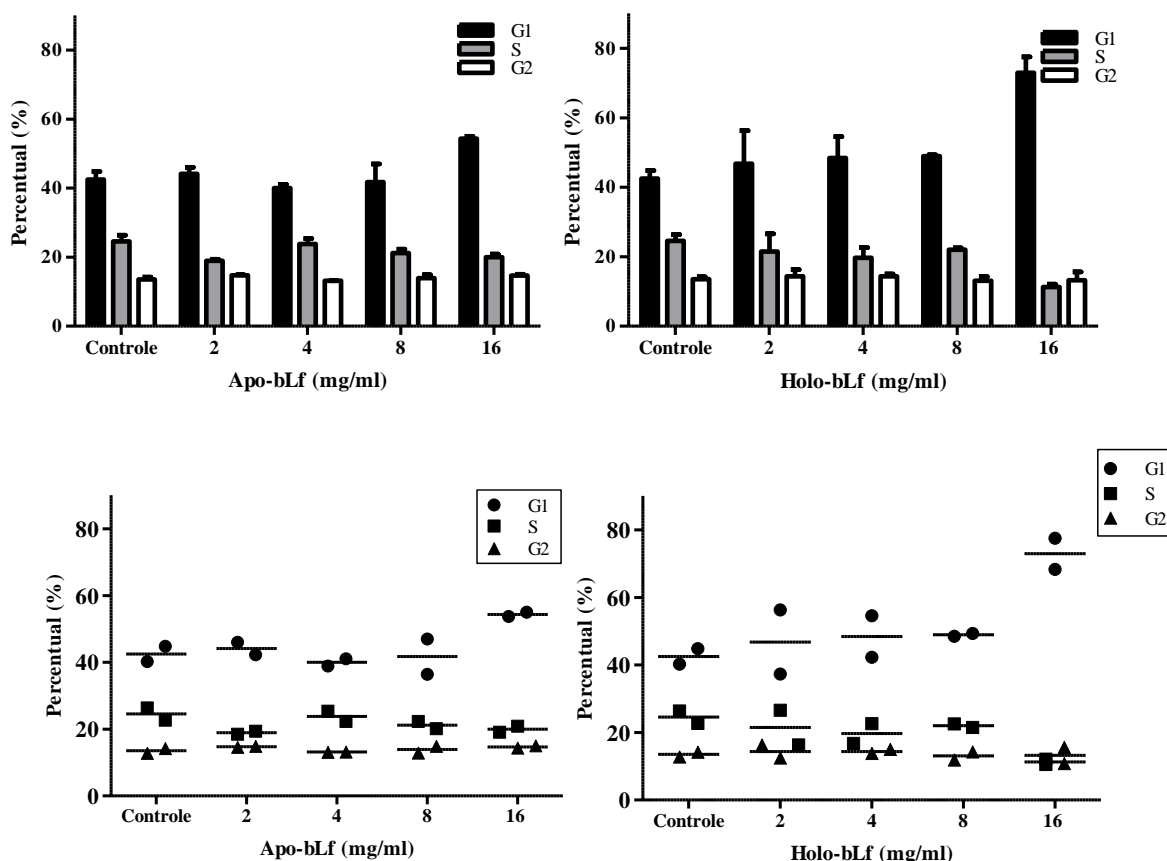


Figura 24: Quantificação do ciclo celular em células DU-145 em 24 horas.

Gráfico com as quantificações de células em cada fase do ciclo celular. As células da linhagem DU-145 foram tratadas durante 24 horas com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo- e holo-bLf. No controle foi utilizado meio de cultura. As células foram marcadas com a solução de Vindelov e analisadas através de Citômetria de fluxo. Esses experimentos foram realizados 2 vezes. Para análise estatística dos dados, foi utilizado o desvio padrão da média.

A **Figura 25** mostra a análise do ciclo celular da linhagem DU-145, quando tratadas durante 48 horas com apo- e holo-bLf. Pode-se observar, assim como em 24 horas, um aumento de células retidas nas fases G_0/G_1 , seguido por um decréscimo de células nas fases G_2/M em relação ao controle.

Porém, essas alterações são maiores e aparecem em todas as concentrações, principalmente na holo-bLf. Tendo, na fase G_0/G_1 quase 20% de aumento em 8mg/ml de apo-bLf, a mesma quantidade que aumento em 2mg/ml de holo-bLf. E quase 40% de aumento em 16mg/ml de holo-bLf. Esses resultados comprovam os resultados anteriores. Mostrando um maior efeito com 48 horas de tratamento e utilizando a holo-bLf.

DU-145 48 horas

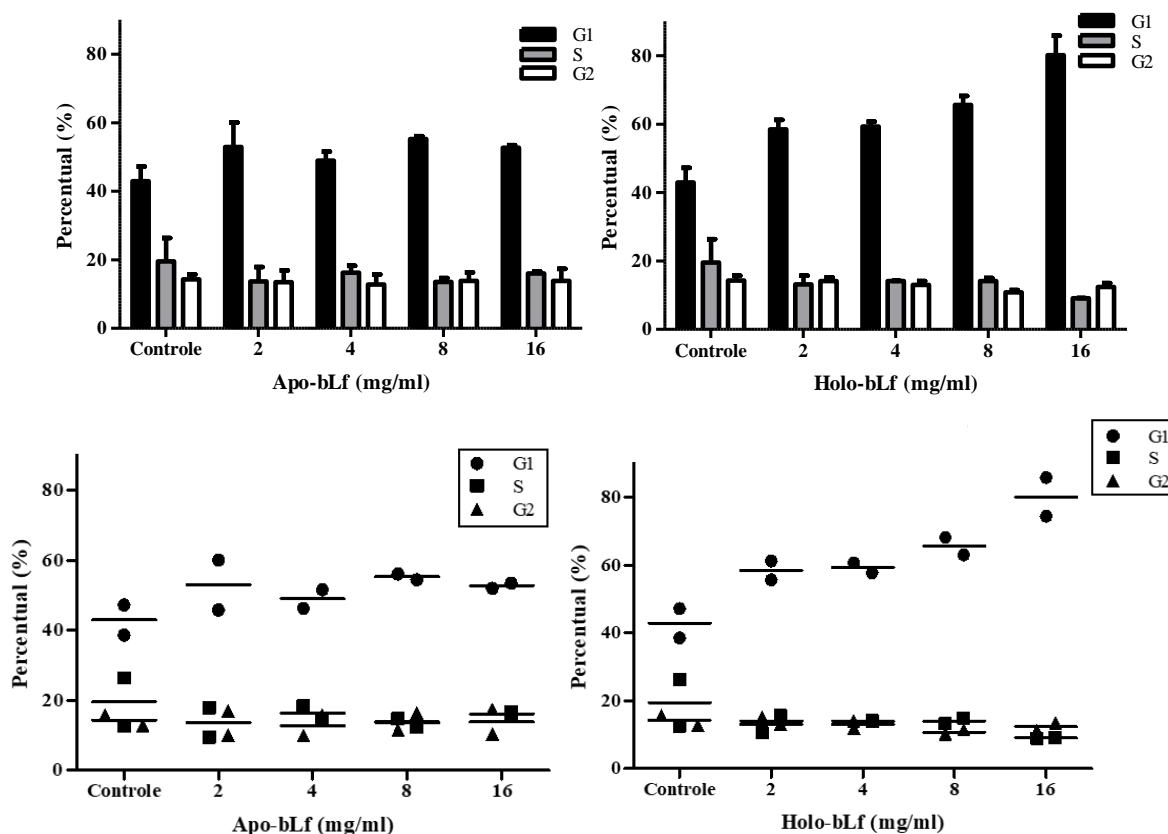


Figura 25: Quantificação do ciclo celular em células DU-145 em 48 horas.

Gráfico com as quantificações de células em cada fase do ciclo celular. As células da linhagem DU-145 foram tratadas durante 48 horas com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo- e holo-bLf. No controle foi utilizado meio de cultura. As células foram marcadas com a solução de Vindelov e analisadas através de Citômetria de fluxo. Esses experimentos foram realizados 2 vezes. Para análise estatística dos dados, foi utilizado o desvio padrão da média.

4.1.5. Efeito da Lactoferrina bovina sobre o processo de apoptose

As alterações no equilíbrio entre proliferação celular e apoptose estão associadas com o desenvolvimento do câncer uma vez que ocorre um aumento na proliferação celular e uma diminuição no processo de apoptose nas células tumorais. Por isso, a quantificação de apoptose pode ser uma medida útil na cinética das células de câncer (INCA, 2018).

Para isso foram realizados ensaios para aferir apoptose da linhagem DU-145 tratadas com apo-bLf e holo-bLf em tempos de 24 e 48 horas. A análise de apoptose mostra as células que estão viáveis, as que estão em necrose e as que estão em apoptose (Figura 26 e 27).

DU-145 24 horas

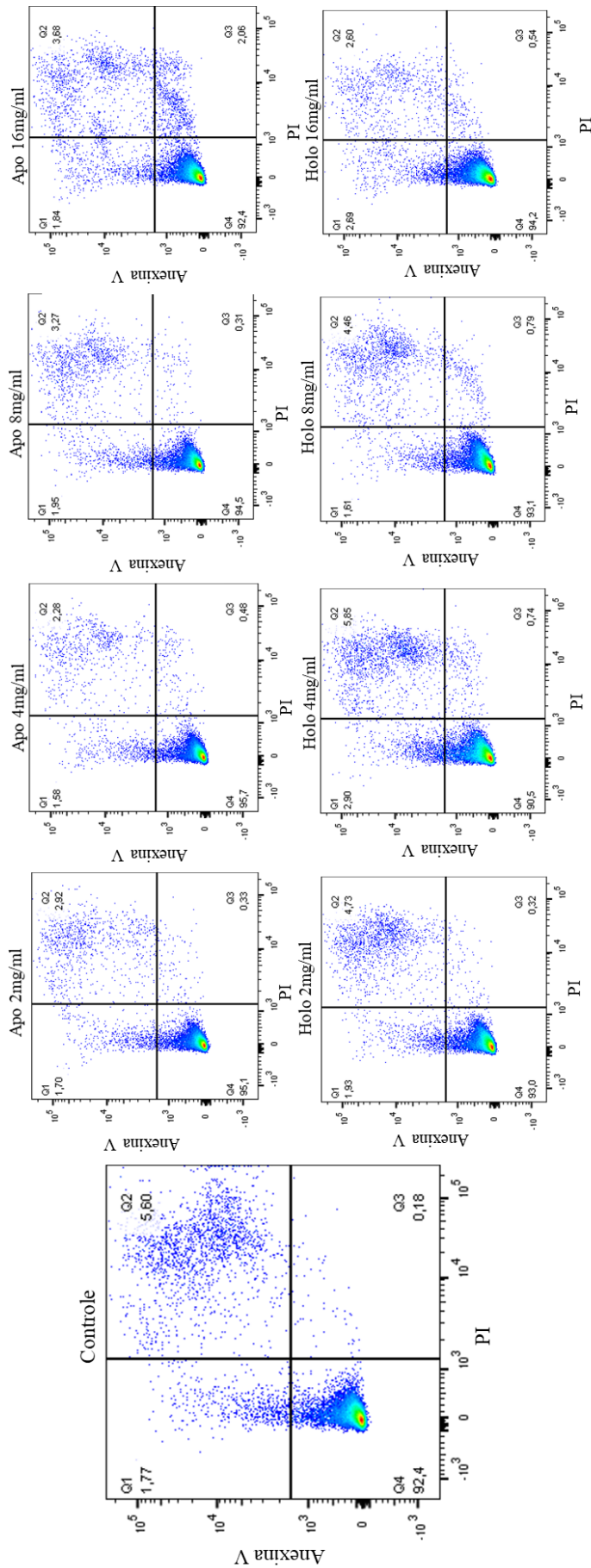


Figura 26: Ensaio de apoptose em células DU-145 com 24 horas de tratamento. As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de apo- e holo-bLF durante 24 horas e marcadas com anexina V e iodeto de propídio. Foram analisadas em citômetro de fluxo. Os quadrantes mostram as representações em porcentagem, onde o Q4 representa as células viáveis (Anexina V-/PI-), o Q3 as células em necrose (Anexina V-/PI+), o Q2 as células em apoptose tardia (Anexina V+/PI+) e o Q1 as células em apoptose inicial (Anexina V+/PI-).

DU-145 48 horas

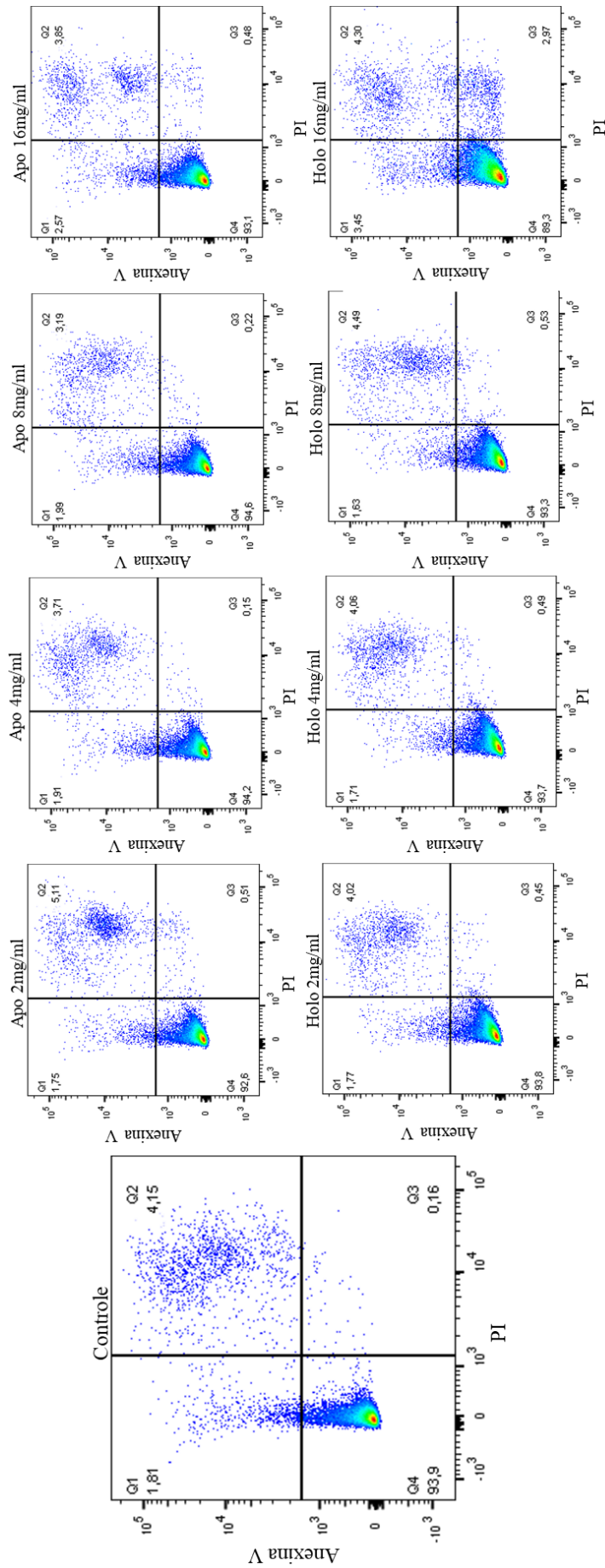


Figura 27: Ensaio de apoptose em células DU-145 com 48 horas de tratamento. As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de apo- e holo-bLF durante 48 horas e marcadas com anexina V e iodeto de propídio. Foram analisadas em citômetro de fluxo. Os quadrantes mostram as representações em porcentagem, onde o Q4 representa as células viáveis (Anexina V-/PI-), o Q3 as células em necrose (Anexina V-/PI+), o Q2 as células em apoptose tardia (Anexina V+/PI+) e o Q1 as células em apoptose inicial (Anexina V+/PI-).

Ao analisarmos a quantificação das células em apoptose, podemos perceber que a apo-bLf em 24 horas não teve efeito de indução de apoptose enquanto que a holo-bLf apresentou um aumento de apoptose na concentração de 4mg/ml. Em 48 horas temos um pequeno aumento de apoptose na concentração de 2 mg/ml de apo-bLf e um aumento maior ainda na concentração de 16 mg/ml de holo-bLf (**Figura 28**).

Seria preciso mais experimentos para comprovar esses resultados, porém já é possível perceber que, provavelmente, o mecanismo de ação antitumoral da lactoferrina bovina não se dá por indução de apoptose na linhagem celular DU-145.

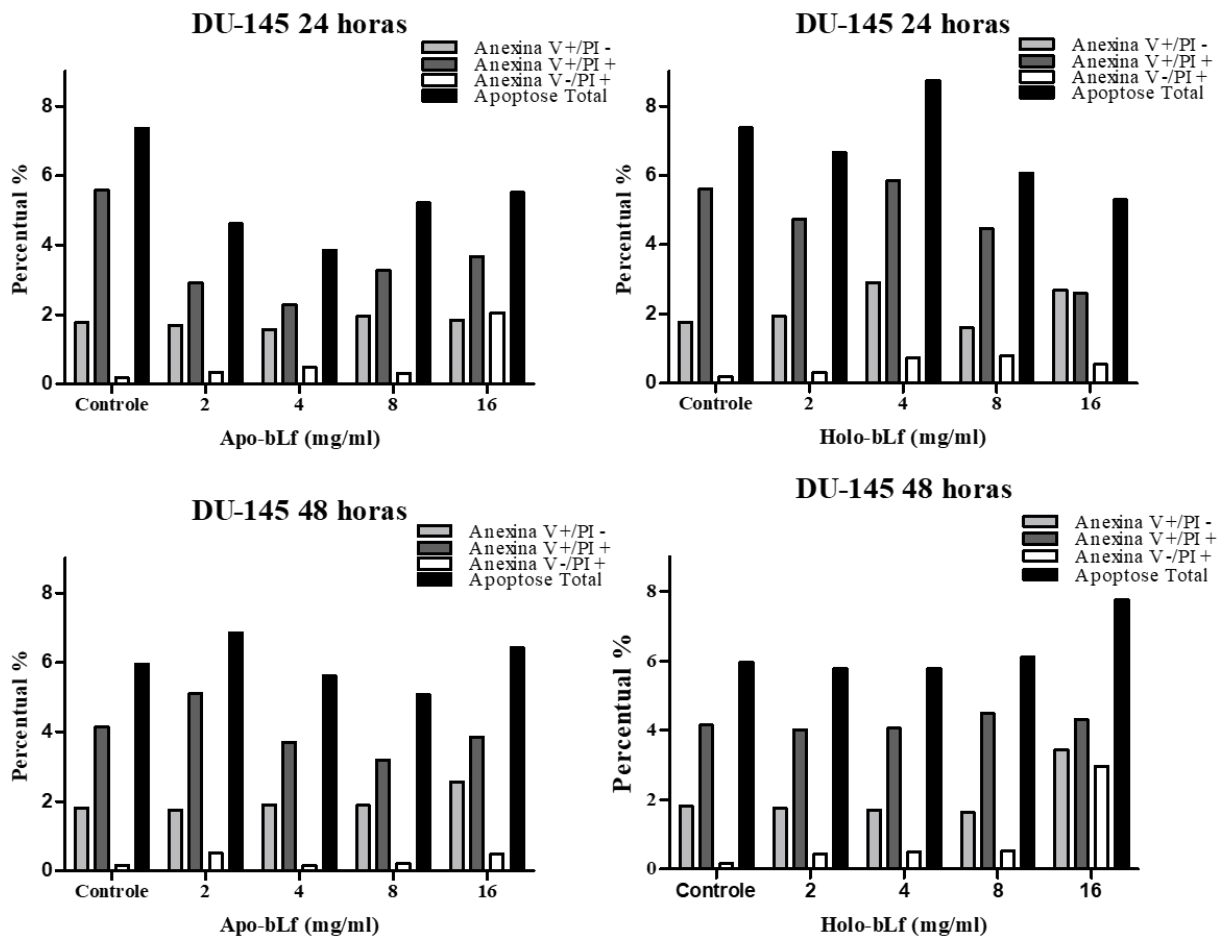


Figura 28: Quantificação de apoptose em células DU-145.

As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de apo- e holo-bLf durante 24 e 48 horas e marcadas com anexina V e iodeto de propídio. Foram analisadas em citômetro de fluxo.

4.1.6. Ensaio com sondas para avaliação de estresse oxidativo e ativação de apoptose no Operetta High-Content Imaging System

Esse ensaio foi realizado para avaliar possíveis alterações no estresse oxidativo e ativação de apoptose, induzidos por células de linhagem DU-145. Para isso foram utilizadas sondas para serem analisadas no Operetta High-Content Imaging System. A primeira sonda quantificava o estresse oxidativo [DHE, o MitoTracker e Hoechst]. A segunda quantificava a ativação de apoptose [Ethydium homodimer, CellEvent Caspase-3/7 e Hoechst].

O DHE é uma sonda fluorescente utilizada para detectar espécies reativas de oxigênio (ROS) em geral, já que passa por um processo de oxidação não específica. O Mitotrack é um marcador das espécies reativas de oxigênio (ROS), com marcação específica da mitocôndria (Mironov, 2005). Na sonda de ativação de apoptose, podemos identificar através da marcação com Ethydium a morte celular em geral. Este é um marcador de DNA não permeável a membrana celular de uma célula viável e por isso, uma célula morta ou destinada a morrer, apresenta poros ou rupturas da membrana permitindo a sua entrada. Já a CellEvent Caspase-3/7 é substrato para caspases 3/7 ativadas, portanto só é fluorescente quando, e quanto, as caspases 3/7 estão ativadas. A ativação dessas caspases significa que a célula está em processo de morte celular por apoptose.

A **Figura 29** mostra um claro aumento do estresse oxidativo celular com o tratamento de bLf. Com 48 horas do tratamento com a apo-bLf não foi possível observar nenhum aumento de ROS na mitocôndria. A holo-bLf mostra que tem pequeno aumento dos níveis de ROS mitocondrial. Já com 24 horas, tanto a apo-bLf, quanto a holo-bLf, aumentaram significativamente os níveis de ROS mitocondrial. Principalmente a holo-bLf que teve um aumento maior em concentrações menores.

A análise geral de ROS também mostrou que o tratamento aumentou os níveis de estresse oxidativo quando comparados com o controle. O efeito foi maior que o causado pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Novamente o efeito foi maior em 24 horas, a apo- e a holo-bLf tiveram efeitos similares nesse tempo. Em 48 horas a holo-bLf teve mais efeito quando comparada com a apo-bLf (**Figura 30**).

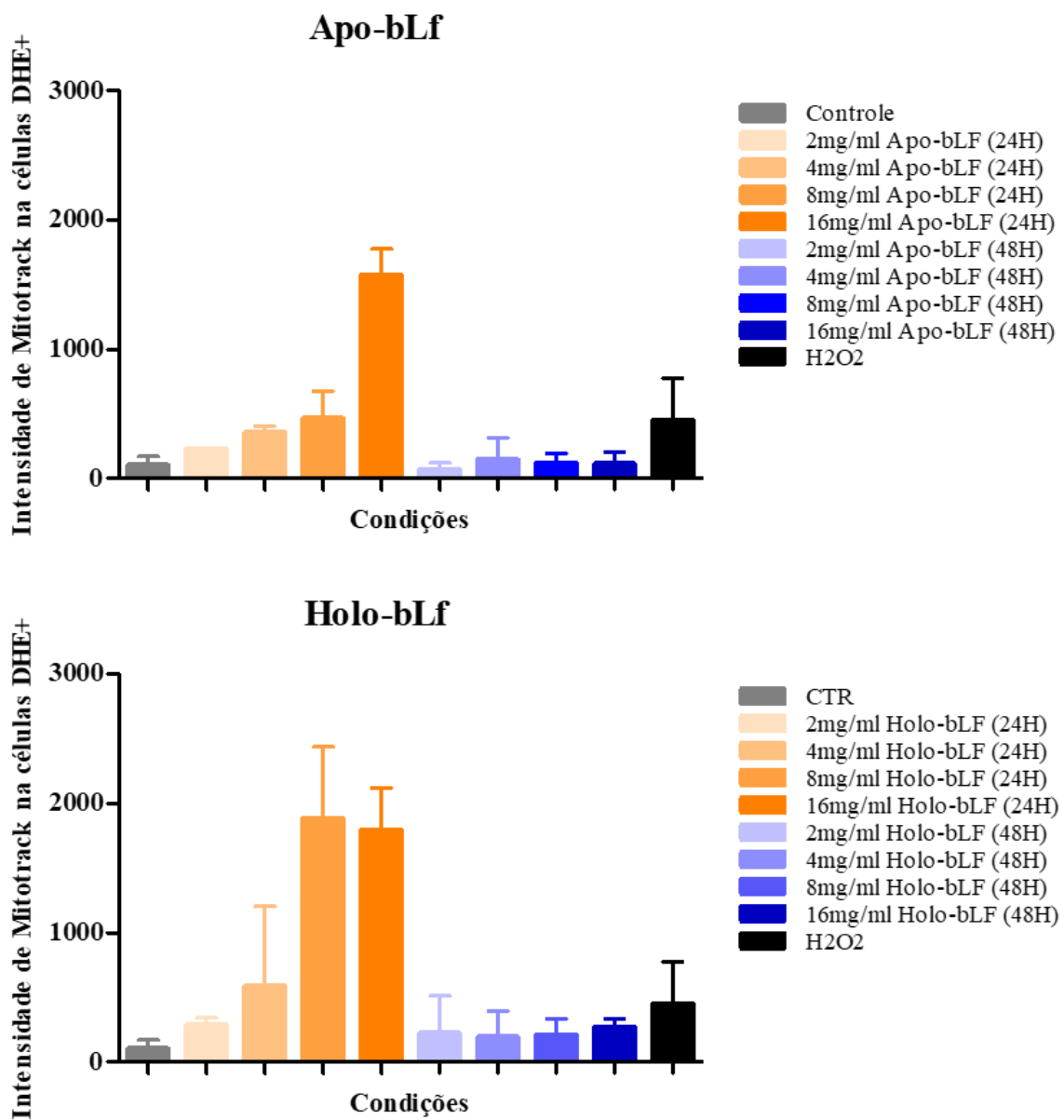


Figura 29: Análise de ROS com Mitotrack em células DU-145.

As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de apo- e holo-bLf durante 24 e 48 horas e marcadas com Mitotrack. Foram analisadas em citômetro de fluxo. Esses experimentos foram realizados 1 vez. Para análise estatística dos dados, foi utilizado o desvio padrão da média das replicatas.

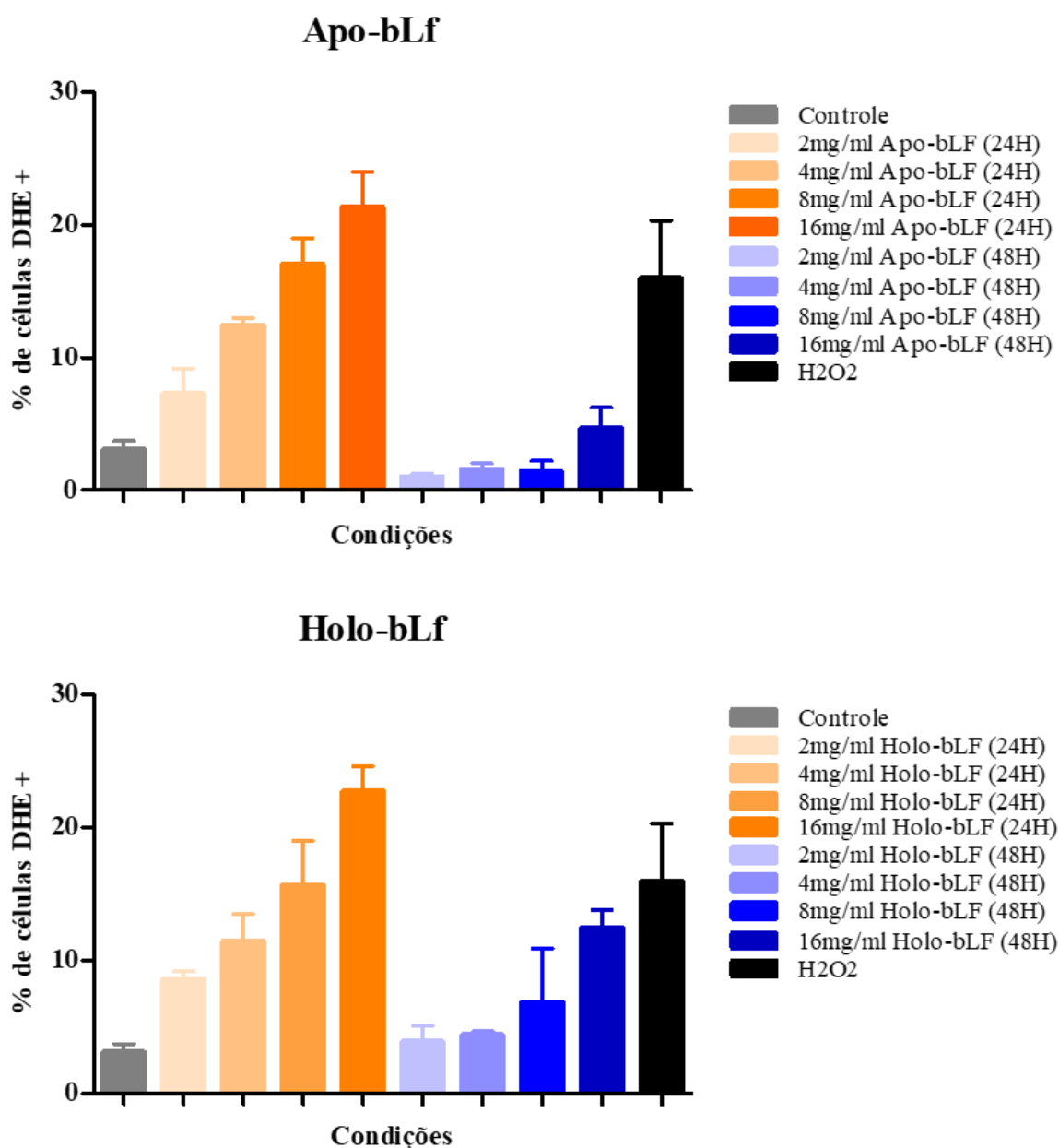


Figura 30: Análise de ROS com DHE em células DU-145.

As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de apo- e holo-bLf durante 24 e 48 horas e marcadas com DHE. Foram analisadas em citômetro de fluxo. Esses experimentos foram realizados 1 vez. Para análise estatística dos dados, foi utilizado o desvio padrão da média das replicatas.

A sonda de morte celular, Ethidium, corroborou o que foi demonstrado nos experimentos de viabilidade celular uma vez que foi demonstrado um efeito maior com 48 horas de tratamento e com a holo-bLf (**Figura 31**). Embora não tenha sido observado nenhum efeito de morte com a apo-bLf, sabe-se, através dos ensaios de

viabilidade celular que ela tem efeito. Isso pode ser explicado pela diferença na detecção dos experimentos onde o MTT, por exemplo, revela uma baixa atividade mitocondrial que pode ser detectada antes mesmo da ruptura das células. Já na contagem com azul de tripan as células são lavadas antes e, portanto, as que estivessem em processo de morte poderiam ter a sua adesão diminuída e soltaram antes mesmo do rompimento.

Um importante resultado foi o de detecção de caspases 3/7 ativadas (**Figura 32**). Nele, pode-se observar um aumento das caspases ativadas já com 24 horas, mesmo sem efeito de morte na sonda da **Figura 31**. A apo-bLf mostrou um aumento nas concentrações de 8 e 16 mg/ml, e a holo-bLf uma ativação gradual nos tratamentos de 4, 8 e 16 mg/ml, o que mostrou uma maior efeito da holo-bLf. Em 48 horas os dois tratamentos tiveram uma maior ativação das caspases 3/7, embora com a holo-bLf ainda tenha sido maior. Esses resultados corroboram com a hipótese anterior e com os experimentos de viabilidade celular. As imagens das quais o programa quantificou os dados são mostradas posteriormente (**Figuras 33 a 38**).

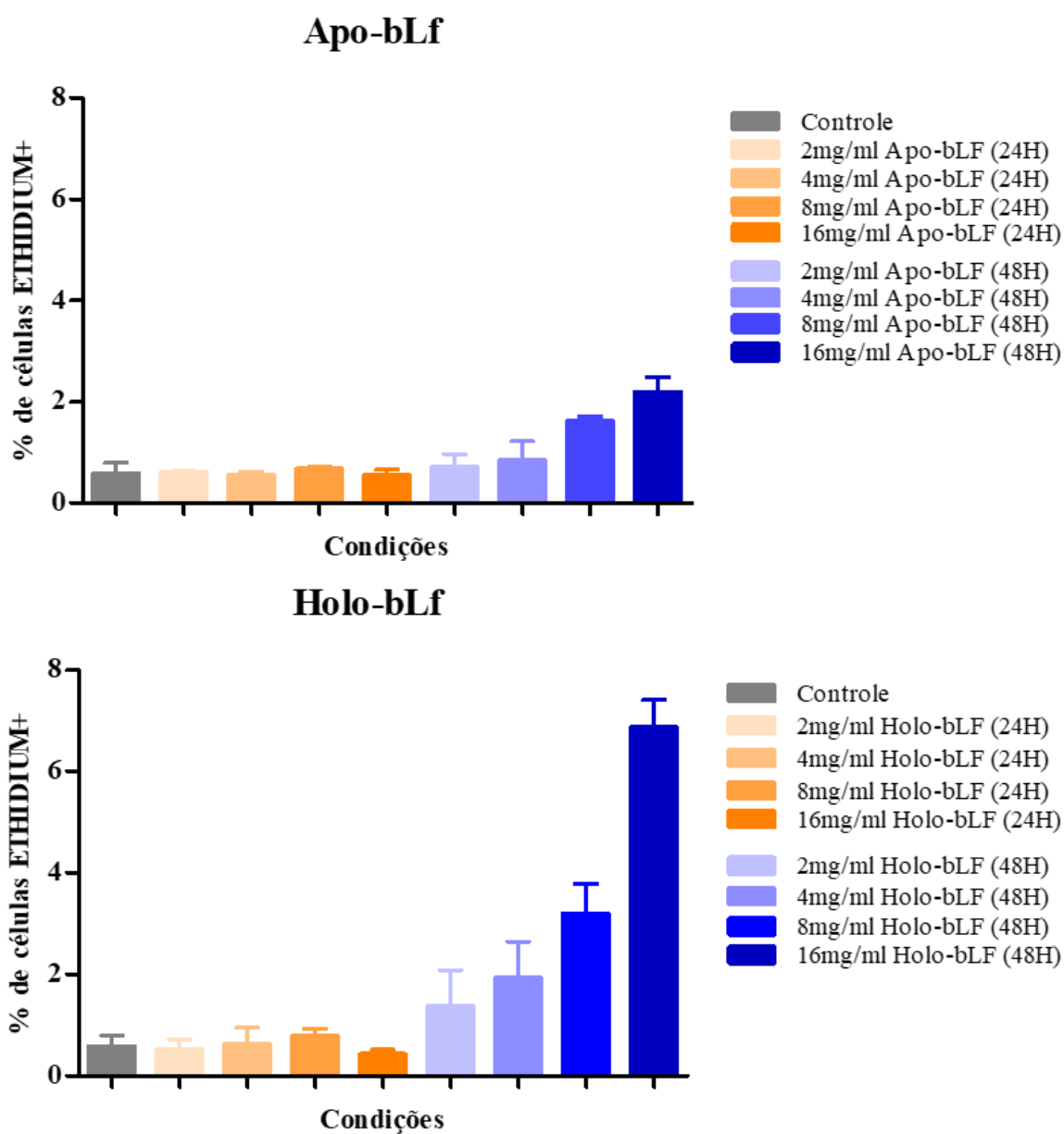


Figura 31: Análise de morte celular com Ethidium em células DU-145.

As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de apo- e holo-bLf durante 24 e 48 horas e marcadas com Ethidium. Foram analisadas em citômetro de fluxo. Esses experimentos foram realizados 1 vez. Para análise estatística dos dados, foi utilizado o desvio padrão da média das replicatas.

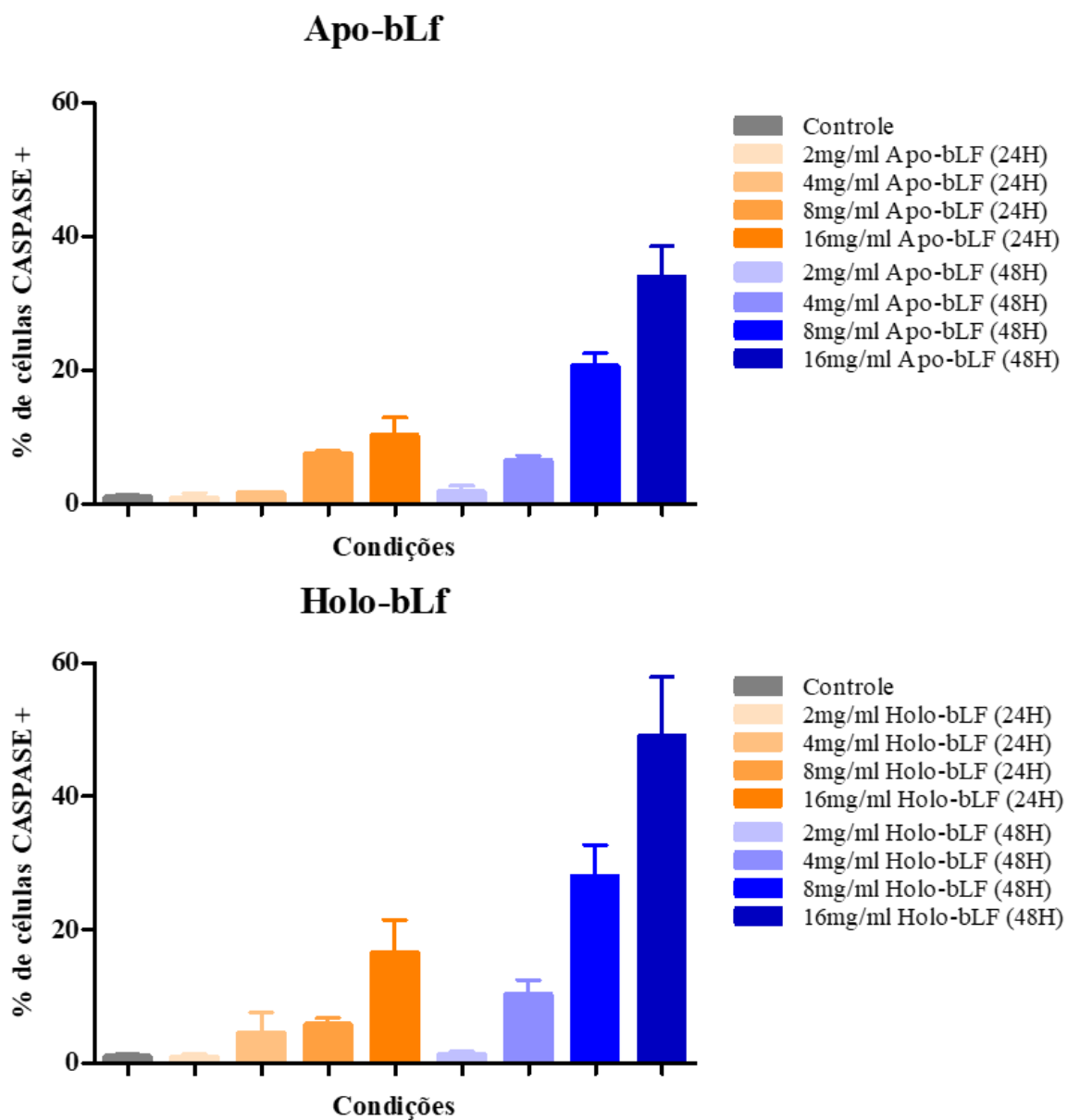


Figura 32: Análise de apoptose com caspases 3/7 em células DU-145.

As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16mg/ml de apo- e holo-bLf durante 24 e 48 horas e marcadas com caspase 3/7. Foram analisadas em citômetro de fluxo. Esses experimentos foram realizados 1 vez. Para análise estatística dos dados, foi utilizado o desvio padrão da média das replicatas.

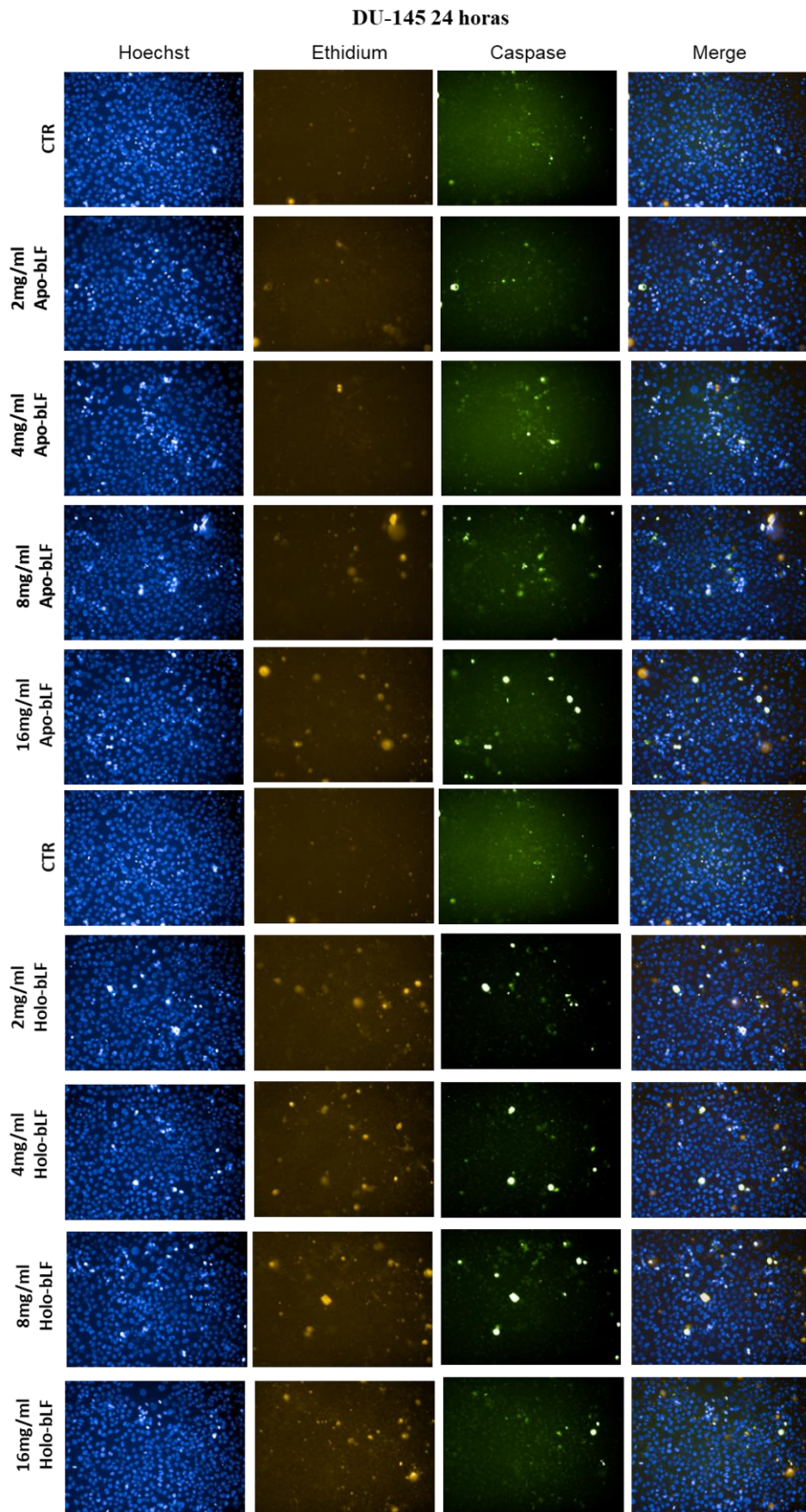


Figura 33: Imagens de morte celular em células DU-145 em 24 horas. As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo- e holo-bLf durante 24 horas e marcadas com Ethidium e caspase 3/7. Foram analisadas em citômetro de fluxo.

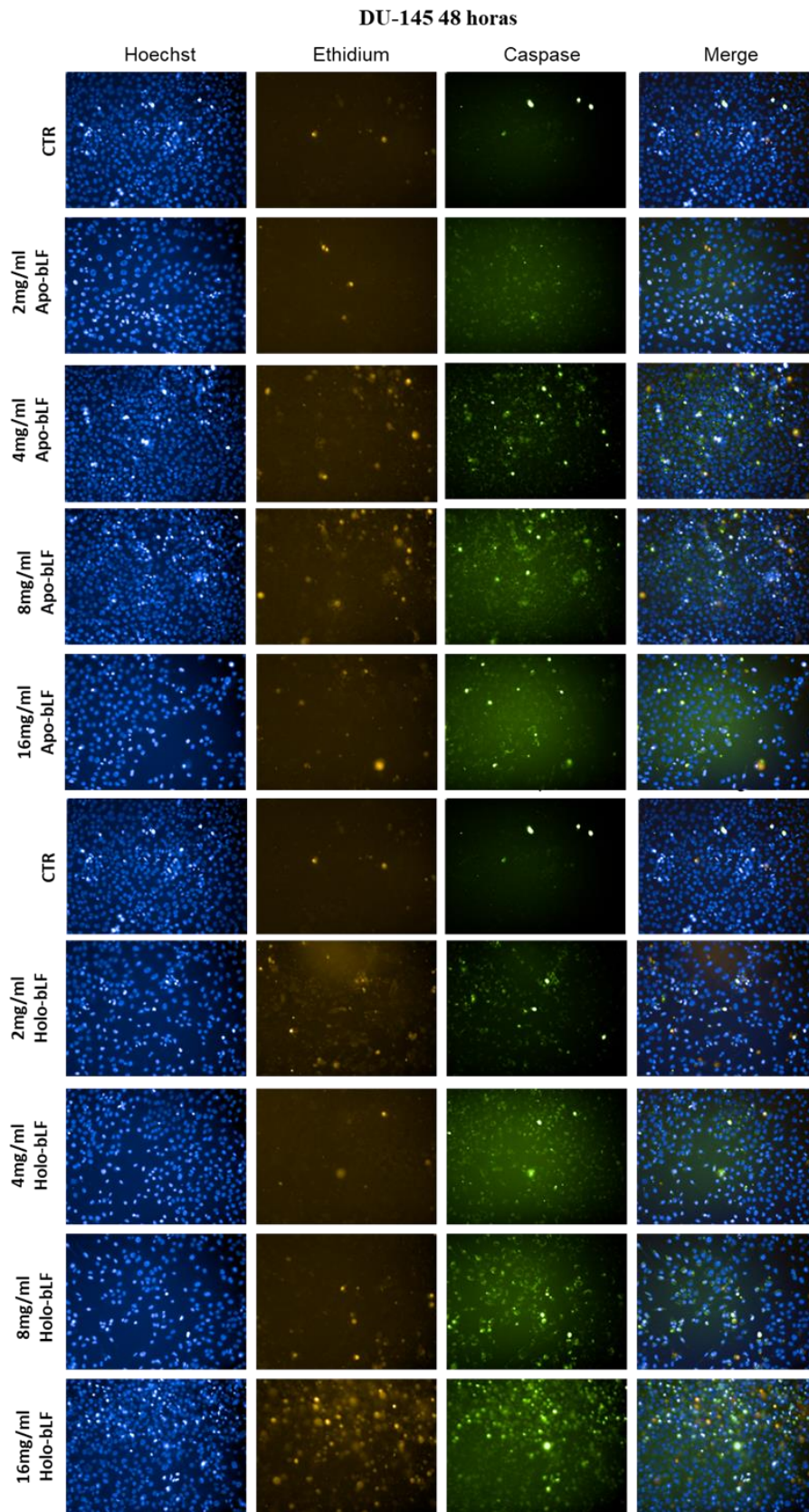


Figura 34: Imagens de morte celular em células DU-145 em 48 horas. As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo- e holo-bLf durante 48 horas e marcadas com Ethidium e caspase 3/7. Foram analisadas em citômetro de fluxo.

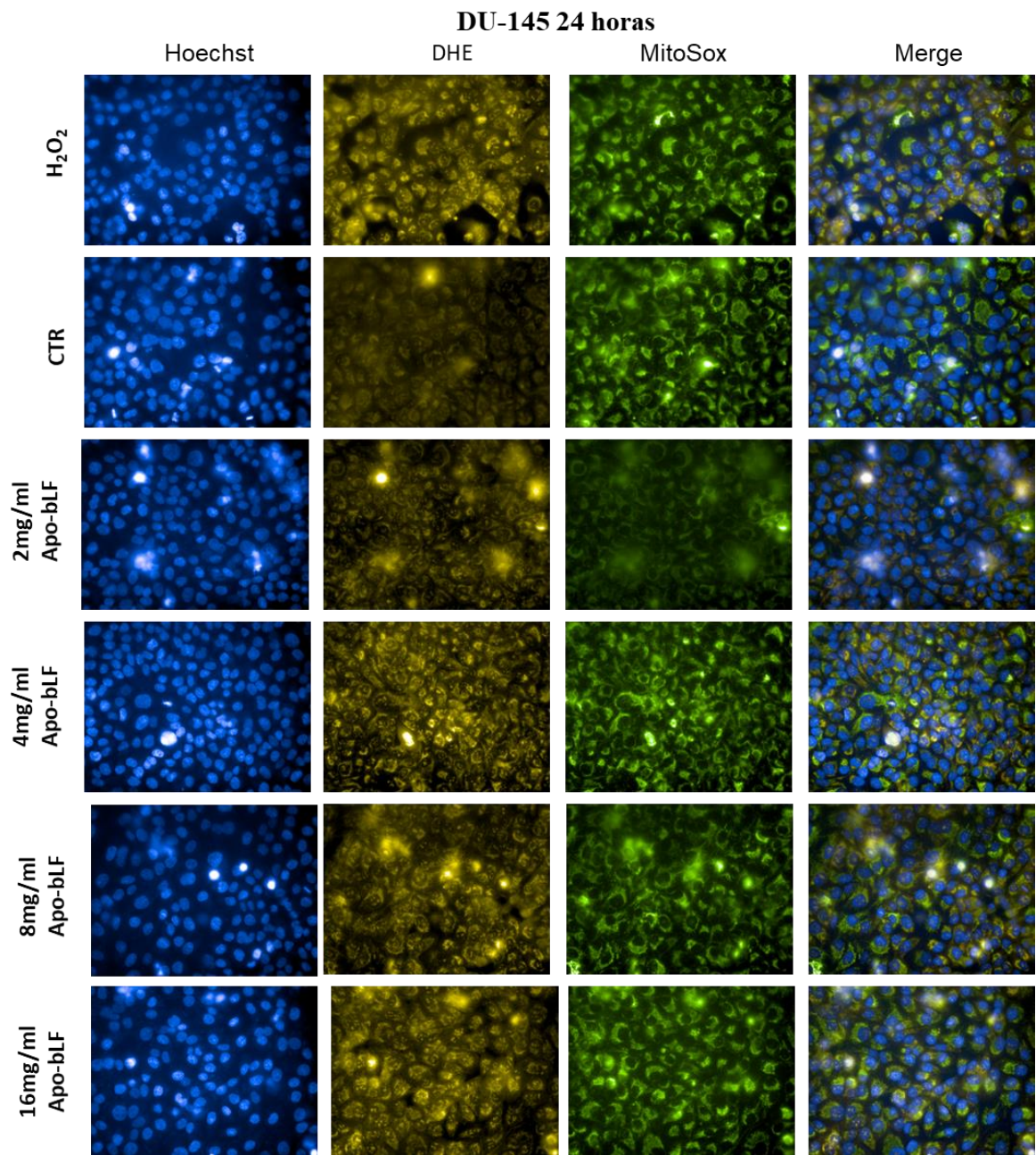


Figura 35: Imagens de estresse oxidativo em células DU-145 em 24 horas com apo-bLf. As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo-bLf durante 24 horas e marcadas com DHE e Mitoracker. Foram analisadas em citômetro de fluxo.

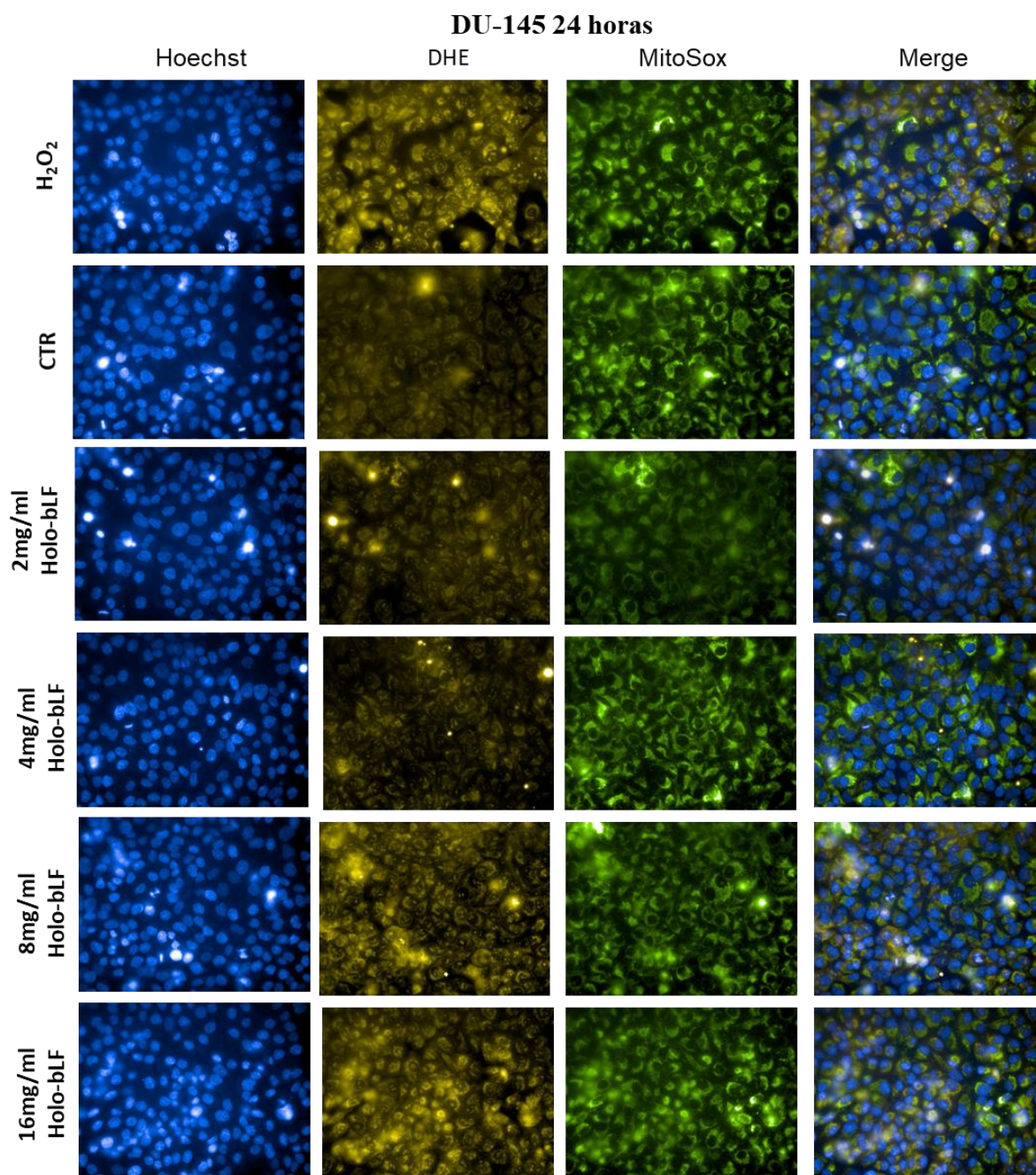


Figura 36: Imagens de estresse oxidativo em células DU-145 em 24 horas com holo-bLf. As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de Holo-bLf durante 24 horas e marcadas com DHE e Mitoracker. Foram analisadas em citômetro de fluxo.

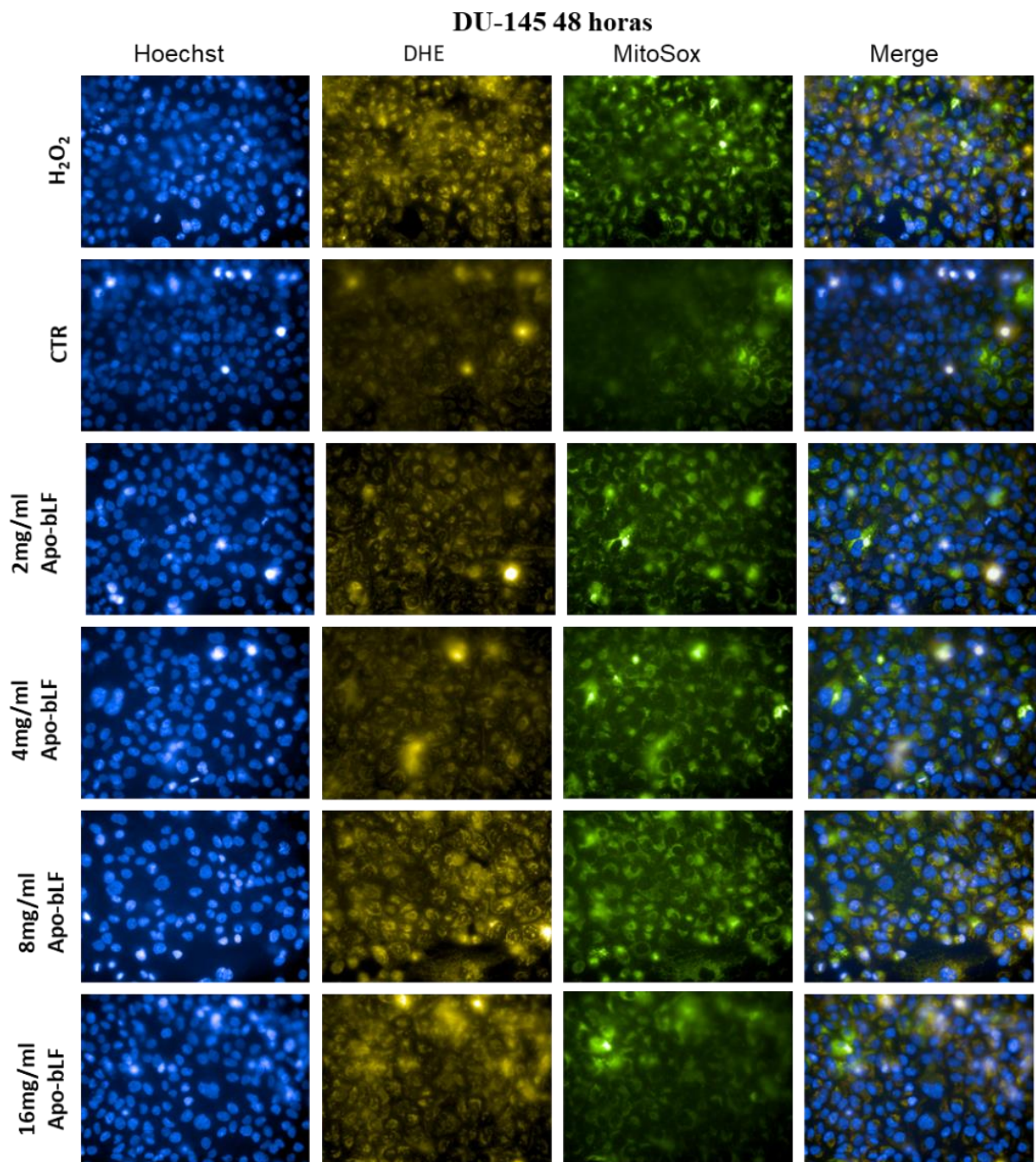


Figura 37: Imagens de estresse oxidativo em células DU-145 em 48 horas com apo-bLf. As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo-bLf durante 48 horas e marcadas com DHE e Mitoracker. Foram analisadas em citômetro de fluxo.

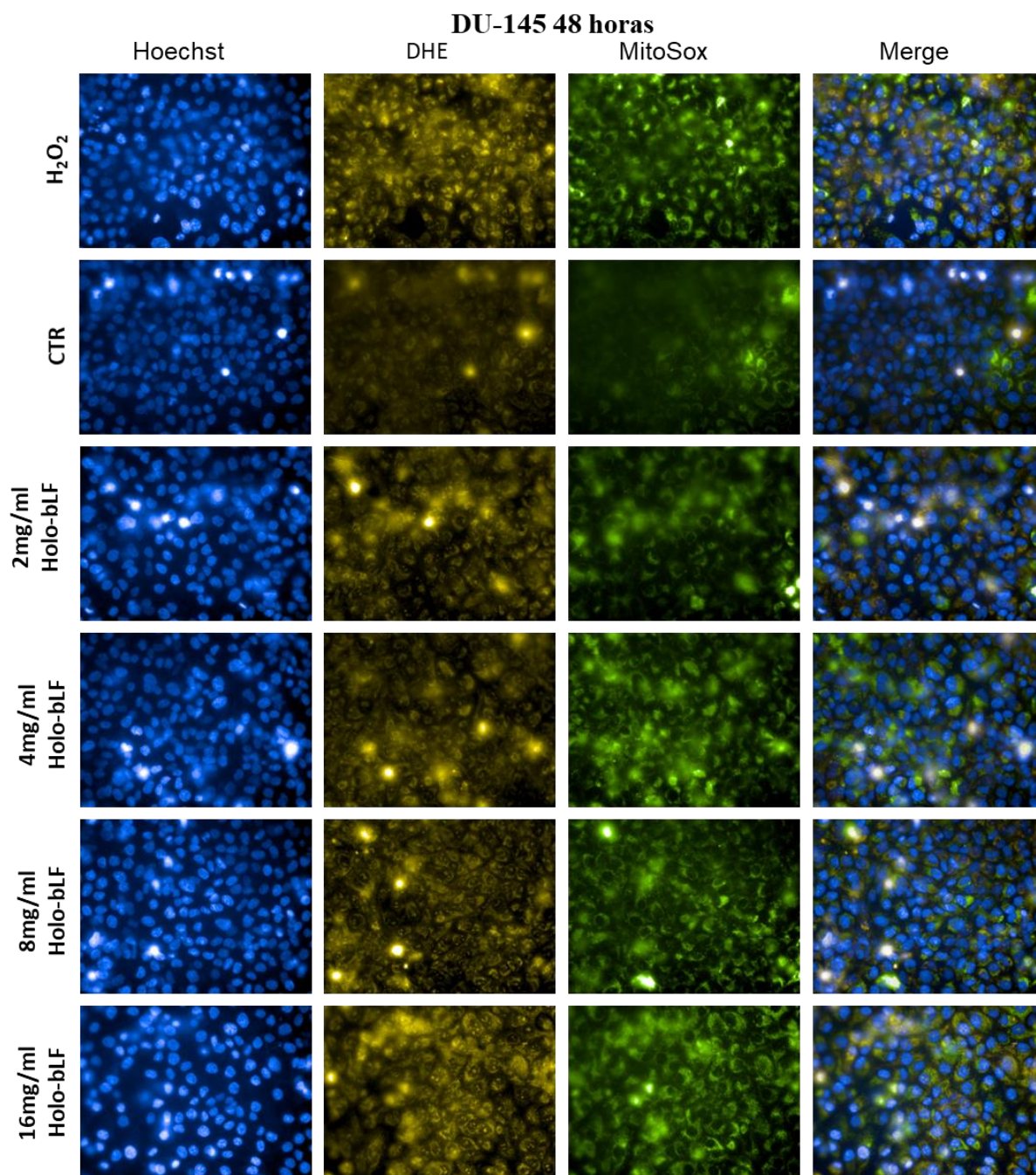


Figura 38: Imagens de estresse oxidativo em células DU-145 em 48 horas com holo-bLf. As células foram incubadas com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de Holo-bLf durante 48 horas e marcadas com DHE e Mitoracker. Foram analisadas em citômetro de fluxo.

4.2. Linhagem Celular PC-3

4.2.1. A influência da Lactoferrina bovina sobre a morfologia celular

Assim como com a linhagem DU-145, examinamos a morfologia celular para determinar se a lactoferrina bovina nas suas formas apo- e holo-bLf alteram as características morfológicas da linhagem PC-3 de câncer de próstata com metástase em osso.

Foram adquiridas imagens com aumento de magnitude de 10 e 20x, em 24 horas e 48 horas nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 10, 16, 20 e 40 mg/ml, permitindo assim, uma melhor comparação com os resultados da linhagem DU-145.

Observando as imagens da linhagem celular PC-3 com 24 horas de tratamento é possível perceber uma clara diminuição na quantidade total de células, desde a primeira concentração de apo-bLf. Além disso, há um espaço maior entre as células e um aumento de grânulos internos. Destaque para a imagem com aumento de 20x da concentração de 16mg/ml, que mostra uma célula completamente tomada por grânulos (**Figura 39**). Com 48 horas de tratamento tem-se um efeito um pouco maior, mais células soltas e maior quantidade de grânulos internos, fáceis de observar na imagem de 20x de aumento com concentração de 8mg/ml (**Figura 40**).

A **Figura 41** mostra concentrações mais elevadas de apo-bLf em 48 horas de tratamento. Nela observa-se que as células ficam mais afiladas e a quantidade de células soltas, que provavelmente estão mortas, é muito grande. Tanto que com 40mg/ml não tem quase células aderidas. Infelizmente nessas imagens a cultura estava um pouco cheia, o que dificulta a visualização dos efeitos.

Apesar da PC-3 ser uma linhagem celular de metástase em osso e a DU-145 ser uma linhagem de metástase em cérebro elas apresentaram alterações morfológicas bem similares. O aumento de grânulos, o afilamento das células e a clara diminuição na quantidade mostrou que a bLf afetou essas duas linhagens de câncer de próstata provavelmente pelo mesmo mecanismo de ação. Isto ocorreu apesar dos ambientes celulares totalmente diferentes e com características distintas.

Estas semelhanças de ação em diferentes células tumorais são muito importantes para avaliar se a lactoferrina poderá ser utilizada como uma droga antitumoral. Além disso, muitos tumores possuem a capacidade metastática possibilitando sua disseminação para diferentes tecidos. Isso corrobora a importância dos estudos com essa proteína multifuncional que pode atingir diferentes linhagens de células tumorais.

Além desse trabalho, muitos outros mostram a bLf como uma importante proteína contra diversos tipos de câncer, como câncer de pulmão, cólon, mama, estômago e outros (Ligo *et al*, 1999; Freiburghaus *et al*, 2009; Gibbons *et al*, 2015).

PC-3 24 horas

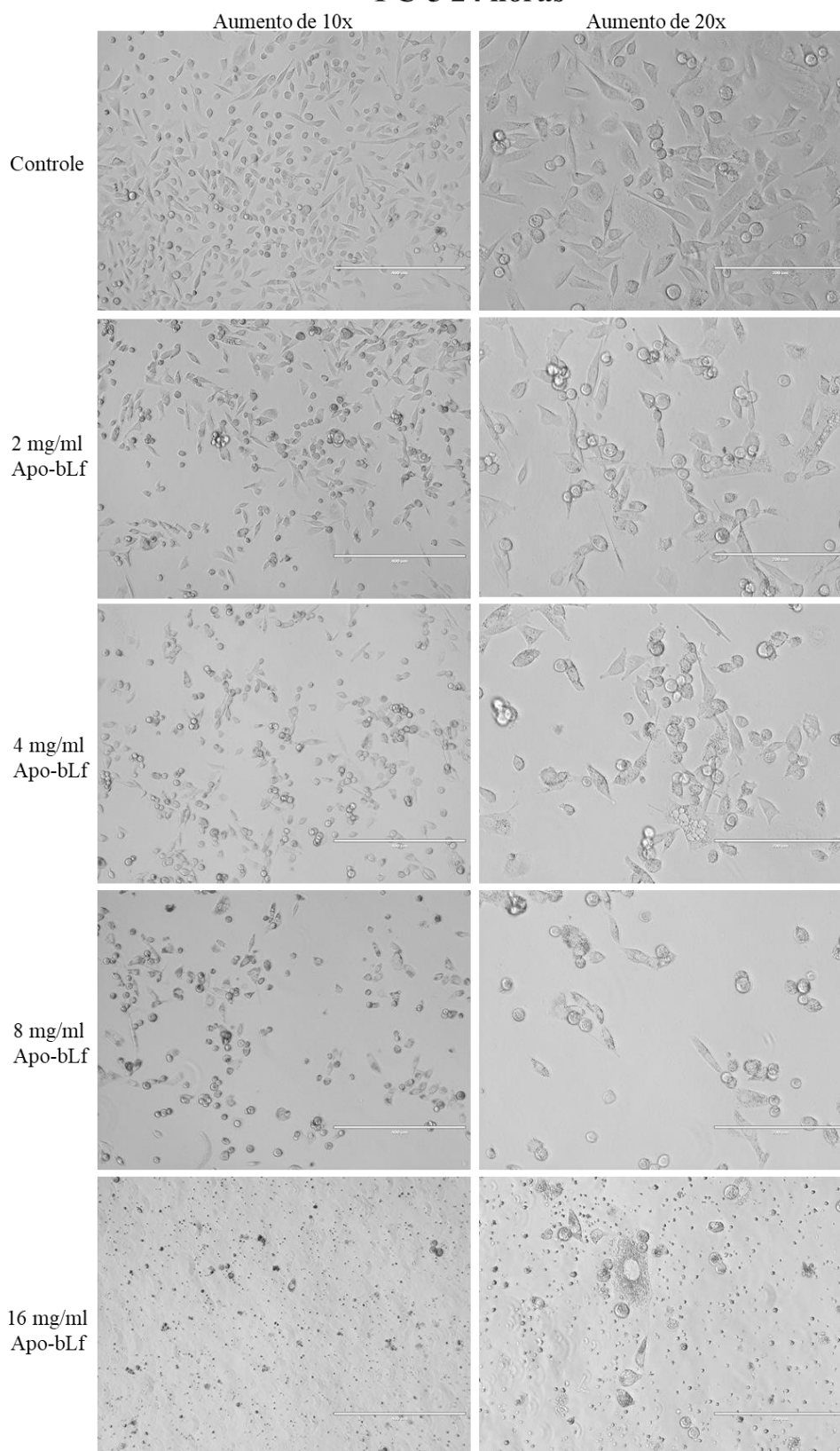


Figura 39: Influência da apo-bLf sobre a morfologia da célula PC-3 em 24 horas. Imagens selecionadas que foram tiradas pelo microscópio EVOS, nos aumentos de 10x e 20x. A linhagem PC-3 foi mantida com as concentrações 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo-bLf por 24 horas, o controle recebeu apenas meio de cultura.

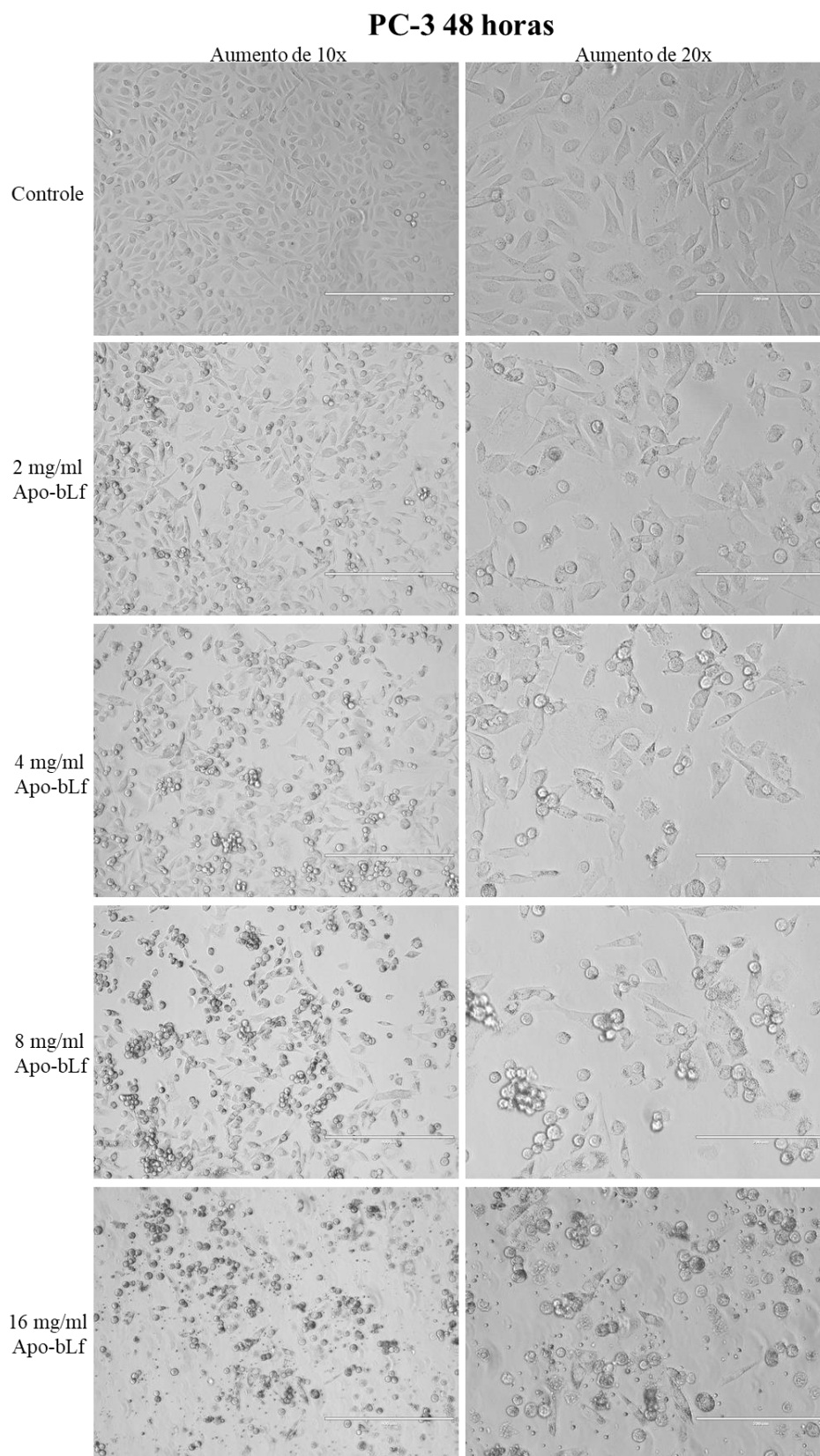
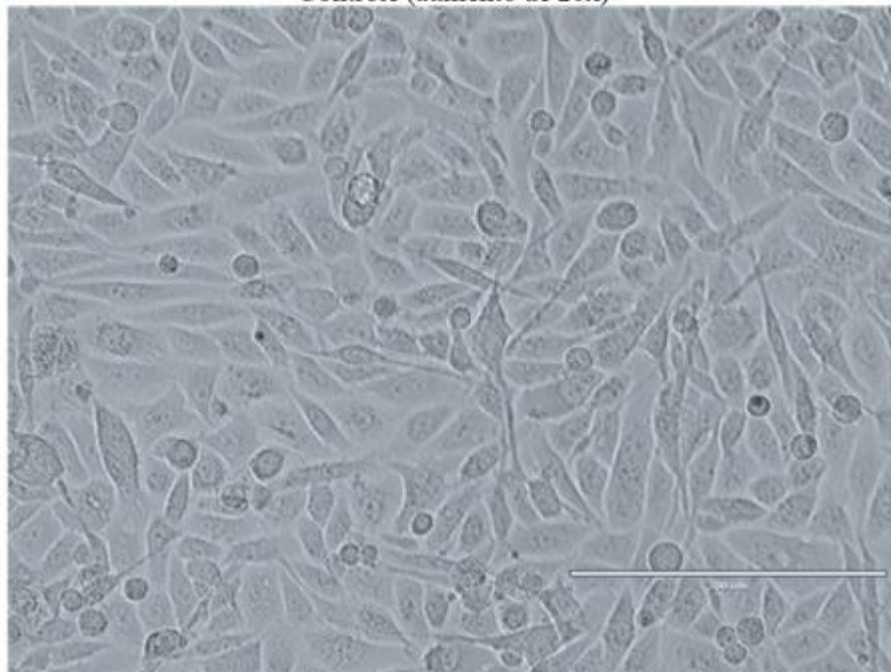


Figura 40: Influência da apo-bLf sobre a morfologia da célula PC-3 em 48 horas. Imagens selecionadas que foram tiradas pelo microscópio EVOS, nos aumentos de 10x e 20x. A linhagem PC-3 foi mantida com as concentrações 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo-bLf por 48 horas, o controle recebeu apenas meio de cultura.

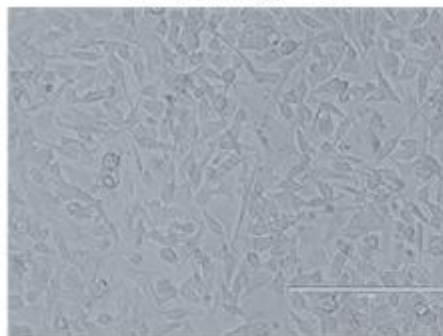
PC-3 48 horas

Controle (aumento de 20x)



1 mg/ml Apo-bLf

10 mg/ml Apo-bLf



20 mg/ml Apo-bLf

40 mg/ml Apo-bLf

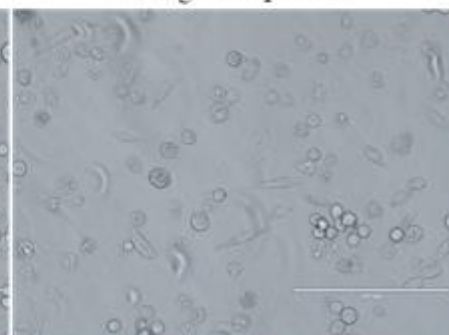
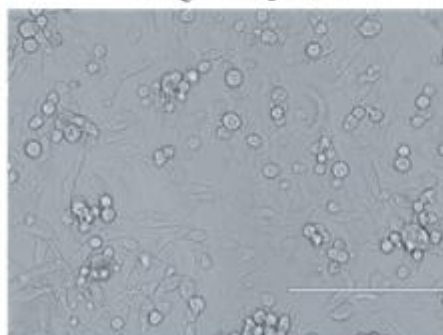


Figura 41: Influência da apo-bLf sobre a morfologia da célula PC-3.

Imagens selecionadas que foram tiradas pelo microscópio EVOS, nos aumentos de 20x. A linhagem PC-3 foi mantida com as concentrações 1, 10, 20 e 40mg/ml de apo-bLf por 48 horas, o controle recebeu apenas meio de cultura.

4.2.2. Efeito da Lactoferrina bovina sobre a viabilidade celular

4.2.2.1. Ensaio de MTT

A redução da viabilidade celular no ensaio de MTT após o tratamento da apo-bLf é observada desde as primeiras concentrações, principalmente com 48 horas de tratamento, chegando a quase 100% com 40 mg/ml de apo-bLf (**Figura 42**). Pode-se observar que, em 48 horas, com 5 e 10 mg/ml ocorre uma queda na toxicidade. Isto pode ser explicado porque algumas drogas apresentam efeitos diferentes em diferentes concentrações (**Figura 42**).

Quando comparados com os resultados da linhagem DU-145, pode-se observar as mesmas quedas na toxicidade. Isso contribui para a hipótese de que em concentrações de 10 mg/ml a apo-bLf pode apresentar efeitos diferentes das outras concentrações. Isto pode ser explicado pela indução da proliferação celular, mas não um efeito tóxico com morte celular.

Na **Figura 43** pode-se observar o efeito das concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de bLf na citotoxicidade. Nessas concentrações temos um alto efeito de toxicidade com 16 mg/ml em 48 horas, com quase 90% de citotoxicidade. Mesmo sendo resultados preliminares, a comparação com os resultados da célula DU-145 demonstra grande similaridade.

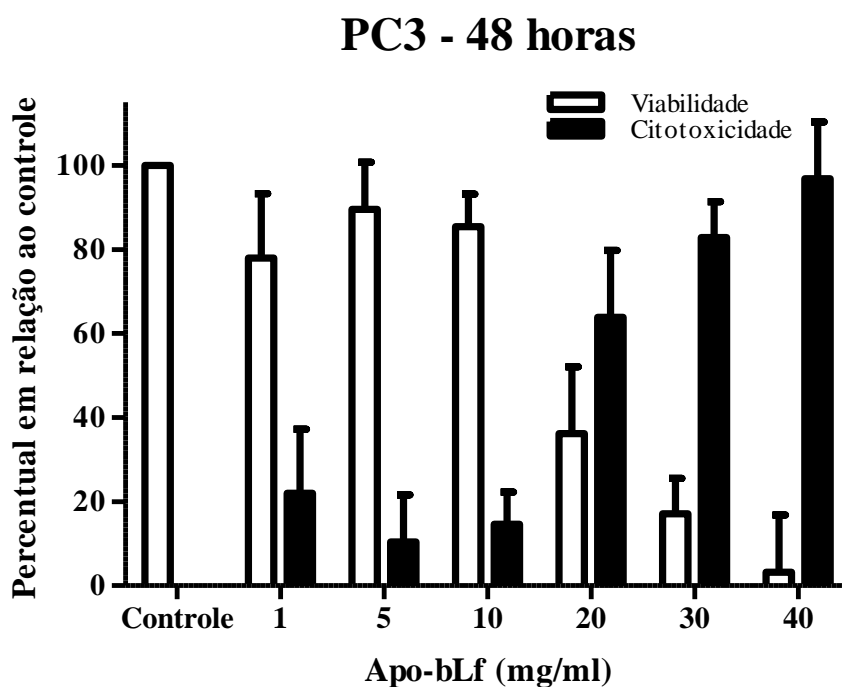
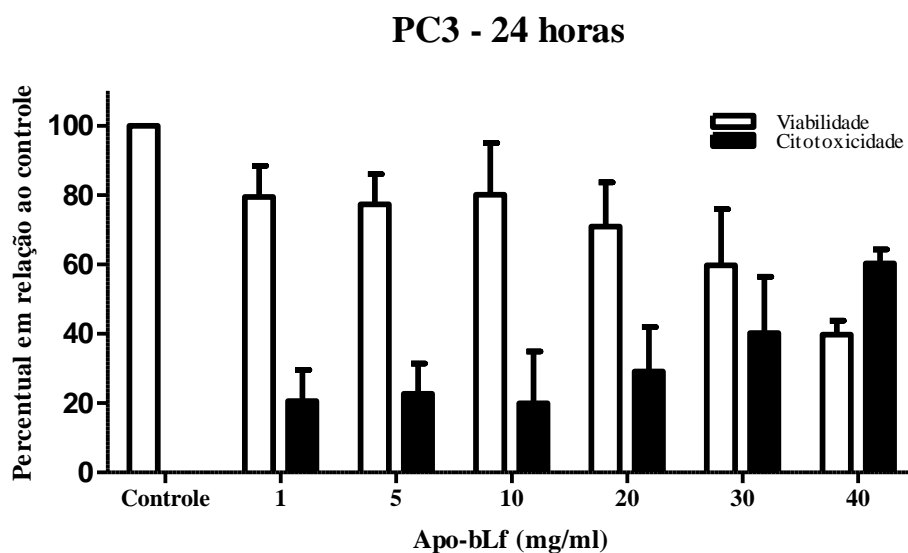
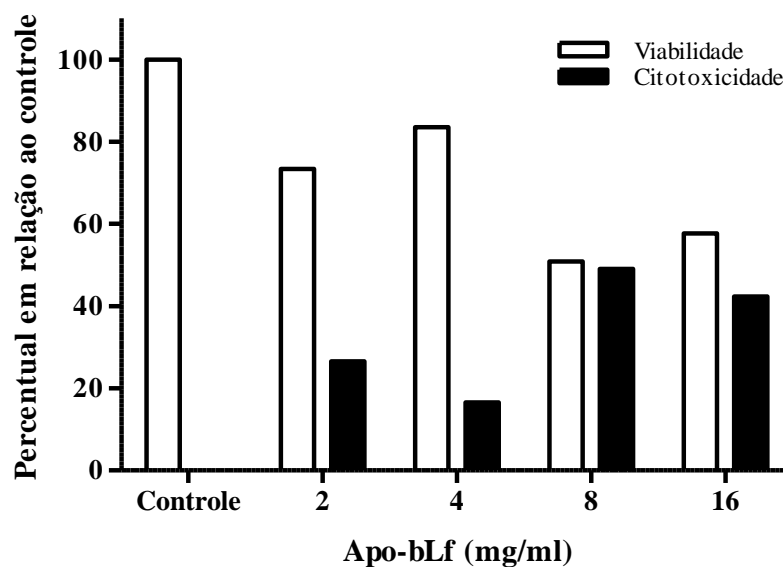


Figura 42: Viabilidade celular por MTT da célula PC-3 com concentrações de 1 até 40mg/ml de apo-bLf.

As células da linhagem PC-3 foram tratadas durante 24 e 48 horas com concentrações de 1 à 40mg/ml de apo-bLf. No controle negativo foi utilizado meio de cultura e no controle positivo triton X-100 a 0,1%. O gráfico foi feito de acordo com o percentual em relação ao controle negativo sendo 100%. Esses experimentos foram realizados, pelo menos, 3 vezes. Para análise estatística dos dados, foi utilizado o desvio padrão da média.

PC-3 24 horas



PC-3 48 horas

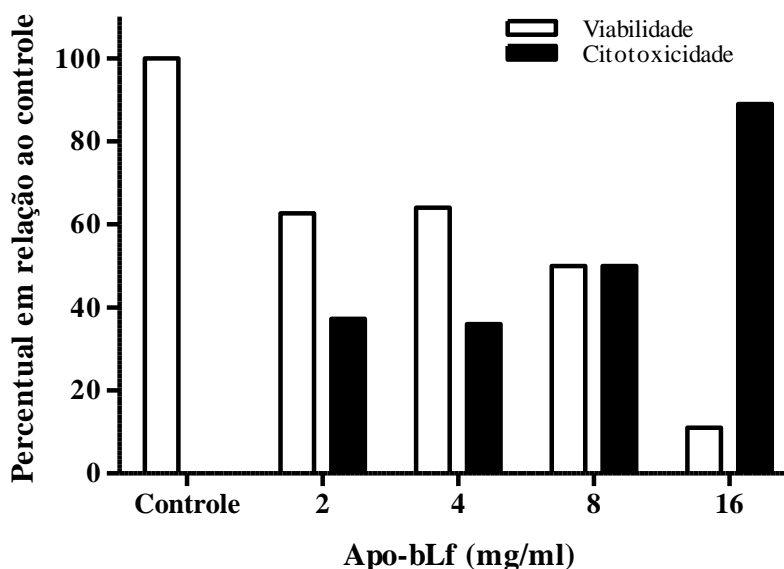


Figura 43: Viabilidade celular por MTT da célula PC-3.

As células da linhagem PC-3 foram tratadas durante 24 e 48 horas com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo-bLf. No controle negativo foi utilizado meio de cultura e no controle positivo triton X-100 a 0,1%. O gráfico foi feito de acordo com o percentual em relação ao controle negativo sendo 100%.

4.2.2.2. Ensaio de contagem por azul de tripan

Através do ensaio de contagem com o azul de tripan pode-se corroborar os resultados obtidos com o ensaio de MTT. Observando que em 48 horas a apo-bLf demonstrou um efeito citotóxico maior e que se apresenta de forma crescente em

relação as concentrações da proteína. Com 16 mg/ml a viabilidade celular cai para quase zero %. Já com 24 horas de tratamento os dados demonstram um aumento da viabilidade nas concentrações de 4 e 8 mg/ml. Embora esses dados tenham que ser repetidos. Isso pode se assemelhar ao efeito que é visto na concentração de 4 mg/ml em 24 horas (**Figura 44**).

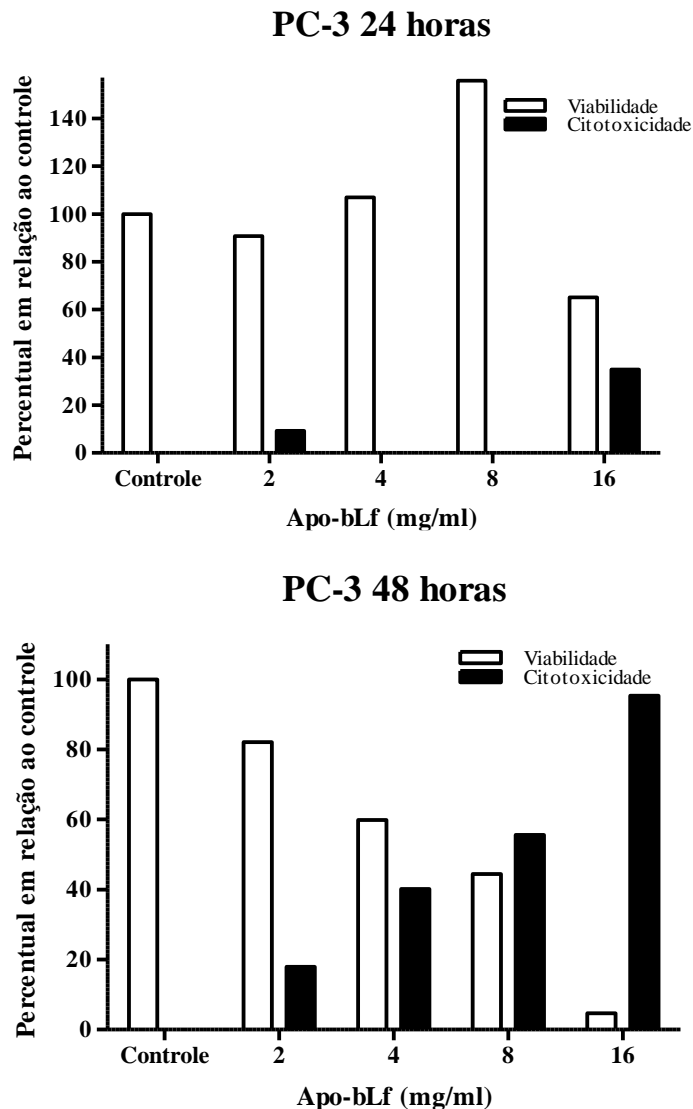


Figura 44: Viabilidade celular por contagem na célula PC-3.

As células da linhagem PC-3 foram tratadas durante 24 e 48 horas com concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg/ml de apo-bLf. No controle negativo foi utilizado meio de cultura. O ensaio foi realizado através da contagem diferencial de células coradas com o corante azul de tripan. O gráfico foi feito de acordo com o percentual em relação ao controle negativo sendo 100%.

4.2.3. Efeito da Lactoferrina bovina sobre a proliferação celular

O ensaio de proliferação foi realizado com a marcação pelo composto Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE). Este composto é usado para ensaios de proliferação porque ele internaliza na célula e conforme essa se divide ele tem a sua intensidade de fluorescência diminuída pela metade. Esta característica torna possível rastrear quais populações tiveram mais ou menos divisões celulares e identificar se a proliferação muda ou não de acordo com o controle.

A **Figura 45** demonstra que o controle apresentou um número maior de divisões celulares, uma vez que tem a menor intensidade de fluorescência, quando comparado com os tratados. Logo, conclui-se que todas as concentrações do tratamento com a apo-bLf diminuíram a proliferação celular da linhagem PC-3. Sendo uma diminuição mais evidente com 1 mg/ml. Para entender melhor essa diferença teria que ser feito mais experimentos.

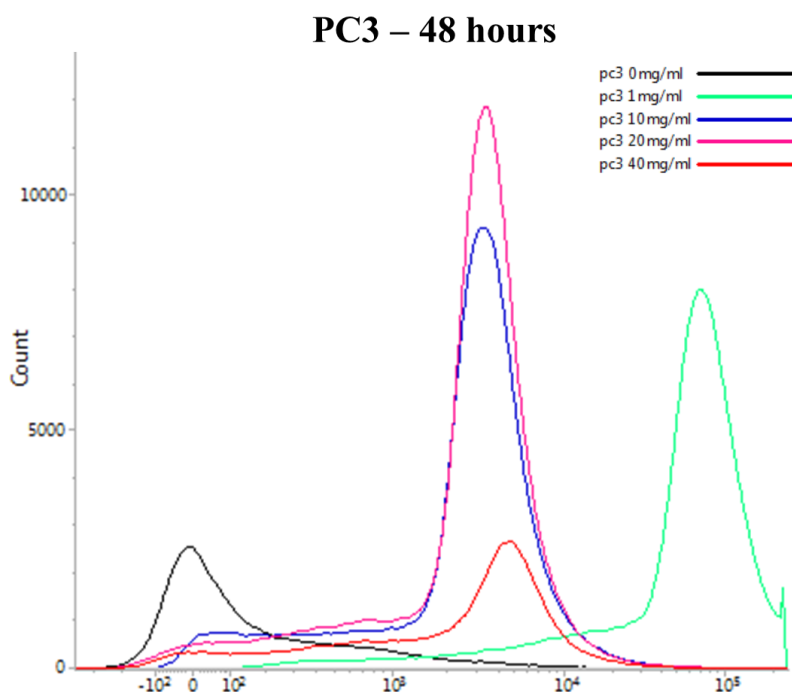


Figura 45: Proliferação celular da célula PC-3.

Ensaio de proliferação feito com a marcação pelo composto CFSE. As células da linhagem PC-3 foram incubadas com concentrações 1, 10, 20 e 40 mg/ml de apo-bLf durante 48 horas. O controle tem 0 mg/ml da proteína, ou seja, apenas meio de cultura.

4.2.4. Efeito da Lactoferrina bovina sobre a progressão do ciclo celular

Com a análise do ciclo celular podemos identificar que o tratamento com a apo-bLf aumenta a morte celular, na linhagem PC-3, de acordo com o aumento da concentração. Por causa do aumento do primeiro pico que aparece, ele indica os restos celulares. Na concentração de 40 mg/ml a célula já está com a sua população quase toda destruída. Temos uma diminuição dos picos da fase G₀/G₁ e um possível aumento das células na fase S (**Figura 46**). Para concluir com mais certeza precisaríamos repetir o experimento.

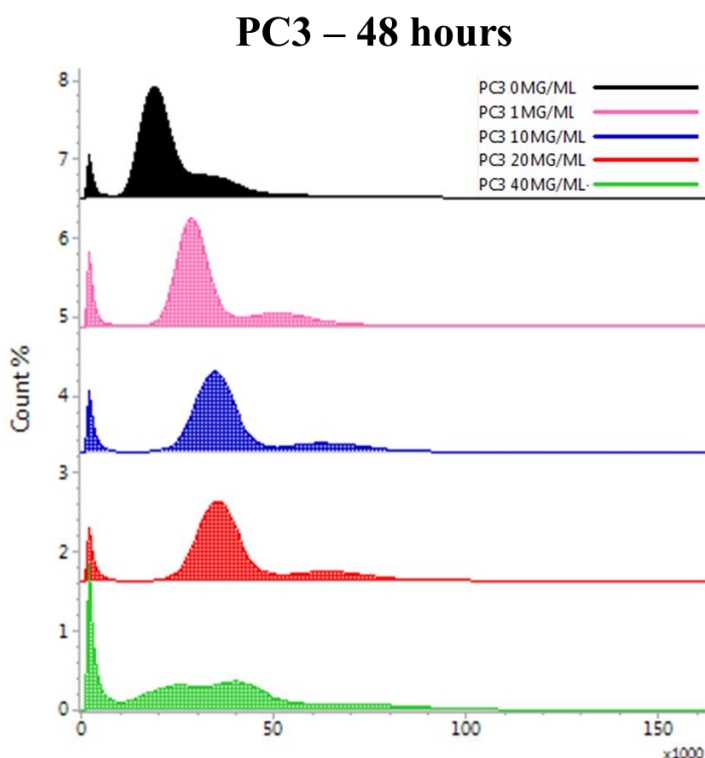


Figura 46: Ciclo celular em células da linhagem PC-3.

Representação do ciclo celular. As células da linhagem PC-3 foram tratadas durante 48 horas com concentrações de 1, 10, 20 e 40 mg/ml de apo-bLf. No controle foi utilizado meio de cultura. As células foram marcadas com a solução de Vindelov e analisadas através de Citometria de fluxo.

4.2.5. Efeito da Lactoferrina bovina sobre o processo de apoptose

Como já foi visto, na célula PC-3, a bLf é citotóxica e diminui a viabilidade celular. Por isso, foi necessário realizar um ensaio de apoptose. Com ele pode-se

descobrir indícios do mecanismo de morte celular induzido, em caso de morte por apoptose (Figura 47 e 48).

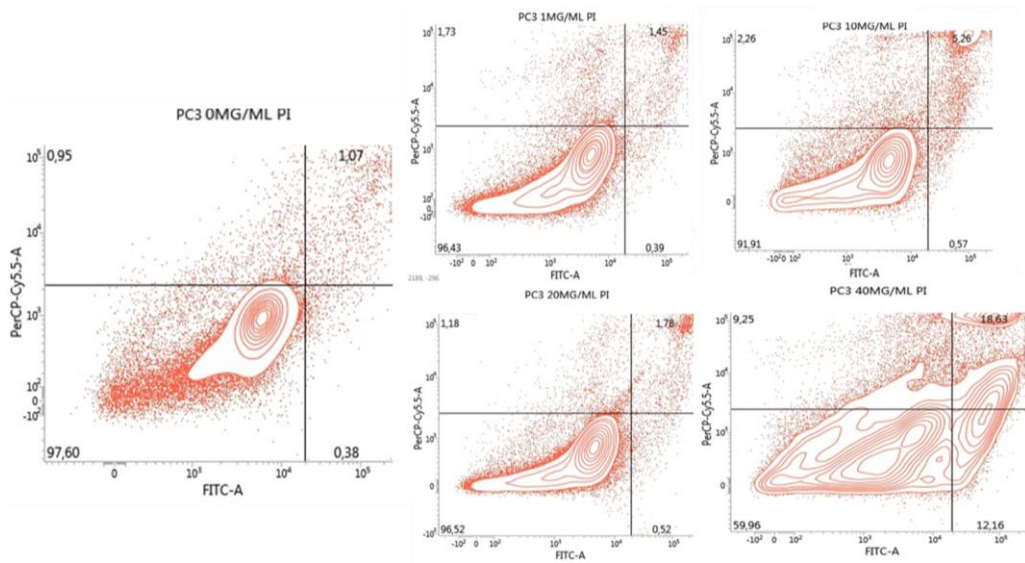


Figura 47: Ensaio de apoptose em células PC-3.

As células da linhagem PC-3 foram incubadas com concentrações de 1, 10, 20 e 40 mg/ml de apo -bLf durante 48 horas e marcadas com anexina V e iodeto de propídio. O controle recebeu apenas meio de cultura. Foram analisadas em citômetro de fluxo.

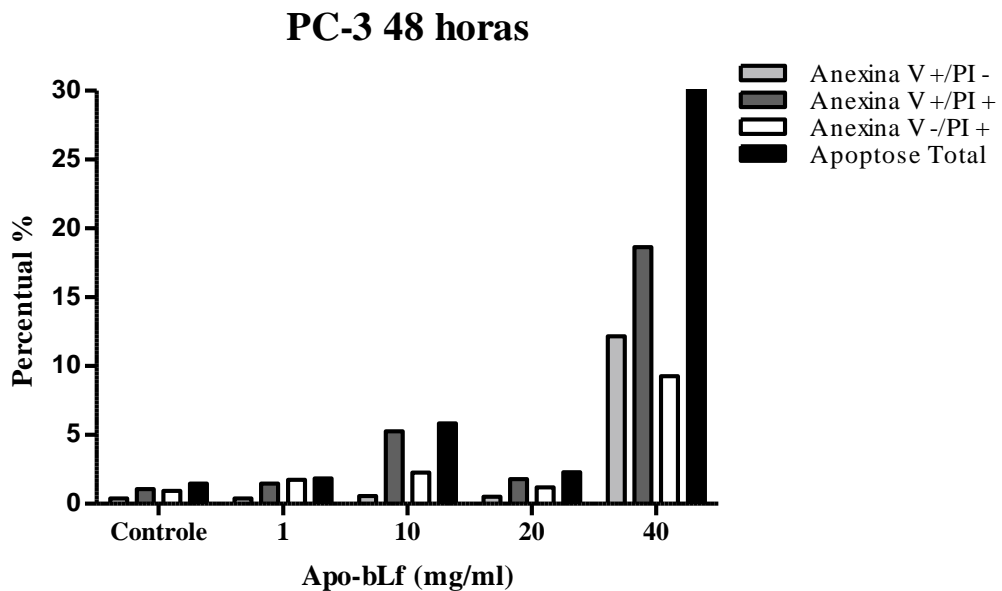


Figura 48: Quantificação de apoptose em células PC-3.

As células da linhagem PC-3 foram incubadas com concentrações de 1, 10, 20 e 40 mg/ml de apo -bLf durante 48 horas e marcadas com anexina V e iodeto de propídio. O controle recebeu apenas meio de cultura. Foram removidas do gráfico os resultados das células viáveis para melhor visualização. Foram analisadas em citômetro de fluxo.

A PC-3 apresenta um aumento da quantidade de células em apoptose total (Apoptose tardia + apoptose inicial), principalmente na concentração de 40 mg/ml. Nessa concentração a apo-bLf induz um aumento de quase 30 vezes mais de apoptose total em relação ao controle (**Figura 47 e 48**).

Ou seja, a apo-bLf tem um efeito antitumoral que provavelmente induz a morte celular por apoptose em células PC-3 com 40 mg/ml e em 48 horas de tratamento. Esse resultado precisa ser refeito para melhor comprovação. Porém quando acrescido dos demais resultados fica mais fácil a compreensão.

Analisando o conjunto dos resultados, pode-se afirmar que a bLf tem um efeito antitumoral em células da linhagem DU-145 e PC-3 de câncer de próstata. Isto pode ser verificado desde as alterações morfológicas mostradas nas imagens adquiridas com o microscópio EVOS. As imagens mostram que as células tratadas têm uma forma mais alongada, células mais espaçadas e um aumento de grânulos internos.

Na literatura, alguns trabalhos mostram a ação da bLf na morfologia celular de maneira similar aos resultados apresentados nesta dissertação. Estudos mostram que a bLf é citotóxica para células de câncer de pulmão e de leucemia, e induz alterações morfológicas similares, como o espaçamento entre as células e a forma mais alongada. Além disso, os resultados dos dois tipos de ensaio de viabilidade celular mostram que a bLf também reduz significativamente a viabilidade nas duas linhagens estudadas. Corroborando com os resultados encontrados na literatura (Tung *et al*, 2013; Roy *et al*, 2002).

Neste trabalho, a bLf induz o arresto na fase G_0/G_1 do ciclo celular, a diminuição da proliferação e a indução de apoptose em linhagens de câncer de próstata. A Lactoferrina já é mostrada, por alguns trabalhos, como sendo responsável pelo arresto do ciclo celular nas fases G_0/G_1 nas células de câncer, tanto a forma humana como a bovina (Xiao *et al*, 2004; Zhang *et al*, 2014).

Os experimentos de ciclo celular, proliferação celular e apoptose estão relacionados à cinética do crescimento celular e neoplásico. Por isso são de suma importância para esse trabalho. Assim, foi possível entender um pouco mais como são os efeitos que a bLf induz nas células de câncer de próstata.

Nas análises das ROS, foi possível perceber que o tratamento da bLf aumentou suas quantidades significativamente. Na literatura a bLf já mostrou ter o mesmo efeito em células de leucemia, induzindo a apoptose nessas células (Yoo *et al*, 1997).

Foram verificadas diferenças quando comparados os resultados que mostram grande ativação das caspases 3/7 com os resultados de marcação de anexina V/PI, em que não foi possível observar um aumento significativo de apoptose total. Embora ainda seja necessário repetir esses experimentos, essas diferenças podem ser explicadas pela atuação das caspases efetoras no processo de apoptose.

De acordo com o trabalho de Mariño & Kroemer (2013), as caspases-3 e -7 são responsáveis por clivar a proteína Xkr8, que ao ser ativada induz a inversão da fosfatidilserina para membrana externa. Portanto, a externalização da fosfatidilserina é dependente da atuação das caspases efetoras. Por isso é possível observar um aumento nas caspases ativadas 3/7 sem ocorrer a externalização da fosfatidilserina nas células DU-145.

Assim, o mecanismo de ação da atividade antitumoral da bLf ainda precisa ser mais estudado e entendido. Porém, em células das linhagens DU-145 e PC-3, essa proteína altera morfologicamente as células, reduz a viabilidade celular, causa um arresto na fase G₀/G₁ do ciclo celular, aumenta os níveis de ROS e, corroborando com todos os resultados anteriores, aumenta os níveis de caspases 3/7, o que indica indução da morte celular através do processo de morte celular programada, apoptose.

5. Conclusão

Com base nos resultados obtidos nesta dissertação podemos concluir que:

- A Lactoferrina bovina alterou a morfologia celular das linhagens DU-145 e PC-3 nas formas apo- e na forma holo-bLf na linhagem DU-145;
- A viabilidade celular, nos ensaios de MTT e contagem por azul de tripan das linhagens estudadas foi reduzida pelo tratamento com a bLf de uma forma dose e tempo-dependente. A holo-bLf mostrou uma maior capacidade em diminuir a viabilidade celular;
- As linhagens DU-145 e PC-3 sofreram um arresto nas fases G_0/G_1 do ciclo celular. O efeito no ciclo celular é mais claro na célula DU-145;
- A linhagem PC-3 teve sua proliferação celular diminuída e a um aumento na atividade apoptótica com o tratamento da apo-bLf em 48 horas;
- A apo-bLf e holo-bLf induzem a apoptose em células da linhagem DU-145, a partir da quantificação de caspase3/7 ativadas. Mais uma vez a forma holo da bLf mostrou-se mais efetiva;
- Na linhagem DU-145 houve um aumento do estresse oxidativo com o tratamento de apo- e holo-bLf;

Com isso, pode-se concluir que os tratamentos com a lactoferrina bovina, nas formas apo- e holo-bLf tiveram um efeito antitumoral nas linhagens de câncer de próstata, DU-145 e PC-3. Importante ressaltar também que a forma holo foi mais eficiente na atividade antitumoral. A ligação de ferro na bLf foi provavelmente a responsável por essa diferença. Contudo, uma investigação mais detalhada é necessária para endereçar melhor esta questão e outros mecanismos celulares ativados pela lactoferrina.

6. Bibliografia

Albayrak, G.; Konac, E.; Dikmen A.U.; Bilen, C.Y. **Memantine induces apoptosis and inhibits cell cycle progression in LNCaP prostate cancer cells.** Hum Exp Toxicol. 2018 Sep;37(9):953-958. doi: 10.1177/0960327117747025. 2017.

American Cancer Society. **The History of Cancer.** <<https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer.html>>. Acessado em 09 de janeiro de 2019.

Andersen, J.H.; Jenssen, H.; Sandvik, K.; Tore, J. Gutteberg. **Anti-HSV Activity of Lactoferrin and Lactoferricin is Dependent on the Presence of Heparan Sulphate at the Cell Surface.** Journal of Medical Virology, 74:262–271, 2004.

Baker, E. N.; Baker, H.M. **A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin.** Biochimie, 91(1):3-10, 2008.

Bokkhim, H. **Physico-chemical properties of different forms of bovine lactoferrin.** Food Chemistry 2013.

Carvalho, C.A.; Sousa I.P. Jr.; Silva, J.L.; Oliveira, A.C.; Gonçalves, R.B.; Gomes, A.M. **Inhibition of Mayaro virus infection by bovine lactoferrin.** Virology, 452-453:297-302, 2014.

Chea, C.; Miyauchi, M.; Inubushi, T.; Ayuningtyas, N.F.; Subarnbhesaj, A.; Nguyen, P.T.; Shrestha, M.; Having, S.; Ohta, K.; Takata, T. **Molecular mechanism of inhibitory effects of bovine lactoferrin on the growth of oral squamous cell carcinoma.** PLoS One. 2018 Jan 30;13(1):e0191683. doi: 10.1371/journal.pone.0191683. eCollection 2018.

Chien, Y.J.; Chen, W.J.; Hsu, W.L.; Chiou, S.S. **Bovine lactoferrin inhibits Japanese encephalitis virus by binding to heparan sulfate and receptor for low density lipoprotein.** Virology, 379:143–151, 2008.

Di Biase, A.M. et al. **Heparin-Interacting Sites of Bovine Lactoferrin Are Involved in Anti-Adenovirus Activity.** Journal of Medical Virology. 69: 495-502, 2003.

Diehl, J. A. **Cycling to cancer with cyclin d1.** Cancer Biol Ther. 1, 226-231. 2002.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al: **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** Int J Cancer 136, E359–E386, 2015.

Freiburghaus, C.; Janicke, B.; Lindmark-Mansson, H.; Oredsson, S.M.; Paulsson, M.A. **Lactoferricin treatment decreases the rate of cell proliferation of a human colon cancer cell line.** J Dairy Sci. 92:2477–84. 2009.

Furini, A.A.C.; Silva, F.A.; Santos, F.C.B.; Sanches, M.H.; Machado, R.L.D. **Serum level of prostate specific antigen in users of a clinical laboratory of Novo Horizonte, São Paulo.** Revista Brasileira de Análises Clínicas. DOI: 10.21877/2448-3877.201600526. 2016.

Ghabili, K.; Tosoian, J.J.; Schaeffer, E.M.; Pavlovich, C.P.; Golzari, S.E.J.; Khajir, G.; Andreas, D.; Benzon, B.; Vuica-Ross, M.; Ross, A.E. **The History of Prostate Cancer from Antiquity: Review of Paleopathological Studies.** Urology 97, 2016.

Gibbons, J. A.; Kanwar, J.R. and Kanwar, R. K. **Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast câncer.** BMC Cancer. 15: 425. DOI 10.1186/s12885-015-1441-4. 2015.

Gifford, J.L.; Hunter, H.N.; Vogel, H.J. **Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties.** Cell Mol Life Sci. 62(22): 2588-98, 2005.

GLOBOCAN 2018 – Global Cancer Observatory. Disponível em:<<http://gco.iarc.fr>>. Acessado em: 09 de janeiro de 2019.

Green M.R.; Pastewka J.V. **Lactoferrin is a marker for prolactin response in mouse mammary explants.** Endocrinology, 103, 1510–1513, 1978.

Groves, M.L. **The Isolation of a Red Protein from Milk.** J. Am. Chem. Soc., DOI: 10.1021/ja01498a029. 82 (13), pp 3345–3350. 1960.

Guedes, J.P.; Pereira, C.S.; Rodrigues, L.R. and Côrte-Real, M. **Bovine Milk Lactoferrin Selectively Kills Highly Metastatic Prostate Cancer PC-3 and Osteosarcoma MG-63 Cells In Vitro.** Front. Oncol. 8:200. doi: 10.3389/fonc.2018.00200. 2018.

ligo, M.; Kuhara, T.; Ushida, Y.; Sekine, K.; Moore, M.A.; Tsuda, H. **Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice.** Clin Exp Metastasis.;17:35–40. 1999.

Instituto Nacional do Câncer. **O que é cancer?** Atualizado em outubro de 2018. Disponível em:<<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>> Acessado em 09 de janeiro de 2019.

Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa para 2018 para os tipos de câncer do Brasil.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>> Acessado em 2018.

Kaighn, M.E.; Narayan, K.S.; Ohnuki, Y.; Lechner, J.F.; Jones, L.W. **Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).** Invest. Urol. 17: 16-23, 1979.

Kanwar R. K, Kanwar J. R. **Immunomodulatory lactoferrin in the regulation of apoptosis modulatory proteins in cancer.** Protein Pept Lett, 20:450–8, 2013.

Khosravi-Far, R.; Lockshin, R.A.; Zakeri, Z. **Programmed Cell Death: general principles for studying cell.** Methods in enzymology, vol. 442; 2008.

Lievore, P. **Caracterização do leite ácido e na elaboração de leite fermentado.** Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2013. 76f. Dissertação (Mestrado Em Ciência E Tecnologia De Alimentos – Área De Concentração: Ciências E Tecnologia De Alimentos), 2013.

Lönnerdal, B. & Iyer, S. **Lactoferrin: molecular structure and biological function.** Annu Rev Nutr.,15:93–110,1995.

Mariño, G. & Kroemer, G. **Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure** Cell Research. 23:1247-1248. doi:10.1038/cr.2013.115; published online 27 August 2013.

Mironov, S.L.; Ivannikov, M.V.; Johansson, M. **[Ca²⁺]_i signaling between mitochondria and endoplasmic reticulum in neurons is regulated by microtubules.** From mitochondrial permeability transition pore to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. J Biol Chem, 280:715-721, 2005.

Moore, S. A. et al. **Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution.** J. Mol Biol. 274: 222-236, 1997.

Mosmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J. Immunol. Methods. 65, 55-63, 1983.

Nacional Cancer Institute. **What is cancer?** Atualizado em fevereiro de 2015. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>> Acessado em 09 de janeiro de 2019.

NICE – National Institute for Health and Care Excellence. **Guideline Suspected cancer: recognition and referral.** Published: 23 June 2015. Disponível em: <<https://www.nice.org.uk/guidance/ng12>>. Acessado em: 18 de março de 2019.

Nunzio C., Kramer G., Marberger M., Montironi R., Nelson W., Schröder F., Sciarra A. & Tubaro A. **The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation.** Eur. Urol. 60, 106-117, 2011.

Organização Mundial da Saúde. **World Health Organization (WHO).** Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/en/>>. Acessado em 09 de janeiro de 2019, 2018.

Queiroz, V.A.O.; Assis, A.M.; Junior, H.C.R. **Efeito protetor da lactoferrina humana no trato gastrintestinal.** Rev. Paul. Pediatr., 31(1):90-5, 2013.

Ross S.A. & Davis C.D. **MicroRNA, nutrition, and cancer prevention.** Adv. Nutr. 2, 472-485, 2011.

Roy, M.K.; Kuwabara, Y.; Hara, K.; Watanabe, Y and Tamai, Y. **Peptides From the N-terminal End of Bovine Lactoferrin Induce Apoptosis in Human Leukemic (HL-60) Cells.** J. Dairy Sci. 85:2065–2074 © American Dairy Science Association, 2002.

Shankaranarayanan, J.S.; Kanwar, J.R.; AL-Juhaishi, A.J.A. and Kanwar, R.K. **Doxorubicin conjugated to immunomodulatory anticancer lactoferrin displays improved cytotoxicity overcoming prostate cancer chemo-resistance and inhibits tumour development in tramp mice.** Sci. Rep. 6, 32062; doi: 10.1038/srep32062, 2016.

Shen M.M. & Abate-Shen C. **Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges.** Genes Dev. 24, 1967-2000, 2010.

Shimazaki, K.; Kamio, M.; Nam, M.S.; Harakawa, S.; Tanaka, T.; Omata, Y.; Saito, A.; Kumura, H.; Mikawa, K.; Igarashi, I. and Suzuki, N. **Structural and Immunochemical Studies on Bovine Lactoferrin Fragments**. 1998.

Siegel R., Naishadham D. & Jemal A. **Cancer statistics, 2012**. C.A. Cancer J. Clin. 62, 10-29, 2012.

Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. **Cancer Statistics**. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 68:7–30, 2018.

Soerensen, M.; Soerensen, S.P.L. **The protein in whey**. C R Trav Lab Carlsberg, 23:55-99, 1939.

Srougi M. & Simon S.D. (Eds.): **Câncer urológico**, 2nd ed. Ed. Platina, São Paulo, Brasil, 1996.

Stone, K.R.; Mickey, D.D.; Wunderli, H.; Mickey, G.H.; Paulson, D.F. **Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)**. Int. J. Cancer 21: 274-281, 1978.

Sudhakar, A. **History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods**. J Cancer Sci Ther. December 1; 1(2): 1–4. doi:10.4172/1948-5956.100000e2. NI, 2009.

Terese Winslow LLC. **Medical and Scientific Illustration**. 2019. Disponível em: <<https://www.teresewinslow.com/>>. Acessado em 09 de janeiro de 2019.

Tomita, M.; Wakabayashi, H.; Shin, K.; Yamauchi, K.; Yaeshima, T.; Iwatsuki, T. **Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications**. Biochimie, 91(1):52-7, 2009.

Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J. & Jemal, A. **Global Cancer Statistics, 2012**. CA Cancer Journal; 65:87–108. 2015.

Tsuda, H.; Sekine, K.; Ushida, Y.; Kuhara, T.; Takasuka, N.; Iigo, M.; Han, B.S.; Moore, M.A. **Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin**. Mutation Research 462 227–233 Ž. 2000.

Tung, Y.; Chen, H.; Yen, C.; Lee, P.; Tsai, H.; Lin, M. and Chen, C. **Bovine lactoferrin inhibits lung cancer growth through suppression of both inflammation and expression of vascular endothelial growth factor**. J. Dairy Sci. 96 :2095–2106. 10.3168/jds.2012-6153. American Dairy Science Association, 2013.

Vindelov L.L. **Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei.** Virchows Arch. B. Cell Pathol. 24, 227-242, 1977.

Voguel, H.J. **Lactoferrin, a bird's eye view.** Biochem. Cell. Biol., 90: 233-44, 2012.

Wakabayashi, H., Yamauchi, K., & Takase, M. **Lactoferrin research, technology and applications.** International Dairy Journal, 16, 1241–1251 2006.

Xiao, Y.; Monitto, C.L.; Minhas, K.M. and Sidransky, D. **Lactoferrin Down-Regulates G1 Cyclin-Dependent Kinases during Growth Arrest of Head and Neck Cancer Cells.** Clinical Cancer Research. Vol. 10, 8683– 8686, December 15, 2004.

Yoo, Y.C.; Watanabe, R.; Koike, Y.; Mitobe M.; Shimazaki, K.; Watanabe, S.; Azuma, I. **Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species.** Biochem Biophys Res Commun. Aug 28;237(3):624-8. 1997.

Yu, C.; Cao, H.; He, X.; Sun, P.; Feng, Y.; Chen, L.; Gong, H. **Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3) plays a critical role in prostate cancer via regulating cell cycle and DNA replication signaling.** Biomed Pharmacother. Dec; 96:1109-1118. doi: 10.1016/j.biopha.2017.11.112. 2017.

Zhang, Y.; Nicolau, A.; Lima, C.F.; Rodrigues, L.R. **Bovine lactoferrin induces cell cycle arrest and inhibits mTOR signaling in breast cancer cells.** Nutri Cancer. 2014;66(8):1371-85. doi: 10.1080/01635581.2014.956260. 2014.