



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

Ativação da apoptose mediada por Lactoferrina Bovina (bLf) em células Vero

Matheus Augusto Patricio de Almeida

Orientador: Rafael Braga Gonçalves

Co-orientador: Carlos Alberto Marques de Carvalho

Rio de Janeiro,
07 de junho de 2019

Matheus Augusto Patricio de Almeida

**Ativação da apoptose mediada por Lactoferrina Bovina
(bLf) em células Vero**

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: Carlos Alberto Marques de Carvalho

Rio de Janeiro,
07 de junho de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Matheus Augusto Patricio.

B277 Ativação da apoptose mediada por lactoferrina bovina em células Vero / Matheus Augusto Patricio de Almeida. -- Rio de Janeiro, 2019.
p.68

Orientador: Rafael Braga Gonçalves.

Coorientador: Carlos Alberto Marques de Carvalho

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

1.Lactoferrina bovina 2.Apoptose 3.Células Vero

I. Gonçalves, Rafael, orient. II. Carvalho, Carlos Alberto Marques, coorient.
III. Título

Matheus Augusto Patricio de Almeida

**Ativação da apoptose mediada por Lactoferrina Bovina (bLf) em
células Vero**

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:

- Rafael Braga Gonçalves (PPGBMC/UNIRIO)
- Pablo Trindade (PPGBMC/UNIRIO)
- Ísis Moraes Ornelas Carlétti (IDOR)
- Cassiano Felipe G. de Albuquerque (PPGBMC/UNIRIO)
- Theo Luiz Ferraz de Souza (UFRJ)

"Ser biólogo não é trabalho, é um modo de vida."
(Ernst Mayr)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom de poder fazer ciência. Por ter a saúde de chegar até aqui. Por muitos momentos me faltaram forças para seguir e sei que foi Ele quem me segurou. "Estou persuadido de que aquele que iniciou em vós esta obra excelente lhe dará o acabamento até o dia de Jesus Cristo" (Filipenses 1, 6).

Agradeço aos meus pais, Jorge e Ana, toda a educação que me foi dada, por trabalharem tão duro e me deixar seguir livremente as minhas escolhas com apoio irrestrito. Hoje esse passo que dou na minha vida, também é de vocês! Obrigado com muito amor.

Agradeço ao meu irmão e melhor amigo Lucas, que durante os dois anos brincou comigo dizendo que não me aguentava mais falando sobre lactoferrina bovina e aturou junto com meus pais, a correria e loucura que foi chegar até aqui! Amo vocês e agora você vai ouvir um pouco menos sobre lactoferrina.

Aos meus amigos de longa data que vibram a cada vitória minha, somos amigos há tanto tempo que já sabemos que assim perdurará. Agradeço por todos os momentos de descontração e as muitas histórias vividas.

A Isabelle, que desde o primeiro momento me incentivou e apoio nas mais diversas escolhas e nos momentos difíceis não abandonou. Agradeço demais pela paciência nos estresses gerados durante a produção desse trabalho, obrigado por ser minha revisora especial e ficar buscando sinônimos comigo. Observa-se que amo você. Seu sorriso me levanta todos os dias.

Aos meus amigos do LBE, Carol, Vanessa e Rafinhaa! Obrigado por esses mais de dois anos de companheirismo e amizade. Vocês me ajudaram tanto a completar esse trabalho, que aqui também tem um pedacinho de cada uma de vocês.

Agradeço a todos do LMA e ao INCA pelo apoio e apoio financeiro também, sem a ajuda de vocês muito desse trabalho não teria acontecido.

Agradecimento especial a professora Dra. Landi que me ajudou durante todo esse processo sendo minha revisora, conselheira e colaboradora desse trabalho, e espero pode continuar contando com essa grande profissional e pessoa.

Ao Pablo Trindade, professor visitante do programa, que ofereceu uma ajuda imensurável, com uma incrível metodologia. Um cara, enérgico que está pronto para colaborar e ajudar a todo momento. Espero que desse trabalho, realmente surjam as novas parcerias. Muito obrigado!

Agradeço a banca por ter prontamente aceitado um convite tão relâmpago, mas cheio de importância.

Ao meu coorientador Carlos Marques, incrível pesquisador que mesmo estando longe conseguiu me ajudar a pensar e desenhar esse projeto, me atendendo sempre que preciso, colocando correções e informações sempre pertinentes e essenciais.

Agradeço ao meu orientador e amigo Rafael Braga. Não tenho palavras para descrever como é trabalhar com você. Me abriu as portas do LBE em 2015 sem muito me conhecer e topou todos os desafios e oportunidades que me apareceram, não mediu esforços para me ajudar quando preciso. Aprendi muito com você sobre ciência e sobre a vida. Tudo que estou conquistando hoje, vêm de você ter me aberto portas, serei eternamente grato e vou buscar sempre retribuir e me espelhar em você.

Por fim agradeço mais uma vez a toda minha família, com agradecimento especial ao meu avô Alberto Augusto, a quem dedico essa dissertação. Ele foi um avô incrível, me ajudou a crescer e me mostrou valores essenciais até o último momento. Te carrego todos os dias no meu coração, na certeza que olha por mim aí de cima. Sigo na luta de levar os Augustos para o mundo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1.	Lactoferrina.....	14
1.1.a.	Funções Biológicas da Lactoferrina	18
1.2.	Apoptose	20
1.3.	Lactoferrina e Apoptose.....	27
2	OBJETIVOS	28
2.1.	Objetivo Geral.....	28
2.2.	Objetivos Específicos	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1.	Reagentes	29
3.2.	Preparo de apo-lactoferrina bovina.....	29
3.3.	Preparo de holo-lactoferrina bovina.....	30
3.4.	Cultura de Células	30
3.5.	Viabilidade Celular.....	31
3.6.	Morfologia Celular.....	32
3.7.	Contagem com azul de Tripán.....	32
3.8.	Citometria de Fluxo – Anexina V e 7AAD	33
3.9.	Ensaio com sondas para avaliação de estresse oxidativo e ativação de apoptose.....	34
3.10.	Ensaio de atividade das caspases 3/7	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1.	A influência da Lactoferrina bovina na morfologia celular.....	36
4.2.	Viabilidade celular e Lactoferrina bovina	39
4.3.	Efeitos da bLf na membrana celular e núcleo.....	43
4.4.	Avaliação da atividade enzimática das Caspases efetoras	48
4.5.	Avaliação do estresse oxidativo e ativação de apoptose.....	50
5	CONCLUSÃO	63
6	REFERÊNCIAS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura Tridimensional da Lactoferrina Bovina.....	16
Figura 2: Resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação de Fe ⁺³	17
Figura 3: Estrutura tridimensional da apo-Lf (esquerda) e holo-Lf (direta) destacando em azul as duas α -hélices que ligam o lobo-C ou lobo-N	18
Figura 4: As principais funções da lactoferrina.....	20
Figura 5: Esquema da alteração morfológica durante a apoptose.....	21
Figura 6: Atividade proteolítica da caspase 3.....	23
Figura 7: Representação das vias apoptóticas dependente de caspase.....	24
Figura 8: Esquema de via extrínseca da apoptose.....	25
Figura 9: Esquema de via intrínseca da apoptose.....	26
Figura 10: Efeito morfológico da apo-bLf.....	36
Figura 11: Efeito morfológico da holo-bLf.....	37
Figura 12: Efeito morfológico da Apo-bLf em maior aumento.....	38
Figura 13: Gráficos de viabilidade e citotoxicidade da apo-bLf em 72hrs	40
Figura 14: Gráficos de viabilidade e citotoxicidade da holo-bLf em 72hrs.	41
Figura 15: Viabilidade celular apo-bLf 24hrs	42
Figura 16: Citometria de fluxo nas células Vero.	44
Figura 17: Comparação de morte por necrose com viabilidade celular.....	46
Figura 18: Comparação de morte por apoptose com necrose secundária.	47
Figura 19: Efeito da bLf nas caspases em 96 horas de tratamento.....	49
Figura 20: Porcentagem de células que marcam DHE em 24 e 48 horas	50
Figura 21: Intensidade da expressão de DHE nas células em 24 e 48 horas	51
Figura 22: Número de células contadas	52
Figura 23: Estresse oxidativo induzido por apo-bLf em 24h.....	54
Figura 24: Estresse oxidativo induzido por apo-bLf em 48h.....	55
Figura 25: Estresse oxidativo induzido por holo-bLf em 24h	56
Figura 26: Estresse oxidativo induzido por holo-bLf em 48h	57
Figura 27: Ativação das caspases e morte celular induzida por apo-bLf em 24h.....	59
Figura 28: Ativação das caspases e morte celular induzida por apo-bLf em 48h.....	60
Figura 29 - Ativação das caspases e morte celular induzida por holo-bLf em 24h....	61
Figura 30 - Ativação das caspases e morte celular induzida por holo-bLf em 48h....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas presentes no soro do leite.....	14
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Apo-bLf – Apo lactoferrina bovina

CD - Dicroísmo circular

DMEM – Meio Dubellco modificado

Gag's – Glicosaminoglicanos

hLf - Lactoferrina humana

Holo-bLf – Holo lactoferrina bovina

KCl – Cloreto de Potássio

kDa – kilo Daltons

Lf – Lactoferrina

LPS – Lipopolissacarídeos

mg – Miligrama

mL – mililitro

mM – Milimolar

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

NaCl – Cloreto de Sódio

PCD – *Programmed cell death*

pH – Potencial de Hidrogênio

pI – Ponto isoelétrico

PS – Fosfatidilserina

ROS – Espécie Reativas de Oxigênio

RPM – Rotações por minuto

TNFR - *Tumor necrosis factor receptor*

RESUMO

A lactoferrina bovina (bLf) é uma glicoproteína de 80 kDa pertencente à família das transferinas. Podendo ser encontrada em muitos fluidos orgânicos, como lágrimas, saliva e leite. Esta proteína ligadora de ferro é encontrada em duas formas: livre de ferro (apo-bLf) e saturada de ferro (holo-bLf). Sua vasta gama de funções tem sido intensamente estudada tais como, as propriedades antimicrobianas, antivirais, anticarcinogênicas e anti-inflamatórias, pelas quais a lactoferrina atua aumentando os níveis de citocinas e proteínas pró-apoptóticas levando a célula à morte programada. Apesar de toda a pesquisa, os efeitos de bLf no mecanismo de morte celular e vias ainda estão por ser desvendados. Este estudo tem como objetivo verificar se a apo-bLf e a holo-bLf induzem a apoptose e as vias afetadas por ela. O efeito de citotoxicidade da bLf foi medido pelo ensaio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], com concentrações variando de 2 a 20 mg / mL com 3 dias de incubação. A citometria de fluxo foi utilizada para analisar eventos precoces de apoptose e necrose usando os marcadores anexina V e 7AAD. Além disso, a atividade da caspase-3/7 foi avaliada usando o Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega®). Nossos resultados mostraram que a apo-bLf tem um efeito negativo na viabilidade das células Vero, reduzindo-a em 15% a 2 mg / mL e alcançando uma redução de até 70% em concentrações mais altas. Isto pode ser correlacionado com os resultados observados por citometria de fluxo, que indicou sinais de anexina V principalmente após 24 e 48 horas de incubação e sinais fortes para o marcador 7AAD após 72 horas de incubação, sugerindo apoptose precoce e apoptose seguido por eventos de necrose respectivamente. Observamos também que a atividade da caspase-3/7 aumentou cerca de 60% quando as células Vero foram tratadas com apo-bLf. Este estudo mostrou que a apo-bLf leva as células Vero à morte; Nossos próximos passos são estender essas análises para holo-bLf e determinar quais vias apoptóticas são afetadas por ambas as formas de bLf.

ABSTRACT

Bovine lactoferrin (bLf) is a glycoprotein with 80 kDa belonging to the transferrin family. It can be found in many organic fluids such as tears, saliva and milk. This iron-binding protein is encountered in two forms: iron-free (apo-bLf) and iron-saturated (holo-bLf). Its vast range of functions has been intensively studied, like the antimicrobial, antiviral, anticarcinogenic and anti-inflammatory properties, by which lactoferrin acts enhancing the levels of cytokines and pro-apoptotic proteins leading the cell to programmed death. Despite all the research, the effects of bLf in the cell death mechanism and pathways are yet to be unraveled. This study aims to verify whether apo-bLf and holo-bLf induces apoptosis and the pathways affected by it. The cytotoxicity effect of bLf was measured by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay, with concentrations ranging from 2 to 20 mg/mL with 3-day incubation. Flow cytometry was used to analyze early apoptosis and necrosis events using annexin V and 7AAD markers. Besides, caspase-3/7 activity was assessed using Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega®). Our results showed that apo-bLf has a negative effect on Vero cell viability, reducing it by 15% at 2 mg/mL and reaching a reduction of up 70% at higher concentrations. This can be correlated with the results observed by flow cytometry, which pointed out signals for annexin V mostly after 24 and 48 hour-incubation and strong signals for 7AAD marker after 72 hour-incubation, suggesting early apoptosis and apoptosis followed by necrosis events respectively. We also observed that caspase-3/7 activity increased by around 60% when Vero cells were treated with apo-bLf. This study showed that apo-bLf leads Vero cells to death; our next steps are to extend these analyses to holo-bLf and determine which apoptotic pathway are affected by both forms of bLf.

1. Introdução

1.1 . Lactoferrina

A lactoferrina (Lf) foi inicialmente descrita por Montreuil (1960) e pertence à família das transferrinas juntamente com a ovotransferrina, melanotransferrina, transferrina sérica e outros membros (Susana et al., 2009). É produzida pela mucosa epitelial de diversos mamíferos, como cavalos, bovinos, cães, roedores e humanos (Montoya et al., 2012) assim como também foi descrita em ovas de trutas arco-íris (Torres et al., 2006).

A Lf é encontrada no grânulo de neutrófilos (Legrand et al., 2008) e em diversas secreções como lágrimas, saliva, secreções nasobronquiais, bile, fluidos gastrointestinais, sêmen, secreções vaginais, urina, plasma e leite (Susana et al., 2009.). Pela abundância desse fluido, o leite torna-se uma das principais fontes de lactoferrina para fins comerciais e biotecnológicos (Lievore, 2013) como apresentado na **(Tabela 1)**.

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 1: Proteínas presentes no soro do leite. (modificado de LIEVORE, 2013)

A lactoferrina é encontrada em concentrações de 7-8 g/L no leite humano maduro e 30 mg/L no leite bovino (Lonnerdal & Iyer, 1995; Legrand et al., 2008), podendo variar dependendo do estágio de lactação. No plasma sua concentração é de 1-2 µg/mL, porém podendo chegar até 200 µg/mL em respostas inflamatórias. A Lf é conhecida por sua grande capacidade de ligação com íons de ferro, sendo a única transferrina a conseguir manter essa interação numa grande faixa de pH, incluindo em valores muito ácidos (Aisen & Leibman, 1972).

Apesar de, preferencialmente ligar-se a íons de ferro, já foi observado que a Lf é capaz de realizar ligações com íons de manganês, cobre, zinco e em alguns sistemas biológicos e testes *in vitro* com condições específicas, com outros íons metálicos, sendo eles: Ga³⁺ e Al³⁺ e metais de transição, como: Vo²⁺ e Co²⁺ (Lonnerdal & Iyer, 1995). Contudo, essas ligações não são tão fortes quanto a ligação ao íon de ferro, pois apresentam uma baixa afinidade (Susana et al., 2009).

A Lf apresenta notável homologia entre espécies, já tendo sido descrita para diversos mamíferos, como cães, felinos, roedores, ruminantes e primatas, nos quais, a similaridade variou de 78% a quase 100%. Essa grande similaridade entre as espécies mostra que a família Lf é muito conservada, sendo as características mais marcantes a elevada carga positiva e o caráter básico (Montoya et al., 2012). A lactoferrina humana possui ~70% de homologia com a de roedores e, comparada com a bovina possui cerca de 69%. Muito embora essas sequências de resíduos sejam parcialmente semelhantes, a sua estrutura tridimensional é fortemente conservada (BAKER; BAKER, 2008).

A Lf é uma proteína básica glicosilada com um ponto isoelétrico (pI) entre 8.0-8.5 e massa molecular de 80 kDa com cerca de 700 aminoácidos, formada por uma cadeia polipeptídica única que se dobra em dois lobos simétricos: o lobo-C e lobo-N, compostos por α-hélices e β-folhas, cada qual dividido em dois domínios (C-1, C-2; N-1, N-2) (**Figura. 1**). Tais lobos possuem homologia de cerca de 41%, sendo ligados por uma região de dobradiça (*hinge*) de duas α-hélices entre os resíduos 333 e 343, o que confere flexibilidade à molécula (Susana et al., 2009; Montoya et al., 2012).

A presença de resíduos de cisteína (Cys) dão à Lf a possibilidade de formação de pontes dissulfeto intramolecular e os resíduos de aspartato (Asp) criam regiões para glicosilação. Sua afinidade por ferro é 260 vezes maior do que da transferrina, proteína transportadora de ferro sanguíneo (Baker, 1994).



Figura 1. Estrutura tridimensional da Lactoferrina bovina: A Lf 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). Esta 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).

A ligação de ferro na Lf ocorre na interligação de seus domínios e dá-se de forma homóloga em ambos os lobos, sendo quatro aminoácidos responsáveis por

essa ligação: duas tirosinas (Tyr 92, 192), um aspartato (Asp 60) e uma histidina (His 253) que conferem uma carga negativa (-3) ao sítio de ligação, é balanceada com a carga positiva do Fe^{+3} , ao mesmo tempo que a cadeia lateral do resíduo de Arginina (Arg) se liga ao íon carbonato (CO_3^{2-}), essencial para a ligação metálica, facilitando a saturação da proteína por ferro (**Figura. 2**) (Legrand et al., 2008).

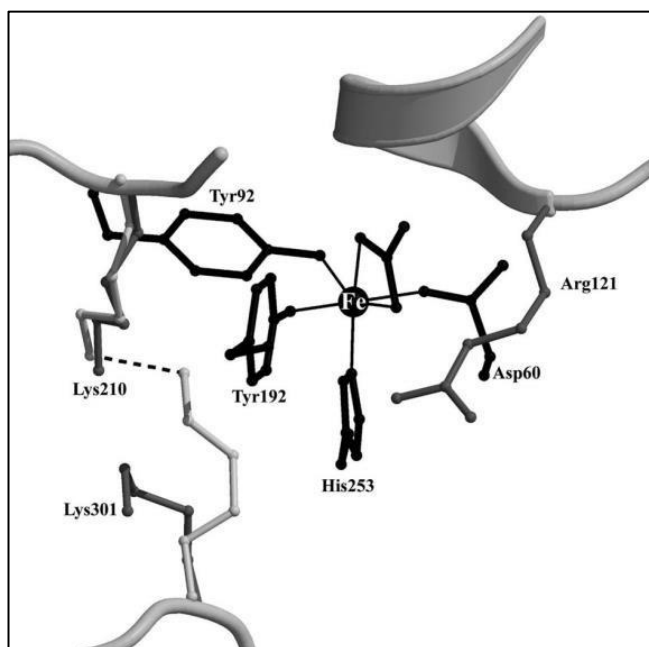


Figura 2: Resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação de Fe^{+3} . Asp 60, His 253, Tyr 92 e 192. Adaptado de Baker (2004).

A estrutura saturada por ferro é chamada de holo-lactoferrina (holo-Lf) na qual, os dois domínios de cada lobo se fecham em torno da ligação de ferro, isolando-o do ambiente externo. Por ser uma estrutura muito fechada, a sua forma holo é em geral mais estável, apresenta forte resistência à clivagem proteolítica e dificilmente libera

seu ferro sem que antes ocorra uma desestabilização de sua estrutura, como por exemplo, na alteração para um pH muito ácido causando protonação de seus aminoácidos (Susana et al., 2009; Moore et al., 1997).

A forma não saturada de ferro da Lf é chamada apo-lactoferrina (apo-Lf) possuindo uma conformação menos compacta e apresenta um comportamento de maior dinamismo e flexibilidade em relação a holo-Lf, permitindo que seus domínios se movam com certa liberdade. A pequena diferença energética entre ambas as formas (apo-Lf e holo-Lf) permite que a apo-Lf se encontre também com seus domínios fechados mesmo sem a ligação de ferro embora exista em sua maior parte do tempo na sua forma aberta (**Figura. 3**) (Baker; Baker, 2005).

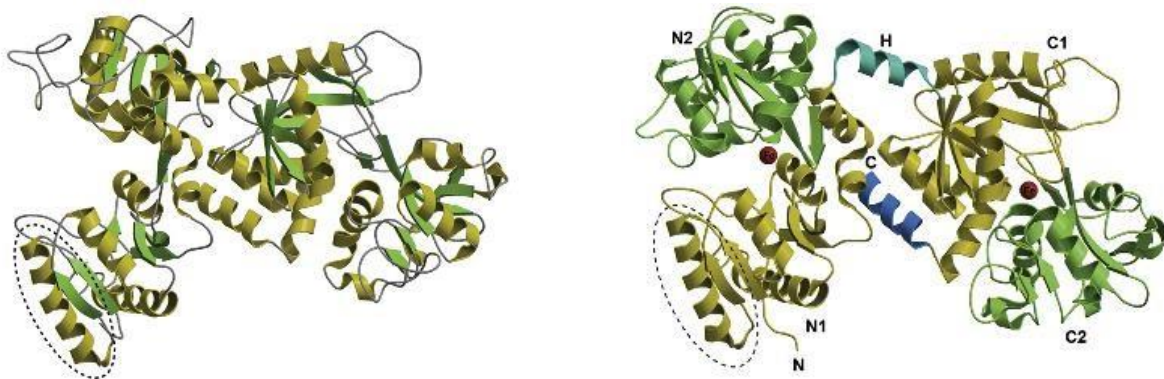


Figura 3: Estrutura tridimensional da apo-Lf (esquerda) e holo-Lf (direita) destacando em azul as duas α -hélices que ligam o lobo-C ao lobo-N (Baker, 2004).

1.1.a. Funções Biológicas da Lactoferrina

Diversas funções biológicas já foram descritas para a Lf (**Figura. 4**). A função primária da Lf no organismo é regular a oferta de Fe^{+3} , mantendo sua homeostase. O ferro é elemento importante para diversos metabolismos, porém seu excesso pode levar ao crescimento bacteriano e a um alto stress oxidativo (Ward et al., 2005), sugerindo por

exemplo que a função primária da Lf presente no leite materno seria de controlar a biota do trato intestinal bem como reduzir possíveis danos causados por ROS (Baldwin et al., 1984).

Foram publicadas atividades antibacterianas da Lf relacionadas à sua capacidade de sequestrar ferro tanto em bactérias Gram-positivas quanto em gram-negativas, incluindo algumas cepas resistentes a antimicrobianos (Susana et al., 2009). Foi observado também a capacidade da Lf de interagir com lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias em Gram-negativas aumentando a permeabilidade da membrana causando danos a bactéria (Farnaud & Evans, 2003).

A Lf apresenta atividade contra diversos vírus de RNA e DNA que afetam humanos e animais, podendo se ligar diretamente ao vírus ou interagir diretamente com receptores virais inespecíficos, tais como glicosaminoglicanos (GAGs), em especial heparan-sulfato (Montoya et al., 2012). Já foram vistos efeitos contra vírus Mayaro (Carvalho et al., 2014), Zika e Chikungunya (Carvalho et al., 2017), Herpes, Hepatite C e HIV (Montoya et al., 2012).

A Lf apresenta também propriedades imunológicas em ambos os sistemas inato e adquirido, com atividades anti-inflamatórias, por inibição de diversas citocinas pró-inflamatória como TNF- α e IL-1 β , sendo translocada para o núcleo e inibindo a via NF- κ B (Legrand et al., 2008). A Lf também possui atividade anticancerígena ao promover a apoptose em células tumorais promovendo a maturação da 3-procaspase (Katunuma et al., 2006), alterando a expressão ou atividade de proteínas inibidoras de cinases como p21 e p27, que vão afetar diretamente a via AKT e MAPK e ainda ativando a apoptose através da via de sinalização FAS resultando na regulação positiva da p53 (Legrand et al., 2008).

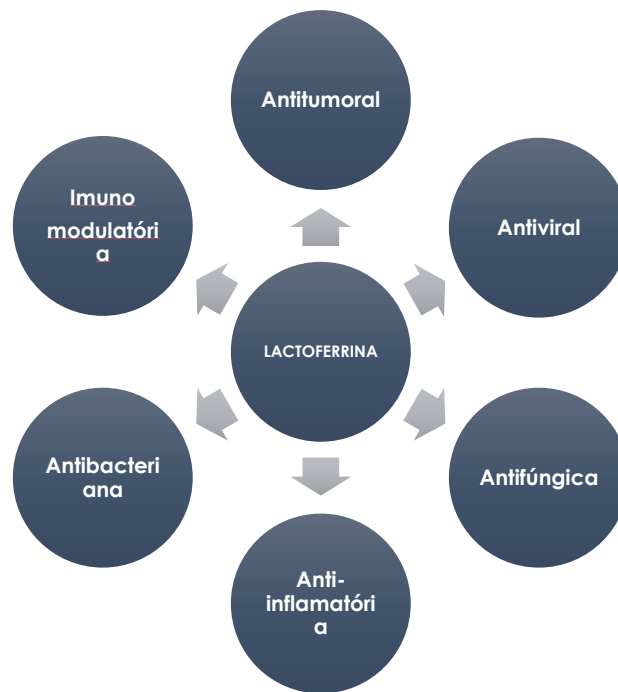


Figura 4: As principais funções da lactoferrina. As principais funções biológicas da Lf separadas por categorias, como atividades contra patógenos, proteína ligadora de ferro, funções gerais e outras.

1.2 . Apoptose

O termo apoptose foi primeiro utilizado por Kerr (1972) para definir um processo distinto de morte celular, que ocorria no organismo *Caenorhabditis elegans*, no qual 131 células somáticas sofriam uma morte celular programada em momentos específicos no decorrer do seu desenvolvimento, que ocorria invariavelmente entre esses nematódeos, mostrando ser um processo preciso e controlado (Elmore, 2007).

O conhecimento a respeito desse mecanismo celular de morte se aprofundou e atualmente já se sabe que existem diversos processos de PCD (*Programmed cell death*), a depender do estímulo que a célula irá receber (Galluzi et al., 2018). Ainda assim, a

apoptose é dita como o mecanismo primário de morte celular sendo um processo evolucionário que ocorre durante o desenvolvimento e envelhecimento de um organismo para a manutenção de sua homeostase (Elmore, 2007; Galluzi et al., 2018).

A morte celular por apoptose ocorre diariamente em diferentes tipos celulares com bilhões de células morrendo enquanto outros bilhões são produzidos. Esse mecanismo é essencial, por exemplo, para remoção das membranas interdigitais, células neuronais não funcionais, linfócitos auto-reativos e células danificadas em geral, onde uma série de sinais indicará aos macrófagos que elas devem ser fagocitadas e removidas. (Nagata, 2018).

A apoptose é dita como um processo não inflamatório de morte; uma cascata de sinalização mediada por proteínas de diversas famílias vão levar as células a mudanças morfológicas como: encolhimento do citoplasma, condensação da cromatina, fragmentação do *DNA*, formando *blebbing* na membrana plasmática e a formação de corpos apoptóticos que, quando fagocitados pelos macrófagos (*eat me signals*) serão digeridos pelas vesículas lisossomais (Medina & Ravichandran, 2016) **(Figura. 5)**

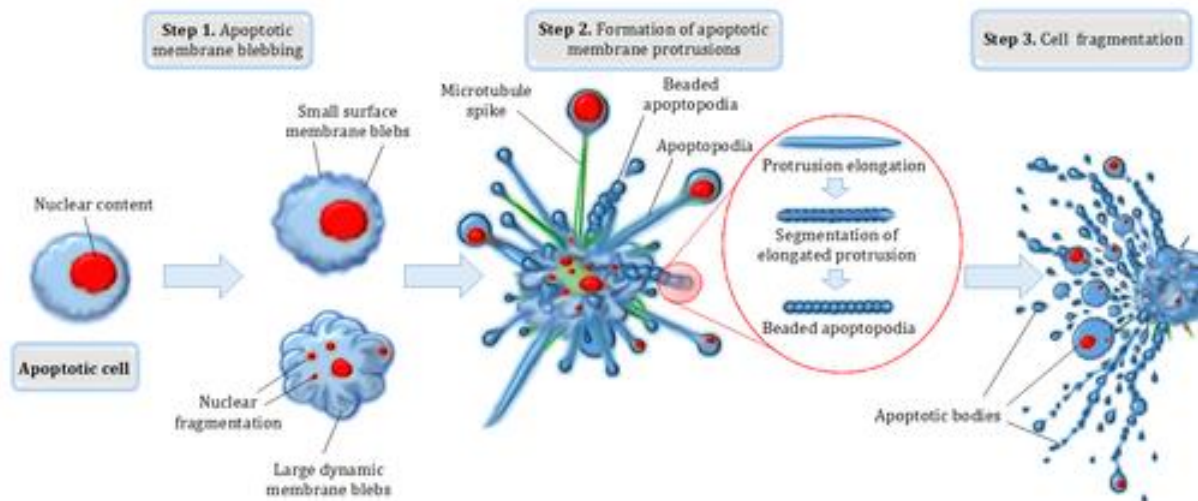


Figura 5: Esquema da alteração morfológica durante a apoptose: a figura mostra a célula reduzindo sua área citoplasmática formando *blebbing* em suas membranas e, logo após formação dos corpos apoptóticos e fragmentação celular (adaptado de Smith et al., 2017)

Até muito tempo atrás a apoptose era considerada um processo irreversível, a partir dos primeiros sinais de morte das células, porém a inibição de algumas famílias de proteínas ligadas à morte celular mostrou que as células podem retroceder nessa via. Contudo a ativação das caspases parece ser um passo irreversível para as células (Elmore, 2017).

As caspases são proteases que possuem em seu sítio ativo sequências de resíduos de histidinas e cisteínas que quebram ligações peptídicas após um resíduo de aspartato (Nagata, 2018). Já foram descritas 14 caspases em mamíferos que participam diretamente da atividade apoptótica como as caspases 3 clivando por exemplo, regiões transmembranares de flipases que inativas passam a permitir que o fosfolípido fosfatidilserina (PS) seja translocado para a membrana externa, na sinalização de *eat me* (**Figura. 6**), e outras que podem realizar atividades não apoptóticas como diferenciação celular e imunomodulação (Kuranaga & Miura, 2007).

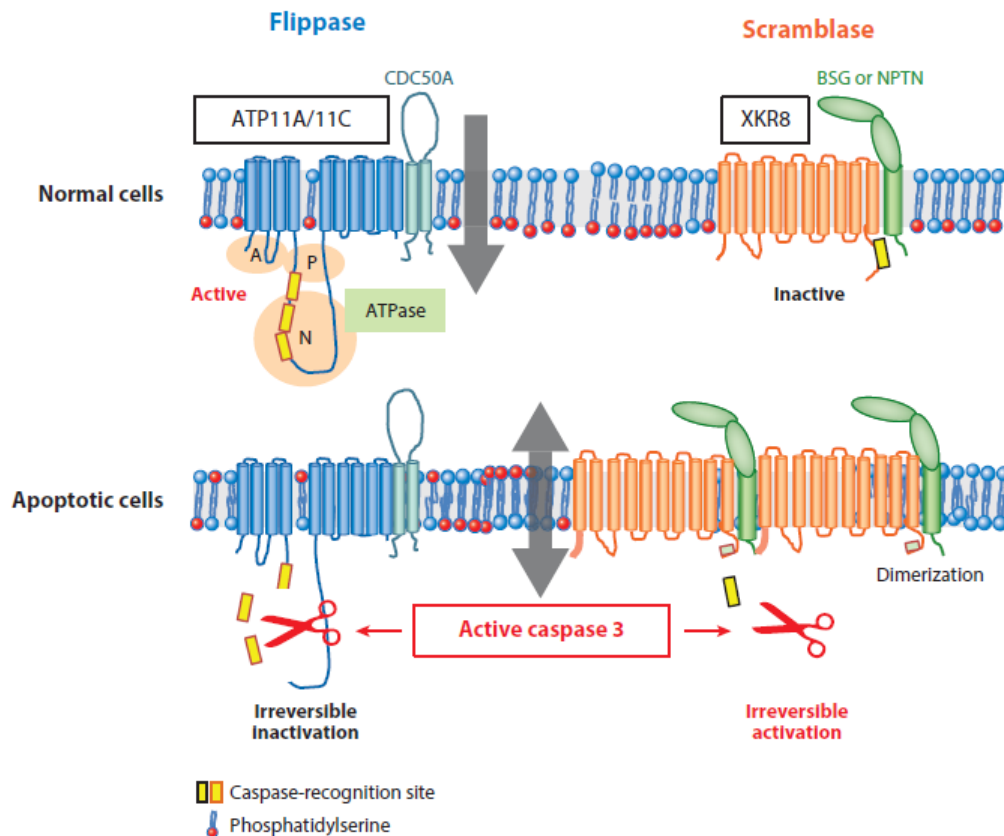


Figura 6: Atividade proteolítica da caspase 3: a enzima se liga a sítios específicos da flippase e escramblase inativando-as, permitindo assim a distribuição simétrica do fosfatidilserina pela bicamada lipídica que atua como sinalizador para a fagocitose dessa célula (adaptado de Nagata 2018).

Atualmente a apoptose é dividida em duas vias distintas: a via intrínseca e via extrínseca e apesar de possuírem vias de ativações diferentes, estudos já mostraram que essas vias tem a capacidade de se comunicar através de sinalizadores intermediários como a BID e tBID, podendo, assim ocorrer mutuamente na célula (Elmore, 2007) **(Figura. 7)**

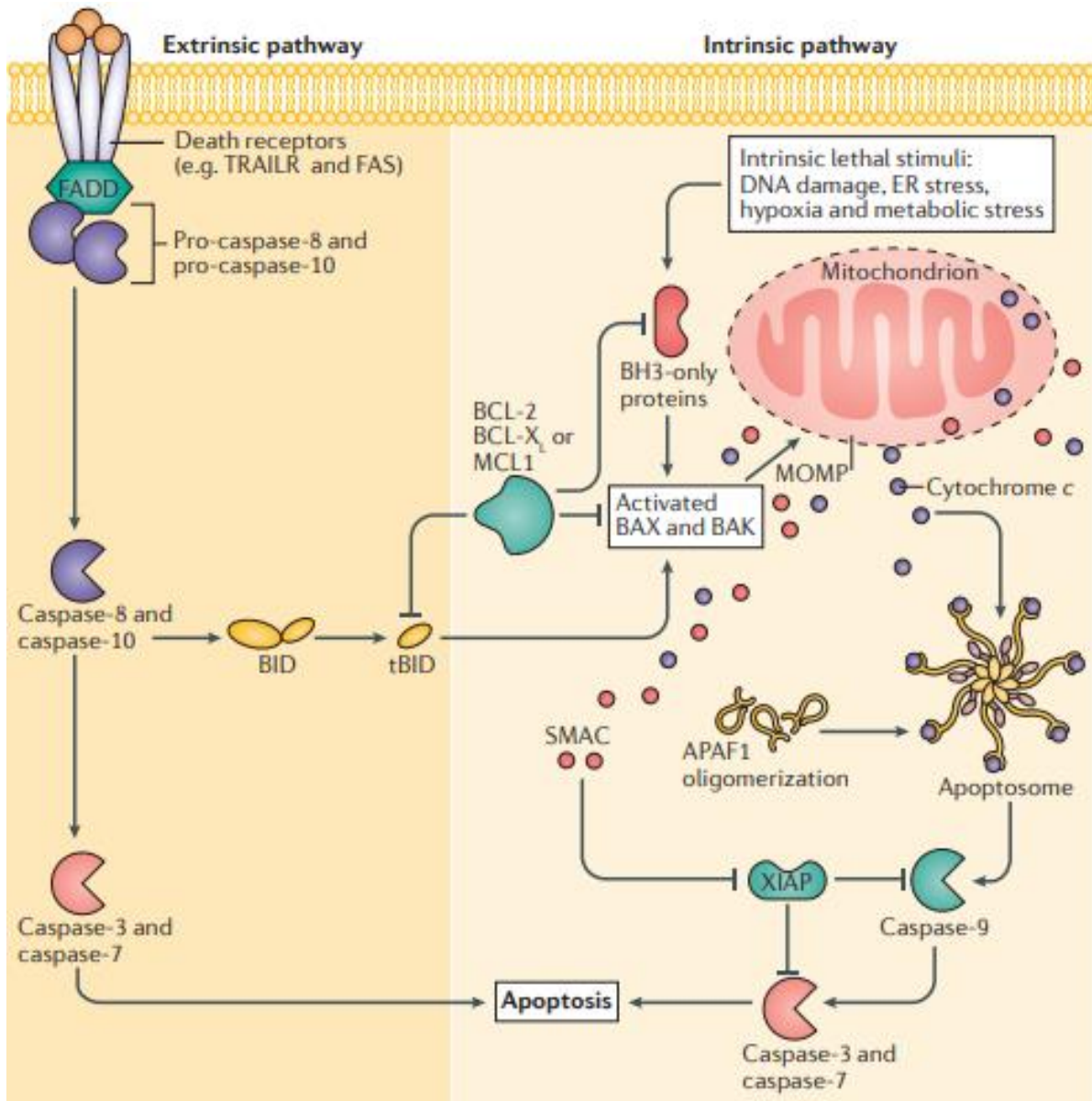


Figura 7: Representação das vias apoptóticas dependente de caspase. A figura mostra a interação entre as vias extrínseca e intrínseca através da BID e tBID levando à apoptose da célula (adaptado de Ichim & Tait, 2016)

A via extrínseca é relacionada com os receptores transmembranares chamados de “receptores de Morte” pertencentes à super-família dos genes dos TNFR (*Tumor*

necrosis factor receptor) que possuem um domínio extracelular rico em cisteína denominados *death domains*, que se ligam aos seus ligantes específicos, a saber, FasL/FasR e TNF- α /TNF1 que formam grandes associações chamadas de FADD e TRADD, respectivamente (Arun et al., 2010). Esses, por sua vez, irão se associar com a procaspase-8 formando os complexos DISC (*death inducing signaling complex*) que resulta na ativação da caspase-8, o que conseqüentemente ativa a caspase-3, que inicia a via efetora da apoptose, gerando a morte celular (Elmore, 2007) (**Figura. 8**).

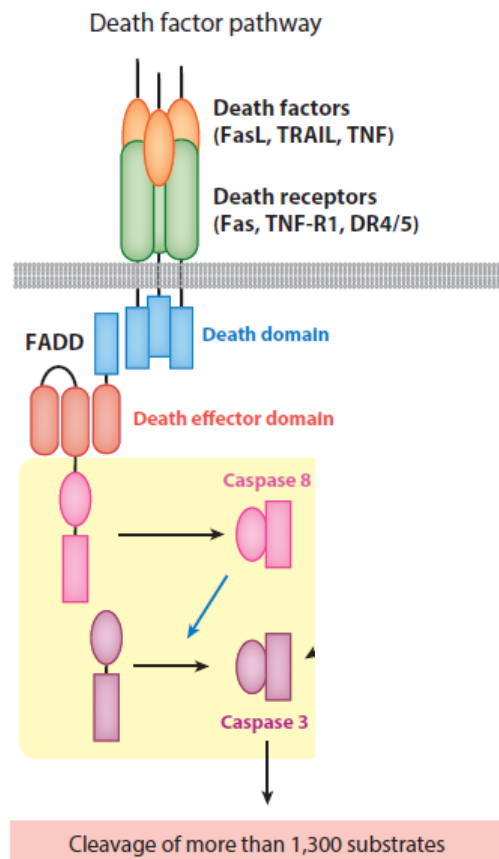


Figura 8: Esquema de via extrínseca da apoptose. A figura mostra o recrutamento dos fatores de morte e a formação do complexo DISC (adaptado de Nagata 2018).

A via intrínseca pode ser disparada por fatores externos como radiação, hipóxia, toxinas e infecções virais, ou por fatores internos, como supressão de fatores de crescimento e, hormônios que funcionariam como fatores anti-apoptóticos (Elmore, 2007). Esses estímulos causam mudanças na membrana interna da mitocôndria, causando uma permeabilidade transicional através das proteínas da família BCL-2, liberando proteínas que se ligam aos fatores pró-apoptóticos: citocromo c, Smac/DIABLO e as proteases HtrA2/Omi (Elmore, 2007). O citocromo c se liga à procaspase-9, formando o apoptossomo e ativando-a em caspase-9; Smac/DIABLO inibem os IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*) ativando a procaspase-3 em caspase-3 e culminando na morte celular (Elmore, 2007) (**Figura. 9**).

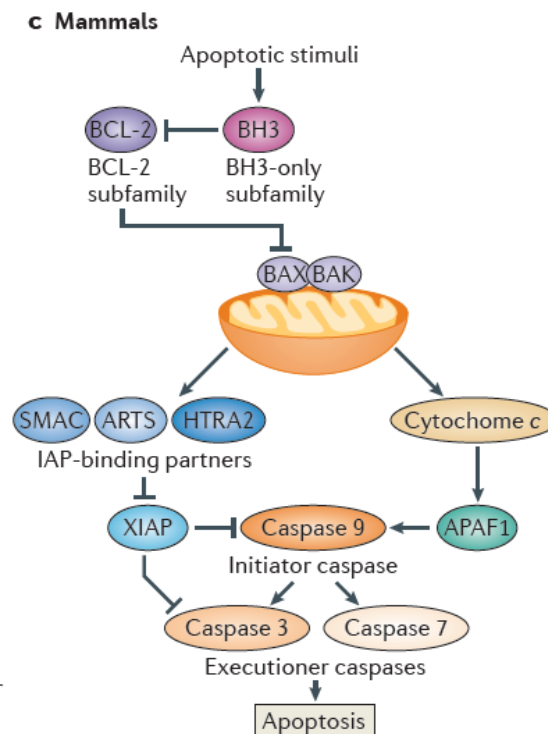


Figura 9: Esquema de via intrínseca da apoptose. A figura mostra o recrutamento das proteínas da família BCL-2 que vão alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial levando a liberação do citocromo C para o citosol (adaptado de Fuchs & Steller, 2014).

1.3. Lactoferrina e Apoptose

Estudos com Lactoferrina humana (hLf) e Lactoferrina bovina (bLf) mostram que a proteína está envolvida de diversas maneiras na apoptose potencializando sua ocorrência em diversos tipos celulares e tecidos. Atualmente essa capacidade vem sendo muito explorada para terapias antitumorígenicas (Montoya et al., 2012) com estudos em diversas linhagens celulares. Nas células HeLa observou-se aumento na atividade das caspases e de ROS, após incubação com bLf (Luzi et al., 2016). Já em linhagens celulares de câncer de mama, a bLf inibiu a produção de survivina (Gibbons et al., 2015). Por fim, em linhagens de câncer de próstata a proteína levou à apoptose dessas células através da acidificação pelas bombas V-ATPase nas vesículas lisossomais (Pereira et al, 2018).

Em modelos murinos *in vivo* foi observado que a bLf é capaz de aumentar a expressão de FAS e das caspase-3 e 8 (Fujita et al., 2004). Já em Katunama (2006) foi mostrado que a Lactoferrina está envolvida em uma via apoptótica secundária de células hepáticas. Quando os níveis de Lactoferrina lisossomal eram aumentados, a mesma era responsável pela ativação da procaspase-3 em caspase-3, tanto em sua forma Apo quanto em sua forma holo, possivelmente ligando-se à procaspase-3 e modificando sua estrutura terciária tornando-a mais suscetível a ativação.

Um estudo de Hessin (2015) mostrou a Lf como uma forte candidata para uso terapêutico no tratamento da fibrose hepática. Observou-se que a Lf é capaz de reduzir a necrose hepática, atuando diretamente como um antioxidante e sendo também capaz de promover a apoptose através da indução dos macrófagos, células NK e CD8+. Sendo assim, neste projeto, a lactoferrina bovina (bLf) foi usada para tentar obter informações acerca dos mecanismos envolvidos em sua atividade pró-apoptótica em células Vero.

2. Objetivos

2.1 . Objetivo Geral:

- Verificar a influência da bLf no processo de apoptose em células da linhagem Vero.

2.2 . Objetivos Específicos:

- Analisar os efeitos da bLf na viabilidade e na proliferação celular;
- Observar efeito morfológicos causados pela incubação celular com bLf;
- Avaliar se a bLf induz o estresse oxidativo nas células;
- Comparar a atividade pró-apoptótica da apo-bLf e da holo-bLf em dose e tempo dependente;
- Investigar se a bLf afeta a atividade de proteínas efetoras da apoptose.

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 MiliQ (Millipore, EUA). A apo-lactoferrina bovina foi adquirida da Life Extension (Flórida,USA). Para o preparo da holo-bLf, o ácido nitrilotriacético e nitrato férrico utilizados foram obtidos da Sigma Chemical Co (EUA).

3.2. Preparo de apo-lactoferrina bovina

A apo-bLf foi preparada a partir de cápsulas contendo 300 mg da proteína. Para a solubilização, foi utilizado um tubo cônico de 15 mL para dispensar todo o conteúdo (pó) da cápsula e adicionar 3 mL de tampão PBS (NaCl a 140 mM, KCl a 2,7 mM, Na₂HPO₄ a 10 mM e KH₂PO₄ a 1,8 mM, pH 7,4), homogeneizando em um agitador do tipo vórtex. 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) a 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) em uma cabine de biossegurança ESCO (EUA), 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 corte 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, aliqotada 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 do íon de ferro foi verificada a partir de leitura espectrofotométrica a 465 nm.

3.4. Cultura de Células

As células Vero foram utilizadas para todos os ensaios, tendo sido cultivadas em monocamadas utilizando frascos de cultura de 25 cm² (Greiner Bio One, Austria) em meio DMEM alta glicose (Sigma Chemical Co, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e tamponadas com 2g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), pH 7,4, sob atmosfera com utilizando-se meio DMEN (Dulbelleco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% do antibiótico Penicilina + Estreptomicina (Gibco, EUA).

3.5. Viabilidade Celular

Conforme descrito por Mosmann (1983), a viabilidade celular foi determinada pelo teste colorimétrico MTT (Amresco, EUA). Ao adicionar o composto MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio] 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, a formazana [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 formazana caracteriza uma detecção da atividade metabólica que está diretamente ligada a viabilidade celular. 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 solução de Penicilina e Estreptomicina. As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24hrs para sua adesão aos poços. Após isto, as células foram lavadas com tampão PBS e 100 μ L de solução com apo- e holo- bLf nas concentrações de apo-bLf de 2, 5, 10 e 15 mg/mL e holo-bLf nas concentrações de 0.5, 1, 1.5, 2.5 e 5 mg/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 72 horas de incubação na estufa, a bLf foi retirada dos poços que foram lavados com PBS e então foi adicionada uma solução de 200 μ L MTT (Amresco, EUA) 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 formazana. Após isto, foram adicionados 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 foram colocados em uma nova placa de 96 poços. Por fim, a placa foi analisada em um espectrofotômetro utilizando a absorbância em 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:

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

3.6. Morfologia Celular

A análise da morfologia celular foi feita através de imagens das células em cultura após 24 horas de tratamento com apo-bLf bLf. As células foram colocadas em uma placa de 12 poços em uma concentração de 0.1×10^6 Cel/mL. 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, 5 e 10 mg/mL de apo-bLf. O período de tratamento foi de 24 horas. Após esse período as imagens foram obtidas, utilizando-se microscópio óptico EVOS (Thermo Fisher, EUA), seguindo a metodologia de duas fotos por poço, sendo uma imagem do centro, uma do quadrante superior direito. As imagens foram tratadas em contraste e nitidez e utilizadas para as comparações da morfologia celular.

3.7. Contagem com 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 apo-bLf em período de 24 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 12 poços com densidade de 0.1×10^6 , mantidas com 800 μ L 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 1 mL de tampão PBS. No controle foi colocado o meio de cultura e nos outros poços as concentrações de apo-bLf de 2, 5, 10 mg/mL, preparadas com o meio de cultura. Após o tratamento as células foram tripsinizadas e ressuspensas em 800 µL de meio DMEM alta glicose e 100 µL dessa suspensão foram retirados e misturados com 100 µL de solução 1% de Azul de Tripán em PBS (Gibco, EUA). Da última suspensão, 10 µL foram retirados e colocados na câmara de Neubauer (Precicolor, Alemanha), 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 10^4 , 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.

3.8. Citometria de Fluxo – Anexina V e 7AAD

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 7-aminoactinomicina-D (7AAD) 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 ao Isotiocianato Fluoresceína (FITC). Dessa forma, o complexo anexina V-

FITC possui uma intensa fluorescência verde (excitação / emissão ≈ 490 nm/ ≈ 520 nm). Assim, como os ensaios são realizados utilizando-se células viáveis não permeabilizadas, a marcação obtida é resultado do processo de externalização de fosfatidilserina. Excluimos a hipótese de estar ocorrendo ruptura de membrana com consequente exposição de PS da face interna à anexina V-FITC, através de ensaios com $10 \mu\text{g/mL}$ de 7AAD, presente no kit, que é um marcador nuclear impermeável à membrana plasmática. As células foram, então, colocadas em placas de 12 poços contendo 1×10^6 células em 1 mL de meio, a 37°C e em uma atmosfera com 5% de CO_2 . Realizamos as análises em 3 tempos 24 horas e 48 horas e 72 horas na concentração de 5 mg/mL de apo-bLf. 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 rico em cálcio, foram centrifugadas a 140 g por 5 min, descartando o sobrenadante, e adicionando $100 \mu\text{L}$ de PBS. Após o processo de lavagem, as células foram ressuspensas em $50 \mu\text{L}$ de *annexin-binding* buffer 1x, adicionando $1 \mu\text{L}$ de annexin V-FITC contida no KIT e $0,25 \mu\text{L}$ de solução de 7AAD a $100 \mu\text{g/mL}$. 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 100.000 eventos no canal do fluorocromo FITC (Filtro bandpass 530/30) e o PerCP (Filtro bandpass 675/20) no citômetro de fluxo FACS Aria (BD Biosciences). Os dados foram adquiridos no software FACSDIVA e analisados pelo software Flow Jo (FlowJo, LLC).

3.9. Ensaio com sondas para avaliação de estresse oxidativo e ativação de apoptose

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), MitoTracker Green FM (MTG) (#M7514), e Hoechst 33342 (#H1399), com concentração final de $5 \mu\text{M}$, $0,15 \mu\text{M}$ e $1 \mu\text{M}$, 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, 5, 10 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 % de CO₂. As imagens obtidas foram analisadas no software Columbus Image Data Storage and Analysis System (Perkin Elmer).

3.10. Ensaio de atividade das caspases 3/7

As células Vero foram incubadas em placas de 96 poços a 37°C por 96 h em diferentes concentrações de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL tanto para apo- quanto para holo-bLf e então avaliou-se a atividade apoptótica através do kit Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega, Fitchburg, USA) seguindo protocolo do fabricante. A emissão de luz foi medida com o leitor GloMax-Multi+ Microplate Multimode Reader (Promega) após 30 min de incubação.

4. Resultados

4.1. A influência da Lactoferrina bovina na morfologia celular

O primeiro experimento analisou a morfologia das células Vero e verificou se a bLf teria a capacidade de alterar sua forma e estrutura de monocamada. Para o teste, as células foram incubadas com a proteína nas duas formas, apo- e holo-bLf, durante 24 horas nas concentrações de 0 (controle), 2, 5 e 10 mg/mL e depois foram tiradas fotos das placas nos aumentos de 100 e 200x. Sendo possível analisar o estado da cultura celular bem como a sua morfologia (**Figuras 10 e 11**).

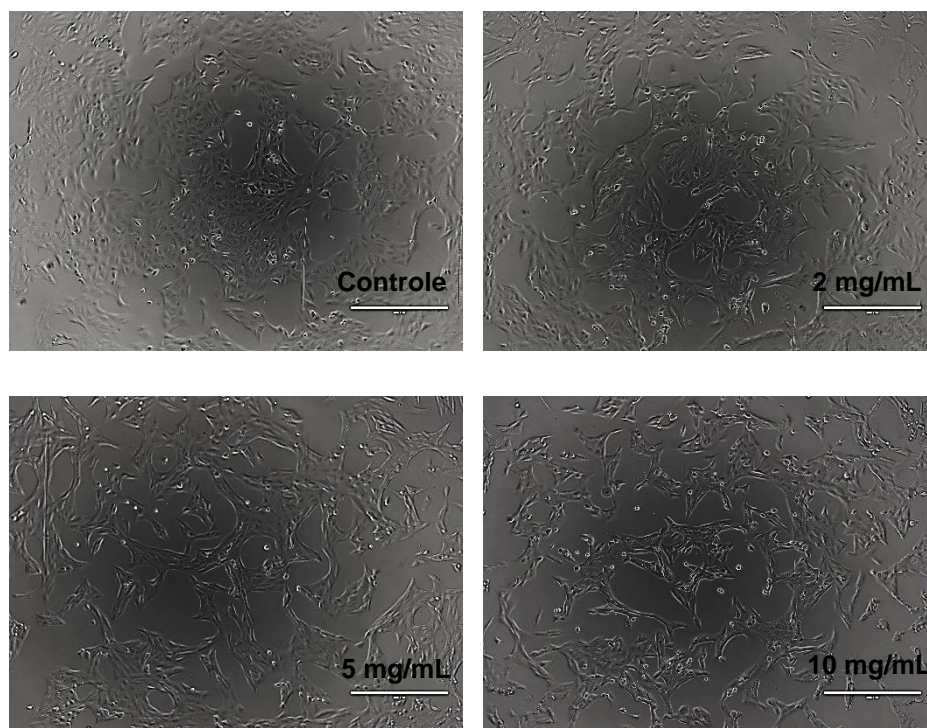


Figura 10: Efeito morfológico em células Vero com apo-bLf. As células foram incubadas durante 24hrs em presença de apo-bLf. Aumento de 100x.

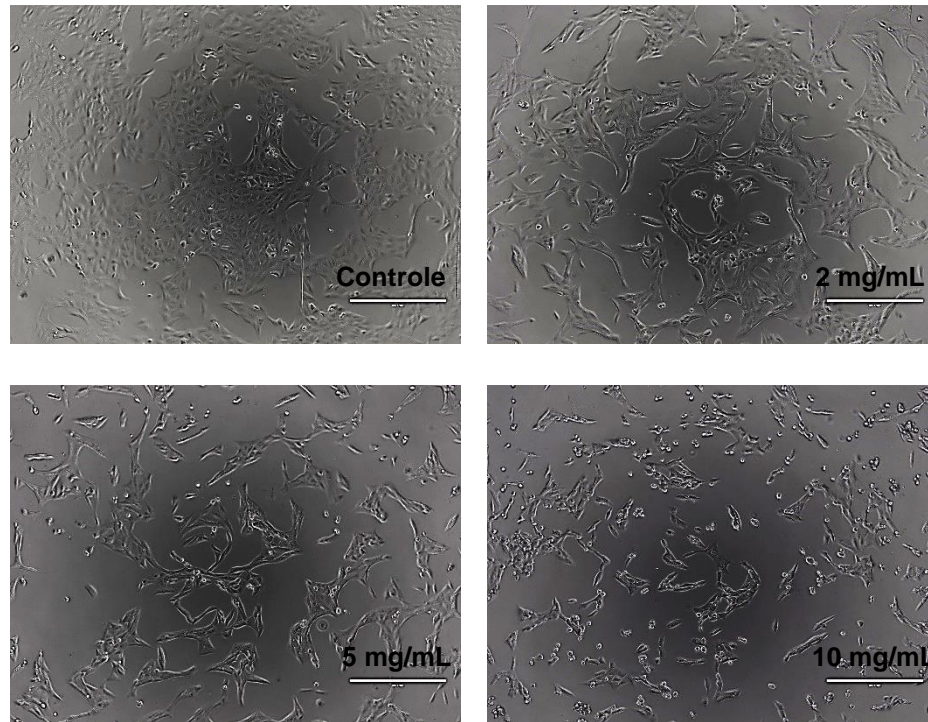


Figura 11: Efeito morfológico em células Vero com holo-bLf. As células foram incubadas durante 24hrs em presença de holo-bLf. Aumento de 100x.

Ao analisar as figuras é possível perceber que a bLf afetou morfológicamente a célula Vero, tanto no tratamento com a apo-bLf como na holo-bLf. A figura que mostra o controle apresenta as células ocupando densamente o poço da placa, com uma confluência próxima de 90%. As células se encontram justapostas e quase não é possível perceber limites entre uma célula e outra, característica normal das células Vero.

No tratamento com apo-bLf os efeitos já podem ser percebidos nas concentrações de 2 mg/mL, a monocamada celular apresentando leve redução de sua confluência e perda de contato célula-célula. Percebe-se que as células começam a formar ilhas populacionais, onde provavelmente acontecem interações celulares. Na concentração de 5 mg/mL o efeito na confluência das células se agrava mostrando uma redução da monocamada com aparecimento em maiores quantidades de algumas células soltas e de tamanho reduzido. As células também alteram um pouco sua morfologia passando a serem mais afiladas em relação ao controle, apresentando algumas projeções, efeito que

pode ser melhor observado na **(Figura. 12)**, em um aumento de 200x. Na concentração de 10 mg/mL os efeitos são amplificados, observando-se menor confluência do que nas demais concentrações com células mais alongadas e finas, muitas vezes sendo difícil definir uma forma, além de uma maior quantidade de células isoladas.

No tratamento com holo-bLf as células responderam de maneira similar ao que foi visto na apo-bLf. As células perderam sua confluência, reduzindo a área da monocamada, adquiriram nova morfologia com mais projeções tornando-se mais alongadas e finas, formando também pequenas populações isoladas de células que ainda teriam capacidade de se comunicar. É importante ressaltar que na incubação com holo-bLf os efeitos citados foram mais evidentes e aconteceram em concentrações menores de bLf o que fica evidente ao comparar as **Figuras 10 e 11**.

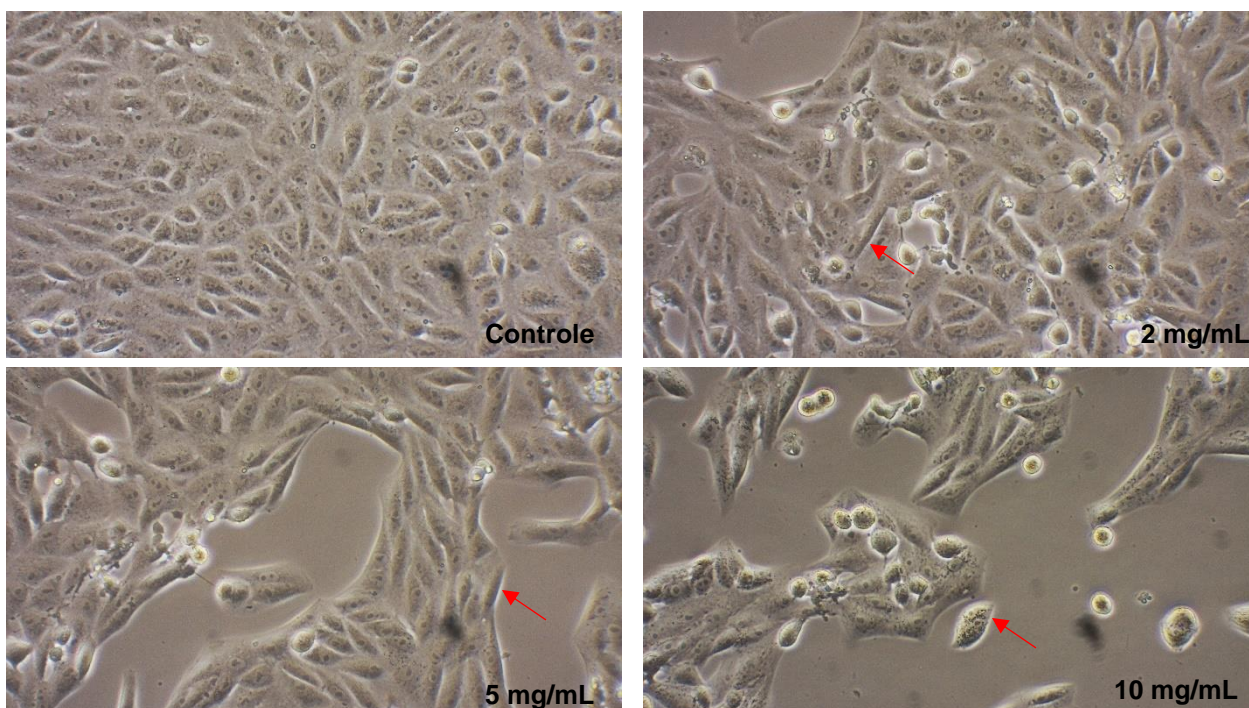


Figura 12: Efeito morfológico da Apo-bLf em maior aumento. Fotos tiradas usando microscopia ótica com contraste de fase no microscópio Motic, setas em vermelho apontam para as alterações morfológicas. As células foram incubadas durante 24hrs com apo-bLf nas concentrações de 0, 2, 5 e 10 mg/mL. Zoom ótico de 200x

O aumento de 200x permitiu melhor visualização do efeito sobre a morfologia da células Vero com apo-bLf. Nele fica mais claro observar as variações morfológicas sofridas pelas células em comparação ao controle, já na concentração de 2 mg/mL. Nessa magnitude as células mostram seu perfil anormal, alongado e fino, muitas vezes fusiforme. Foi possível notar também, que no citoplasma das células incubadas com a proteína há um aumento de grânulos que não foram possíveis de serem explicados com esse experimento, podendo ser decorrentes do stress sofrido com as adições da proteína. Notaram-se algumas células mais arredondas e soltas da monocamada, possivelmente passando por algum processo de morte celular.

O experimento permitiu observar o estresse morfológico que a célula Vero sofreu ao ser incubada por 24 horas em variadas concentrações de apo- e holo-bLf. Essas mudanças também parecem ocorrer e serem agravadas de uma maneira dose-dependente.

4.2. Viabilidade celular e Lactoferrina bovina

As análises da morfologia celular sugerem que a bLf influencia as células Vero levando as mesmas ao stress e por consequência uma redução na sua viabilidade. Para melhor entender esses efeitos foram realizados testes de viabilidade celular utilizando MTT e o teste de contagem celular com azul de tripan. O ensaio de MTT quantifica a redução de MTT a formazan, processo ligado à atividade mitocondrial que por sua vez é associado a viabilidade celular e muito utilizado para teste de citotoxicidade e viabilidade celular (Mosmann, 1983; Carvalho et al., 2014).

Inicialmente as células foram incubadas com apo- e holo-bLf durante 72 horas em diferentes concentrações. Para apo-bLf foram utilizadas concentrações de 0, 2, 5, 10, 15 e 20 mg/mL (**Figura. 13**). Para holo-bLf foram utilizadas concentrações mais baixas de 0, 0.5, 1, 1.5, 2.5 e 5 mg/mL (**Figura. 14**).

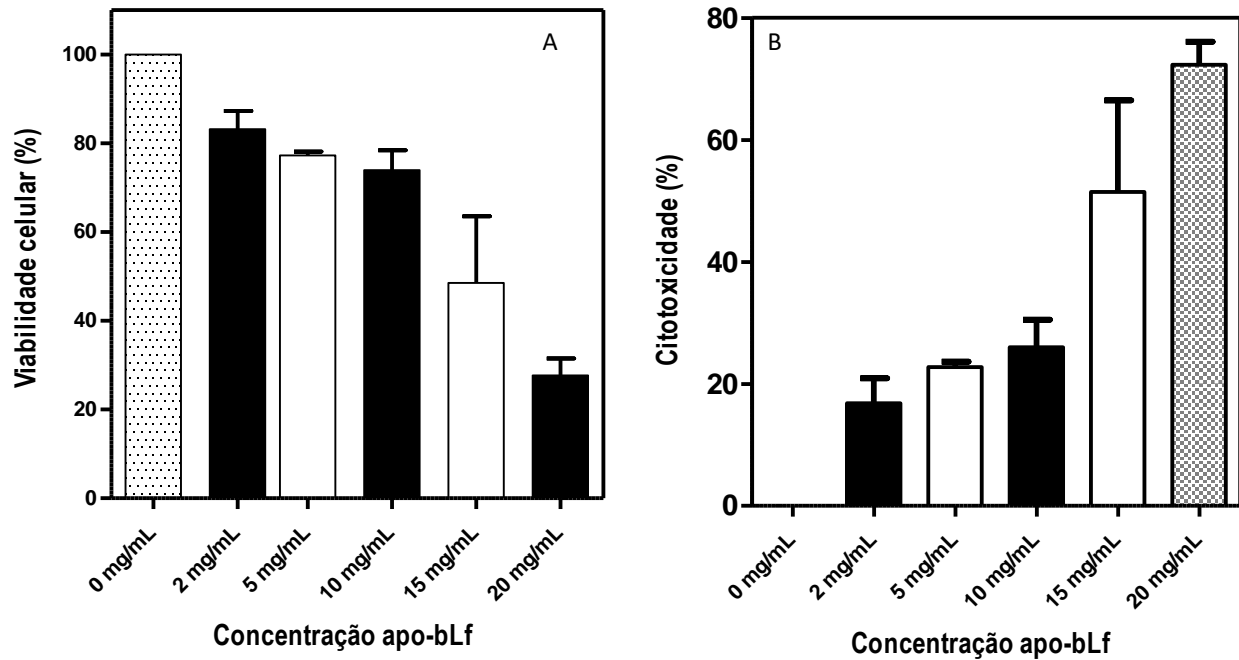


Figura 13: Gráficos de viabilidade e citotoxicidade da apo-bLf em 72hrs. As células foram incubadas por 72hrs nas concentrações de 0, 2, 5, 10, 15 e 20 mg/mL. (n=2)

A apo-bLf mostrou reduzir a viabilidade celular em torno de 20% na concentração de 2 mg/mL chegando até 70% de redução na concentração de 20 mg/mL. Essa eficácia também é traduzida na citotoxicidade da proteína que avalia o quão tóxica é a proteína e sua capacidade de matar as células. Tanto a viabilidade quanto a citotoxicidade possuem uma resposta dose dependente. A capacidade da apo-bLf de reduzir a viabilidade das células corrobora com as fotomicrografias das células onde a medida em que se altera a morfologia e interação célula-célula vai existir também, possivelmente, uma perda de função das mesmas.

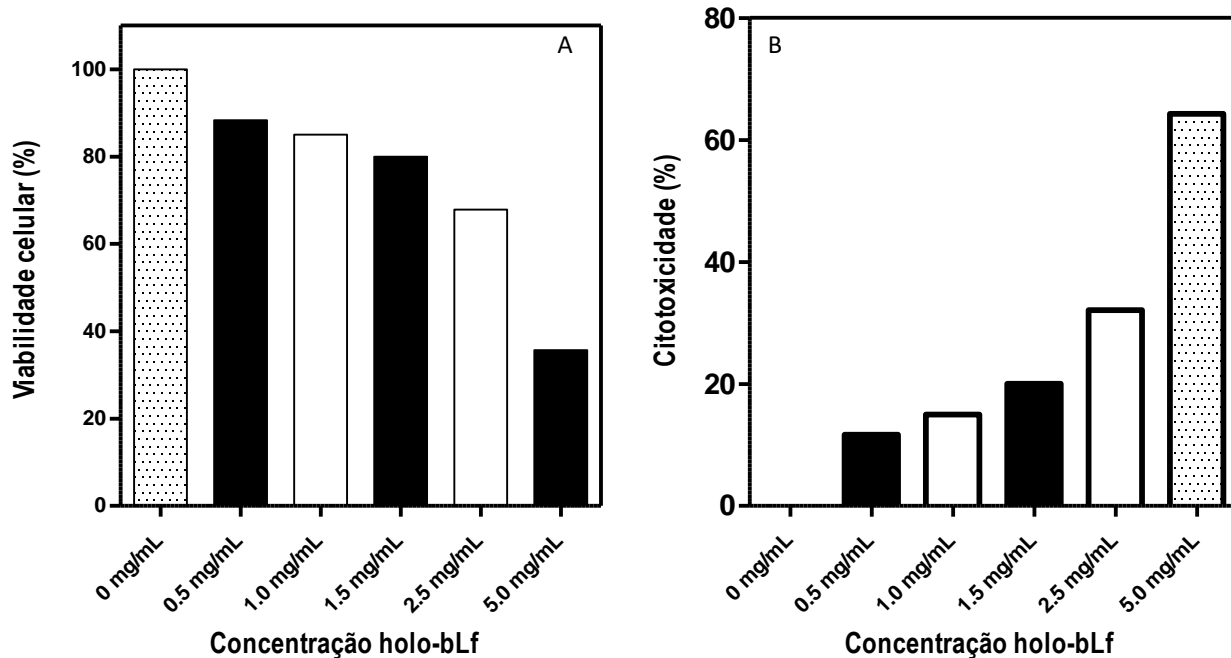


Figura 14: Gráficos de viabilidade e citotoxicidade da holo-bLf em 72hrs. As células foram incubadas por 72hrs nas concentrações de 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 e 5 mg/mL (n=1).

A holo-bLf foi capaz de reduzir a viabilidade das células Vero em cerca de 15% na concentração de 0.5 mg/mL, respondendo como a apo-bLf, de forma dose-dependente, mesmo estando mais diluída que sua forma não saturada de ferro. Pelo teste de MTT a holo-bLf mostrou ter um efeito na citotoxicidade e na viabilidade mais expressivo que a apo-bLf, resultado similar ao que foi observado quando se avaliou a morfologia celular.

Na literatura alguns teste evidenciaram que a bLf saturada com ferro exerce um efeito citotóxico a depender do tipo de linhagem celular. Foi visto que a holo-bLf era capaz de induzir a apoptose através da inibição da survivina em células do câncer de mama (Gibbons et al., 2015), enquanto nas células HeLa, a holo-bLf não pareceu induzir apoptose, somente a forma apo-bLf (Luzi et al., 2016). Um artigo publicado em 2014 por Carvalho et al., mostrou que a apo-bLf em concentrações de até 1 mg/mL não era capaz de afetar a viabilidade celular em Vero, e sim, de certa maneira, a apo-bLf parecia beneficiar as células nessas concentrações.

A utilização do teste de MTT não é a única forma de comprovar se a célula está sofrendo estresse ou se ela está realmente morrendo, contudo, fornece bons indícios preliminares. E em busca de avaliar a capacidade da apo-bLf em afetar a viabilidade das células, foi realizado uma contagem com azul de Tripán (**Figura. 15**) para fomentar os dados obtidos com MTT, visto que a apo-bLf é mais utilizada na literatura.

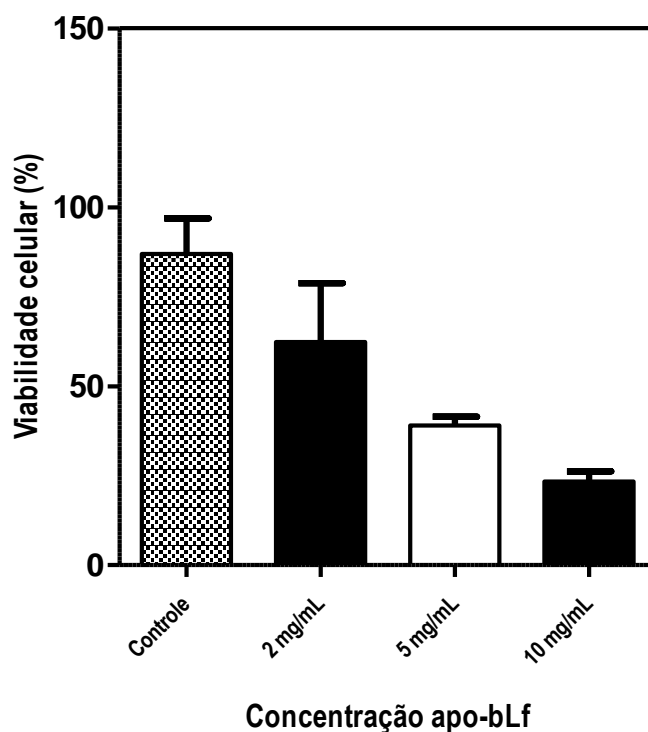


Figura 15: Viabilidade celular apo-bLf 24hrs. O gráfico mostra a viabilidade das células após 24hrs de incubação com apo-bLf nas concentrações de 0, 2, 5 e 10 mg/mL. (n=1)

A contagem com azul de tripan, apesar de muitas vezes possuir um erro em torno de 30% na estimativa das células, mostrou que a apo-bLf também é capaz de reduzir a viabilidade celular no tempo de 24hrs em concentrações tão baixas quanto 2 mg/mL. A

redução do número de células viáveis no tempo de 24 horas mostrou-se, igualmente, ser um efeito dose-dependente.

Os dados obtidos com os testes de MTT e com a contagem com azul de Tripán demonstraram que a bLf em ambas as formas causam às células Vero um efeito citotóxico que reduz a sua viabilidade e por conseguinte leva à morte das mesmas. Com interesse em entender melhor o tipo de morte que as células estariam passando e, se essa poderia ser apoptose, foram realizados novos experimentos utilizando sondas e marcadores específicos capazes de avaliar a nova hipótese.

4.3. Efeitos da bLf na membrana celular e núcleo

Os dados obtidos com o MTT e azul de Tripán que mostraram o efeito sobre a viabilidade das células Vero. Em seguida, foram então realizados testes para verificar se essa redução poderia ser derivada da apoptose das mesmas. Para tal, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo com marcadores específicos, Anexina V e o 7AAD, no intuito de visualizar apoptose. As células foram incubadas com 5 mg/mL de apo-bLf, durante os tempos de 24, 48 e 72 horas, concentração escolhida por ser a mais baixa e com bom efeito sobre as células durante teste com MTT (**Figura. 16**).

A Anexina V é uma sonda específica, impermeável, para ligar-se ao fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PS). Esse fosfolípido encontra-se na face interna das células e uma das formas de ser exposto à face membranar externa, é mediante sinal de apoptose e ativação das caspases efetoras 3 e 7, expondo o PS para sinalização *eat-me* e eferocitose dos macrófagos (Medina & Ravichandran, 2016).

O 7AAD é um intercalante de DNA que interage com regiões ricas em GC, sendo capaz de entrar na célula e ligar-se ao DNA somente através de permeabilização da membrana plasmática, permitindo assim visualizar e separar células necróticas das demais.

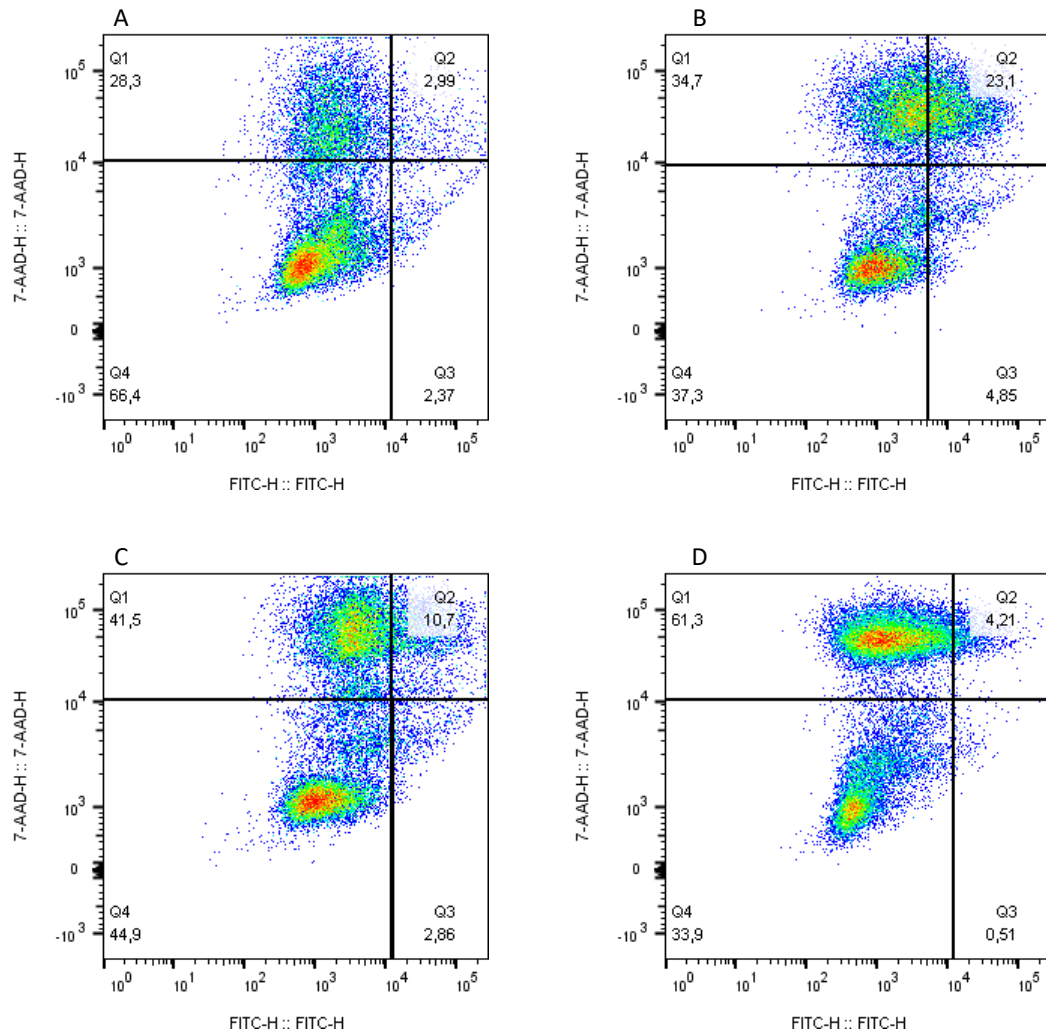


Figura 16: Citometria de fluxo nas células Vero. A figura mostra os quadrantes selecionados para análise dos 100.000 eventos. Na figura A é mostrado o controle do experimento, na B a incubação de 24 horas, na C de 48 horas e na D de 72 horas. Em todos os tempos as células foram incubadas com 5 mg/mL de apo-bLf. (n=1).

Na **Figura 16**, a área foi dividida em 4 quadrantes diferentes: Q1, Q2, Q3 e Q4, que mostram eventos distintos. No quarto quadrante estão representadas as células não marcadas por anexina V e 7AAD, sendo as células viáveis. No Q1 estão as células que não foram marcadas por Anexina V mas sim pelo 7AAD, sendo elas consideradas células necróticas. No Q2 estão as células marcadas por 7AAD e Anexina V, sendo possível

observá-las em estágio de necrose secundária e, por fim, no Q3 estão as células Anexina V positiva somente, sendo elas consideradas as células em apoptose.

Os dados mostraram que em todos os tempos ocorreram um *shifting* das populações de células (eventos) em relação ao controle. No tempo de 24 horas de incubação com apo-bLf foi constatado um maior número de evento no quadrante Q3 que indica um maior número de células em apoptose, também foi visto uma elevação considerável de células em necrose secundária (Q4) em relação ao controle. Nesse tempo observou-se que houve em geral uma elevação quantitativa de células mortas sendo elas apoptóticas ou necróticas.

Nos tempos de 48 e 72 horas houve aumento no número de células mortas e como consequência a redução de células viáveis, no entanto, a distribuição dos eventos mostrou-se alterado do observado em 24 horas. Nesses dois tempos, o maior número de eventos de morte se concentra no quadrante Q1 onde estão as células consideradas necróticas.

Como efeito de facilitar a visualização dos eventos, os dados obtidos foram tratados e analisados em forma de gráficos. A primeira avaliação demonstra comparativamente os eventos de morte celular *versus* viabilidade das células (**Figura. 17**).

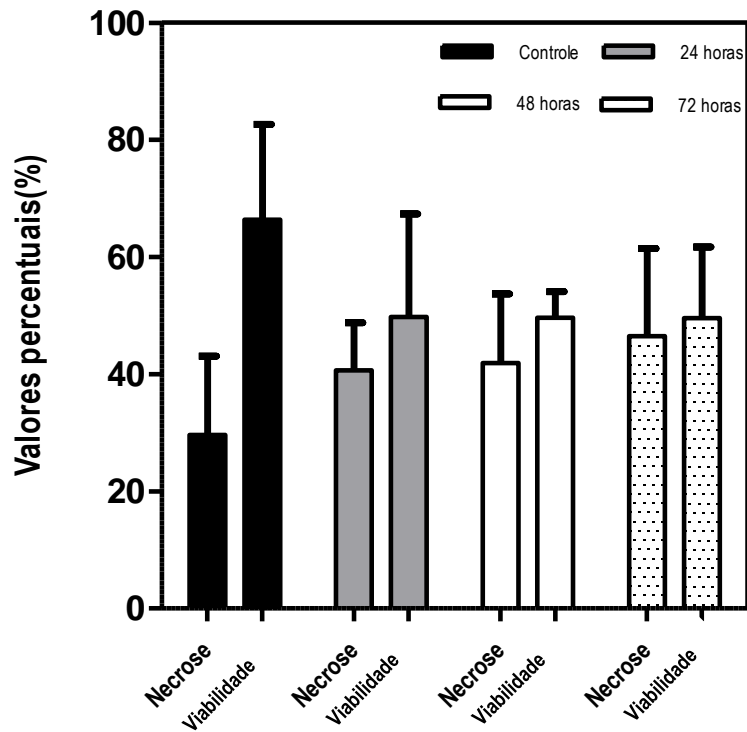


Figura 17: Comparação de morte por necrose induzida por bLf com viabilidade celular. O gráfico compara os valores percentuais de morte por necrose e viabilidade celular no controle e nos tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação. (n=1).

O gráfico mostra que a apo-bLf teve influência direta na viabilidade das células reduzindo-a em cerca de 60% quando incubadas por 72 horas. Há uma tendência de aumento da morte por necrose de maneira tempo dependente que é indicada pela marcação individual de 7AAD, que necessita de um dano na membrana celular para a entrada do mesmo.

Como o objetivo do projeto era avaliar a ativação da apoptose pela bLf, foi investigado se o número de células apoptóticas aumentava em consideração ao controle, o que pode ser notado na **Figura. 18**.

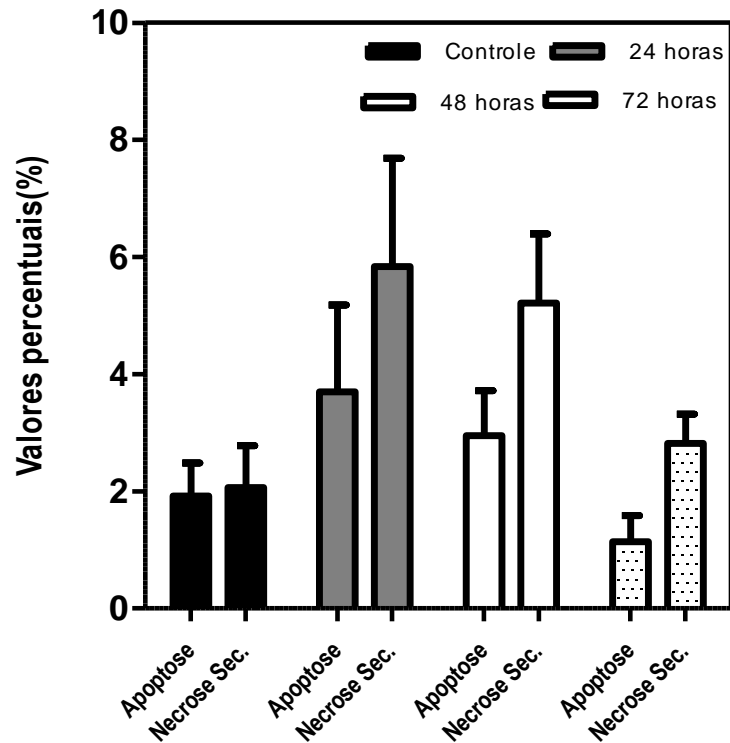


Figura 18: Comparação de morte por apoptose com necrose secundária. O gráfico compara os valores percentuais de morte por apoptose e necrose secundária no controle e nos tempos de 24, 48 e 72 horas de incubação. (n=1).

O gráfico acima melhor revela o que foi evidenciado na seleção dos gates na **Figura 17**. Nele podemos perceber que a apo-bLf influenciou positivamente as mortes por apoptose, contudo, no tempo de 72 horas, verificou-se a diminuição dessas mortes, sincronicamente ao aumento da necrose secundária. Ainda tema de discussão, a necrose secundária pode ser considerada um caminho natural das células apoptóticas em modelos *in vitro* (Silva, 2010). Ela ocorre quando a célula completa sua cascata apoptótica, mas não existe a atividade das células fagocitárias para realizar a eferocitose e retirar a célula apoptótica da região e como consequência ocorre uma permeabilização da membrana e extravasamento de seu conteúdo citosólico, o que permite assim por exemplo explicar a marcação com 7AAD em células anexina V positivas.

Consequentemente, podemos considerar pelos resultados da citometria de fluxo que a apo-bLf aumentou a quantidade de células em apoptose quando comparadas ao controle. Constatou-se ainda que o melhor tempo para visualizar as alterações nas células para apoptose foi de 24 horas. Por outro lado, os períodos mais longos de incubação parecem perder o *timing* para observar essas mudanças capturando outros eventos.

4.4. Avaliação da atividade enzimática das caspases efetoras

Sabe-se que uma das funções da caspase-3 é clivar e inativar as escramblases clivando-as em regiões específicas dessa proteína. Com isso, a célula passa a expor na face externa de sua membrana, o fosfatidilserina, fosfolípido que em condições normais fica voltado para o interior da célula (Nagata, 2018).

Os dados obtidos com a citometria de fluxo mostram que a ligação de anexina V com o PS é aumentada quando as células são incubadas com apo-bLf. Desse modo, decidiu-se avaliar se essa alteração na exposição do fosfolípido ocorria derivada do incremento da atividade enzimática das caspases-3/7.

As células foram incubadas com apo- e holo-bLf nas concentrações de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 e 1,0 mg/mL durante 96 horas e em seguida, medida sua atividade caspásica. Por ser um experimento muito sensível que detecta pequenas variações na atividade enzimática utilizaram-se concentrações mais baixas de bLf por um tempo maior de incubação (**Figura. 19**).

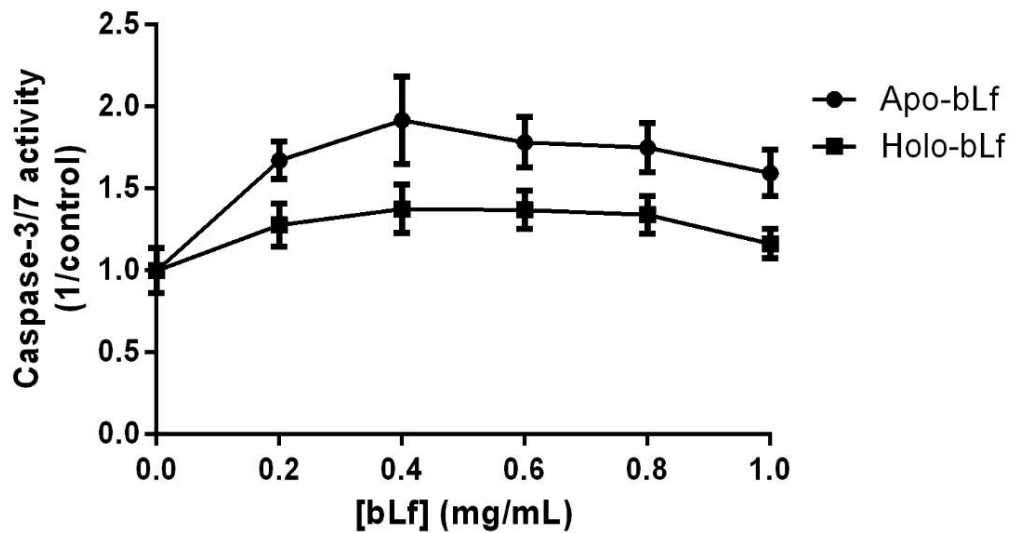


Figura 19: Efeito da bLf nas caspases em 96 horas de tratamento. As células foram incubadas por 96hrs nas concentrações de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 e 1 mg/mL e a atividade enzimática das caspases avaliada com o kit Caspase-Glo 3/7 (Promega®). (n=1).

O ensaio evidenciou que ambas as formas de bLf induziram aumento da atividade enzimática das caspases-3/7. A apo-bLf mostrou ter uma maior influência do que a holo-bLf, acrescentando a atividade em quase 70% na concentração de 0.4 mg/mL. Esta também foi a concentração de holo-bLf que elevou a atividade das caspases efectoras. Nas demais concentrações, essa atividade parece atingir um platô.

É sabido que as caspases efectoras permanecem em forma de zigômeros inativos no citoplasma das células e após toda cascata de sinalização, elas são clivadas e passam a realizar sua atividade catalítica (Kuranaga & Miura, 2007). O experimento deixa claro que existe um aumento das caspases ativas, pois mede a atividade dessas enzimas. Porém, não é possível inferir se a bLf está interferindo diretamente na clivagem desses zigômeros ou se ela está afetando positivamente a expressão dessas proteínas e, por consequência, aumentando a sua quantidade e atividade. Mais estudos precisam ser feitos para tentar elucidar essa pergunta.

4.5. Avaliação do estresse oxidativo e ativação de apoptose

Em última análise, as células Vero foram incubadas com apo- e holo-bLf nas concentrações de 2, 5 e 10 mg/mL durante 24 e 48 horas. Após esse período, as células foram marcadas com sondas para avaliar estresse oxidativo, detecção de superóxidos totais (DHE) (**Figuras 20 e 21**) e sondas para morte celular (Cell event Caspase 3/7 e Etídio homodímero) e sonda de marcação nuclear, Hoechst.

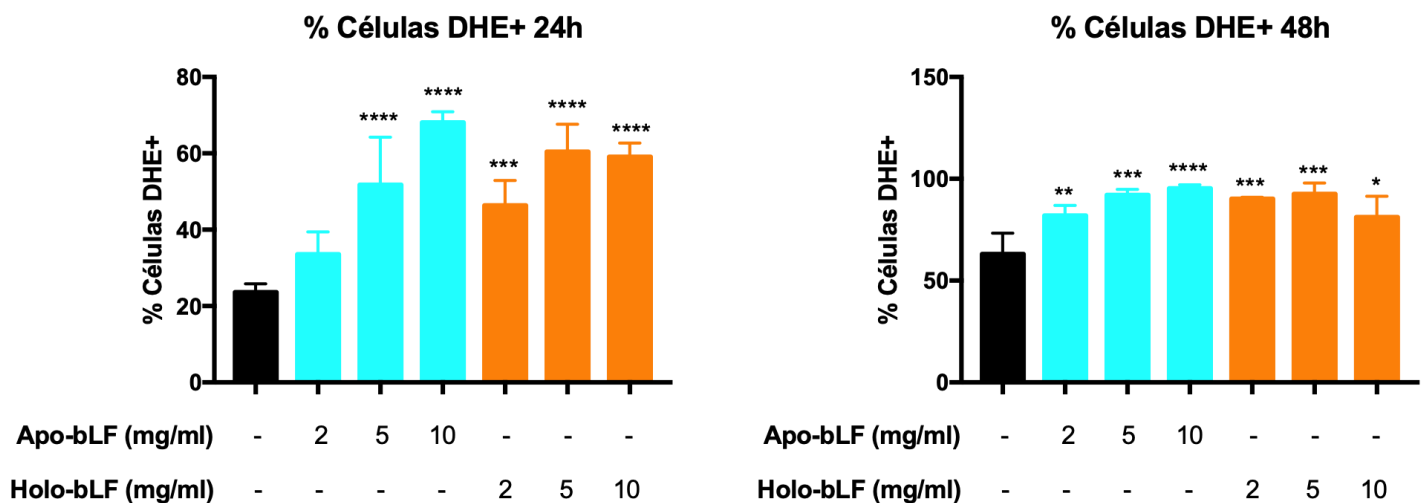


Figura 20: Porcentagem de células que marcam DHE em 24 e 48 horas. Os gráficos mostram a quantidade de células marcadas com DHE. Em preto o controle, na coloração azul apo-bLf e em laranja holo-bLf. (n=1)

A partir de análises qualitativas, foi definido um limiar de expressão de DHE que pode ser quantificado e demonstrado em gráficos. Em ambos os tempos, a apo- e holo-bLf mostraram capacidade de aumentar a expressão de ROS nas células Vero, com a exceção da apo-bLf que não mostrou valores estaticamente significativos.

A holo-bLf parece interferir mais na produção de ROS do que a apo-bLf. Observando os gráficos pode-se notar que o percentual de células expressando as espécies reativas de oxigênio aumentava em concentrações maiores de lactoferrina, sendo melhor observadas quando utilizadas as concentrações 5 e 10 mg/mL (**Figura 20**).

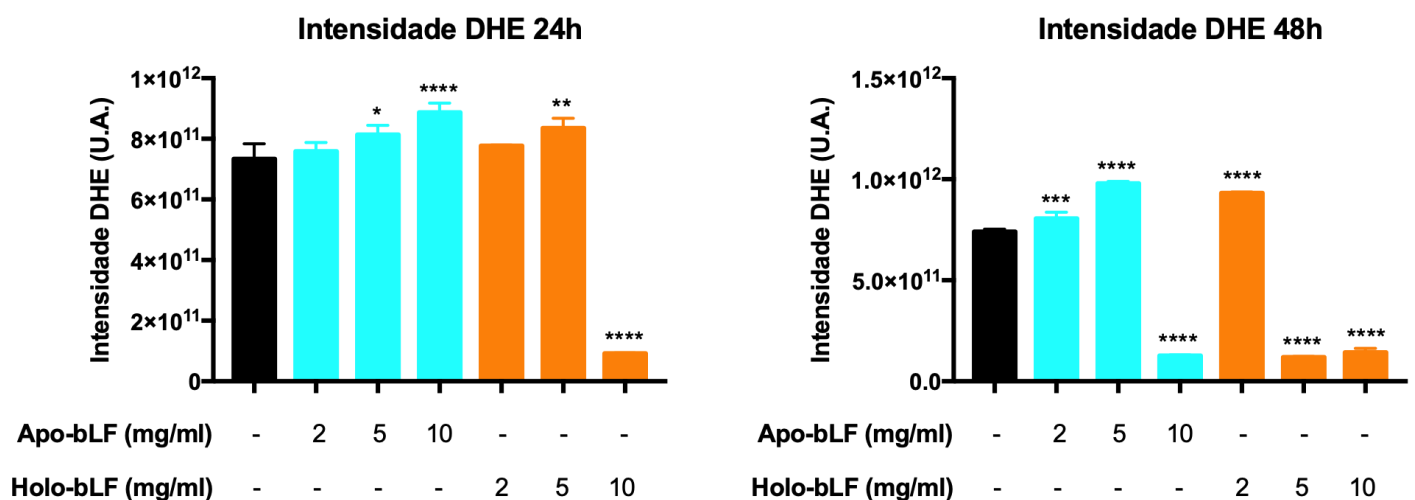


Figura 21: Intensidade da expressão de DHE nas células em 24 e 48 horas. Os gráficos mostram a densidade de expressão de DHE nas células. Em preto o controle, na coloração azul apo-bLf e em laranja holo-bLf.

Observou-se, ainda utilizando a sonda DHE, a intensidade na qual as células expressavam esse marcador. Esses valores estimam a quantidade de ROS encontrado por célula.

Nos gráficos da **Figura 21**, nota-se que existe uma diminuição significativa na intensidade de DHE quando se compara os tempos de 24 e 48 horas. Era esperado uma resposta dose e tempo-dependente da produção de ROS e bLf. Contudo, parece que para esse tipo de linhagem celular o aumento de ROS possui uma cinética diferente dos aqui observados.

Tal hipótese é corroborada quando comparamos a holo-bLf 5 mg/mL nos dois tempos distintos. Enquanto em 24 horas existe uma alta produção de ROS, em 48 horas ela reduziu expressivamente de intensidade, o que talvez tenha sido causado pela morte das células devido a altas concentrações de ROS que, por sua vez, não puderam ser observadas nos tempos escolhidos. Na **(Figura 22)** é mostrado o número de células viáveis nas diferentes concentrações e incubação.

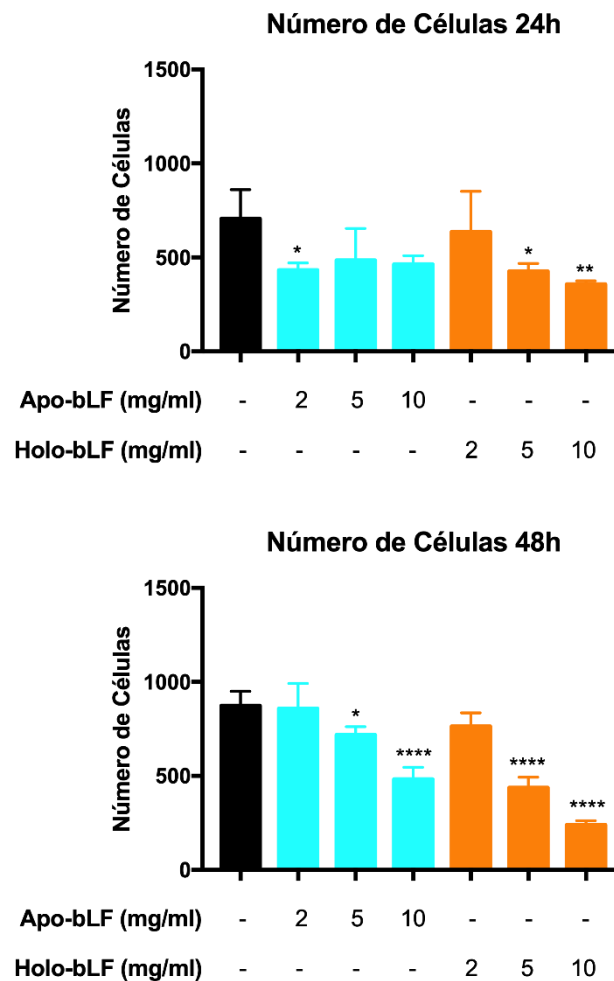


Figura 22: Número de células contadas: as células podem ser contadas a partir da marcação de DHE e Hoescht. Em preto o controle, em azul apo-bLf e em laranja holo-bLf. (n=1).

A contagem de células parece confirmar os efeitos vistos na medição da intensidade de DHE. Foram observadas quedas no número de células no tempo de 24 e 48 horas. A apo-bLf, na concentração de 2 mg/mL, mostrou possuir função oposta nos diferentes tempos. Enquanto em 24 horas reduziu significativamente o número de células, em 48 horas a contagem mostra uma recuperação dessas células, parecendo auxiliar na proliferação das mesmas, fato também notado em Carvalho *et al.* (2014). Nas demais concentrações, a bLf atua reduzindo o número de células, o que pode ser uma explicação plausível para os dados da **Figura 21**, pois se as células já morreram, não há como ocorrer uma marcação do ROS intracelular, perdendo sua intensidade.

Os testes com DHE demonstraram que a lactoferrina bovina possui potencial para causar um estresse celular por elevação de espécies reativas de oxigênio no seu citoplasma, culminando em morte celular tanto na apo-bLf (**Figuras. 23 e 24**) quanto na holo-bLf (**Figuras 25 e 26**). Nesse experimento as mitocôndrias também foram marcadas e se mostraram co-localizadas ao DHE, sugerindo que quanto utilizadas em altas concentrações a bLf pode induzir um dano mitocondrial podendo levar a liberação de ROS

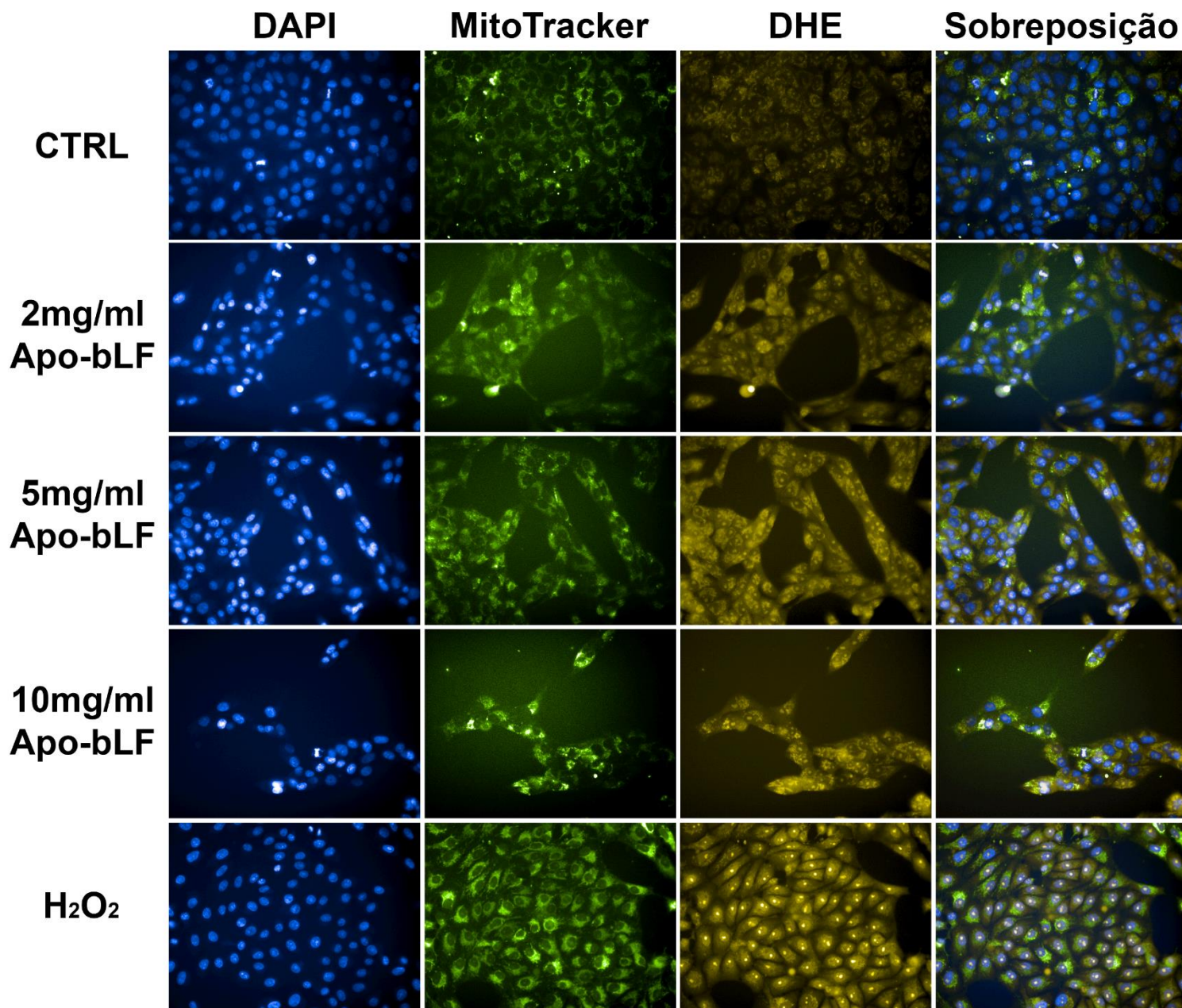


Figura 23: Estresse oxidativo induzido por apo-bLf em 24h. As figuras mostram a quantidade de ROS encontrada das células Vero após tratamento com bLf. Em azul, o núcleo, em verde, mitocôndrias e em amarelo, ROS. (n=1).

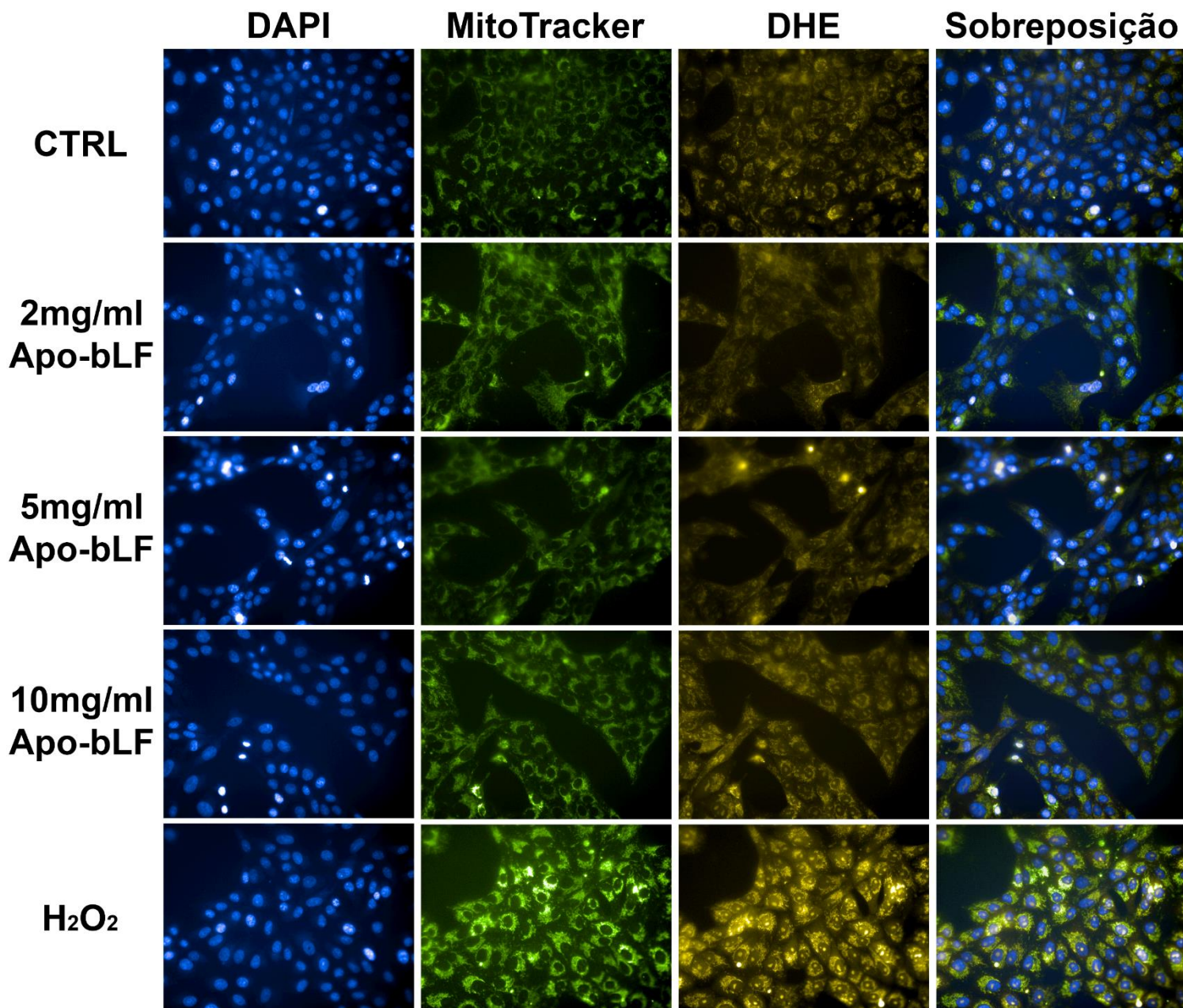


Figura 24: Estresse oxidativo induzido por apo-bLf em 48h. As figuras mostram a quantidade de ROS encontrada das células Vero após tratamento com bLf. Em azul, o núcleo, em verde, mitocôndrias e em amarelo, ROS. (n=1).

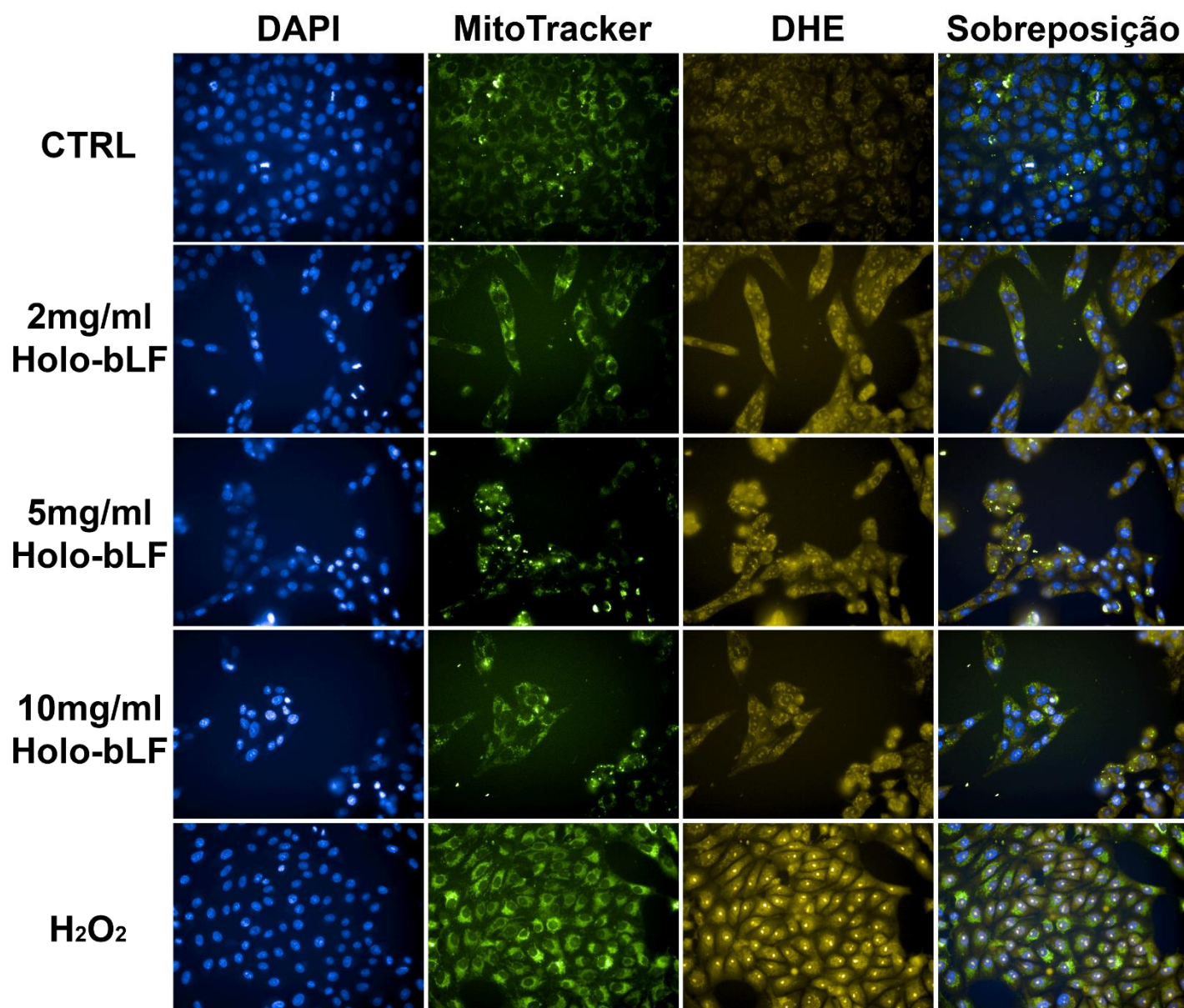


Figura 25: Estresse oxidativo induzido por holo-bLf em 24h. As figuras mostram a quantidade de ROS encontrada das células Vero após tratamento com bLf. Em azul, o núcleo, em verde, mitocôndrias e em amarelo, ROS. (n=1).

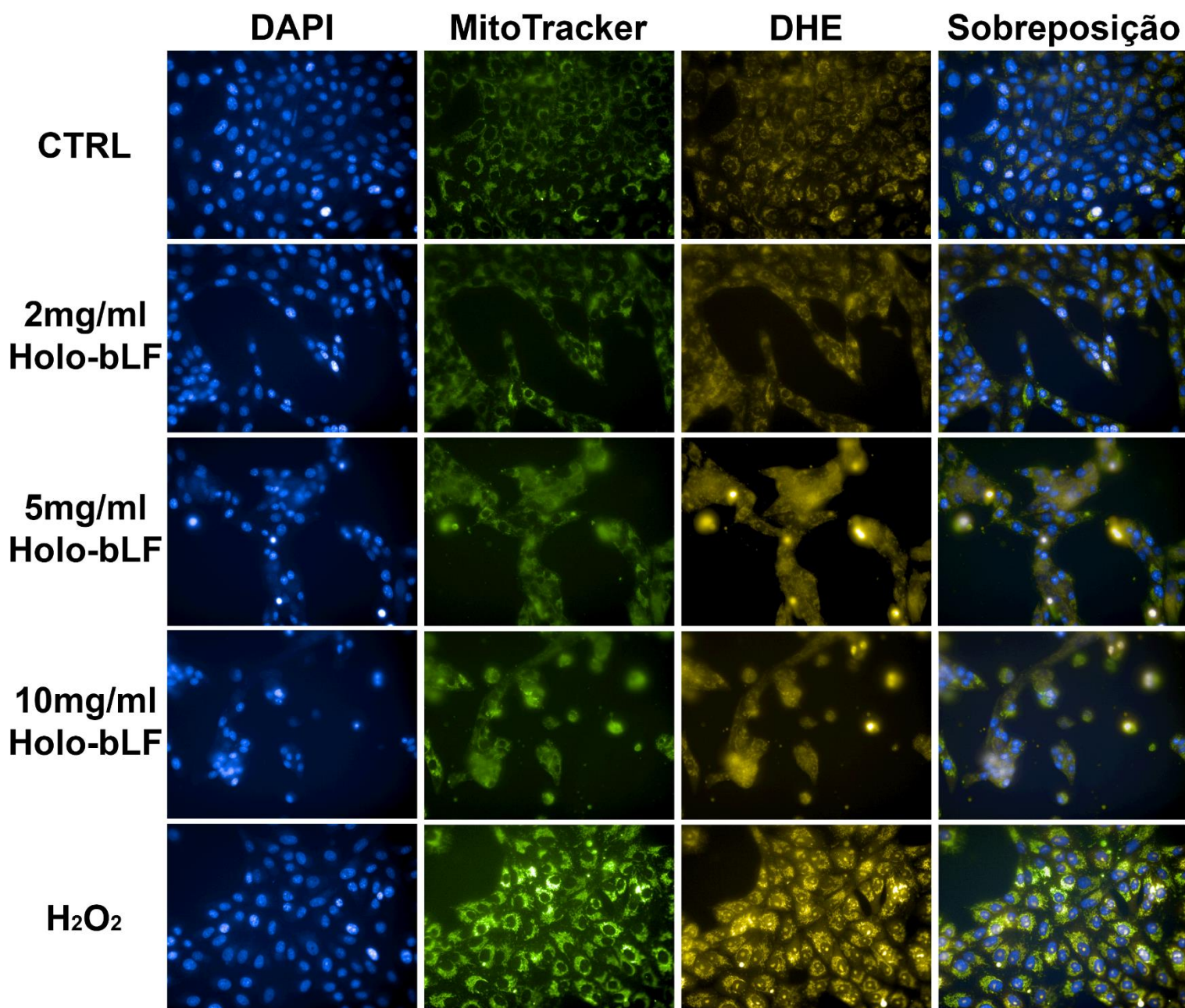


Figura 26: Estresse oxidativo induzido por holo-bLf em 48h. As figuras mostram a quantidade de ROS encontrada das células Vero após tratamento com bLf. Em azul, o núcleo, em verde, mitocôndrias e em amarelo, ROS. (n=1).

Com o intuito de investigar se o tipo de morte sofrido pelas células seria apoptótica, foram utilizadas as sondas Caspase-3/7, Homodímero de etídio e Hoescht. Nas **(Figuras. 27 e 28)** observou-se que a apo-bLf marcou menos caspases-3/7 do que a holo-bLf **(Figuras. 29 e 30)** nos tempos de 24 e 48 horas, tempo que em geral, foi melhor visualizado os efeitos da bLf sobre as células. Nota-se também o aparecimento da marcação de EthD-1 que parece ser pouco expressiva durante as 24 horas de incubação.

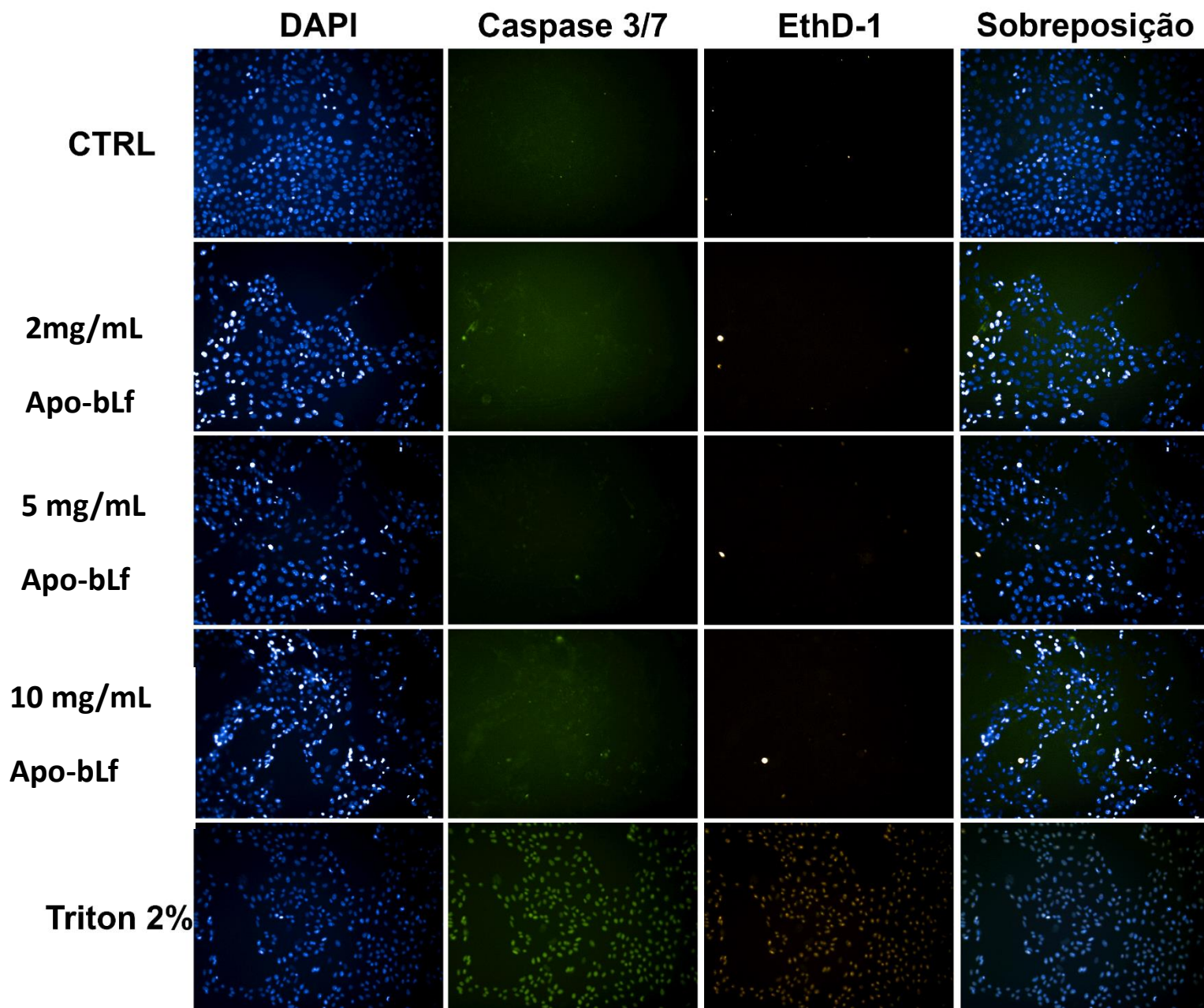


Figura 27: Ativação das caspases e morte celular induzida por apo-bLf em 24h. As figuras mostram ativação das caspases-3/7 nas células Vero após tratamento com bLf e também morte com EthD-1. Em azul, o núcleo, em verde, caspases-3/7 e em vermelho, EthD-1. (n=1).

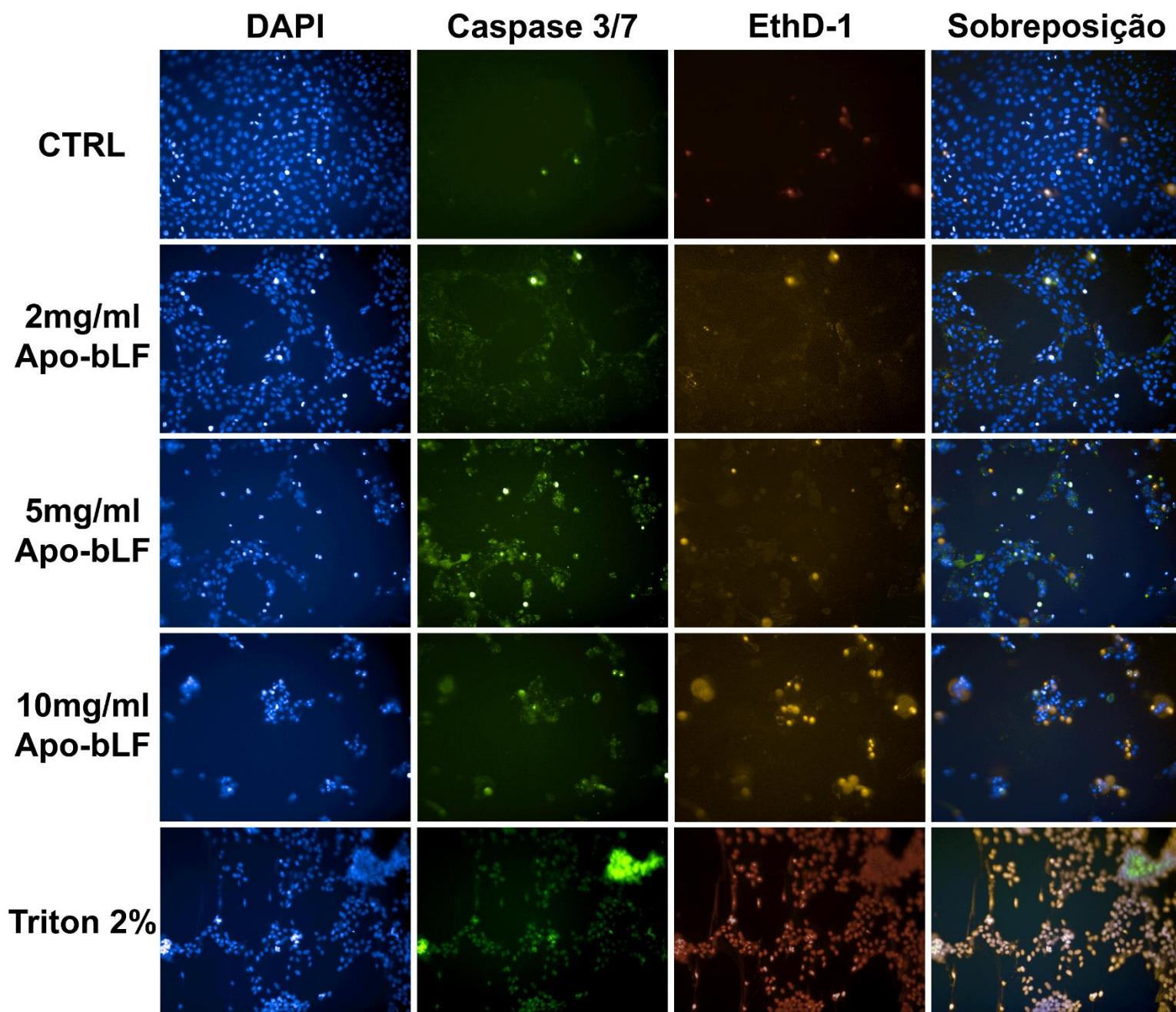


Figura 28: Ativação das caspases e morte celular induzida por apo-bLf em 48h. As figuras mostram ativação das caspases-3/7 nas células Vero após tratamento com bLf e também morte com EthD-1. Em azul, o núcleo, em verde, caspases-3/7 e em vermelho, EthD-1. (n=1).

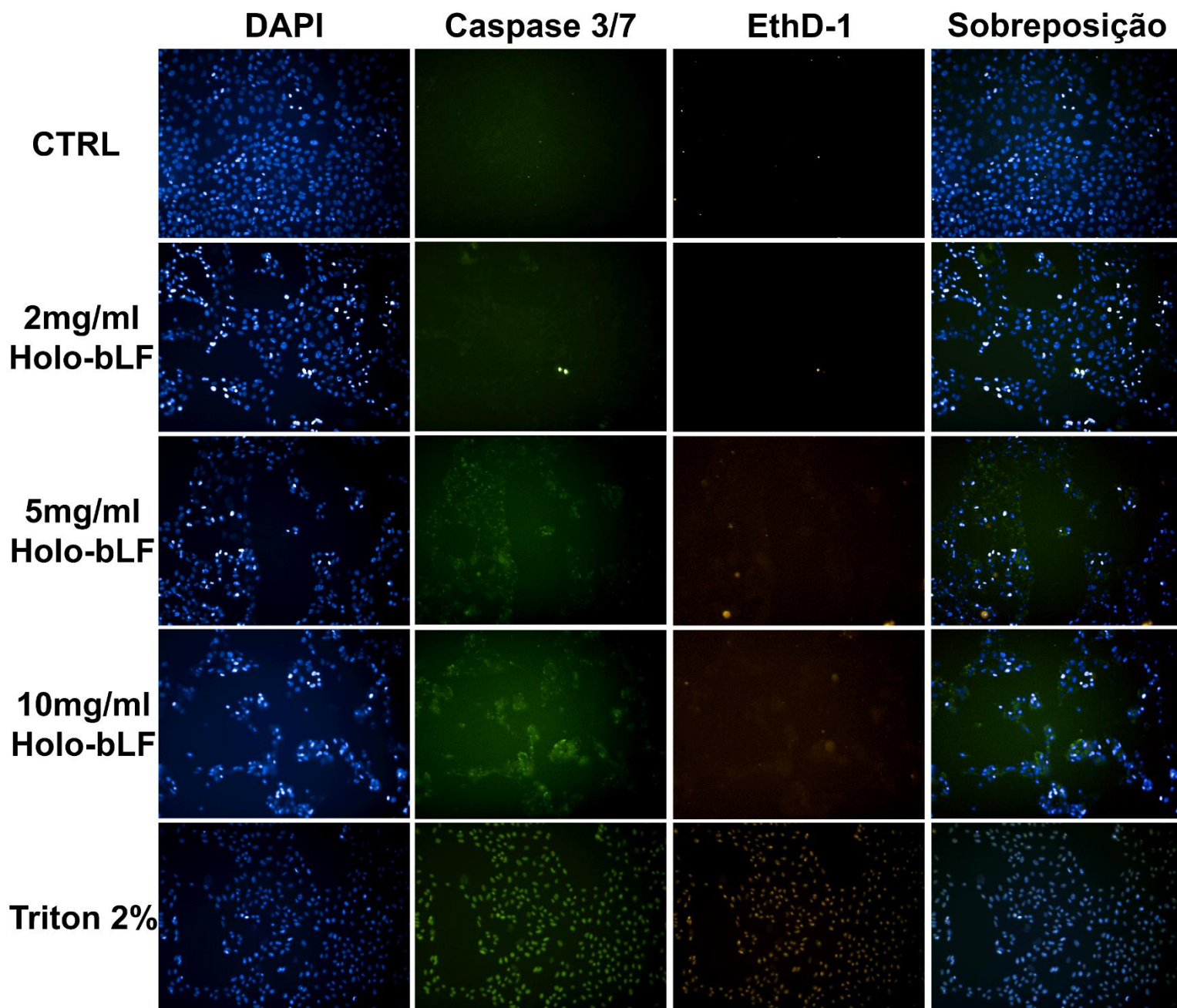


Figura 29: Ativação das caspases e morte celular induzida por holo-bLf em 24h. As figuras mostram ativação das caspases-3/7 nas células Vero após tratamento com bLf e também morte com EthD-1. Em azul, o núcleo, em verde, caspases-3/7 e em vermelho, EthD-1. (n=1).

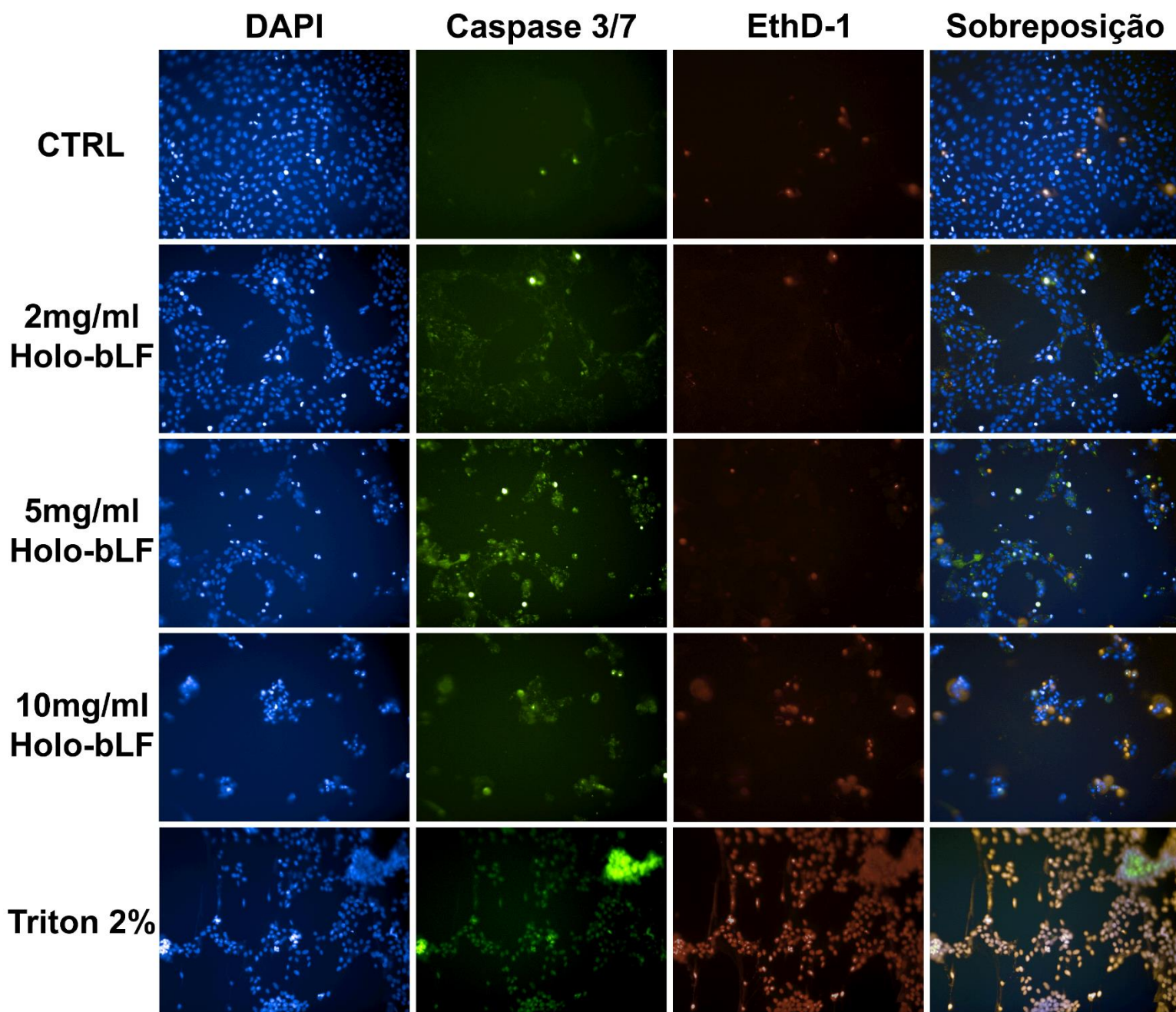


Figura 30: Ativação das caspases e morte celular induzida por holo-bLf em 48h. As figuras mostram ativação das caspases-3/7 nas células Vero após tratamento com bLf e também morte com EthD-1. Em azul, o núcleo, em verde, caspases-3/7 e em vermelho, EthD-1. (n=1).

5. Conclusão

O presente estudo buscou entender a relação entre a lactoferrina bovina, em suas formas apo-bLf e holo-bLf e o processo de morte celular por apoptose em células Vero. Observou-se que a bLf induz alterações na monocamada celular bem como alterações morfológicas deixando as células sem forma definida. A proteína teve efeito na viabilidade celular, sendo citotóxica à célula em altas concentrações na forma apo-bLf e em concentrações mais diluídas na forma holo-bLf. A citometria de fluxo mostrou uma elevação na morte das células, sendo elas necróticas e também apoptóticas visualizadas através da marcação com Anexina V. Os motivos que podem ter levado as células à morte foram melhor explicados através da marcação com DHE, onde as células exibiram expressiva quantidades de *ROS* em seu citoplasma, sendo essa, uma condição altamente estressante à célula potencializando a ativação de vias de morte celular. Através do ensaio que avaliou a atividade enzimática das caspases efetoras, ficou claro o efeito ativador que a bLf tem sobre elas, o que foi endossado pelas imagens de microscopia de fluorescência, nas quais as caspases-3 e 7 foram marcadas.

O projeto mostrou que a bLf induz morte celular em linhagens Vero, em suas duas formas. E devido as evidências com marcações específicas para apoptose, é possível dizer que esse tipo de morte celular está sendo ativado por meios que ainda precisam ser melhor investigados.

6. Referências

AISEN, P; LEIBMAN, A. **Lactoferrin and Transferrin: A Comparative Study.** Biochimica et Biophysica Acta, p. 314-323, 1971.

ARUN, S et al. **Apoptosis: A Review.** Oral & Maxillofacial Pathology Journal, v.1, n.2, Jul-Dez. 2010.

BAKER, E. N. **Structure and reactivity of Transferrin.** Advan. Inorg. Chem, p. 389-463, 1994.

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

BAKER, E. N; BAKER H. M. **Molecular Structures, binding properties and dynamics of lactoferrin.** Cellular and Molecular Life Sciences, p. 2531-2539, 2005

BALDWIN, D.A; ELIZABETH, R.J; AISEN, P. **The Effect of Human Serum Transferrin and Milk Lactoferrin on Hydroxyl Radical Formation from Superoxide and Hydrogen Peroxide.** The Journal of Biological Chemistry, p. 13391-13394, 1984.

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

Carvalho, C.A.M.; Casseb, S.M.M.; Gonçalves, R.B.; Silva, E.V.P.; Gomes, A.M.O.; Vasconcelos, P.F.C. **Bovine lactoferrin activity against Chikungunya and Zika viruses.** Journal of General Virology, 98:1749-1754, 2017.

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.

ELMORE, Susan. **Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.** *Society of Toxicologic Pathology*, n.35, p. 495-516, 2007.

FARNAUD, S; EVANS, W. R. **Lactoferrin: A Multifunctional Protein with Antimicrobial Properties.** *Molecular Immunology*, 40, p. 395-405, 2003.

FUCHS, Y; STELLER, H. **Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells.** *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 2014.

GALLUZI, L & VITALE, I. **Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.** *Cell death & Differentiation*, p. 486-541, 2018.

Gibbons, J. A.; Kanwar, J.R; Kanwar, R. K. **Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer.** *BMC Cancer*, 2015.

HESSIN, A et al. **Lactoferrin Enhanced Apoptosis and Protected Against Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis in Rats.** *OA Maced J Med Sci*, p. 195-201, 15 jun. 2015

ICHIM, G; TAIT, W. G. **A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process.** *Nature reviews, Cancer*, vol. 16, p. 539-548, 2016.

KATUNUMA, N et al. **A Novel Apoptosis Cascade Mediated by Lysosomal Lactoferrin and its Participation in Hepatocyte Apoptosis Induced by D-glactosamine.** FEEBS Letters, n. 580, p. 3699-3705, 5 jun. 2006.

KHOSRAVI-FAR, R.; LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. **Programmed Cell Death: general principles for studying cell.** Methods in enzymology, vol. 442; 2008.

KURANAGA, E & MIURA, M. **Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination.** TRENDS in Cell Biology, vol. 17, n.03, p. 135-144, 2007.

LEGRAND, Dominique et al. **Lactoferrin Structure and Functions.** Bioactive components of milk, p. 163-194, 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 Ver Nutr, 15, p. 93-110, 1995.

LUZI, C et al. **Apoptotic effects of bovine apo-lactoferrin on HeLa tumor cells.** Cell Biochemistry & Function, p. 1-9, 2017.

MEDINA, C.B; RAVICHANDRAN, K.S. **Do not let death do us part: 'find-me' signals in communication between dying cells and the phagocytes.** Cell Death and Differentiation, p. 979-989, 2016.

MONTOYA, G. A. I et al. **Lactoferrin a Multiple Bioactive Protein: An Overview.** Biochimica et Biophysica Acta, p. 226-236, 2012.

MOORE, S. A et al. **Three-dimensional Structure of Diferric Bovine Lactoferrin at 2.8 Å Resolution.** J. Mol. Biol, p. 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.

NAGATA, Shigekazu. **Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells.** Annual review of Immunology, p. 489-517, 2018.

PEREIRA, C.S et al. **Lactoferrin selectively triggers apoptosis in highly metastatic breast cancer cells through inhibition of plasmalemmal V-H⁺-ATPase.** Oncotarget, Vol.7, n.38, 2016.

SILVA, T. MANUEL. **Secondary Necrosis: The Natural Outcome Of The Complete Apoptotic Program.** FEBS Letters, p. 4491-4499, 2010.

SMITH, A et al. **Cell Disassembly during apoptosis.** WikiJournal of Medicine, p.4-8, 2017.

SUSANA, A. G. C et al. **Lactoferrin: structures, functions and applications.** Internacional Journal of Antimicrobial Agents, 33, 2009.

TORRES, J. M; CONCEPCIÓN, J. L; VIELMA, J. R. **Detección de lysozima and lactoferrin por westernblot en ovas de Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).** Mundo Pecuário, p. 57-59, 2006.

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

WARD, P.P; PAZ, E; CONNELLY, O. M. **Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview.** Cellular and Molecular Life Sciences, p. 2540-2548, 2005.