

MODULAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR DE QUERATINÓCITOS PELA LACTOFERRINA: IMPLICAÇÕES PARA TERAPIAS DE CICATRIZAÇÃO

MORGANA LÜDTKE AZEVEDO¹; NATHALIA STARK PEDRA¹; ROSELIA SPANEVELLO¹; RAFAEL GUERRA LUND¹

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil – morganaludtke@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A cicatrização da pele é um processo dinâmico e multifatorial que envolve eventos celulares e moleculares interligados, incluindo resposta inflamatória, proliferação e migração celular e remodelamento da matriz extracelular. A regulação adequada desses eventos é essencial para que o reparo da pele seja eficiente, evitando o atraso da cicatrização ou a formação de cicatrizes disfuncionais (PEÑA & MARTIN, 2024).

Entre os moduladores desse processo, a lactoferrina (Lf) tem recebido atenção crescente. Trata-se de uma glicoproteína presente em secreções e grânulos neutrofílicos, que apresenta propriedades antimicrobianas, imunomoduladoras e reguladoras do metabolismo do ferro (NG et al., 2025). Evidências sugerem que a Lf pode influenciar diretamente células epiteliais, modulando sua capacidade proliferativa, migratória e seu equilíbrio redox (ABDALLA *et al.*, 2020; BELVEDERE *et al.*, 2021).

A análise dos efeitos da Lf em queratinócitos humanos é particularmente relevante, uma vez que essas células são protagonistas no processo de cicatrização, atuando na proliferação e migração celular e restauração da barreira epitelial (AMIRI *et al.*, 2022). Assim sendo, compreender como a Lf modula diretamente o comportamento dos queratinócitos pode subsidiar o desenvolvimento de terapias tópicas ou biomateriais para feridas crônicas, onde a regulação redox e o estímulo à reepitelização desempenham papel central.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito de concentrações não citotóxicas de Lf sobre viabilidade, proliferação, migração e marcadores de estresse oxidativo em queratinócitos HaCaT, buscando integrar os achados para entender o potencial terapêutico da Lf em contextos de reparo tecidual.

2. METODOLOGIA

2.1. CULTIVO CELULAR

A linha celular de queratinócitos humanos HaCaT foi obtida do American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). As células foram cultivadas em meio DMEM (pH 7,4) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,1% de anfotericina B. As culturas foram mantidas a 37°C em incubador úmido com 5% de CO₂.

2.2. TRATAMENTO

A Lf foi dissolvida inicialmente em meio de cultura a 5 mg/mL e diluída em DMEM com 10% FBS para obter concentrações finais de 5, 7,5 e 10 µg/mL. As células foram semeadas em diferentes densidades conforme o ensaio (citotoxicidade, migração ou análise de estresse oxidativo) e tratadas por 24 ou 48 horas. Os controles receberam apenas DMEM com 10% FBS.

2.3. ENSAIOS DE VIABILIDADE, PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT, enquanto a proliferação foi analisada pelo ensaio SRB. A migração celular foi investigada através da técnica *scratch assay*, monitorando a cobertura do espaço livre em diferentes tempos (0, 6, 12, 24 e 48 h) e quantificando a migração com o software ImageJ.

2.4. ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Após o tratamento, as células foram lisadas e o conteúdo proteico determinado pelo método de Lowry. Parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados, incluindo níveis de nitrito (reação de Griess), tióis totais (DTNB), atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), seguindo protocolos previamente estabelecidos.

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com réplicas técnicas em duplicata. Os dados foram analisados por ANOVA, seguida do teste post hoc de Tukey, utilizando o GraphPad Prism 9.5. Resultados foram apresentados como média \pm SEM, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

A exposição à Lf (5, 7,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) não comprometeu a viabilidade nem a proliferação dos queratinócitos HaCaT nas janelas de 24, 48 e 72 h (MTT e SRB; $p > 0,05$). Esses dados confirmam que as concentrações testadas são seguras para aplicação *in vitro*. Ademais, a manutenção da integridade celular é um requisito fundamental para a análise dos demais parâmetros funcionais (RODRIGUES *et al.*, 2018).

3.2. MIGRAÇÃO CELULAR

No ensaio de migração celular, verificou-se fechamento progressivo da ferida em todos os grupos. Aos 48 h, as concentrações de 5 e 7,5 $\mu\text{g/mL}$ mostraram fechamento significativamente maior que o controle ($p < 0,05$), sugerindo um efeito positivo da Lf na migração tardia dos queratinócitos (Fig. 1). Esse achado indica que a Lf pode atuar estimulando fases posteriores da reepitelização, relevantes para a restauração da barreira cutânea (DENG *et al.*, 2022).

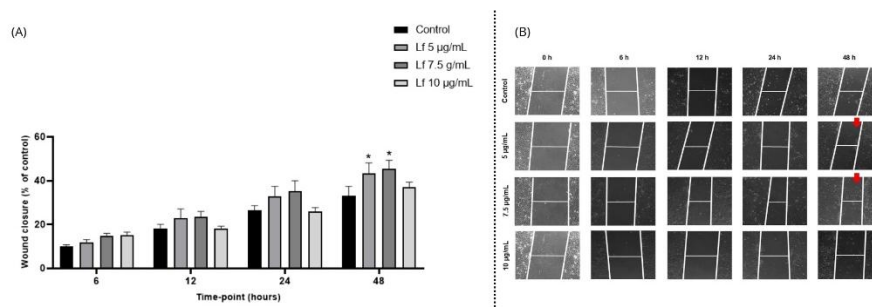


Figura 1. Efeitos do Lf na migração de células HaCaT. **(A)** Análise unificada do fechamento da ferida (%) ao longo do tempo para os grupos controle e tratados com Lf (5, 7,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$). Diferenças significativas foram observadas apenas em 48 h para os grupos de 5 e 7,5 $\mu\text{g/mL}$ em

comparação ao controle ($p < 0,05$, ANOVA unidirecional com teste post hoc de Dunnett). Os dados são expressos como média \pm EPM. **(B)** Imagens microscópicas representativas das áreas da ferida em diferentes pontos de tempo (0, 6, 12, 24 e 48 h) para os grupos controle e tratados com Lf (5, 7,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$).

3.3. PERFIL REDOX E BIOMARCADORES ANTIOXIDANTES

A Lf aumentou de forma consistente a atividade da catalase (CAT) em todas as doses testadas ($p < 0,01$ – $0,001$), sem alterar significativamente a atividade da SOD ou os níveis de nitrito. Por outro lado, observou-se redução nos níveis de tióis totais e da atividade de GST nas concentrações mais altas (Fig. 2). Esses resultados sugerem uma reorientação das defesas antioxidantes: maior detoxificação de H_2O_2 pela CAT, acompanhada de ajuste no sistema tiol/GST. Tal padrão é compatível com um microambiente celular que limita estresse oxidativo excessivo e, ao mesmo tempo, preserva sinais necessários para processos de cicatrização (WANG *et al.*, 2023; UKAEGBU *et al.*, 2025).

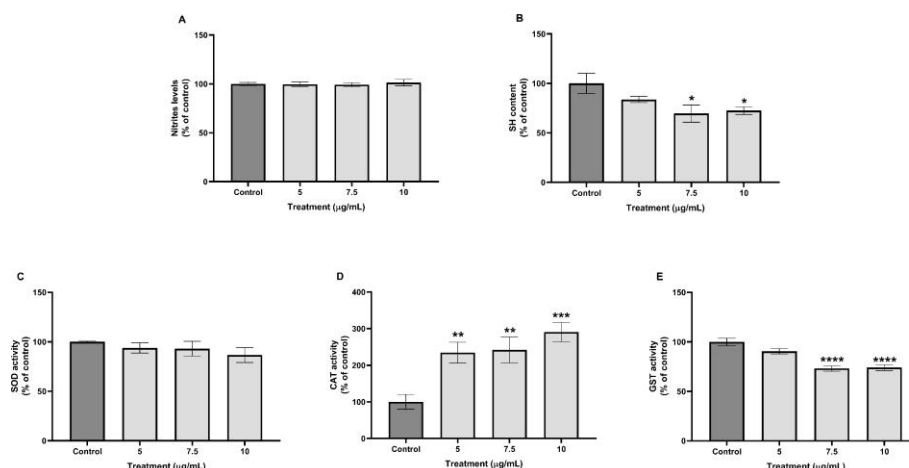


Figura 2. Efeitos de Lf em biomarcadores de estresse oxidativo em células HaCaT. As células foram tratadas com Lf (5, 7,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h, e os seguintes parâmetros foram medidos: **(A)** níveis de nitrito; **(B)** conteúdo total de tiol (SH); **(C)** atividade da superóxido dismutase (SOD); **(D)** atividade da catalase (CAT); e **(E)** atividade da glutathione S-transferase (GST). Os dados são expressos como % do controle (média \pm EPM, $n = 9$). A análise estatística foi realizada usando ANOVA unidirecional seguida pelo teste post hoc de Dunnett. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. controle.

3.4. INTEGRAÇÃO DOS ENSAIOS

De maneira integrada, os resultados mostram que a Lf preserva a viabilidade, não altera a proliferação, favorece a migração celular em fases tardias e modula seletivamente o sistema antioxidante. Isso reforça a hipótese de que a Lf atua como modulador redox e funcional em queratinócitos, promovendo condições favoráveis à cicatrização cutânea.

4. CONCLUSÕES

Portanto, o estudo confirma que a Lf apresenta compatibilidade com queratinócitos e exerce efeitos funcionais que a tornam promissora para a

cicatrização da pele. Ademais, a Lf favorece a migração celular e promove uma modulação seletiva do perfil antioxidante, preservando processos essenciais ao funcionamento celular. Essas características sugerem seu potencial como agente terapêutico para acelerar a reepitelização e ajustar o microambiente oxidativo. Assim, a Lf se apresenta como uma alternativa promissora para abordagens terapêuticas em formulações tópicas ou biomateriais voltados ao tratamento de feridas, combinando segurança celular e funcionalidade biológica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDALLA, S. S. I.; KATAS, H.; CHAN, J. Y.; GANASAN, P.; AZMI, F.; BUSRA, M. F. M. Antimicrobial activity of multifaceted lactoferrin or graphene oxide functionalized silver nanocomposites biosynthesized using mushroom waste and chitosan. **RSC Advances**, v.10, n.9, p.4969-4983, 2020.
2. AMIRI, N.; GOLIN, A. P.; JALILI, R. B.; GHAHARY, A. Roles of cutaneous cell-cell communication in wound healing outcome: an emphasis on keratinocyte-fibroblast crosstalk. **Experimental Dermatology**, v.31, n.4, p.475-484, 2022.
3. BELVEDERE, R.; PESSOLANO, E.; NOVIZIO, N.; TOSCO, A.; ELETTO, D.; PORTA, A.; PETRELLA, A. The promising pro-healing role of the association of mesoglycan and lactoferrin on skin lesions. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.163, p.105886, 2021.
4. DENG, X.; GOULD, M.; ALI, M. A. A review of current advancements for wound healing: Biomaterial applications and medical devices. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v.110, n.11, p.2542-2573, 2022.
5. NG, Z. J.; BIN MD DAUD, M. F. A.; LIAN, K. O. B.; MIGEEMANATHAN, S.; SHIN, G. K.; SHUNMUGHAM, T. R.; TAN, J. S. Lactoferrin in health and disease: A review of its bioavailability and evidence-based benefits across study models. **Trends in Food Science & Technology**, v.160, p.105024, 2025.
6. PEÑA, O. A.; MARTIN, P. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.25, n.8, p.599-616, 2024.
7. RODRIGUES, M.; KOSARIC, N.; BONHAM, C. A.; GURTNER, G. C. Wound healing: a cellular perspective. **Physiological Reviews**, 2018.
8. UKAEGBU, K.; ALLEN, E.; SVOBODA, K. K. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Wound Healing: Mechanisms and Therapeutic Potential. **International Wound Journal**, v.22, n.5, p.e70330, 2025.
9. WANG, G.; YANG, F.; ZHOU, W.; XIAO, N.; LUO, M.; TANG, Z. The initiation of oxidative stress and therapeutic strategies in wound healing. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.157, p.114004, 2023.