

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

**MORGANA LÜDTKE AZEVEDO<sup>1</sup>; NATHALIA STARK PEDRA<sup>1</sup>; ROSELIA SPANEVELLO<sup>1</sup>; RAFAEL GUERRA LUND<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Programa 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 CO<sub>2</sub>.

#### 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 glutathiona 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.

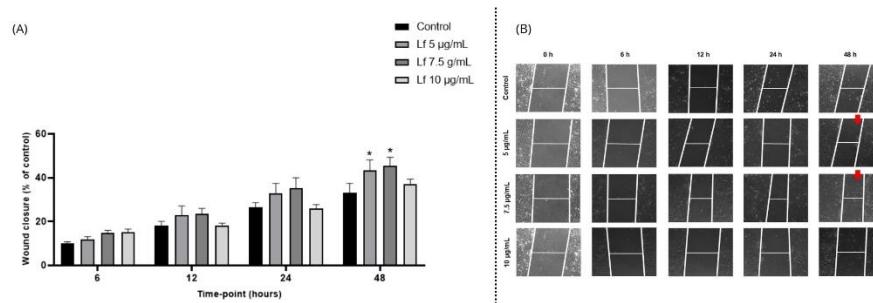
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 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).

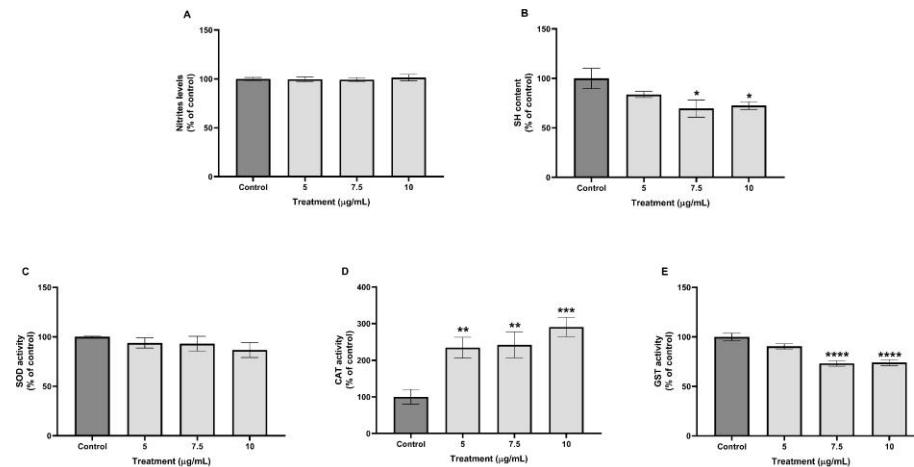


**Figura 1.** Efeitos do Lf na migração de células HaCaT. **(A)** Análise unificada do fechamento da ferida (%) ao longo do tempo para os grupos controle e tratados com Lf (5, 7,5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ). Diferenças significativas foram observadas apenas em 48 h para os grupos de 5 e 7,5  $\mu\text{g/mL}$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 glutationa 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 antioxidant. 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 antioxidant, 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.