



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

**O efeito da ligação de ferro na lactoferrina bovina: implicações em sua estabilidade estrutural e tráfego intracelular**

**Caroline Augusto Barros**

Orientador: Rafael Braga Gonçalves  
Co-orientador: Theo Luiz Ferraz de Souza

Rio de Janeiro,  
18 de agosto de 2017

**Caroline Augusto Barros**

**O efeito da ligação de ferro na lactoferrina bovina:  
implicações em sua estabilidade estrutural e tráfego  
intracelular**

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: Theo Luiz Ferraz de Souza

Rio de Janeiro,  
18 de agosto de 2017

## FICHA CATALOGRÁFICA

Barros, Caroline Augusto.

B277 O efeito da ligação de ferro na lactoferrina bovina: implicações em sua estabilidade estrutural e tráfego intracelular / Caroline Augusto Barros. -- Rio de Janeiro, 2017.

87

Orientador: Rafael Braga Gonçalves.

Coorientador: Théo Luiz Ferraz de Souza

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, 2017.

1.Lactoferrina bovina 2.Estabilidade estrutural 3.Ligação de ferro

I. Gonçalves, Rafael, orient. II. Souza, Théo Luiz Ferraz de, coorient. III. Título

**Caroline Augusto Barros**

**O efeito da ligação de ferro na lactoferrina bovina:  
implicações em sua estabilidade estrutural e tráfego  
intracelular**

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:

- Andréa Cheble de Oliveira (Doutora em Química Biológica) UFRJ
- Ivanildo Pedro de Sousa Junior (Doutor em Química Biológica) FIOCRUZ
- Vera Carolina Bordallo Bittencourt (Doutora em Ciências - Microbiologia) UNIRIO
- Renata Travassos de Lima (Doutora em Ciências Biológicas - Biofísica) UFRJ

*"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."*  
**(Louis Pasteur)**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor incondicional e por me ter me proporcionado tantas coisas boas na vida. *"Sei que seus olhos sempre atentos permanecem em mim e os seus ouvidos são sensíveis para ouvir meu clamor. Posso até chorar, mas a alegria vem de manhã. És Deus de perto, e não de longe, nunca mudaste, Tu és fiel."*

Aos meus pais, Mariléia e Ocimar por todo esforço para que eu pudesse chegar até aqui. Devo tudo a vocês e reconheço a cada segundo o quanto vocês batalharam pela minha educação. A minha irmã, Maria Clara, pelo companheirismo... não podia ter pedido um presente melhor aos meus pais. Ao Hashi, pela companhia, principalmente no escritório na fase de escrita desta dissertação.

À minha grande amiga, Vanessa Rocha, que vem me acompanhando desde o primeiro período da faculdade, compartilhando alegrias e tristezas. Além disso, trabalha comigo no laboratório e por diversas vezes me ajudou com os experimentos nessa fase final. É muito bom saber que posso contar com você, tanto para assuntos pessoais quanto no trabalho. Você vai longe!

Ao Matheus Augusto, por diversas vezes ser solícito a qualquer ajuda que eu precisasse, com o preparo dos experimentos, discussão de resultados ou até mesmo com a revisão desta dissertação. Se todas as pessoas fossem que nem o Matheus, o mundo seria outro.

Ao meu querido aluno, Vítor Macena, por ter me ajudado muito a evoluir como profissional. Muitos dos experimentos realizados nesta dissertação tiveram o toque minucioso do trabalho deste aluno. Além de ter sido meu aluno, se tornou um amigo que quero levar para toda vida. Sou sua fã número 1.

Ao Samir Campos, pela sua ajuda o quanto fosse preciso.

Ao Gabriel Paiva, que por diversas vezes me ajudou me fazendo companhia no fundão para fazer experimentos aos sábados ou até mesmo à noite ou ao colocar um filme para me distrair. A peça fundamental para que eu levasse essa fase numa tranquilidade impressionante. Eu agradeço imensamente toda ajuda. Isso tudo seria muito mais complicado sem você.

Aos meus amigos, Julia e Guilherme, por me ajudarem com as correções no abstract. Mesmo não entendendo sobre o trabalho, foram prestativos ao meu pedido.

Aos meus amigos do LBE, os que estão e os que passaram por este laboratório. Cada um de vocês contribuiu para que este trabalho fosse realizado, seja com a ajuda direta no projeto ou nas conversas durante o dia-a-dia sobre os resultados. O LBE é realmente um laboratório de sorte. Quantas pessoas de bom coração passaram por lá! Espero que isso nunca mude.

A todos que fazem parte dos laboratórios LIMIN, LIMIR, LMA, LABEV e LTPV, por toda alegria, ajuda e principalmente colaboração. A ciência não é feita sem ajuda.

À banca, por ter aceitado prontamente o meu convite.

Ao professor Theo, por ter aceitado nosso convite para ser meu co-orientador e além disso, por ter me ajudado na fase final desta dissertação com experimentos e discussão de resultados. É uma pessoa que eu convivi durante esse tempo que me agregou muito conhecimento e está sempre pronto a ajudar. Sua simplicidade é contagiante. Obrigada, Theo!

Ao meu professor, orientador e amigo, Rafael, que durante esses anos que nos conhecemos se tornou fundamental para meu crescimento pessoal. Te agradeço imensamente por todo conselho e cuidado que teve comigo. É muito difícil precisar o quão você se tornou importante para mim. De fato, o que eu sei é que eu me espelho em você. Como eu sempre digo, o Rafael além de ser orientador, é um amigo. Continue assim!

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1.	O uso da desnaturação de proteínas para estudos estruturais .....	19
1.2.	Proteínas do Leite.....	23
1.3.	A Lactoferrina .....	24
1.3.1.	Uma proteína multifuncional.....	26
1.3.2.	Estrutura da lactoferrina bovina.....	29
1.3.3.	Lactoferrina e células: como interagem?.....	34
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	39
2.1.	Objetivo Geral.....	39
2.2.	Objetivos Específicos .....	39
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
3.1.	Reagentes .....	40
3.2.	Preparo de apo-lactoferrina bovina.....	40
3.3.	Preparo de holo-lactoferrina bovina.....	40
3.4.	Desnaturação química por ureia e hidrócloro de guanidina.....	41
3.5.	Efeito da Alta Pressão Hidrostática na lactoferrina bovina .....	41
3.6.	Fluorescência da sonda extrínseca hidrofóbica bis-ANS.....	42
3.7.	Espectroscopia de Fluorescência.....	44
3.8.	Espalhamento de Luz .....	45
3.9.	Dicroísmo Circular .....	45
3.10.	Quantificação da liberação de ferro em presença de ureia .....	46
3.11.	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	46
3.12.	Calorimetria por Varredura Diferencial .....	47
3.13.	Cálculo da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) .....	47
3.14.	Cultura de células .....	48
3.15.	Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT .....	48
3.16.	Cinética da internalização e do trânsito intracelular da lactoferrina por Microscopia de Fluorescência Confocal .....	49
3.17.	Análise estatística.....	50
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	51
4.1.	Estabilidade estrutural da lactoferrina bovina .....	51
4.1.1.	Desnaturação química induzida por ureia .....	51



4.1.2.	Desnaturação química induzida por hidrocloreto de guanidina .....	57
4.1.3.	Efeito da alta pressão hidrostática na estrutura da lactoferrina bovina ....	61
4.1.4.	Comparação da estrutura secundária de apo e holo por dicroísmo circular .....	63
4.1.5.	Liberação e ligação de ferro pela lactoferrina bovina .....	65
4.1.6.	Calorimetria diferencial de varredura da apo-bLf e apo-bLf pressurizada	69
4.2.	Cinética de internalização da apo e holo-bLf em células Vero .....	72
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	78
6	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	79

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Enovelamento proteico ilustrado por um funil energético.....	18
Figura 2: Efeito da ureia e guanidina em proteínas.....	21
Figura 3: Utilização de alta pressão hidrostática no estudo de estabilidade estrutural de proteínas .....	22
Figura 4: Número de publicações sobre a lactoferrina ao longo dos anos.....	25
Figura 5: As principais funções da lactoferrina.....	27
Figura 6: Estrutura tridimensional da lactoferrina bovina. ....	30
Figura 7: Aminoácidos que participam da ancoragem do íon férrico na lactoferrina.	31
Figura 8: Estrutura tridimensional da lactoferrina .....	32
Figura 9: Estrutura da Intelectina 1 humana.....	35
Figura 10: A interação de heparan sulfato e proteínas e as principais funções biológicas. ....	37
Figura 11: Sistema de Alta Pressão Hidrostática. ....	42
Figura 12: Sonda extrínseca hidrofóbica bis-ANS (4,4'-bis-1-anilinoftaleno-8-sulfonato).....	43
Figura 13: Espectro de fluorescência de aminoácidos aromáticos.....	44
Figura 14: Efeito desnaturante da ureia na apo e holo-bLf. ....	52
Figura 15: Espectros de apo e holo-bLf em presença de ureia.....	54
Figura 16: Estabilidade estrutural da apo e holo-bLf em presença de ureia - parâmetros termodinâmicos. ....	55
Figura 17: Desnaturação induzida por ureia e monitorada por bis-ANS. ....	56
Figura 18: Desnaturação da apo e holo-bLf induzida por hidrocloreto de guanidina.	58
Figura 19: Espectros de apo e holo-bLf em presença de hidrocloreto de guanidina.	59
Figura 20: Grau de desnaturação da apo e holo-bLf em presença de hidrocloreto de guanidina.....	60
Figura 21: Medida de espalhamento de luz para apo e holo-bLf e presença de hidrocloreto de guanidina .....	61
Figura 22: Efeito da APH na apo e holo-bLf.....	62
Figura 23: Efeito da APH na apo e holo-bLf monitorada por bis-ANS.....	63
Figura 24: Análise de estrutura secundária da bLf por dicróismo circular .....	64
Figura 25: Absorbância a 465 nm da apo e holo-bLf.....	66
Figura 26: Quantidade de ferro na lactoferrina em presença de ureia .....	67
Figura 27: Análises do tempo de retenção da apo e holo-bLf no HPLC.....	70

Figura 28: Termogramas de DSC de apo-bLf e P- apo-bLf.....	71
Figura 29: Ensaio de viabilidade celular por MTT .....	73
Figura 30 - Microscopia Confocal de Fluorescência por Escaneamento com Laser das células Vero incubadas com apo e holo-bLf - FITC.....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas presentes no soro do leite.....	24
Tabela 2 - Análise da estabilidade da lactoferrina baseado nos dados de fluorescência .....	55
Tabela 3 - Pós-teste estatístico de Dunnett para apo-bLf. ....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

- Abs - Absorbância
- ANS - 8-anilinoftaleno-1-sulfonato
- Apo-Lf - Apolactoferrina
- bis-ANS - 4,4'-bis-1-anilinoftaleno-8-sulfonato
- CD - Dicroísmo circular
- $C_p$  - Calor específico
- DMEM – Meio Dubellco modificado
- DSC – Calorimetria de varredura diferencial
- FITC - Isoticianato de fluoresceína
- $G_{1/2}$  – Concentração de guanidina capaz de induzir metade do processo de desnaturação
- GaGs - Glicosaminoglicanos
- HHP - Alta pressão hidrostática
- hLf - Lactoferrina humana
- Holo-Lf - Hololactoferrina
- HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
- HS - Heparan sulfato
- HSV-1 - Vírus da herpes tipo 1
- IntL- Intelectina
- $K_d$  - Constante de dissociação
- Lf - Lactoferrina
- LSCFM - Microscopia de fluorescência confocal
- MTT- Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
- P-apo-bLf - Apo-bLf pressurizada
- PGHS - Proteoglicanos de heparan sulfato
- pH - Potencial hidrogeniônico
- P-holo-bLf - Holo-bLf pressurizada
- pI - Potencial isoelétrico
- rhIntL - Intelectina recombinante humana
- rhLf - Lactoferrina recombinante humana
- Rlfs - Receptores de lactoferrina
- TLR4 - Receptor do tipo toll 4

$T_m$  - Temperatura de transição

$U_{1/2}$  – Concentração de ureia capaz de induzir metade do processo de desnaturação

UV- Luz ultra-violeta

$\Delta G$  - Energia livre de Gibbs

$\Delta H$  - Variação de entalpia

## RESUMO

A lactoferrina é uma glicoproteína ligadora de ferro de cerca de 80 kDa, sendo comumente encontrada no leite, além de ser um componente de muitas secreções externas como as lágrimas, o sêmen, saliva e secreções mucosas, fluidos pancreáticos, secreções gastrointestinais e é um importante constituinte dos grânulos secundários de neutrófilos. Sua estrutura é dividida em dois lobos, -N e -C e cada lobo é dividido em dois domínios, N1 e N2 e C1 e C2. Esta proteína, pertencente à família das transferrinas é amplamente conhecida por sua grande diversidade de funções tais como: antifúngica, imunomoduladora, antitumoral, antiviral, antibacteriana, entre outros. Estudos demonstraram que a ligação de íons metálicos em proteínas leva a uma maior estabilidade estrutural. Uma vez que a estrutura tridimensional da proteína está ligada a sua função e que o íon ferro pode levar a uma mudança estrutural, decidiu-se investigar os efeitos da ligação do ferro na estabilidade da lactoferrina bovina (bLf). Para tanto, foram utilizadas ureia, guanidina e alta pressão hidrostática para causar perturbações na estrutura da lactoferrina bovina nas formas apo e holo (não saturada e saturada por ferro, respectivamente). As possíveis mudanças conformacionais foram analisadas utilizando espectroscopia de fluorescência através do uso de sonda intrínseca, triptofano e o bis-ANS (4,4'-bis-1-anilinoftaleno-8-sulfonato) como uma sonda extrínseca. O dicróismo circular foi utilizado para verificar se a ligação de ferro influenciaria na estrutura secundária da bLf. Os resultados mostraram que a ligação do íon ferro leva a uma maior estabilidade estrutural da lactoferrina e, além disso, causa uma mudança conformacional na estrutura terciária, mas não na estrutura secundária. A ligação de ferro foi também avaliada na presença de concentrações crescentes de ureia no espectrofotômetro. Os resultados de ligação de ferro mostraram que, em concentrações acima de 4 M de ureia, o sítio de ligação do íon ferro na estrutura da apo-bLf se encontrava provavelmente desestruturado. Por outro lado, o mesmo não foi observado para a holo-bLf que se manteve ligada ao íon ferro mesmo em altas concentrações de ureia. A pressurização da apo-bLf mostrou, por calorimetria de varredura diferencial, uma menor estabilidade quando comparada à amostra não pressurizada. Uma vez que diferenças na estabilidade estrutural das formas apo e holo-bLf foram demonstradas e o papel estabilizante do ferro foi observado, decidiu-se obter dados sobre a cinética de internalização da bLf em células Vero. Foi possível observar que a cinética de internalização da holo-bLf foi mais rápida quando comparada à forma apo. Isto pode indicar que as mudanças estruturais promovidas pela ligação do ferro podem exercer papel fundamental no tráfego intracelular da bLf. Embora mais estudos sejam necessários para endereçar melhor esta questão, estes resultados colaboram para o entendimento da interação entre a bLf e a célula e isto pode contribuir para o desenvolvimento de fármacos antivirais baseados na lactoferrina.

## ABSTRACT

Lactoferrin is an iron binding glycoprotein of about 80 kDa and is commonly found in milk as well as a component of many external secretions such as tears, semen, saliva and mucous secretions, pancreatic fluids, gastrointestinal secretions and it is an important constituent of secondary neutrophil granules. Its structure is divided into two lobes, -N and -C and each lobe is divided into two domains, N1 and N2 and C1 and C2. This protein belongs to the transferrin family and it is widely known for its great diversity of functions such as: antifungal, immunomodulatory, antitumor, antiviral, antibacterial. Studies have shown that the binding of metal ions to proteins leads to greater structural stability. Since the three-dimensional structure of the protein is linked to its function and the iron ion may lead to structural change, it was decided to investigate the effects of iron binding on the stability of bovine lactoferrin (bLf). In that regard, urea, guanidine and high hydrostatic pressure were used to cause perturbations in the structure of bovine lactoferrin in apo and holo (unsaturated and iron saturated, respectively) forms. Possible conformational changes were analyzed using fluorescence spectroscopy using intrinsic probe, tryptophan and bis-ANS (4,4'-bis-1-anilinonaphthalene-8-sulfonate) as an extrinsic probe. Circular dichroism was used to verify if iron binding would influence the secondary structure of bLf. The results have shown that iron ion binding leads to greater structural stability of lactoferrin and, in addition, it causes a conformational change in the tertiary structure, but not in the secondary structure. The iron binding was also evaluated in the presence of increasing urea concentrations in the spectrophotometer. The results showed that, at concentrations above 4M urea, the iron ion binding site in the apo-bLf structure was probably unstructured. On the other hand, the same was not observed for holo-bLf which remained iron-bound even at high urea concentrations. Apo-bLf pressurization showed, by differential scanning calorimetry, less stability when compared to the non-pressurized sample. Since differences in the structural stability of the apo and holo-bLf forms were demonstrated and the stabilizing role of iron was observed, it was decided to obtain data on the kinetics of bLf internalization in Vero cells. It was possible to observe that the kinetics of holo-bLf internalization was faster when compared to apo form. This may indicate that structural changes promoted by iron binding may play a key role in the intracellular traffic of bLf. Although further studies are needed to better address this issue, these results support the understanding of the interaction between bLf and the cell and this may contribute to the development of lactoferrin-based antiviral drugs.



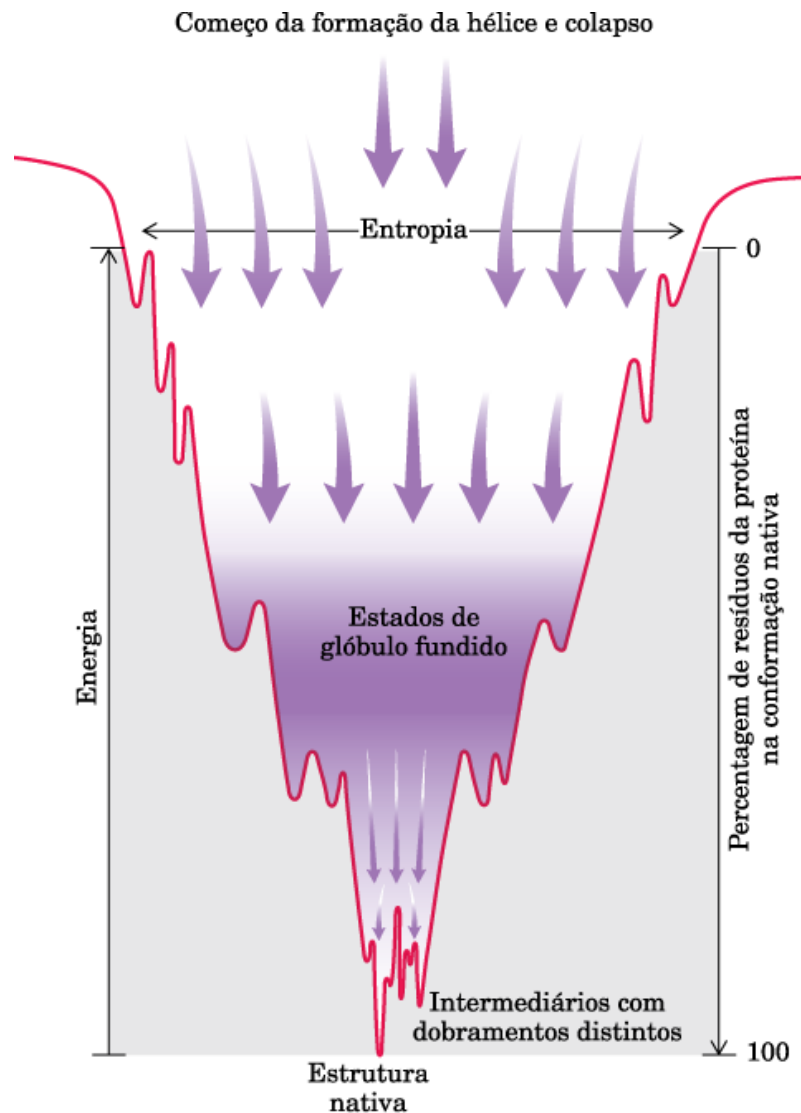
## 1 INTRODUÇÃO

As proteínas são macromoléculas de grande importância para os seres vivos, uma vez que exercem funções cruciais nos sistemas biológicos (ENGLAND; HARAN, 2011). São formadas por unidades monoméricas, os aminoácidos, que se ligam através da ligação peptídica (estrutura primária). As sequências desses aminoácidos formam a cadeia peptídica, que possuirá funcionalidade quando a estrutura tridimensional (estrutura terciária) específica for atingida (STRYER, 2008). A forma com que esses aminoácidos ocupam o espaço, de acordo com os ângulos de restrição, e interagem fazendo ligações de hidrogênio com o seu próprio arcabouço peptídico geram padrões de estrutura secundária, tais como as  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  (STRYER, 2008).

A ampla faixa de grupamentos funcionais que os aminoácidos possuem e a sequência em que estes são combinados levam a uma vasta quantidade de proteínas com variadas funções. Os diferentes organismos podem gerar diferentes proteínas, tais como enzimas e anticorpos, as quais podem desempenhar diversas funções, tais como armazenamento, proteção, transporte, transdução de sinais, catálise, regulação, entre outros (NELSON; COX, 2010).

O enovelamento proteico ocorre através das interações hidrofóbicas, a partir da diminuição do contato de aminoácidos hidrofóbicos com a água, além de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e força de van der Waals. Na **Figura 1** está mostrado o funil energético de enovelamento proteico que representa as diferenças de energia e entropia entre o estado nativo e o desenovelado. Conforme as proteínas adotam estruturas intermediárias estáveis, a entropia do sistema diminui, assim como o número de estruturas intermediárias possíveis. Ao atingir o equilíbrio, o estado nativo da proteína é o de menor energia e de menor entropia, pois há apenas uma conformação possível para estrutura (NELSON; COX, 2010). A conformação chamada de enovelada ou estado nativo é a forma mais encontrada na grande maioria das proteínas que possuem funções *in vivo* (ENGLAND; HARAN, 2011).

Algumas depressões mostradas no funil de enovelamento mostram alguns intermediários semi-estáveis que a proteína pode adotar e que possuem maior entropia do que o estado nativo (NELSON; COX, 2010).



**Figura 1: Enovelamento proteico ilustrado por um funil energético.**

O topo do funil representa o estado de maior entropia, onde temos um maior número de conformações que a proteína pode adotar. Conforme o funil desce, esse número de conformações disponíveis diminui assim como a entropia e a energia. O estado nativo representa o fim do funil energético onde temos o menor nível de energia livre e consequentemente a estrutura funcional. (Extraído de NELSON; COX, 2010)

O enovelamento é um processo cooperativo onde a tendência é reter intermediários parcialmente corretos. No fundo do funil se encontra o estado

enovelado com conformação bem definida. Contudo, várias vias podem chegar a essa conformação nativa (STRYER, 2008).

A estrutura tridimensional nativa de uma proteína define a sua função. Qualquer desordem no enovelamento pode produzir doenças como por exemplo, a fibrose cística ou até mesmo doenças neurodegenerativas como a encefalopatia espongiiforme bovina (STRYER, 2008). Logo, estudos que visam entender o processo de desnaturação e de estabilidade estrutural, podem gerar informações importantes acerca do conhecimento sobre proteínas.

As investigações sobre funções de proteína correlacionando com as informações estruturais são comuns (SILVA *et al*, 2001). O estudo da desnaturação e reenovelamento de proteínas são atrativos para áreas da bioquímica, biofísica e biologia estrutural, uma vez que se tem um papel para a compreensão da relação entre estrutura de proteínas e suas funções (BIAN; JI, 2014). Em vista disso, o grande avanço das técnicas experimentais têm nos ajudado a compreender esses fatores.

Os estudos de transição de conformação são conduzidos a partir de proteínas que foram desnaturadas e reenoveladas pela utilização de agentes desnaturantes como pH, temperatura, agentes químicos, alta pressão hidrostática entre outros. O uso de agentes desnaturantes é importante, uma vez que as transições de conformações de proteínas e outros parâmetros como organização, função, agregação podem ser obtidos desta forma (BIAN; JI, 2014).

### **1.1. O uso da desnaturação de proteínas para estudos estruturais**

As mudanças conformacionais de uma proteína podem ser monitoradas por diversas técnicas espectroscópicas, como a espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular, entre outras. O enovelamento e desenovelamento de proteínas são questões que a termodinâmica visa compreender. Contudo, não é considerado apenas o estado completamente nativo ou desnaturado, mas sim a estabilidade estrutural desta transição.

O entendimento da origem da estabilidade de proteínas é essencial para compreender sua função e estrutura. Para esses estudos são utilizados agentes que modificam a estrutura tridimensional, levando à perda desta estrutura e em casos mais drásticos, pode ocasionar a perda total, onde a proteína pode se encontrar completamente desnaturada. A desnaturação de proteínas com a utilização de agentes físicos, como a alta pressão hidrostática, e químicos como ureia e hidrocloreto de guanidina, tem sido amplamente utilizada para os estudos de estabilidade estrutural.

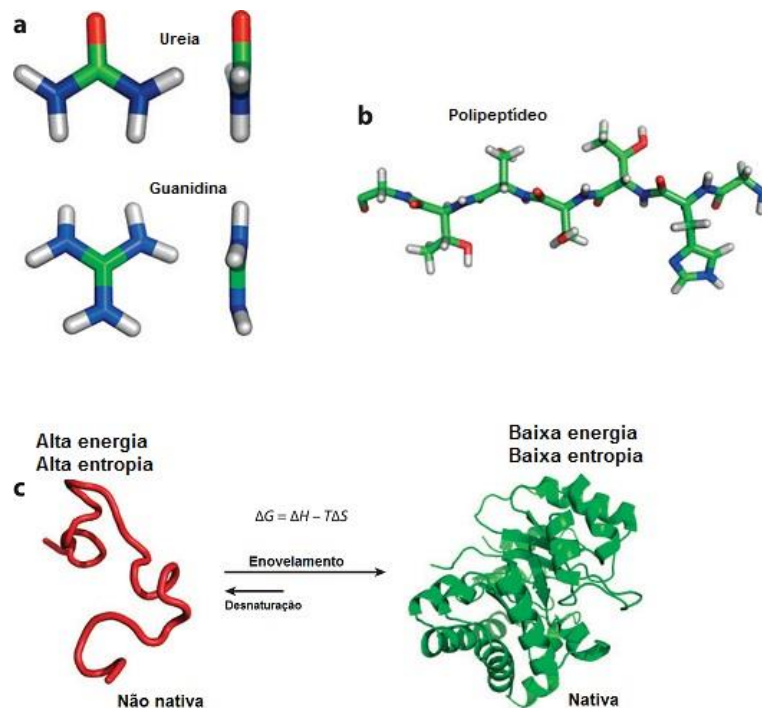
A estratégia de acrescentar concentrações crescentes de um agente desnaturante leva a entender o processo de desnaturação e, conseqüentemente, o processo de enovelamento. Embora a ureia e o hidrocloreto de guanidina sejam amplamente utilizados para a desestabilização de proteínas globulares, ainda há questões que precisam ser resolvidas acerca da ação dessas moléculas na estrutura de proteínas. A forma como essas moléculas se acumulam na superfície de proteínas enoveladas está relacionada à sua atividade desnaturante (MASON *et al.*, 2007).

A ureia e o hidrocloreto de guanidina são desnaturantes químicos de proteínas e vêm sendo utilizados há quase um século (TIMASHEFF; XIE, 2003) (**Figura 2**). Embora esses agentes desnaturantes sejam comumente utilizados, essas moléculas agem por diferentes mecanismos (BARRECA, *et al.* 2014) podendo ser classificado como kosmotrópicos ou caotrópicos. Os agentes kosmotrópicos diminuem a disponibilidade de moléculas de água em solução, favorecendo as interações hidrofóbicas enquanto os agentes caotrópicos desordenam a estrutura da água, enfraquecendo o efeito hidrofóbico. Os mecanismos de interação entre a ureia/ hidrocloreto de guanidina com proteínas ainda são controversos (CARVALHO *et al.*, 2015).

O poder de desnaturação da ureia se deve ao fato desta molécula interagir com componentes polares e apolares. A ureia preferencialmente forma ligação de hidrogênio com o arcabouço peptídico. Uma vez que as moléculas de ureia aumentam a solubilidade e podem se encontrar próximas as cadeias laterais hidrofóbicas, esta interação pode levar a uma desestabilização da estrutura e conseqüentemente à desnaturação da proteína (O'BRIEN *et al.*, 2007). Embora essa

interação seja fraca, as partículas agregadas formadas por segmentos hidrofóbicos podem ser rompidas utilizando este agente desnaturante (ROSSKY, 2008).

O hidrocloreto de guanidina é um sal utilizado como um potente agente desnaturante. Essa molécula pode aumentar a força das interações hidrofóbicas por ordenar a estrutura da água. Estudos mostraram que a guanidina pode formar ligação de hidrogênio com a água no plano molecular, porém acima e abaixo do plano essa interação é fraca. Com isso, a natureza hidrofóbica da guanidina pode resultar em um sal altamente desnaturante onde este íon se “empilha” contra as cadeias laterais hidrofóbicas de modo a reduzir o custo entrópico através do deslocamento das moléculas de água e se ligar a hidrogênios do arcabouço peptídico (MASON *et al.*, 2007). Uma característica comum entre os agentes desnaturantes é o uso em altas concentrações, tipicamente 6 M de hidrocloreto de guanidina e 8 M de ureia (TIMASHEFF; XIE, 2003).



**Figura 2: Efeito da ureia e guanidina em proteínas.**

(A) A ureia e o íon guanidina são moléculas orgânicas planares com um carbono central (em verde). O nitrogênio, representado em azul, possui carga positiva enquanto o oxigênio, representado em vermelho, possui carga negativa. (B) Uma cadeia polipeptídica (as cores estão representadas como em A). (C) A proteína quando adota sua estrutura tridimensional nativa é termodinamicamente estável, com menor energia e menor entropia. (Extraído e modificado de ENGLAND; HARAN, 2011)

A técnica de alta pressão hidrostática (*High Hydrostatic Pressure* - HHP) (**Figura 3**), que na década de 1990 era considerada exótica para o estudo de estabilidade de proteínas, atualmente é uma ferramenta poderosa para estudos de dinâmica, estrutura e intermediários de enovelamento. O efeito da pressão depende intrinsecamente da diferença de volume entre as amostras, seu enovelamento e estágios de transição. A HHP induz a entrada de água em cavidades hidrofóbicas presentes na estrutura da proteína (SILVA *et al.*, 2001). Como algumas proteínas possuem pequena modificação de volume ou uma grande estabilidade, o efeito da pressão não causa desnaturação completa. Com isso, é necessário o uso adicional de agente desnaturantes em baixa concentração ou mudanças de temperatura (SILVA *et al.*, 2001).

A grande vantagem do uso da HHP é que esta técnica não necessita de alteração química da composição da amostra, uma vez que a mesma somente altera o volume das cavidades internas da molécula, forçando a entrada de água nas cavidades hidrofóbicas da proteína, o que leva à sua desestabilização e, conseqüentemente, à sua desnaturação (PERRET *et al.*, 2002). Outra vantagem é que esta técnica promove mudanças estruturais menos drásticas, permitindo acompanhar melhor as mudanças estruturais. A presença de cavidades na estrutura da proteína favorece a dissociação e o desenovelamento (PERRET *et al.*, 2002).



**Figura 3: Utilização de alta pressão hidrostática no estudo de estabilidade estrutural de proteínas**

Representação esquemática do efeito da alta pressão na estrutura de proteína. Para esta ilustração foi utilizado a proteína mutante, em cinza, SNAase 192A e as esferas vermelhas representam as moléculas de água. Sob alta pressão hidrostática, a água penetra nas cavidades na proteína (azul), levando ao desenovelamento. (Extraído e modificado de SILVA *et al.*, 2014)

As funções que as proteínas desempenham dependem diretamente de sua estabilidade estrutural, uma vez que estas podem passar por processos que podem degradar a sua estrutura. As proteínas, além de serem biomoléculas importantes para os organismos, são amplamente utilizadas para desenvolver produtos e terapias contra agentes etiológicos.

## 1.2. Proteínas do Leite

As proteínas são essenciais na dieta humana, visto que possuem funções que controlam a maioria das reações químicas que ocorrem no organismo. O leite, por exemplo, possui vários tipos de proteínas em sua composição, que possuem em sua maioria, aminoácidos essenciais (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Para simplificar, a fração proteica do leite pode ser separada em dois grupos: as caseínas e as proteínas do soro do leite (LIEVORE, 2013).

Estudos recentes vêm tentando demonstrar que tanto as proteínas do leite quanto as do soro do leite possuem um alto valor biológico, apresentando agentes antimicrobianos, imunomoduladoras, anti-hipertensivos, fatores de crescimento, entre outros (HARAGUCHI *et al.*, 2005).

As caseínas são as proteínas em maior quantidade no leite (cerca de 26 g.L<sup>-1</sup>) que formam polímeros. As proteínas do soro do leite são amplamente utilizadas na indústria alimentícia. O grupo majoritário das proteínas do soro do leite englobam as beta-lactoglobulinas, as alfa-lactoalbuminas, as albuminas séricas e as imunoglobulinas. Pertencem ao grupo minoritário as transferrinas, glicoproteínas, microglubulinas, lactoferrina e etc. Essas proteínas variam em quantidade, função, peso e tamanho (ALMEIDA *et al.*, 2013). A **Tabela 1** mostra as frações proteicas presentes no soro do leite.

**Tabela 1 – Proteínas presentes no soro do leite**

<b>Proteína</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Soro (%m/v)</b>
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

(Modificado de LIEVORE, 2003)

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

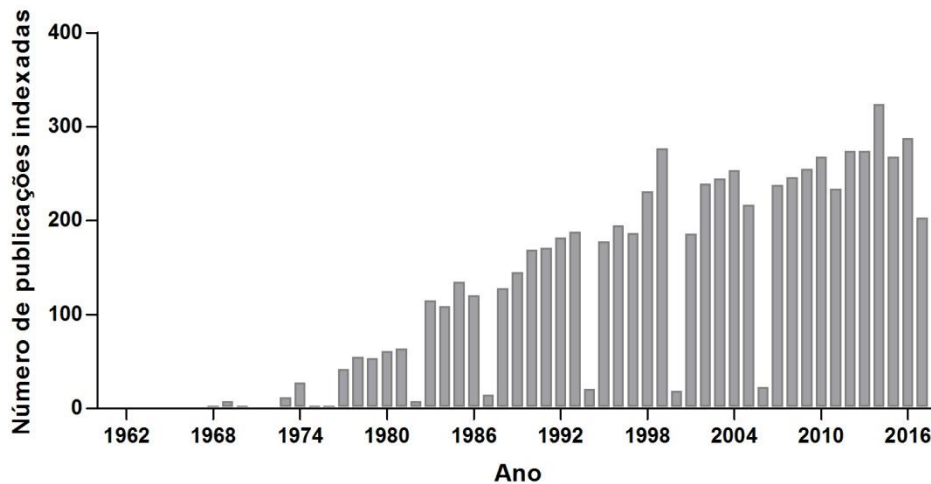
Muitas funções biológicas atribuídas à lactoferrina têm sido demonstradas em diversos trabalhos, onde podemos destacar a atividade imunomoduladora, anti-inflamatória, antitumoral, antiviral, estimulação do crescimento celular, antioxidante, entre outras (GIFFORD *et al.*, 2005). Sendo assim, estudos estruturais envolvendo a lactoferrina são fundamentais para o entendimento das suas diversas funcionalidades.

### **1.3. A Lactoferrina**

A lactoferrina bovina (bLf) foi fracionada como uma parte vermelha do leite de vaca em 1939 (SORENSEN; SOERENSEN, 1939). Em 1960, a desconhecida “proteína vermelha do leite” foi descrita como uma proteína pertencente à família das transferrinas (TOMITA *et al.*, 2009). Desde então, crescentes estudos sobre a estrutura e função vêm sendo feitos, uma vez que a lactoferrina desempenha um



importante papel na saúde por ser uma proteína multifuncional (BAKER; BAKER, 2008). A **Figura 4** mostra o crescente número de publicações indexadas sobre a lactoferrina ao longo dos anos.



**Figura 4: Número de publicações sobre a lactoferrina ao longo dos anos.**

A busca dos dados para este gráfico foi feita a partir da ferramenta de busca do Pubmed pela palavra chave "*Lactoferrin*". A partir destes dados o gráfico foi criado utilizando o software GraphPad Prism 5 (extraído de Pubmed - acessado em 06/08/2017).

A lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína de cerca de 80 kDa, sendo comumente encontrada no leite, além de ser um componente de muitas secreções externas como as lágrimas, o sêmen, saliva, secreções mucosas, fluidos pancreáticos, secreções gastrointestinais e é um importante constituinte dos grânulos secundários de neutrófilos (BAKER; BAKER, 2008; BAKER, 2005). Pode ser encontrada em diferentes espécies de mamíferos, como cavalos, búfalos, cachorros, roedores e etc (REDWAN *et al.*, 2014).

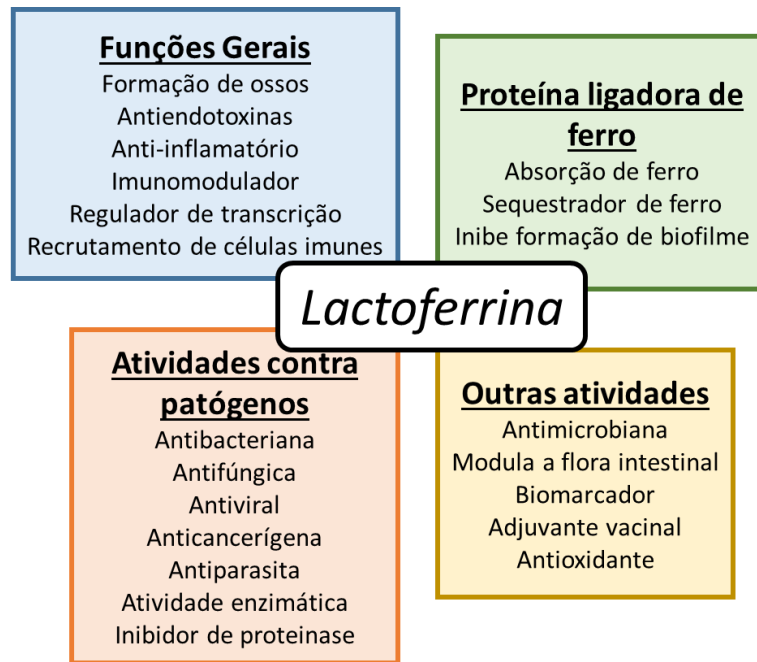
A Lf é uma molécula catiônica, apresenta um ponto isoelétrico (pI) em torno de 9 e possui cargas positivas em sua superfície (BAKER, 2005). Esta característica é muito importante para que esta proteína possa exercer suas atividades biológicas, que incluem, por exemplo, sua ligação a moléculas de DNA e heparina (BAKER *et al.*, 2002).

As transferrinas, família à qual a lactoferrina pertence e que inclui a transferrina sérica e ovotransferrina, são proteínas que possuem afinidade a íons ferro. Embora essas proteínas possuam esta habilidade em comum de se ligar a ferro, existem algumas diferenças entre elas. A transferrina está presente no sangue circulante e está envolvida na internalização do ferro nas células, visto que possui receptores celulares para endocitose (BAKER *et al.*, 2002). Por outro lado, a lactoferrina é encontrada em fluidos biológicos. Devido a suas funções, a lactoferrina tem um maior poder de reter o íon ferro mesmo em pH em torno de 3,5, enquanto a transferrina libera este mesmo íon em pH em torno de 6,0. Isto demonstra a alta afinidade da lactoferrina por este íon (BAKER *et al.*, 2002).

A lactoferrina e a transferrina controlam a quantidade do íon ferro nos fluidos biológicos do corpo. Além disso, possuem sequências conservadas, sítio de ligação de ferro e podem ser encontradas saturadas e insaturadas por este íon (BAKER; BAKER, 2008).

### 1.3.1. Uma proteína multifuncional

A lactoferrina é amplamente conhecida como uma proteína multifuncional (**Figura 5**), sendo um componente importante do sistema de imunidade inata, porque pode responder de várias formas às mudanças fisiológicas (MONTROYA *et al.*, 2012). Esta proteína está presente em diversos estudos como um tratamento preventivo e terapêutico, pois pode apresentar atividade antimicrobiana, antifúngica, imunomoduladora, antitumoral, antiviral, neutralizar substâncias bioativas, entre outras (VOGUEL, 2012). A primeira atividade descoberta da lactoferrina foi sua função antimicrobiana, inibindo o crescimento de várias bactérias patogênicas a humanos e outros animais (VALENTI; ANTONINI, 2005).



**Figura 5: As principais funções da lactoferrina.**

As principais funções biológicas da lactoferrina como a função antimicrobiana contra bactérias, vírus e fungos e sua atividade imunomoduladora, por exemplo, regulando a atividade inflamatória (Modificado de VOGUEL *et al.*, 2012).

A atividade antimicrobiana da lactoferrina pode ser de natureza bacteriostática, que envolve a capacidade de sequestrar ferro nos fluidos biológicos e a atividade bactericida que depende da interação da lactoferrina com a bactéria (VALENTI; ANTONINI, 2005). Sendo assim, a atividade bacteriostática da lactoferrina deve-se à sua saturação por ferro, ou seja, quanto menos ferro a lactoferrina estiver ligada, mais ela poderá retirar este íon do meio no processo de saturação (QUEIROZ *et al.*, 2013).

A atividade bactericida da lactoferrina independe da ligação de ferro. Essa proteína se liga diretamente à membrana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, causando perturbações (VALENTI; ANTONINI, 2005). Para obter ferro, as bactérias produzem sideróforos, que são pequenas moléculas queladoras de ferro, que podem competir com a Lf pelo íon  $Fe^{3+}$  insolúvel. Outra forma de obter ferro envolve a remoção de ferro da hemoglobina (produto da oxidação), onde a lactoferrina pode competir pelo ferro liberado. Dessa forma, muitas bactérias Gram-negativas possuem sistemas para obter o ferro a partir de lactoferrina e transferrina,

onde as bactérias se ligam a essas proteínas através de receptores e induz mudanças conformacionais que resultam na redução da afinidade de uma região da lactoferrina, o lobo C, pelo íon ferro (VALENTI; ANTONINI, 2005).

A lactoferrina possui atividade antiviral contra vários vírus envelopados e não envelopados que afetam humanos e animais. Esta função da lactoferrina pode ocorrer devido à ligação desta proteína com a célula antes do contato destas com o vírus ou ser devido interação da lactoferrina com a partícula viral nas primeiras fases da infecção (REDWAN *et al.*, 2014).

O efeito imunomodulador da lactoferrina se dá primeiramente por sua presença nos grânulos secundários dos neutrófilos, participando assim da defesa primária. Sendo os neutrófilos a primeira linha de combate contra patógenos, este pode responder de algumas formas, como fazer a degranulação liberando proteínas de defesa e também por outros grânulos secretórios (VOGUEL, 2012).

A lactoferrina pode ser utilizada como um biomarcador para doenças inflamatórias, uma vez que em pacientes que sofrem de doenças intestinais, esta proteína pode ser liberada pelos neutrófilos para combater a inflamação. Posteriormente, a lactoferrina pode ser detectada em amostras fecais, uma vez que é estável no intestino (VOGUEL, 2012).

A lactoferrina pode também modular a expressão específica e não específica de proteínas antimicrobianas, influenciar na resposta imune sistêmica e de mucosa de ratos, induzir mediadores de células do sistema imune inato, se ligar a moléculas carregadas negativamente na superfície de várias células do sistema imune, interagir com a molécula de DNA e ativar diferentes vias de sinalização (VOGUEL, 2012). Dessa forma, esta proteína está totalmente interligada à regulação dos mecanismos de defesa contra patógenos e em inflamações crônicas (MONTROYA *et al.*, 2012).

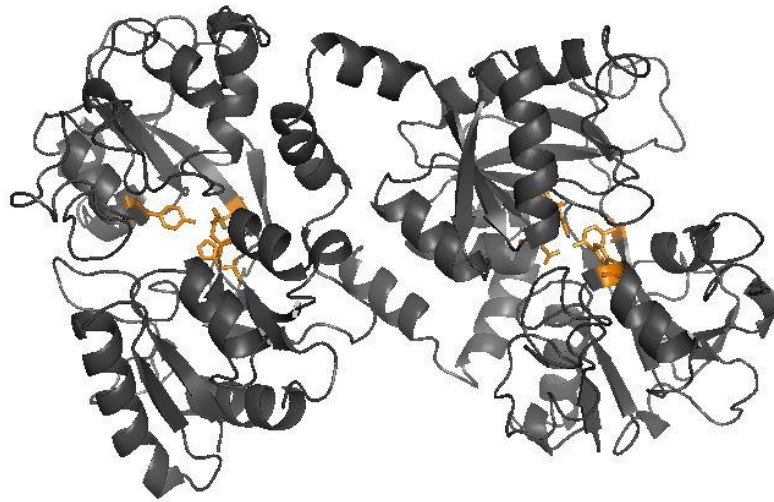
A ativação do sistema imune inato de crianças e adultos deve-se ao fato de que a lactoferrina pode ativar receptores do tipo toll 4 (TLR4) de células intestinais e, dessa forma, esse receptor é capaz de detectar a presença de lipopolissacarídeos bacterianos (QUEIROZ *et al.*, 2013). Como a função da lactoferrina depende

inteiramente da sua estrutura tridimensional, é importante entender a estabilidade estrutural da mesma.

### 1.3.2. Estrutura da lactoferrina bovina

A lactoferrina bovina é composta por uma única cadeia de 689 aminoácidos enovelada em dois lobos globulares simétricos, lobos N e C. O lobo N compreende a cadeia de aminoácidos entre 1-332 e o lobo C de 344-689. Esses lobos estão conectados por uma alfa-hélice de 10 aminoácidos (aminoácidos 334 – 344), que confere flexibilidade à estrutura e possuem uma alta homologia entre si (MONTROYA *et al.*, 2012). Essa homologia dos lobos é compartilhada por uma grande família de proteínas periplasmáticas de bactérias que tem como função o transporte de íons, o que sugere uma origem evolutiva em comum (BAKER; BAKER, 2008).

Os lobos N e C são divididos por dois domínios  $\alpha/\beta$ , para o lobo N os domínios N1 e N2 e para o lobo C, os domínios C1 e C2 (BAKER; BAKER, 2008). O sítio de ligação de ferro está localizado em uma fenda entre os domínios  $\alpha$  e  $\beta$  (BAKER *et al.*, 2005). Cada lobo pode se ligar a um íon ferro sinergicamente com o íon carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). A **Figura 6** representa a estrutura tridimensional da lactoferrina.

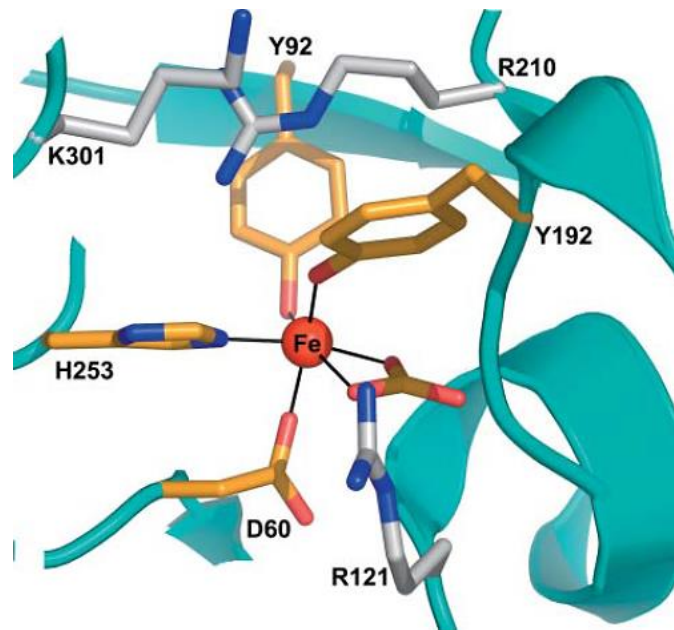


**Figura 6: Estrutura tridimensional da lactoferrina bovina.**

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

A lactoferrina não só se liga a íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , mas também pode se ligar a outros íons metálicos como o  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  (BAKER *et al.*, 2004). Em cada lobo há quatro aminoácidos responsáveis pela ancoragem do ferro, que são para o lobo N Aspartato 60, Tirosina 92, Tirosina 192 e Histidina 253. Para o lobo C, são os aminoácidos Aspartato 395, Tirosina 433, Tirosina 526 e Histidina 595. A ligação ao carbonato ocorre devido à presença do aminoácido Arginina e Treonina (121 e 117 para o lobo N e 463 e 459 para o lobo C, respectivamente). Dessa forma, a ligação de hidrogênio do carbonato é totalmente satisfeita, permitindo uma melhor ligação entre os átomos do carbonato e o ânion da ligação de ferro (MOORE *et al.*, 1997).

O íon carbonato pode estar protonado em compartimentos celulares onde o pH é baixo, como por exemplo nos endossomas, promovendo a liberação do íon ferro. O íon ferro se liga fortemente à estrutura da lactoferrina, conferindo uma afinidade de  $K_d \sim 20\text{-}20 \text{ mol/L}$ . Os aminoácidos que participam da ancoragem de ferro na estrutura da lactoferrina estão representados na **Figura 7**.



**Figura 7: Aminoácidos que participam da ancoragem do íon férrico na lactoferrina.**

Sítio de ligação de ferro do lobo N da lactoferrina. O ferro é ancorado por quatro aminoácidos (duas tirosinas, uma histidina e um aspartato). O íon carbonato  $\text{CO}_3^{2-}$  também participa desta ligação, interagindo com a arginina (extraído de BAKER, 2005).

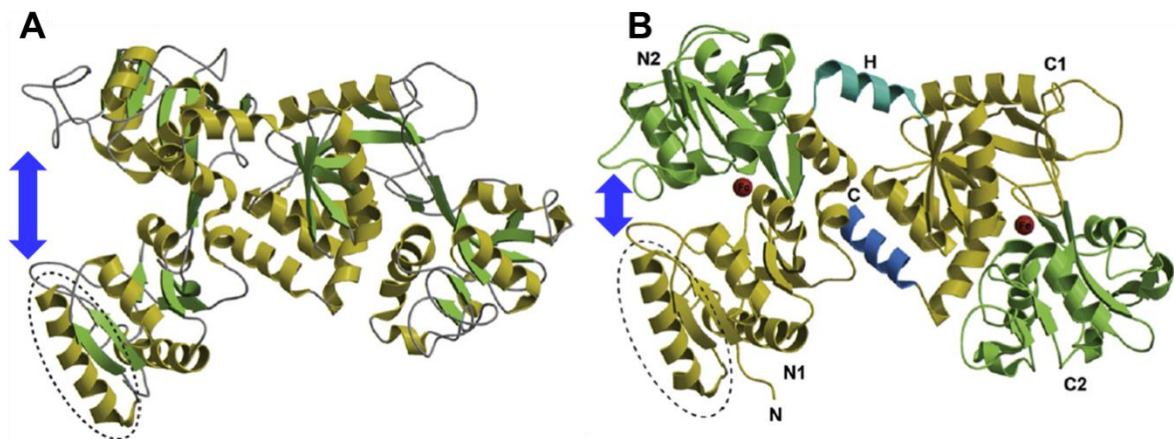
A nomenclatura utilizada para a lactoferrina que possui menos de 5% de saturação por ferro é apolactoferrina (apo-Lf), enquanto a estrutura saturada por ferro é chamada de hololactoferrina (holo-Lf) (**Figura 8**). A forma natural da lactoferrina é chamada de lactoferrina nativa e possui cerca de 15-20% de saturação por ferro (BOKKHIN *et al.*, 2013). Os ligantes de ferro na estrutura da lactoferrina são os mesmos para as transferrinas e ovotransferrinas (BAKER; BAKER, 2004) e também aparecem da mesma forma em outras espécies como cavalos, búfalos e humanos (BAKER; BAKER, 2008).

Há muito tempo já vem sendo reportado que íons metálicos podem alterar a estrutura e funcionalidade de proteínas, ainda mais se estas forem intrinsecamente desnaturadas (JANCSÓ *et al.*, 2011). Uma vez que as proteínas são moléculas dinâmicas, a ligação desses íons pode influenciar em sua estrutura de forma a aumentar a estabilidade frente a alguns tipos de agentes desnaturantes.

Os estudos demonstram que há uma grande diferença conformacional entre a lactoferrina humana saturada e insaturada por ferro (BAKER *et al.*, 2004). A ligação

de ferro induz a estrutura da lactoferrina a uma forma mais fechada, pois os domínios se unem para ancorar este íon. Dessa forma, o ferro aumenta a estabilidade da proteína, uma vez que sua estrutura está mais fechada e menos suscetível à desnaturação (BAKER; BAKER *et al.*, 2008).

Por outro lado, a apolactoferrina possui uma estrutura mais aberta e, conseqüentemente, mais dinâmica do que a holo-Lf. Segundo Baker *et al* (2004), a apo-Lf é a estrutura que pode se ligar de forma irrestrita ao íon ferro. A lactoferrina insaturada por ferro é mais flexível e menos estável e, dessa forma, é mais propensa à desnaturação térmica e à proteólise (BAKER; BAKER *et al.*, 2008).



**Figura 8: Estrutura tridimensional da lactoferrina**

(A) Estrutura da apo-lactoferrina. (B) Estrutura da holo-lactoferrina com o íon ferro, representado pela esfera vermelha. As setas e azul indicam as diferenças de abertura entre os domínios nas duas formas da lactoferrina. A estrutura secundária alfa-hélice e folha- $\beta$  estão representadas em amarelo e verde, respectivamente. A linha pontilhada representa a lactoferricina, que apresenta atividade antimicrobiana. (Extraído e modificado de BAKER; BAKER, 2008)

Estudos espectroscópicos mostraram que primeiramente, o íon carbonato ( $\text{CO}_2^{-3}$ ) se liga à estrutura da apo-Lf neutralizando as cargas positivas provenientes dos resíduos de arginina e posteriormente, os outros quatro aminoácidos que estão presentes nos lobos podem ancorar o íon metálico (BAKER; BAKER *et al.*, 2004).



Os lobos da apo-Lf em solução podem ser encontrados tanto na forma aberta, quanto fechada (mesmo na ausência de um íon ferro) (BAKER; BAKER *et al.*, 2004). Essa diferença estrutural foi analisada por Anderson e colaboradores (1990), que por cristalografia de raios-X revelou, curiosamente, que o lobo C da lactoferrina humana se encontrava fechado mesmo na ausência do íon ferro. Isso demonstra o quanto dinâmica pode ser a estrutura da apolactoferrina (BAKER; BAKER *et al.*, 2004). Outros estudos demonstraram que a apo lactoferrina de cavalo possui os dois lobos fechados (SHARMA *et al.*, 1999b), enquanto a de camelo possui os dois lobos abertos (KHAN *et al.*, 2001a), mostrando a diversidade de estruturas que a apolactoferrina pode adotar em diferentes espécies. A capacidade da lactoferrina de se ligar a ferro e a outros íons e a sua estrutura confere algumas propriedades funcionais desta proteína.

A homologia de sequência de aminoácidos da lactoferrina é conhecida para diferentes espécies de mamíferos como: humano, cavalo, búfalo, porco, camelo entre outros (BAKER; BAKER *et al.*, 2008). Através de uma base dados de sequências, pode-se dizer o quanto as sequências de aminoácidos são conservadas entre as espécies. O mínimo de homologia conhecida é de 65% e pode chegar até aproximadamente 100% (BAKER; BAKER, 2004). A lactoferrina humana, comparada com a de ratos possui ~70% de homologia, enquanto a humana comparada com a bovina possui cerca de 69%. Muito embora essas sequências sejam parcialmente idênticas, a sua estrutura tridimensional é fortemente conservada (BAKER; BAKER, 2008).

Os lobos da lactoferrina possuem uma sequência interna repetida, o que indica um possível evento evolutivo como a duplicação ancestral do gene (BAKER; BAKER, 2004). Esta sequência apresenta cerca de 40% de identidade (BAKER, 2004; BAKER *et al.*, 2008).

A estabilidade estrutural de proteínas é imprescindível para a funcionalidade desta. Contudo, pouco se sabe sobre a estabilidade da lactoferrina bovina frente à desnaturação química e física. Além disso, é importante entender como esta proteína interage com as células e de que forma pode exercer sua função.

### 1.3.3. Lactoferrina e células: como interagem?

As diversas funções da lactoferrina dependem da interação desta proteína com as células. Dessa forma, é importante entender quais são os receptores que participam da internalização desta proteína. A absorção de ferro é regulada para a manutenção de sua quantidade no corpo. A presença de proteínas que facilitam a absorção de ferro é de grande importância, pois absorvem ferro e liberam nas células intestinais (SANCHEZ *et al.*, 1996).

Os componentes celulares de diferentes tecidos dependem de um reconhecimento específico para lactoferrina. As atividades biológicas da lactoferrina podem ser exercidas quando esta encontra receptores de lactoferrina (RLfs) nas superfícies celulares. É importante lembrar que a lactoferrina possui um alto pI (em torno de 9) e uma carga total positiva e, desta forma, há uma especificidade em termos de ligação (SUZUKI; LONNERDAL, 2002).

Os receptores para lactoferrina podem ser encontrados em diversos tipos celulares como células da mucosa epitelial, monócitos, hepatócitos, macrófagos, linfócitos, trombócitos, fibroblastos entre outros. Há presença de receptores de lactoferrina em algumas bactérias como a *Staphylococcus aureus* (ADLEROVA *et al.*, 2008). Embora haja uma especificidade, algumas células possuem “receptores principais” que além de se ligarem a lactoferrina, também podem se ligar a outras proteínas como as transferrinas e lactoferrina de outras espécies (ADLEROVA *et al.*, 2008). Diversas características de receptores de lactoferrina aparecem em diferentes tipos celulares, e “pseudo receptores” são encontrados em diferentes tecidos onde expressam seus próprios RLfs (SUZUKI; LONNERDAL, 2002).

No trabalho de Suzuki e Lonnerdal (2002) há a caracterização de vários receptores de lactoferrina em mamíferos. Os autores mostraram a presença desses receptores em diferentes tipos celulares, mediando algumas funções da lactoferrina. Neste trabalho, os autores clonaram um receptor para lactoferrina humana intestinal e desta forma puderam elucidar a função e expressão de diversos receptores e explorar diferentes genes relacionados.

A intelectina (IntL) (**Figura 9**) é conhecida como uma lectina com massa molecular de 38 kDa (WAKABAYASHI *et al.*, 2008), que atua como uma proteína ligadora de carboidrato que é expressa no tecido epitelial intestinal no período fetal/neonatal em níveis altos (ADLEROVA *et al.*, 2008; AKIYAMA *et al.*, 2013). Esta proteína é encontrada em microdomínios de membrana na borda em escova do intestino delgado (OGUCHI *et al.*, 1995). A IntL tem suas funções na resposta inata a infecções e medeia a ligação de lactoferrina e sua ligação a ferro nos enterócitos.



**Figura 9: Estrutura da Intelectina 1 humana.**

A estrutura obtida através do “Protein Data Bank” sob o código 4WMQ. A estrutura secundária alfa-hélice e folha- $\beta$  estão representadas em magenta e amarelo, respectivamente, e as esferas verdes representam ligantes que podem interagir com a molécula.

A lactoferrina humana liga-se a um receptor específico que está presente na membrana apical do intestino delgado. Este receptor de lactoferrina (RLf) foi caracterizado, sequenciado e clonado e por fim, foi possível relacioná-lo à estrutura da intelectina (LONNERDAL *et al.*, 2011). Embora seja investigada a ligação de lactoferrina nos enterócitos, a contribuição da IntL ainda não é bem entendida. Akiyama e colaboradores (2013) utilizaram microscopia de fluorescência confocal para avaliar a localização subcelular, ligação e liberação da lactoferrina em células Caco-2 e a contribuição da intelectina neste processo. Este grupo mostrou que a lactoferrina alterou a localização subcelular da intelectina e aumentou o sinal deste receptor nas células Caco-2 (AKIYAMA *et al.*, 2013).

A lactoferrina bovina, similarmente à lactoferrina humana, modula a produção de citocinas em enterócitos, bem como a sua diferenciação. Segundo um artigo publicado por Shin e colaboradores (2008), a lactoferrina bovina mostrou possuir uma maior afinidade pela intelectina humana recombinante (rhIntL) do que a lactoferrina humana. Com isso, eles sugeriram que a lactoferrina bovina e seus fragmentos se ligam à intelectina humana (WAKABAYASHI *et al.*, 2008).

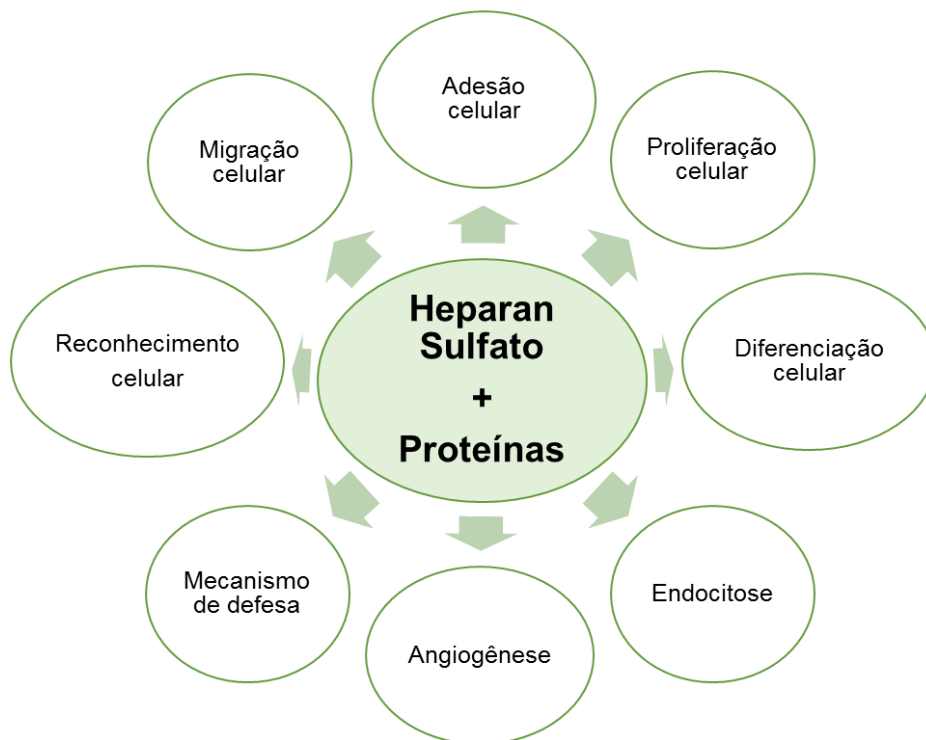
Uma vez que a lactoferrina é resistente à digestão por enzimas proteolíticas, esta proteína pode ser encontrada nas fezes de bebês que se alimentam somente do leite materno (LONNERDAL *et al.*, 2011). A lactoferrina saturada por ferro e a apolactoferrina possuem atividades biológicas de forma diferenciada (LONNERDAL *et al.*, 2011). A holo lactoferrina das espécies humana e bovina, no trabalho de Oguchi e colaboradores (1995) mostrou aumentar a proliferação celular de células Caco-2 enquanto a apolactoferrina suprimiu essa função. Dessa forma, a modulação e proliferação das células do epitélio intestinal podem ocorrer dependendo do grau de saturação de ferro (OGUCHI *et al.*, 1995).

A lactoferrina induz o crescimento e proliferação dos enterócitos dependendo da sua concentração e também afeta a permeabilidade e função da mucosa intestinal (HIROTANI *et al.*, 2008). A endocitose da lactoferrina saturada e não saturada por ferro é realizada por receptores de lactoferrina mediada via clatrina em células Caco-2. Neste trabalho, a internalização ocorre de forma independente de saturação por ferro (JIANG *et al.*, 2011).

A lactoferrina possui um sítio de ligação a glicosaminoglicanos (GAGs) no N-terminal em sua estrutura, assim como já foi reportado como um sítio de ligação a lipoproteínas de baixa densidade. A interação da lactoferrina com proteoglicanos de heparan sulfato (PGHS) evidencia que a lactoferrina pode interferir nas fases iniciais de infecções virais, por exemplo, na replicação do vírus do herpes, o HSV-1 em células Vero (MARCHETTI *et al.*, 1996). A lactoferrina bovina foi a glicoproteína mais efetiva na inibição da ligação do vírus nas células em monocamada (MARCHETTI *et al.*, 1996).

O heparan sulfato (HS) é um polissacarídeo complexo sulfatado da família dos glicosaminoglicanos e pode ser encontrado na superfície da membrana celular

de vertebrados e invertebrados e na matriz extracelular, além de se ligar a diferentes proteínas que fazem parte de complexos moleculares como: proteínas formadoras de proteoglicanos ou proteínas que recobrem o material genético de alguns vírus (DREYFUSS *et al.*, 2009). O HS pode se ligar a diversas proteínas com diferentes processos biológicos e está envolvido com diversos fenômenos celulares como homeostase e desenvolvimento celular, por exemplo, (**Figura 10**). É um receptor primário para a HSV-1 e está presente em várias células de mamíferos e é componente de matriz extracelular. Foi identificado em sua estrutura um sítio de ligação para lactoferrina humana e bovina (MARCHETTI *et al.*, 1996).



**Figura 10: A interação de heparan sulfato e proteínas e as principais funções biológicas.**

(Extraído e modificado de DREYFUSS *et al.*, 2008).

Um trabalho do nosso grupo, realizado por Carvalho e colaboradores (2014) mostrou que a presença de GAGs sulfatados na membrana plasmática é crucial para a ligação da lactoferrina em células Vero. Carvalho utilizou a lactoferrina bovina

como um inibidor da infecção pelo vírus Mayaro. Os autores sugeriram que a inibição da entrada do vírus na célula foi provocada pela interação da lactoferrina bovina pelos grupos sulfatados da célula. Ou seja, um entendimento da interação da lactoferrina com a célula pode ajudar a elucidar o mecanismo de entrada do vírus Mayaro (CARVALHO *et al.*, 2014).

Ainda convém lembrar que entender os mecanismos de entrada e a cinética de internalização da apo e holo lactoferrina bovina são importantes para diversas funcionalidades da proteína, incluindo o efeito antiviral, por exemplo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- Comparar a estabilidade estrutural da apo e holo-bLf e as suas consequências em aspectos funcionais.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Analisar as mudanças estruturais induzidas por ureia, guanidina e alta pressão hidrostática na estrutura terciária da apo e holo-bLf monitoradas por espectroscopia de fluorescência, utilizando sua fluorescência intrínseca e uma sonda extrínseca, o bis-ANS;
- Comparar a estrutura secundária da apo e holo-bLf através de técnicas de dicroísmo circular;
- Medir a liberação e ligação do íon ferro na bLf em presença de ureia;
- Verificar o  $\Delta H$  da apo-bLf nativa e pressurizada por calorimetria de varredura diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* - DSC);
- Comparar a interação da apo e holo-bLf com células Vero por microscopia de fluorescência confocal.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Reagentes**

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico. A água destilada foi filtrada e deionizada num sistema de purificação de água Millipore. A apo-lactoferrina bovina foi comprada na Life Extension (Flórida,USA). Os tampões, ureia ultrapura e cloreto de guanidina utilizados são obtidos da Sigma Chemical Co., bem como o ácido nitrilotriacético e nitrato férrico para a preparação da holo-bLf. Os experimentos foram feitos à temperatura de 25°C e em tampão 25 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7.5.

#### **3.2. Preparo de apo-lactoferrina bovina**

A apo-lactoferrina bovina foi preparada a partir de uma cápsula contendo 300 mg de bLf. O pó obtido desta capsula foi colocado em um tubo falcon e foi adicionado 3 mL de tampão PBS. Para solubilizar esta solução, foi utilizado um vortex até que a solução estivesse homogênea. Posteriormente, foi utilizada a centrifugação para separar a celulose contida na cápsula. A amostra foi centrifugada (centrífuga Eppendorf modelo 5430, rotor F-35-6-30) em quatro ciclos de 10 minutos cada, 7000 rpm (12.052 x g) à 4 °C. Por fim, a lactoferrina foi filtrada em membrana de nitrocelulose com poro de 0,22 µm (Millipore, EUA) na cabine de biossegurança, aliquotada em eppendorfs de 500 µL e congelada a -20°C. A apolactoferrina foi dosada utilizando o espectrofotômetro em 280 nm, com o coeficiente de extinção molar de 1.27.

#### **3.3. Preparo de holo-lactoferrina bovina**

A holo lactoferrina foi preparada a partir de apo lactoferrina seguindo a metodologia descrita por Bokkhin *et al* (2013). A apo lactoferrina com uma concentração de 10mg/mL foi diluída em tampão Tris 10 mM NaCl 75 mM pH 7,2. A solução FeNTA foi preparada utilizando 9,9 mM de nitrato férrico e 8,5 mM de ácido nitrilotriacético,



água deionizada e ajuste de pH para 7,0 (utilizando bicarbonato de sódio – 1 M). Esta solução FeNTA foi adicionada à lactoferrina a uma proporção de 2:1, respectivamente. A lactoferrina ficou incubando durante uma hora a 4°C. Para retirar o excesso de íon ferro da lactoferrina, a amostra foi dialisada contra tampão 25 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,5 a 4 °C durante 48 horas. Foram feitas cerca de 4 a 5 trocas de tampão durante este período. A hololactoferrina foi filtrada em membrana de nitrocelulose com poro de 0,22 µm (Millipore, EUA) na cabine de biossegurança, aliquotada em eppendorfs de 500 µL e congelada a -20°C. Esta proteína foi dosada utilizando a absorbância de único ponto no espectrofotômetro a 280 nm, com o coeficiente de extinção molar de 1.51. A medição de ligação do íon ferro a estrutura da lactoferrina foi feita utilizando o espectrofotômetro a 465 nm.

### **3.4. Desnaturação química por ureia e hidrocloreto de guanidina**

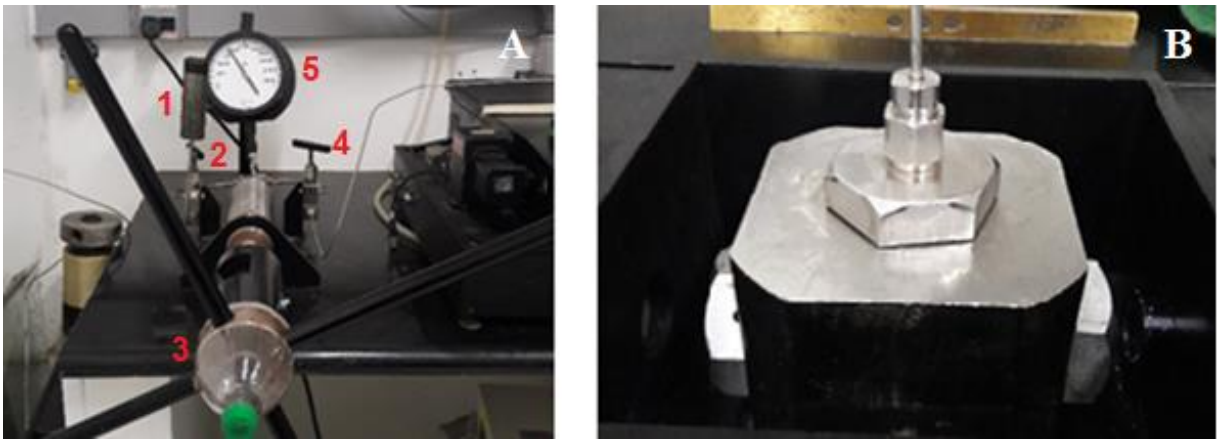
A curva de ureia foi feita a partir de amostras com concentrações de 0,5 M a 8 M de ureia. A concentração de proteína utilizada foi 500 µg/mL (ou 6,25 µM). O tampão utilizado foi Tris 25 mM, NaCl 150 mM pH 7,5. Os experimentos de desnaturação por ureia foram feitos com a incubação das amostras durante 24 h.

A desnaturação química da lactoferrina com hidrocloreto de guanidina foi feito a partir de concentrações de 0,5 M a 7 M. As amostras foram preparadas separadamente, cada uma com a sua concentração de agente químico. Cada experimento foi realizado por pelo menos três vezes com diferentes preparações de lactoferrina.

### **3.5. Efeito da Alta Pressão Hidrostática na lactoferrina bovina**

A alta pressão hidrostática (*High Hydrostatic Pressure* - HHP) (**Figura 11**) foi utilizada a fim de causar a perturbações na estrutura da apo e holo-bLf. A lactoferrina foi colocada em uma cubeta de quartzo em formato de garrafa e fechada com um tubo flexível de polietileno. A amostra foi fechada com total ausência de bolhas para que a pressão fosse aplicada igualmente por toda a amostra. O sistema

de pressão estava acoplado ao espectrofluorímetro para que as medidas pudessem ser feitas. A bomba de pressão, onde a cubeta se encontra durante o experimento, possui três janelas óticas de quartzo onde a luz pode incidir sobre a amostra e a fluorescência pode ser capturada num ângulo de 90° (em relação à entrada de luz). O reagente utilizado para causar o efeito hidrostático é o etanol absoluto, uma vez que possui um índice de refração próximo ao do quartzo. Nos ciclos de pressurização, as amostras foram submetidas à pressão hidrostática em passos de 0.2 em 0.2 kbar até 2.9 kbar, tendo um tempo de incubação de 10 minutos em cada pressão. Estes experimentos foram repetidos três vezes com diferentes preparações de lactoferrina.



**Figura 11: Sistema de Alta Pressão Hidrostática.**

(A) Os componentes de alta pressão consistem em: (1) reservatório de etanol; (2) válvula que permite a entrada de etanol para o gerador de pressão; (3) gerador manual de pressão; (4) válvula que permite a saída de etanol do gerador de pressão para a bomba de pressão; (5) manômetro que afere a pressão da bomba. (B) Bomba de pressão acoplada a um espectrofluorímetro modelo ISSK2 (ISS Inc., Champaign, IL, USA) (foto tirada em 28/06/2017).

### 3.6. Fluorescência da sonda extrínseca hidrofóbica bis-ANS

A sonda fluorescente bis-ANS (bis 8- anilino-naftaleno-1-sulfonato) (**Figura 12**) é uma sonda extrínseca que se liga a segmentos hidrofóbicos e a regiões positivas da proteína. O bis-ANS quando não ligado a segmentos hidrofóbicos da proteína, possui fluorescência desprezível no solvente, porém, quando ligada, há um aumento

em sua emissão de fluorescência. Esta sonda foi utilizada com uma abordagem para monitorar a desnaturação da lactoferrina por ureia e alta pressão hidrostática. O pó de bis-ANS foi diluído em água deionizada. Para dosar, foi colocado 10 µL de bis-ANS em 1000 µL de metanol. A absorção foi medida em 395 nm no espectrofotômetro. O coeficiente de extinção molar é 23.000. Sendo assim, para calcular a concentração do bis-ANS foi utilizada a seguinte equação:

$$[C] = \frac{ABS \times DIL}{\epsilon \times CO}$$

onde:

[C]: concentração

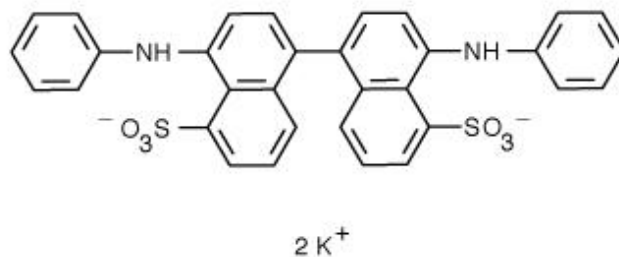
ABS: absorvância

DIL: diluição

E: coeficiente de extinção molar

CO: caminho óptico

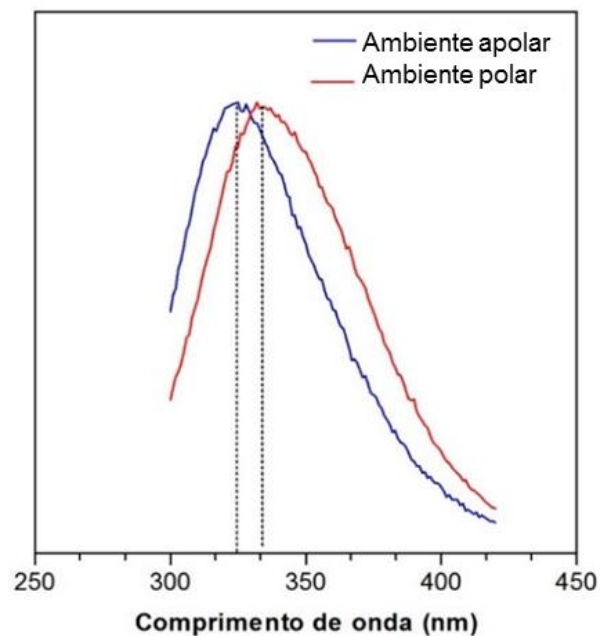
Dessa forma, foi feita uma curva de titulação a fim de chegar a um máximo de ligação de bis-ANS para apo e holo. A concentração utilizada para os experimentos foi de 24 µM. Os experimentos com bis-ANS foram feitos três vezes com diferentes preparações de lactoferrina.



**Figura 12: Sonda extrínseca hidrofóbica bis-ANS (4,4'-bis-1-anilinoftaleno-8-sulfonato).**

### 3.7. Espectroscopia de Fluorescência

A técnica de espectroscopia de fluorescência pode ser utilizada para o estudo de dinâmica de proteínas, utilizando os aminoácidos aromáticos para monitorar as mudanças conformacionais ou até mesmo pelo uso de sondas extrínsecas. Em nosso caso, utilizamos a emissão de fluorescência do triptofano para avaliar a estrutura terciária da lactoferrina bovina. Quando o triptofano é exposto a ambientes polares, sua emissão ocorre em comprimentos de ondas maiores (**Figura 13**).



**Figura 13: Espectro de fluorescência de aminoácidos aromáticos.**

A linha azul representa o espectro dos resíduos aromáticos hidrofóbicos, como por exemplo, o triptofano, quando se encontra protegido do solvente. A linha vermelha representa o espectro de fluorescência quando esses resíduos estão expostos ao solvente. Esta exposição pode ocorrer devido à presença de agentes desnaturantes que expõe esses resíduos a ambientes polares.

Os espectros de fluorescência foram registrados em um espectrofluorímetro modelo ISSK2 (ISS Inc., Champaign, IL, USA). O centro de massa espectral  $\langle u \rangle$ , que é obtido pela emissão de fluorescência do triptofano, é diretamente proporcional à energia de emissão e pode ser calculado conforme a equação abaixo:

$$\langle u \rangle = \frac{\sum u_i \times F_i}{\sum F_i}$$

onde  $F_i$  é a fluorescência emitida em um determinado número de onda  $u_i$ , sendo o somatório realizado à partir de uma grande quantidade de valores  $F$ . Os treze triptofanos presentes na estrutura da lactoferrina bovina foram excitados a 280 nm e seu espectro de emissão foi captado em uma varredura de 300–420 nm. O bis-ANS foi uma sonda extrínseca utilizada nos experimentos de desnaturação química e física. O bis-ANS foi excitado a 360 nm e sua emissão foi detectada em uma varredura de 400–600 nm. Os espectros foram obtidos com a bLf na concentração final de 500 µg/mL diluída em tampão Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5.

### 3.8. Espalhamento de Luz

A medida de espalhamento de luz visa obter a estimativa do tamanho da partícula em solução. O movimento browniano das moléculas e seu tamanho faz com que a luz do laser que foi incidido na amostra, se espalhe em vários níveis diferentes em todas as direções. Esta técnica consiste em analisar essas flutuações de intensidade. Dessa forma, quanto maior a molécula, mais luz será espalhada. No nosso trabalho utilizamos esta técnica para verificar se estava ocorrendo agregação proteica durante os estudos de estabilidade por desnaturação por guanidina. Uma luz de 320 nm foi incidida nas amostras e o espalhamento de luz foi obtido a 90° sendo os valores obtidos a partir da área gerada pela varredura na faixa de 315–325 nm. O equipamento utilizado foi um espectrofluorímetro modelo ISSK2 (ISS Inc., Champaign, IL, EUA).

### 3.9. Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular (Circular Dichroism-CD) é uma técnica que permite analisar a estrutura secundária de proteínas pela alteração na medida da diferença da luz circularmente polarizada para direita (R) e para esquerda (L). Moléculas opticamente ativas exibem sinal de CD. A técnica de dicroísmo circular foi utilizada neste trabalho

para comparar a estrutura secundária da apo e holo-bLf. As amostras estavam a uma concentração de 500 µg/mL diluídas em tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM pH 7.5. O espectropolarímetro utilizado foi o Jasco J-715 modelo 1505. O comprimento de onda utilizado foi no UV distante, de 260–190 nm.

### **3.10. Quantificação da liberação de ferro em presença de ureia**

Para verificar se o ferro estaria sendo liberado da estrutura da holo-bLf em presença de ureia, utilizamos o espectrofotômetro e realizamos as leituras a 465 nm para detectar o ferro ligado a estrutura da lactoferrina (MAJKA *et al.*, 2013). Portanto, as amostras analisadas foram: apenas ferro livre em tampão Tris 25 mM, NaCl 150 mM pH 7,5, apo e holo-bLf nativas, em presença de ureia e adicionando 50 µM de FENTA. Esses experimentos foram feitos em triplicata com diferentes preparações de lactoferrina.

### **3.11. Cromatografia líquida de alta eficiência**

A fim de purificar, substituir o tampão da lactoferrina bovina para os experimentos de calorimetria e comparar o tempo de retenção das amostras, foi utilizado a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) do modelo Shimadzu. O sistema foi equilibrado primeiramente com água deionizada deaerada para retirar o etanol absoluto (20%) no qual a coluna encontrava-se guardada. A coluna foi equilibrada com o tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM pH 7,5 deaerado (durante 30 minutos). A coluna de gel filtração Superdex 75 10/300 GL (GE Healthy Care) foi utilizada com um fluxo de 0,5 mL/min durante todo o experimento. O tempo de corrida foi de 40 minutos e o volume de amostra utilizado foi de 250 µL. A eluição das amostras foram monitoradas por fluorescência a 280 nm e 214 nm. A amostra foi coletada no HPLC, dosada e utilizada no DSC.

### 3.12. Calorimetria por Varredura Diferencial

Os termogramas de calorimetria (Differential Scanning Calorimetry – DSC) foram feitos em um calorímetro do modelo VP-DSC da MicroCal (Northampton, MA). O calorímetro foi utilizado para medir a diferença de capacidade calorífica entre a temperatura da cela que contém a amostra, a apo-bLf, e da cela que contém apenas a referência, onde se encontra o tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM e pH 7,5. Dessa forma, podemos determinar parâmetros importantes de uma proteína, tal como estabilidade. As amostras foram purificadas no HPLC antes de serem colocadas no calorímetro. As amostras foram pressurizadas no sistema de pressão com metodologia descrita no item “*Efeito da Alta Pressão Hidrostática na lactoferrina bovina*”. As amostras de apolactoferrina e apolactoferrina pressurizadas se encontravam na concentração de 15  $\mu$ M e foi colocada cerca de 750  $\mu$ L de amostra e tampão em cada cela. Os escaneamentos no DSC foram feitos com temperatura de 25–75 °C com uma taxa de aquecimento de 90 °C/h.

### 3.13. Cálculo da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ )

A energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) foi calculada a partir dos experimentos de espectroscopia de fluorescência utilizando ureia. Para realizar o cálculo do  $\Delta G$ , foi feita a média aritmética dos três experimentos. Os valores de grau de desnaturação ( $\alpha$ ) foram obtidos pela seguinte equação:

$$\alpha = \frac{(CM - CM_i)}{(CM_i - CM_f)} \quad (1)$$

onde:

( $\alpha$ ): grau de desnaturação

CM: centro de massa

CMi: centro de massa inicial

CMf: centro de massa final

A equação que descreve o cálculo da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) é:

$$\Delta G = -RT \ln \frac{\alpha}{1-\alpha} \quad (2)$$

onde:

R: constante dos gases (considerado 0,001987)

T: temperatura em Kelvin (considerado 298,15K)

ln: logarítimo natural

### **3.14. Cultura de células**

A célula Vero (células do rim de macaco verde) foi utilizada para o rastreamento da entrada de apo e holo-bLf. Essas células foram cultivadas em monocamadas em meio DMEM (Dubellco's Modified Eagle Medium), Sigma, suplementado com soro fetal bovino 10 %, vitaminas 0,4 %, aminoácidos não essenciais 1 % e antibióticos 1 % (penicilina e estreptomicina).

### **3.15. Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT**

Este ensaio tem como objetivo avaliar a atividade das desidrogenases mitocondriais através da quantificação da redução do MTT a formazan. A redução do MTT está diretamente ligada a atividade mitocondrial e conseqüentemente a viabilidade celular. O ensaio de MTT foi utilizado para identificar qual concentração de lactoferrina poderia ser utilizada com células Vera nos experimentos de microscopia de fluorescência confocal. As células foram colocadas em uma placa de 96 poços (100  $\mu$ L de célula em meio DMEM a 10% de soro e 1% de antibiótico) e foram incubadas na estufa até atingirem 100% de confluência. Após atingirem 100 % de



confluência, o meio de cultura foi retirado da placa e a placa foi lavada com PBS. A apo e holo lactoferrina foram adicionadas nos poços com concentrações de 2 mg/mL, 1 mg/mL, 500 µg/mL e 250 µg/mL (diluídas em meio de cultura). O controle negativo manteve somente meio de cultura e o controle positivo foi colocado Triton X-100 a 0,1 %. A lactoferrina foi deixada durante 24 h na placa com células. A lactoferrina foi retirada dos poços que foram lavados com PBS. Após este processo, foi adicionado o MTT a uma concentração de 500 µg/mL, diluído em PBS. Foi adicionado 200 µL de MTT em cada poço e ficou incubando durante 3 h na estufa a 37°C. O MTT foi retirado dos poços com muito cuidado e foi adicionado 200 µL de álcool isopropílico. O álcool isopropílico foi bem homogeneizado e 100µL deste foi colocado em uma nova placa. A absorbância (abs) dos poços foi medida em um espectrofotômetro a 570 nm e 650 nm. A viabilidade celular foi calculada conforme a seguinte equação:

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

Os poços com o controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade celular. Este experimento foi repetido em triplicata com preparações independentes.

### **3.16. Cinética da internalização e do trânsito intracelular da lactoferrina por Microscopia de Fluorescência Confocal**

Com o intuito de rastrear a trajetória da lactoferrina, tanto durante sua ligação quanto após sua possível entrada na célula, realizou-se uma marcação dessa molécula com FITC - isotiocianato de fluoresceína - na razão molar de 1:10. Para a marcação, a lactoferrina foi colocada em tampão fosfato básico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2,5%)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,082%)) em pH 8. A lactoferrina utilizada se encontrava na sua forma nativa (apo e holo-bLf) e pressurizada (P-apo e P-holo). Para a remoção de todo FITC livre, foram feitas sucessivas centrifugações contendo PBS (cerca de 5 vezes) em uma unidade filtrante Vivaspin (GE Health Care, EUA) com peso molecular de corte em 30 kDa.

As proteínas foram ressuspensas em tampão PBS, verificando se o volume final era o mesmo que o inicial para não ocorrer mudanças de concentração das proteínas. As proteínas marcadas foram utilizadas no mesmo dia para o experimento. As células Vero subconfluentes em placas de 35 milímetros de fundo de vidro (MatTek, Ashland, MA, EUA) foram incubadas com solução de 1 mg/ml contendo o conjugado Lactoferrina Bovina-Isiotiocianato de Fluoresceína (FITC-bLf) durante 15 minutos a 4°C. Depois deste passo de sincronização, as moléculas de lactoferrina não ligadas foram lavadas com PBS e as células foram incubadas em DMEM a 37°C para permitir a endocitose. A 0, 30 e 60 minutos na temperatura de análise, as células foram lavadas novamente com PBS e fixadas com formaldeído a 3,7% durante 15 minutos. As células controle não receberam a FITC-bLf. O estudo da localização da lactoferrina ocorreu mediante análise microscópica de um grid com células e a solução FITC-bLf nos tempos  $t=0$ ,  $t=30$  minutos e  $t=60$  minutos após sua entrada nas células. A técnica de microscopia utilizada foi a microscopia confocal por escaneamento com laser e análise de fluorescência (LSCFM – Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscopy), o laser utilizado foi o laser de íons de argônio, com absorção em 488 nm e emissão a 500 - 550 nm. As fatias ópticas analisadas possuíam espessura menor que 1  $\mu\text{m}$  e utilizando uma objetiva plana-apocromática de imersão em óleo, com aumento de 63 vezes (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Esse experimento foi conduzido com o auxílio do doutor do Instituto de Bioquímica Médica (IBqM) da UFRJ, Carlos Marques.

### **3.17. Análise estatística**

Os dados dos experimentos estão representados graficamente com média  $\pm$  desvio padrão da média e os valores de  $p < 0,05$  são considerados significativos. Os dados seguem distribuição normal e o teste utilizado foi o teste *t-student* para dados pareados. Foi utilizado também a análise por ANOVA com o pós-teste de *Dunnnett* para comparação com de controle com diferentes concentrações de ureia. As análises foram feitas no software GraphPrism versão 5.03.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Estabilidade estrutural da lactoferrina bovina

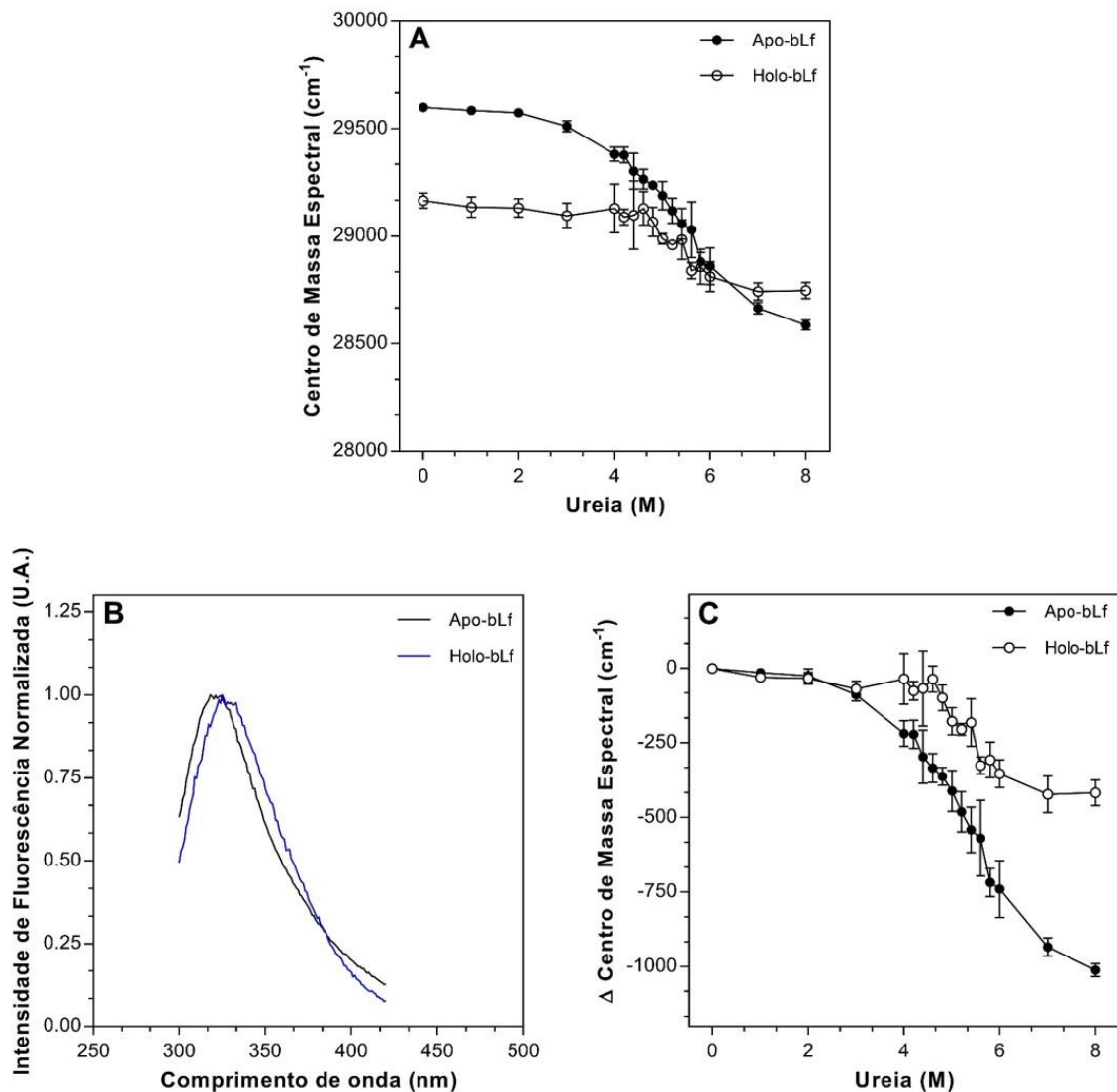
Neste trabalho foi comparada a estabilidade estrutural da lactoferrina bovina nas formas apo e holo frente à desnaturação por agentes químicos, como a ureia e guanidina e agentes físicos, como a alta pressão hidrostática. Para monitorar as possíveis mudanças conformacionais, foi utilizado, principalmente, a espectroscopia de fluorescência tendo como sonda intrínseca o triptofano e como sonda extrínseca o bis-ANS.

#### 4.1.1. Desnaturação química induzida por ureia

A ureia é um agente químico desnaturante que age rompendo as ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas que anteriormente estabilizavam a estrutura da proteína, levando-a à perda da sua estrutura tridimensional e muitas vezes inibindo ou mesmo abolindo sua atividade biológica.

A lactoferrina bovina, nas suas formas apo e holo, foi submetida a concentrações crescentes de ureia (**Figura 14A-C**). Uma vez que o triptofano é um aminoácido hidrofóbico e a lactoferrina possui treze resíduos deste aminoácido, é natural que eles apresentem diferentes graus de exposição ao solvente. Esta característica foi explorada para observar mudanças estruturais na lactoferrina. Valores de centro de massa espectral indicam o quanto os triptofanos presentes na estrutura da lactoferrina estão em contato com o ambiente polar.

A média dos valores de centro de massa inicial para apo-bLf e holo-bLf foi de  $29.600 \pm 18$  e  $29.165 \pm 35 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Dessa forma, verificamos que os triptofanos presentes na estrutura da holo-bLf encontram-se mais expostos ao solvente do que na apo-bLf. Essa diferença também pode ser observada quando os espectros de emissão de fluorescência do triptofano das formas apo e holo-bLf são normalizados, onde o pico máximo de emissão de fluorescência é de  $\cong 318 \text{ nm}$  para a apo-bLf e  $\cong 326 \text{ nm}$  para a holo-bLf (**Figura 14B**).



**Figura 14: Efeito desnaturante da ureia na apo e holo-bLf.**

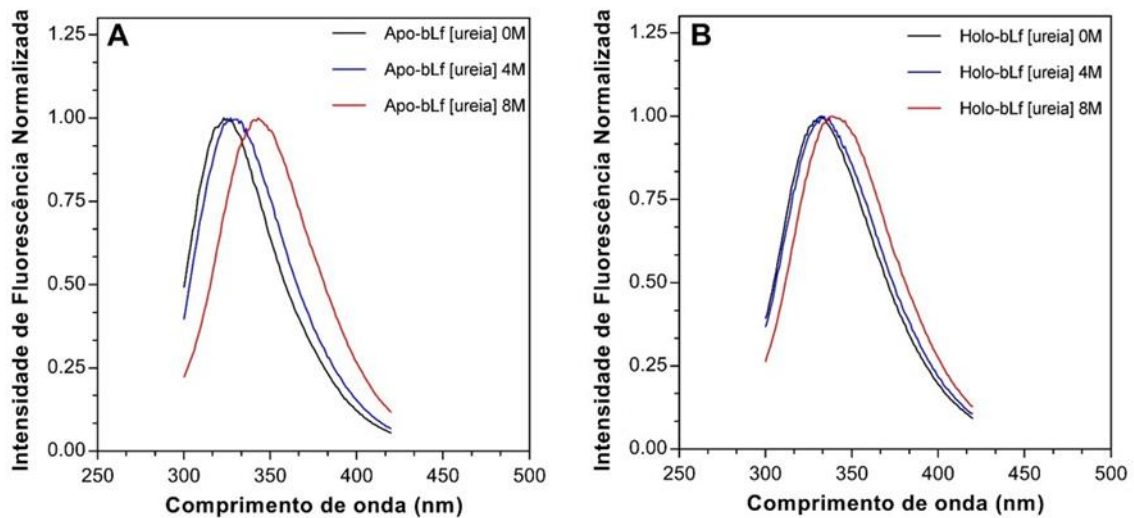
A fim de verificar o quanto a ligação do íon ferro influencia a estabilidade estrutural das formas apo e holo-bLf, a lactoferrina bovina foi submetida concentrações crescentes de ureia (0,5 a 8,0 M). A lactoferrina foi diluída em tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM, pH 7,5, para uma concentração final de 500 µg/mL. Em **A** é representado o centro de massa espectral das duas formas da lactoferrina em presença de ureia. Em **B** estão representados os espectros normalizados de apo e holo-bLf nativos. Em **C** é representado a variação de centro de massa. O comprimento de onda de excitação do triptofano foi de 280 nm e o comprimento de onda de varredura 300 a 420 nm. Esses experimentos foram realizados pelo menos 3 vezes com diferentes preparações de lactoferrina a temperatura ambiente. Para análise estatística dos dados, foi utilizado o desvio padrão da média.

Embora os valores iniciais de centro de massa possuam uma variação de aproximadamente  $\cong 400 \text{ cm}^{-1}$ , as médias dos valores de centro de massa finais são de  $28.588 \pm 24$  e  $28.748 \pm 38 \text{ cm}^{-1}$ , para apo e holo, respectivamente. A média da variação de centro de massa final é de aproximadamente  $161 \text{ cm}^{-1}$ , e isso indica que

ambas as formas da lactoferrina chegaram a um grau de desnaturação relativamente próximo.

É importante ressaltar que a forma apo-bLf começa a sofrer desnaturação em concentrações em torno de 3 M de ureia, enquanto a holo-bLf apresenta desnaturação em torno de 4,5 M de ureia. Assim, nossos dados sugerem que a ligação de ferro na lactoferrina bovina, além de estabilizar a sua estrutura, leva a uma mudança conformacional onde temos uma maior exposição média dos triptofanos ao solvente (**Figura 14**). Este resultado pode ser melhor visualizado quando a variação de centro de massa é mostrada (**Figura 14C**). Neste gráfico pode-se observar que, ao igualar os valores de centro de massa iniciais a zero, percebe-se que o início da desnaturação da holo-bLf ocorreu em concentrações maiores de ureia quando comparados a apo-bLf.

Ao avaliar os espectros de emissão de fluorescência do triptofano das formas apo e holo-bLf (**Figura 15 A e B**), pode-se notar um desvio maior para apo-bLf (4 M) (**Figura 15A**), em relação à holo-bLf (4 M) (**Figura 15B**).



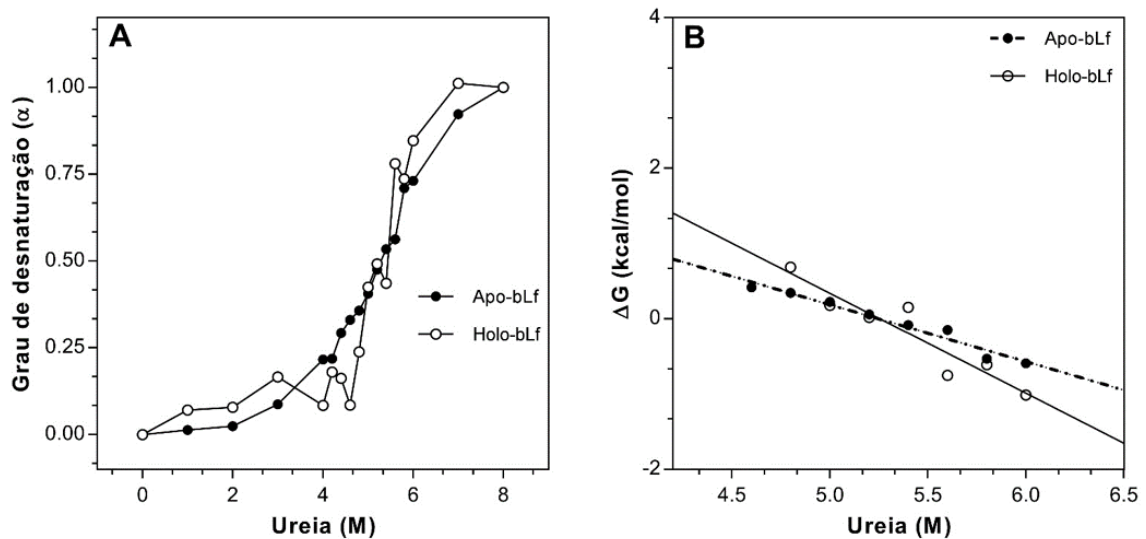
**Figura 15: Espectros de apo e holo-bLf em presença de ureia.**

Para avaliar se ocorreu o desvio do espectro para comprimento de onda maiores da apo e holo-bLf, foi representados os espectros da bLf nas concentrações de 0, 4 e 8M de ureia. A lactoferrina foi diluída em tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM, pH 7.5, para uma concentração final de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Em **A** é representado os desvios dos espectros de emissão de fluorescência de triptofano da apo-bLf em presença de ureia. Em **B** é representado os desvios dos espectros de emissão da fluorescência de triptofano da holo-bLf em presença de ureia. O comprimento de onda de excitação do triptofano foi de 280 nm e o comprimento de onda de varredura 300 a 420 nm. Esses espectros são referentes a uma das triplicatas.

Adicionalmente, os parâmetros termodinâmicos foram calculados para verificar qual estrutura era mais resistente à desnaturação por ureia (**Figura 16A e B**). O perfil de desnaturação das formas apo e holo-bLf estão representados na **figura 16A**. Pode-se verificar que, em baixas concentrações de ureia a holo-bLf sofreu uma desnaturação sutilmente menor em comparação com a apo-bLf. Contudo, a partir de 4 M de ureia, essa tendência foi invertida, uma vez que a apo fica mais sensível à desnaturação do que a holo-bLf. Em 6 M de ureia este perfil foi novamente subvertido. O efeito estabilizador do ferro pode ser visto também em função do  $\Delta G$  (**Figura 16B**).

Os pontos considerados para medir os valores de  $\Delta G$  para apo-bLf foram de 4,6 – 6 M de ureia e 4,8 – 6 M para a holo-bLf. O valor de  $\Delta G$  para apo foi de  $3,97 \pm 0,32$  e para holo-bLf  $6,99 \pm 1,15$ . A partir destes dados pode-se afirmar que a holo-bLf é mais estável que a apo-bLf quando a desnaturação é induzida por ureia. A **tabela 2** representa a estabilidade da lactoferrina bovina nas formas apo e holo-bLf com desnaturação induzida por ureia. Assim, nota-se o efeito estabilizante do íon

ferro na estrutura da lactoferrina quando submetida a altas concentrações de ureia.



**Figura 16: Estabilidade estrutural da apo e holo-bLf em presença de ureia - parâmetros termodinâmicos.**

A fim de verificar o quanto a ligação do íon ferro influencia a estabilidade estrutural da lactoferrina, submetemos esta proteína a concentrações crescentes de ureia (0,5 a 8,0 M). A lactoferrina foi diluída em tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM, pH 7.5, para uma concentração final de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Em **A** está representado o grau de desnaturação duas formas da lactoferrina em presença de ureia. Em **B** está representada a energia livre de Gibbs de apo e holo-bLf. Para obter o valor de  $\Delta G$  foi utilizado o método regressão linear.

**Tabela 2 - Análise da estabilidade da lactoferrina baseado nos dados de fluorescência**

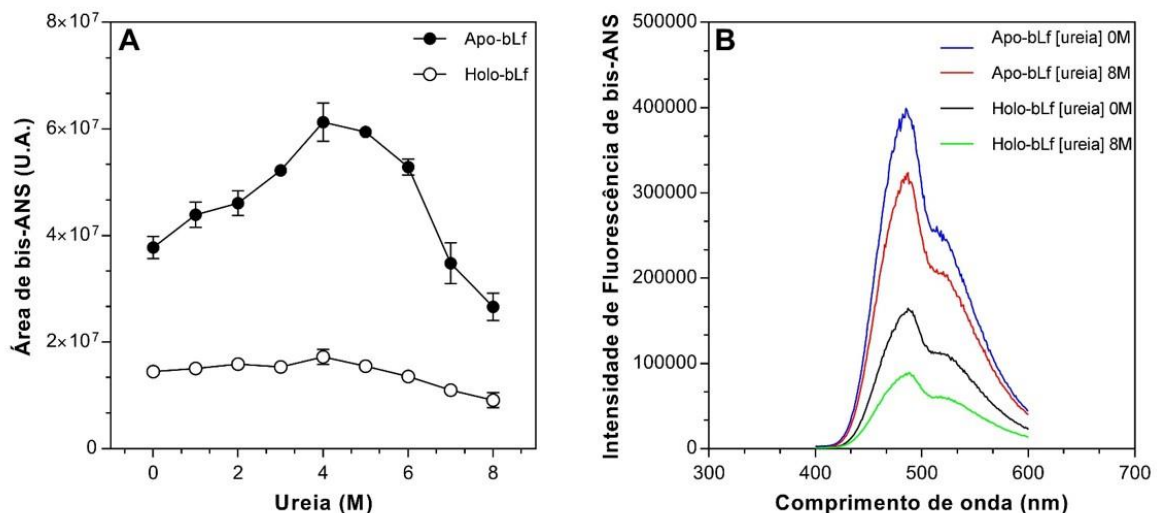
	Ureia	
	[U] <sub>1/2</sub>	$\Delta G$ (kcal/mol)
<b>Apo-bLf</b>	5,2	3,973
<b>Holo-bLf</b>	5,2	6,988

A ureia foi utilizada para causar perturbações na estrutura da lactoferrina bovina e as modificações estruturais foram analisadas por espectroscopia de fluorescência. O resultado de  $U_{1/2}$  corresponde à quantidade de ureia que causa 50% da desnaturação da lactoferrina bovina. Todos esses parâmetros foram obtidos à pressão atmosférica.

Uma outra abordagem utilizada para verificar o efeito da ureia na estrutura da lactoferrina bovina foi pela fluorescência da sonda hidrofóbica bis-ANS. Sondas

fluorescentes como o bis-ANS (4,4'-bis-1-anilinaftaleno-8-sulfonato) e ANS (8-anilinaftaleno-1-sulfonato) são sensíveis à polaridade do meio, sendo amplamente utilizadas para caracterizar intermediários de enovelamento, variantes estruturais e agregados proteicos. Outra aplicação é caracterizar nas superfícies de proteínas nativas, as suas regiões hidrofóbicas (HAWE *et al.*, 2010).

Dessa forma, a sonda bis-ANS foi utilizada para fornecer dados acerca da interação entre bis-ANS e bLf nas formas apo e holo para obter informações a respeito da estabilidade de cada uma das formas (**Figura 17**). Foi observado através da área espectral de bis-ANS que apo-bLf ligou mais a bis-ANS do que a holo-bLf (**Figura 17A**). O desligamento do bis-ANS na estrutura da holo-bLf pode ser melhor visualizado pelo espectro de intensidade desta sonda (**Figura 17B**).



**Figura 17: Desnaturação induzida por ureia e monitorada por bis-ANS.**

A sonda hidrofóbica bis-ANS é uma molécula que se liga a segmentos hidrofóbicos e regiões positivas da proteína. Em **A** o bis-ANS foi utilizada para monitorar a desnaturação da apo e holo-bLf por ureia. Em **B** é representado por espectro da intensidade de fluorescência de bis-ANS em presença e ausência de uréia (8 M) A concentração de bis-ANS utilizada foi de 24  $\mu$ M. A bLf foi diluída em tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM, pH 7.5. A concentração final da bLf era de 500  $\mu$ g/mL. O comprimento de onda de excitação foi de 360 nm e a emissão de fluorescência foi de 400 a 600 nm. Os experimentos foram repetidos por pelo menos três vezes. A análise estatística utilizada foi o desvio padrão da média. O espectro representa apenas um desses experimentos.

Além do bis-ANS se ligar mais à forma apo, os resultados mostraram um aumento na ligação da sonda em concentrações subdesnaturantes de ureia (1 - 4 M). O estudo conduzido por Stanciuc e colaboradores (2013) mostrou que o



aumento gradual da temperatura da lactoferrina bovina levou a um aumento significativo da intensidade de fluorescência do ANS. O autor também cita que a ligação do ANS a proteínas com estrutura parcialmente enovelada não altera sua conformação e estabilidade mostrando, portanto, que as vias de enovelamento e a cinética não são afetadas.

Outro trabalho realizado por Sreedhara e colaboradores (2010) mostra que ao submeter a lactoferrina bovina a diferentes valores de pH, leva à mudança na fluorescência da sonda ANS. Neste trabalho foi visto que ao colocar a lactoferrina bovina a pH abaixo de 5, verificou-se um aumento na intensidade de fluorescência do ANS. Desse modo, a desnaturação parcial da lactoferrina levou à exposição de ambientes hidrofóbicos onde a sonda pôde se ligar. Outra característica analisada foi que a lactoferrina bovina nativa e completamente desnaturada possuem emissão de fluorescência de ANS menor quando comparada com a forma parcialmente desenovelada.

Esses trabalhos corroboram o que foi visto nesta dissertação, onde é sugerido que em concentrações iniciais de ureia houve a exposição de segmentos hidrofóbicos que estavam menos expostos anteriormente. Após 4 M de ureia, foi observado o desligamento desta sonda, consequência da desnaturação da apo-bLf.

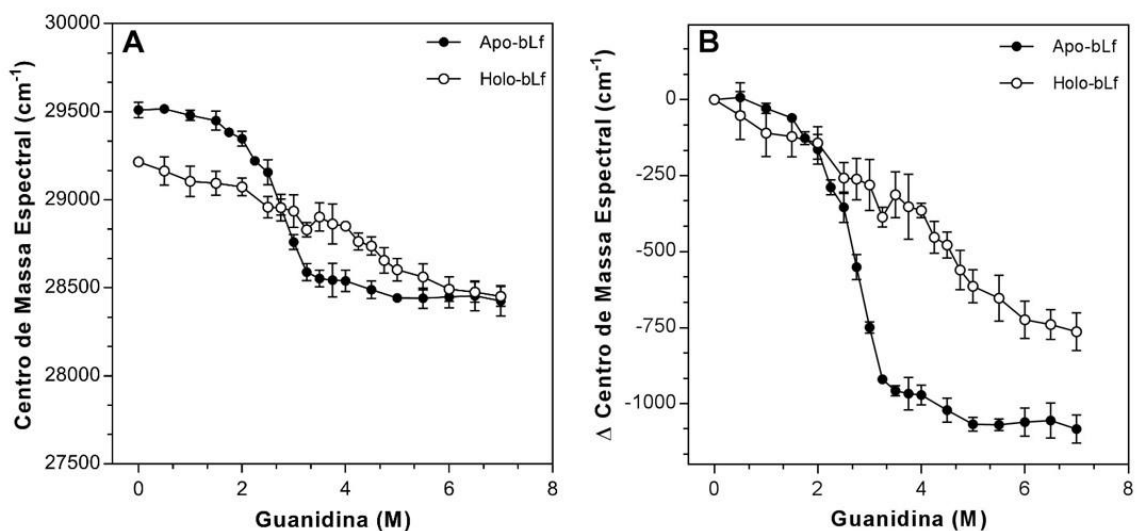
Em comparação com a apo-bLf, a forma holo possui menos sítios de ligação a bis-ANS. Isto foi verificado uma vez que a ligação do bis-ANS foi muito menor na forma holo do que na apo-bLf na ausência de ureia. Em virtude disto foi possível observar que o efeito estabilizante do ferro foi capaz de impedir a exposição de sítios de ligação a bis-ANS na forma holo. Isto reforça a diferença entre as estruturas tridimensionais das formas apo e holo e o papel estabilizante do íon ferro.

#### 4.1.2. Desnaturação química induzida por hidrocloreto de guanidina

O hidrocloreto de guanidina é um agente químico potente e também foi utilizado para causar perturbações na estrutura da lactoferrina. A estabilidade estrutural das formas apo e holo-bLf foi comparada utilizando concentrações de 0,5 M a 7 M de guanidina (**Figura 18**). Como já visto anteriormente nos experimentos de

ureia (**Figura 14A**), o centro de massa espectral inicial da apo-bLf é maior do que da holo-bLf (**Figura 18A**). Ao adicionar concentrações crescentes de guanidina é possível notar os diferentes padrões de desnaturação entre apo-bLf e holo-bLf (**Figura 18B**).

Nas primeiras concentrações de guanidina, a holo apresentou uma diminuição nos valores de centro de massa em comparação com a apo-bLf. Contudo, em concentrações de guanidina a partir de 3 M a apo-bLf já se encontrava quase completamente desenovelada. Em contraste, a curva de desnaturação da holo mostra uma desnaturação mais gradual à medida que há o aumento na concentração de guanidina (**Figura 18 A e B**).

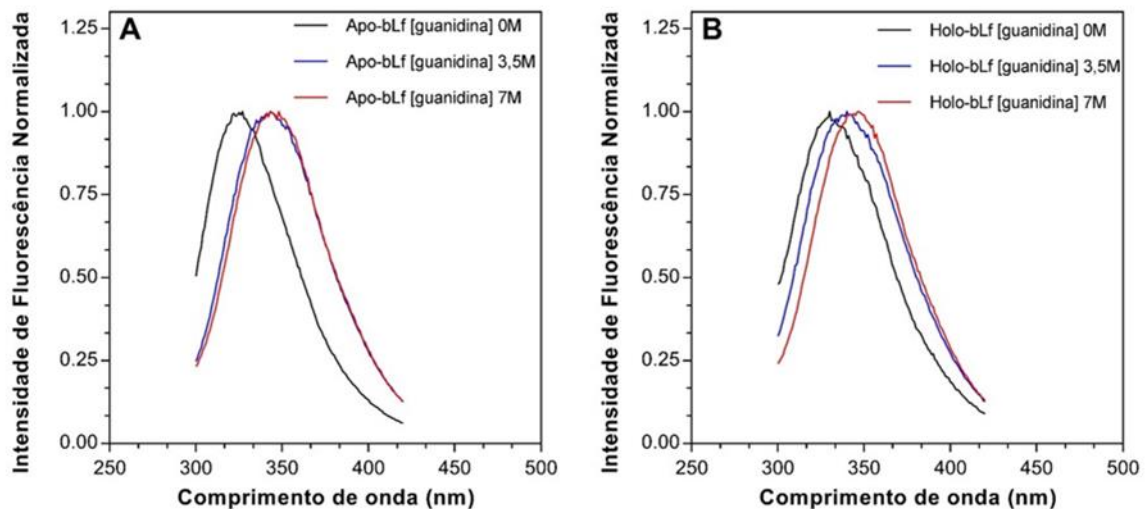


**Figura 18: Desnaturação da apo e holo-bLf induzida por hidrocloreto de guanidina.**

A guanidina foi um agente químico utilizado para causar perturbações na estrutura da lactoferrina e consequentemente levar a sua desnaturação. Em **A** apo e holo-bLf foram submetidas a diferentes concentrações de guanidina (0,5 M a 7,0 M) e foram avaliadas as medidas de centro de massa espectral. Em **B** é representada a variação de centro de massa da apo e holo-bLf em presença de guanidina. A bLf foi diluída em tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM, pH 7,5. A concentração final da bLf era de 500 µg/mL. O comprimento de onda de excitação do triptofano foi de 280nm e a emissão de fluorescência foi varrida de 300 a 420 nm. Os experimentos foram repetidos por pelo menos três vezes. A análise estatística utilizada foi o desvio padrão da média.

A análise dos espectros de emissão de fluorescência do triptofano (**Figura 19 A e B**) revela que em concentrações intermediárias de hidrocloreto de guanidina (3,5 M) o espectro da apo-bLf se encontra mais deslocado para comprimentos de ondas

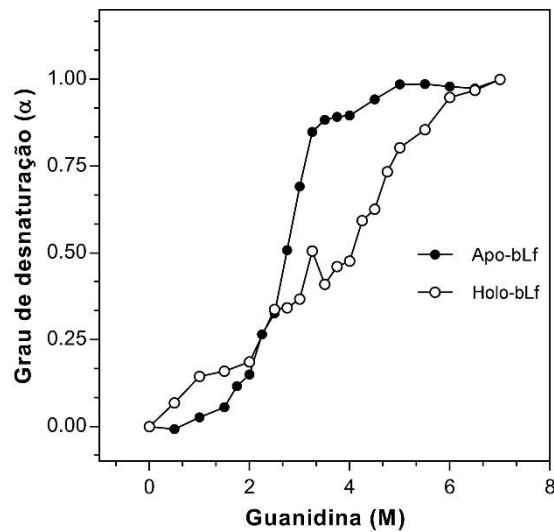
maiores quando comparados aos da holo-bLf. O espectro de apo-bLf a 3,5 M de guanidina mostra claramente que esta já se encontra mais desnaturada uma vez que ocorre uma sobreposição do mesmo com o espectro na concentração final (7 M) (**Figura 19A**). Na **Figura 19B**, não foi possível observar o mesmo resultado, o que demonstra claramente que 3,5 M não foi efetiva para levar a holo-bLf a um estado desenovelado.



**Figura 19: Espectros de apo e holo-bLf em presença de hidrócloro de guanidina.**

Para avaliar o desvio do comprimento de onda da apo e holo-bLf, plotamos os espectros da apo e holo-bLf nas concentrações de 0, 3,5 e 7M de hidrócloro de guanidina. A lactoferrina foi diluída em tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM, pH 7,5, para uma concentração final de 500 µg/mL. Em **A** é representado os desvios dos espectros de emissão de fluorescência de triptofano da apo-bLf em presença de hidrócloro de guanidina. Em **B** é representado os desvios dos espectros de emissão da fluorescência de triptofano da holo-bLf em presença de hidrócloro de guanidina. O comprimento de onda de excitação do triptofano foi de 280 nm e o comprimento de onda de varredura 300 a 420 nm. Esses espectros são referentes a uma das triplicatas.

Em vista disso, o perfil de desnaturação da bLf induzido por guanidina se mostrou muito semelhante à desnaturação induzida por ureia (**Figura 20**). Estes resultados já eram esperados uma vez que ambos agentes atuam de maneira muito similar nas proteínas. A concentração de guanidina necessária para levar a apo e holo-bLf a 50% ( $G_{1/2}$ ) de desnaturação é de 2,75 M e 4 M, respectivamente.

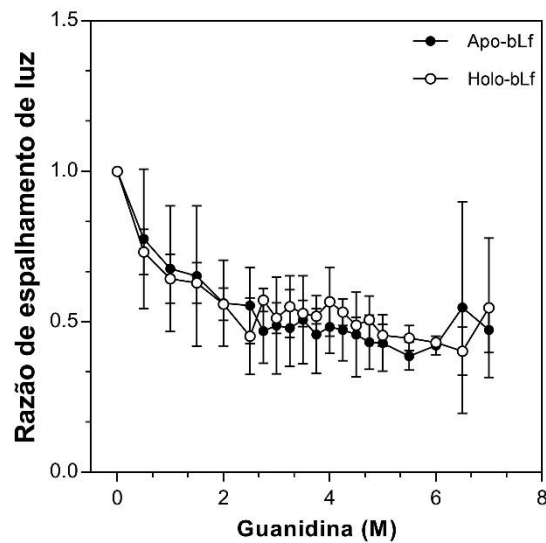


**Figura 20: Grau de desnaturação da apo e holo-bLf em presença de hidrocloreto de guanidina**

A fim de verificar o quanto a ligação do íon ferro influencia a estabilidade estrutural da lactoferrina, submetemos esta proteína a concentrações crescentes de hidrocloreto de guanidina (0,5 a 7,0M). A lactoferrina foi diluída em tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM, pH 7,5, para uma concentração final de 500 µg/mL.

Outra abordagem pode ser utilizada para verificar a desnaturação de complexos macromoleculares ou mesmo a agregação. Esta técnica, denominada espalhamento de luz estático, é utilizada para detectar o tamanho das partículas em solução, agregados, ácidos nucleicos, complexos e ligação de ligantes (LORBER *et al.*, 2012). Os agregados proteicos podem ter origem a partir de estresse físico ou químico, como a variação de pH, de temperatura, oxidação, agitação, entre outros. A agregação em proteínas ocorre quando há exposição de regiões hidrofóbicas e reativas ao solvente. Inicialmente esses agregados podem ser pequenos e posteriormente podem se tornar partículas grandes e insolúveis (YU *et al.*, 2013).

Sendo assim, utilizamos esta técnica para avaliar se estaria ocorrendo a formação de agregados quando a bLf era submetida a altas concentrações de hidrocloreto de guanidina (**Figura 21**). Os resultados mostraram que não houve agregação, uma vez que não houve um aumento na quantidade de luz espalhada pela proteína.



**Figura 21: Medida de espalhamento de luz para apo e holo-bLf e presença de hidrocloreto de guanidina**

Para verificar se estava ocorrendo agregação da lactoferrina bovina ao ser induzida a desnaturação por guanidina, foi utilizado o espalhamento de luz. A amostra foi excitada a 320 nm e a emissão foi medida de 315 a 325 nm. Esse experimento apresenta o desvio padrão de três experimentos diferentes. A razão do espalhamento foi calculada dividindo-se todos os valores pelo inicial.

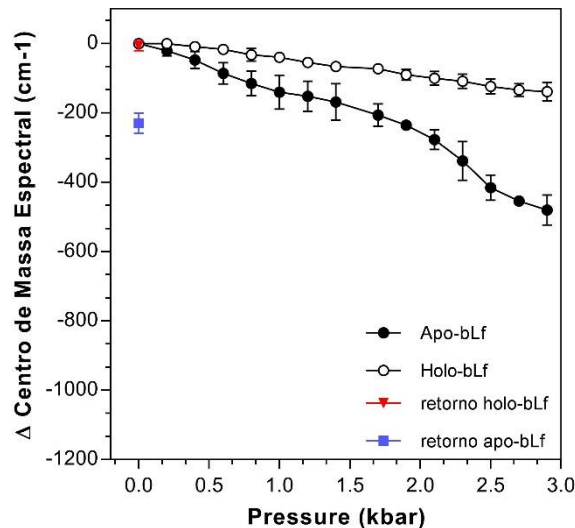
#### 4.1.3. Efeito da alta pressão hidrostática na estrutura da lactoferrina bovina

A alta pressão hidrostática é uma técnica ainda pouco difundida para corroborar estudos de enovelamento proteico. Por outro lado, ela vem sendo cada vez mais utilizada para conservação e higiene de alimentos (MUNIZAGA *et al.*, 2014) como uma alternativa para substituir o tratamento térmico (FRANCO *et al.*, 2013). A utilização da HHP possui a vantagem de ser uma técnica mais sutil para a desnaturação de proteínas uma vez que não interfere quimicamente na amostra. Ela atua nas ligações não covalentes de proteínas como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas (MUNIZAGA *et al.*, 2014).

Tendo isto em vista é importante entender como a HHP atua na estrutura da lactoferrina bovina com o objetivo de fornecer mais dados que permitam entender o papel do ferro na estabilidade desta molécula.

Assim como visto para os experimentos de ureia e cloreto de guanidina, a HHP parece ser mais efetiva em causar perturbações na estrutura da apo-bLf do que na holo-bLf, uma vez que a diminuição nos valores de centro de massa para

holo-bLf não foram significativos (**Figura 22**). Interessante perceber que a apo-bLf, quando colocada novamente à pressão atmosférica, não retornou totalmente a forma nativa.

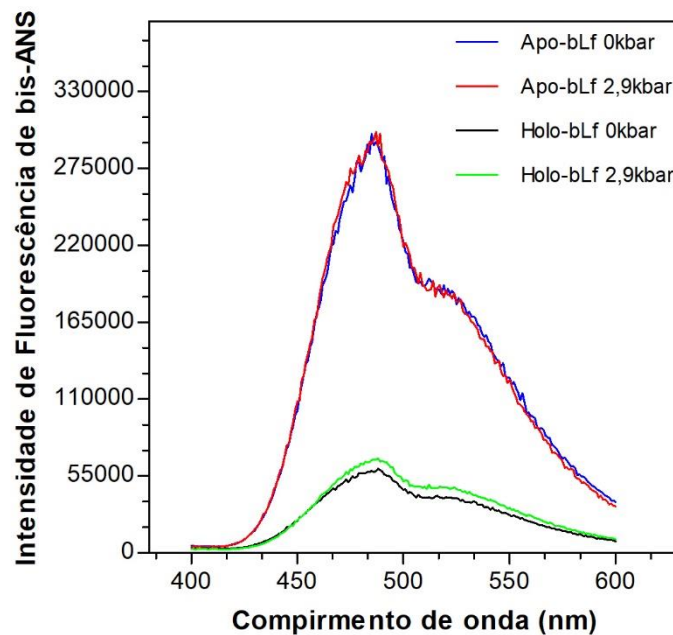


**Figura 22: Efeito da APH na apo e holo-bLf**

A alta pressão hidrostática foi utilizada para causar perturbações na estrutura da lactoferrina e estabilidade estrutural da lactoferrina bovina nas formas apo e holo-bLf foi comparada. A lactoferrina foi diluída em tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM, pH 7,5, para uma concentração final de 500 µg/mL. A lactoferrina foi submetida à pressão de 0.2 em 0,2 kbar até 2,9 kbar com um tempo de incubação de 10 min em cada pressão. As medidas de retorno foram feitas após dez minutos a pressão atmosférica. O comprimento de onda de excitação do triptofano foi de 280 nm e o comprimento de onda de varredura 300 a 420 nm. A análise estatística utilizada foi o desvio padrão da média de três experimentos diferentes.

Um estudo conduzido por Franco e colaboradores (2013) mostrou que a holo-bLf é mais resistente à alta pressão do que as outras formas da lactoferrina (como a apo-bLf e nativa). Este resultado corrobora o que foi visto nesta dissertação.

Além do monitoramento através da fluorescência do triptofano, foi utilizada a sonda extrínseca bis-ANS para avaliar o efeito da HHP na bLf. Pode ser observado, uma vez que a HHP não causa a completa desnaturação da lactoferrina bovina, que não houve alterações no perfil de interação da sonda (**Figura 23**). Contudo, foi possível reafirmar que a apo-bLf tem mais sítios de ligação a bis-ANS do que a holo-bLf, mostrando que a ligação ao ferro altera a estrutura terciária da lactoferrina.



**Figura 23: Efeito da HHP na apo e holo-bLf monitorada por bis-ANS**

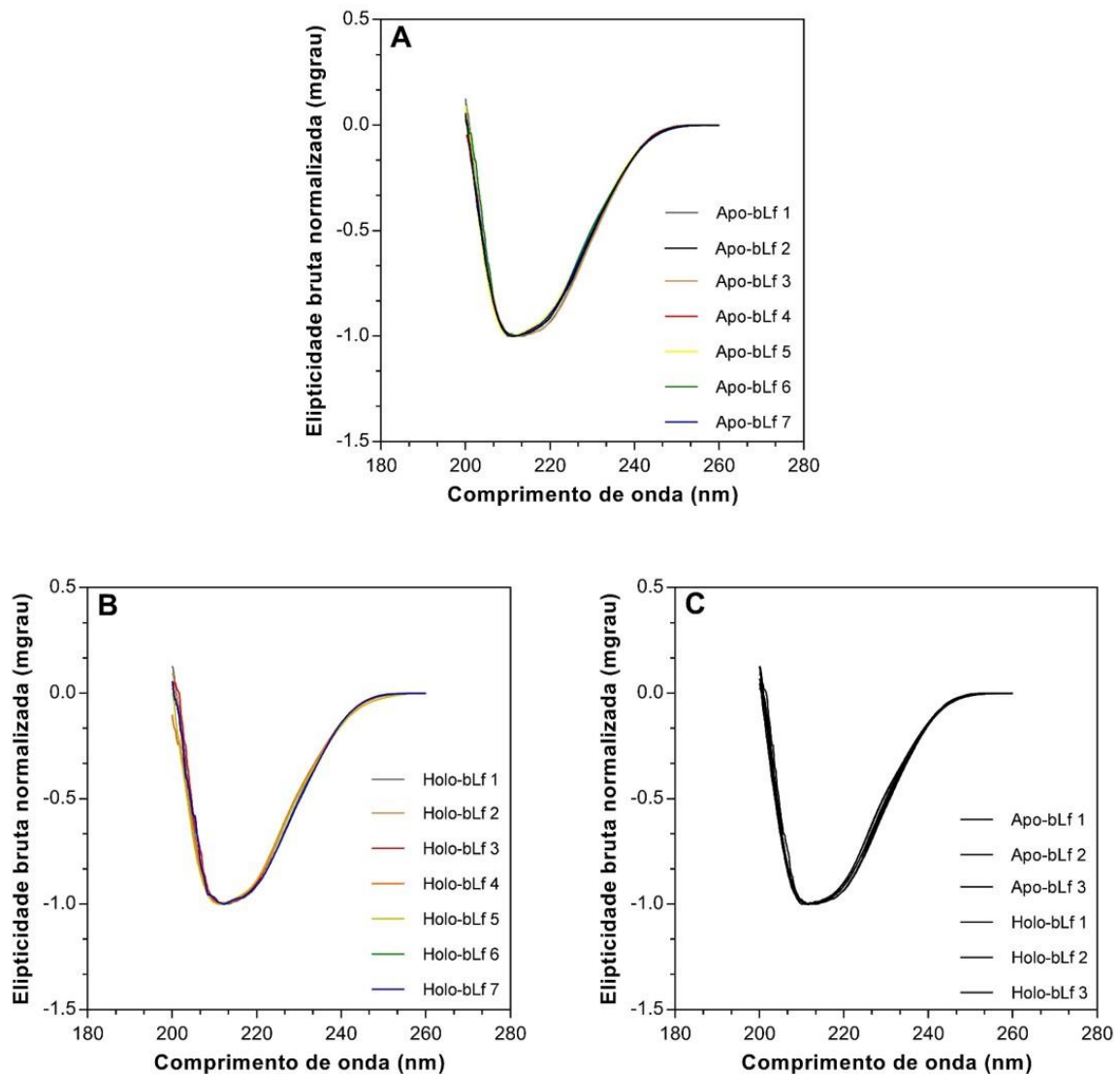
A alta pressão hidrostática foi utilizada para causar perturbações na estrutura da lactoferrina e com isso avaliar a estabilidade estrutural da lactoferrina bovina nas formas apo e holo-bLf. A lactoferrina foi diluída em tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM, pH 7,5, para uma concentração final de 500 µg/mL. A lactoferrina foi submetida à pressão de 0,2 em 0,2 kbar até 2,9 kbar com um tempo de incubação de 10min em cada pressão. As medidas de retorno foram feitas após dez minutos a pressão atmosférica. O comprimento de onda de excitação do bis-ANS foi de 360 nm e o comprimento de onda de varredura 400 a 600 nm. Esses espectros são referentes a uma das triplicatas.

#### 4.1.4. Comparação da estrutura secundária de apo e holo por dicroísmo circular

O dicroísmo circular é uma técnica para análise de estrutura secundária de proteínas (MATSUO; GEKKO, 2013). Esta técnica resulta da interação de uma molécula quiral ou um cromóforo com a luz circularmente polarizada pra esquerda e para direita. A diferença de absorção desta amostra por essa luz polarizada a transforma em uma luz elipticamente polarizada, e pode ser medida em comprimentos de onda em um espectro de CD (VERDINO; KELLER, 2004).

A lactoferrina bovina nas formas apo e holo foram analisadas no CD para avaliar possíveis mudanças em sua estrutura secundária. Os espectros de CD de apo e holo-bLf foram normalizados para uma melhor visualização das possíveis mudanças na estrutura (**Figura 24A e B**). O fato dos espectros serem sobreponíveis

indicam que não existem diferenças nos percentuais dos conteúdos das estruturas secundárias das formas apo e holo-bLf (**Figura 24C**).



**Figura 24: Análise de estrutura secundária da bLf por dicroísmo circular**

Para avaliar a estrutura secundária da apo e holo-bLf, foi utilizado a técnica dicroísmo circular. Em **A** estão representados sete espectros de apo-bLf, em **B** de holo-bLf e em **C** são plotados apo e holo-bLf. A lactoferrina foi diluída em tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM, pH 7.5, para uma concentração final de 500  $\mu\text{g/mL}$ . A cubeta de quartzo utilizada foi de 0.2 cm de caminho óptico. O comprimento de onda de varredura foi de 260 a 190 nm. Os dados foram normalizados.

Esses dados corroboram com Bokkhim e colaboradores (2013), onde o autor mostrou que entre os comprimentos de onda de 200 a 250 nm as características espectroscópicas como a magnitude e picos são idênticas para apo e holo-bLf. O autor também verificou mudanças na estrutura terciária no UV-próximo, onde os



aminoácidos aromáticos absorvem a luz circularmente polarizada. Nos comprimentos de onda entre 260 - 340 nm há um pico mais positivo para a holo-bLf, em torno de 290 nm. A partir dessas observações o autor sugere que a ligação de ferro afeta principalmente a estrutura terciária da lactoferrina bovina.

O estudo realizado por Brown e Parry (1974) também mostrou que nos espectros de CD os comprimentos de onda abaixo de 240 nm não há diferenças entre apo e holo-bLf. Embora sejam notadas pequenas diferenças nos espectros de holo-bLf próximos a 254, 275, 291 e 295 nm e bandas adicionais apareçam em torno de 310 e 455 nm, mostrando diferenças em termo de estrutura terciária para essas duas formas de lactoferrina.

Outra proteína do leite, a  $\alpha$ -lactoalbumina bovina, possui habilidade de se ligar a íons metálicos positivos, tendo uma maior afinidade pelo íon cálcio. Atri e colaboradores (2010) mostraram que há pequenas diferenças nos espectros de estrutura secundária do CD entre a  $\alpha$ -lactoalbumina saturada e não saturada pelo íon cálcio. Porém, ao avaliar a estrutura terciária, estudos de fluorescência mostraram que há uma mudança mais pronunciada.

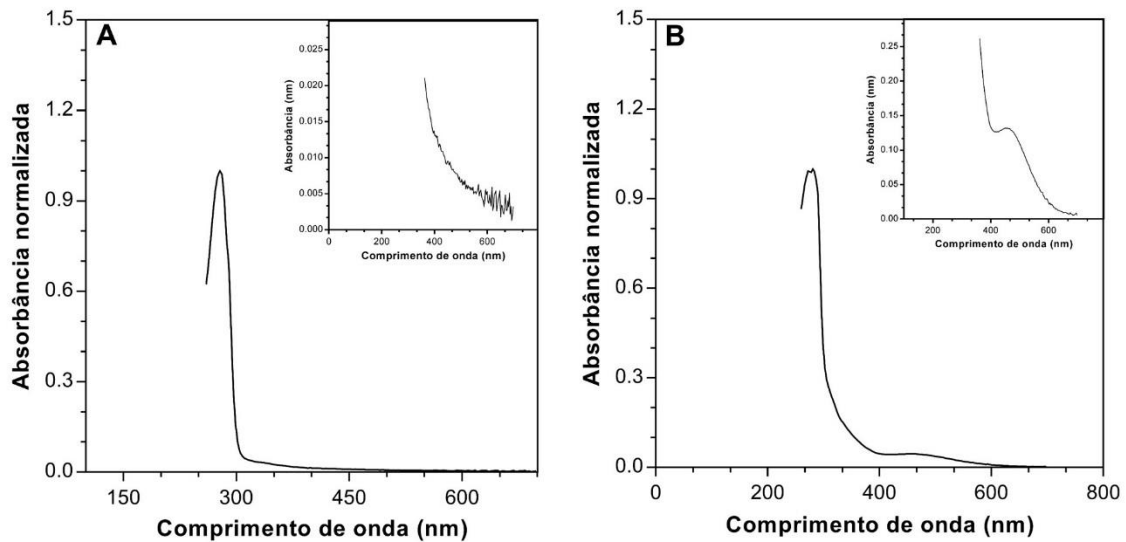
Embora nesta dissertação não tenha sido avaliada a estrutura terciária da lactoferrina por CD, e sim por espectroscopia de fluorescência, chegou-se a mesma conclusão destes autores.

#### 4.1.5. Liberação e ligação de ferro pela lactoferrina bovina

Como dito anteriormente, a lactoferrina possui a habilidade de reter o ferro em pH ácidos e de se ligar ao íon ferro mais fortemente do que as transferrinas. As análises espectrofotométricas são amplamente utilizadas para calcular o conteúdo de ferro em uma amostra. A quantificação do ferro é realizada utilizando-se um coeficiente de absorção medido a 465 nm (MAJKA *et al.*, 2013).

A fim de verificar a presença de ferro na estrutura da lactoferrina, foram medidos espectros de absorbância de apo e holo-Lf de 200 a 700 nm (**Figura 25**). O

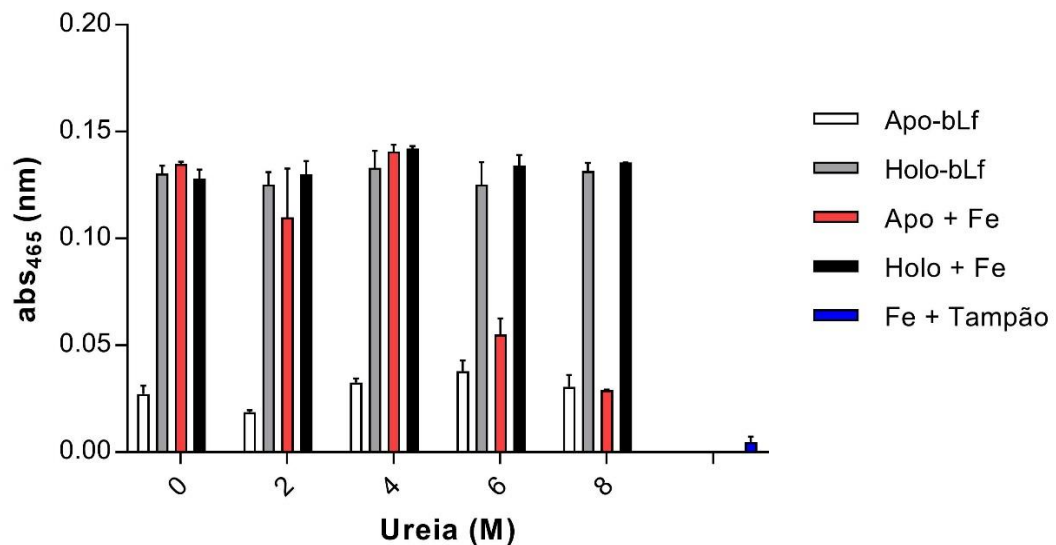
espectro de holo-bLf (**Figura 25 e B**) mostrou um pequeno pico de absorção de ferro próximo a 465 nm, o que não observado para a forma apo-bLf.



**Figura 25: Absorbância a 465 nm da apo e holo-bLf**

Para verificar se a apo e holo-bLf possuem um pico de absorção de ferro, foram feitos espectros de absorção da lactoferrina de 200 - 700 nm a temperatura ambiente com tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM pH 7,5. Em **A** está representado o espectro de apo-bLf com um inserto de 400 a 700 nm e em **B** o espectro de holo-bLf. Os espectros de apo e holo foram normalizados enquanto os insertos mostram a absorbância sem normalização.

Outra informação importante foi verificar o quão estável era a ligação de ferro na holo-bLf durante o processo de desnaturação. Sendo assim, foram adicionadas concentrações crescentes de ureia e a absorbância de ferro foi medida a 465 nm (**Figura 26**).



**Figura 26: Quantidade de ferro na lactoferrina em presença de ureia**

A quantificação do ferro na estrutura da apo e holo-bLf foi feita para avaliar a liberação deste íon em presença de ureia com medidas de absorbância a 465 nm. O branco foi obtido da soma da absorbância do tampão Tris 25 mM NaCl 150 mM e pH 7,5 com a absorbância da ureia a 8 M. Para obter um sinal considerável de ferro, a concentração utilizada de apo e holo para esses experimentos foi de 3,5 mg/mL. A solução FENTA adicionada às amostras estava a uma concentração de 50  $\mu$ M. Esses experimentos foram realizados três vezes com preparações diferentes de lactoferrina. O desvio padrão da média foi aplicado a esses dados.

Esses resultados mostraram que a partir de 6 M de ureia, a apo-bLf perdeu a capacidade de se ligar a ferro, enquanto para a holo-bLf, além do íon ferro não ter sido liberado de sua estrutura, ao ser adicionado mais ferro, não houve um aumento de sua ligação.

Para verificar se essas diferenças da ligação de ferro entre a apo-bLf controle (0 M) e as apo-bLf em presença das concentrações de ureia utilizadas (2, 4, 6 e 8 M) eram significativas, foi aplicado pós-teste estatístico de *Dunnnett* (Tabela 3).

**Tabela 3 - Pós-teste estatístico de Dunnett para apo-bLf.**

<b>Teste de comparativo de Dunnett.</b>	<b>Significativo? (p &lt; 0,05)</b>	<b>Resumo</b>	<b>95% de diferença</b>
0 M vs 2 M	Não	N.S.	-0,0007694 - 0,05070
0 M vs 4 M	Não	N.S.	-0,03164 - 0,01984
0 M vs 6 M	Sim	***	0,05400 - 0,1055
0 M vs 8 M	Sim	***	0,07996 - 0,1314

O teste estatístico de Dunnett foi utilizado para comparar os diversos tratamentos entre apo controle e apo em presença de ureia. A sigla N.S. significa "não significativo". É considerado significativo valor de  $p < 0,05$ . O software utilizado para obter esses dados foi o GraphPad Prism 5.03.

O resultado do teste estatístico revelou que as diferenças entre a apo-bLf controle e apo-bLf em presença de ureia acima de 6 M são significativas, ou seja, a adição de FeNTA a essa concentração não causa a ligação do ferro à estrutura da apo-bLf. Este mesmo teste estatístico foi utilizado para comparar a holo-bLf controle com a holo-bLf em crescentes concentrações de ureia em presença de FeNTA. Os resultados mostraram que não há diferenças significativas entre esses dados.

Franco e colaboradores (2013) mostraram que, a apo-bLf submetida a 400 MPa mantinha sua capacidade de se ligar a ferro, enquanto com 500 e 600 MPa esse fenômeno ocorreu de forma bem menos significativa. A lactoferrina bovina também passou por tratamento térmico a 72 °C por 15 segundos e a 85 °C por 2 minutos. Verificou-se que a ligação do íon ferro na estrutura da apo-bLf também foi prejudicada por estes tratamentos.

Em outro trabalho estes mesmos autores mediram a ligação de ferro na lactoferrina humana recombinante de arroz transgênico (rhLF) (2012). Os mesmos tratamentos e mesmas condições com alta pressão hidrostática e temperatura foram utilizados. O resultado obtido mostrou que a apo-rhLF em 400 MPa e a 72 °C ainda foi capaz de se ligar a ferro diferentemente dos outros tratamentos aplicados.

A ligação de ferro na lactoferrina humana (hLf) sob diferentes tratamentos foi avaliada em um trabalho de Mata e colaboradores (1998). A apo-hLf foi centrifugada após o tratamento térmico (72 ou 135 °C durante 60 segundos ou 85 °C por 20

minutos) para retirar as proteínas desnaturadas. Os agregados formados a partir do aquecimento da apo-hLf sob o tratamento de 72 °C ou 135 °C durante 60 segundos ainda possuíam a habilidade de se ligar ao íon ferro diferentemente do que foi visto pelo tratamento térmico a 85°C.

Os resultados de ligação de ferro desta dissertação mostraram que em concentrações acima de 4 M de ureia, o sítio de ligação do íon ferro na estrutura da apo-bLf se encontra provavelmente desestruturado. Isto explica a não ligação de ferro nesta estrutura. Por outro lado, a holo-bLf mesmo em altas concentrações de ureia, não há a liberação deste íon, o que mostra a alta afinidade deste íon pela molécula.

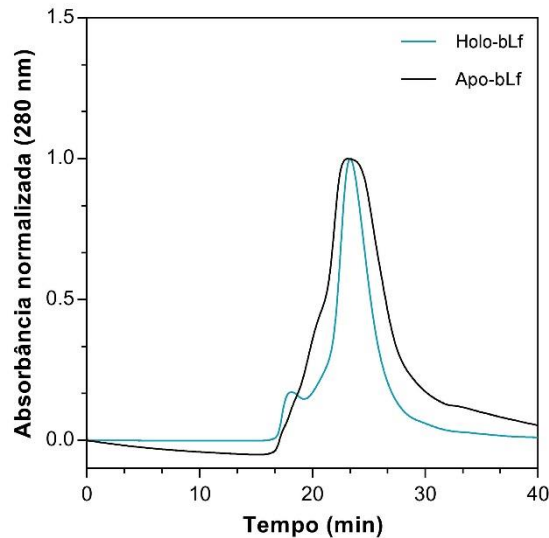
#### 4.1.6. Calorimetria diferencial de varredura da apo-bLf e apo-bLf pressurizada

A calorimetria é a parte da Termodinâmica que mede a quantidade de calor transferida entre um sistema e seus arredores. A calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi um dos primeiros métodos de calorimetria desenvolvidos. Muitos artigos descrevem o uso do DSC para estudar proteínas intrinsecamente desenoveladas, ácidos nucleicos e lipídeos (JOHNSON, 2013). Atualmente o DSC é utilizado para medir e caracterizar os parâmetros termodinâmicos de macromoléculas biológicas (PAGANO *et al.*, 2013). Este método termoanalítico mede a diferença do fluxo de calor ou a diferença de temperatura entre a amostra observada e a referência inerte conforme é aumentado e/ou diminuída a temperatura (LIU *et al.*, 2011).

Primeiramente, antes de analisar as amostras no calorímetro, foi necessário o uso da HPLC para substituir o tampão para os experimentos e comparar o tempo de retenção da apo e holo-bLf (**Figura 27**). As medidas de absorvância de apo e holo-bLf foram normalizadas a fim de auxiliar a visualização dos picos. Foi observado que o tempo de retenção de apo e holo-bLf é o mesmo, indicando que não há variação no tamanho das amostras.

Majka e colaboradores (2013) utilizaram uma coluna de troca iônica para separar lactoferrina humana nas formas apo e holo. Eles observaram que não houve

mudanças na eluição de apo e holo e que essas duas formas de lactoferrina se ligaram igualmente aos ligantes aniônicos presentes na coluna.



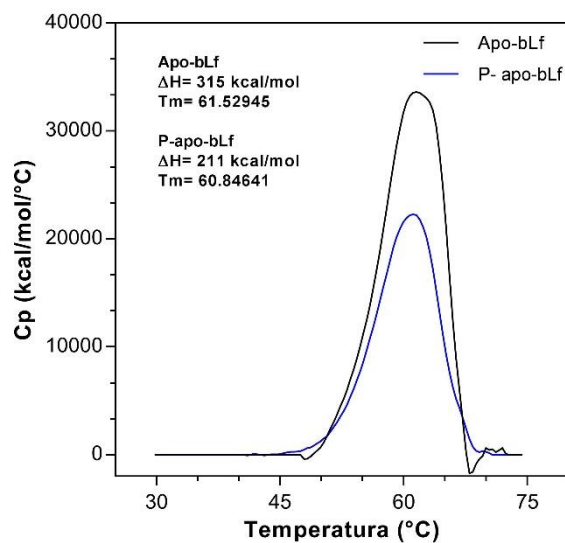
**Figura 27: Análises do tempo de retenção da apo e holo-bLf no HPLC**

A lactoferrina bovina nas formas apo e holo-bLf foram colocadas no HPLC para verificar se essas amostras possuíam o mesmo tempo de retenção. O tampão utilizado para equilibrar a coluna (Superdex 75) e para as amostras de lactoferrina foi o Tris 25 mM NaCl 150 mM pH 7,5. A apo-bLf foi colocada na coluna com uma concentração de 50 mg/mL e a holo-bLf com 9 mg/mL. Os espectros de absorbância de apo e holo-bLf foram normalizados.

A variação de entalpia ( $\Delta H$ ) é igual ao calor trocado durante o processo que foi efetuado a uma pressão constante, com isso, as medidas de  $\Delta H$  estão associadas a uma transição de fase. A variação da entalpia de transição é dada pela área do pico. A temperatura de transição ( $T_m$ ) é a temperatura na qual metade das proteínas se encontram no estado enovelado e a outra metade está desnaturada. Com essas medidas, pode-se avaliar a estabilidade térmica das proteínas uma vez que estão intrinsecamente relacionadas.

Neste trabalho, os experimentos de DSC foram feitos apenas com as amostras da apo-bLf que, após ser submetida ao HPLC, foi dosada e pressurizada a 2,9 kbar. Não foi possível realizar este experimento com a holo-bLf visto que não havia tempo suficiente. As amostras de apo e P- apo-bLf foram analisadas no calorímetro a fim de verificar a estabilidade térmica dessas duas amostras (**Figura 28**). Os valores de  $T_m$  e  $\Delta H$  obtidos para a apo-bLf foram maiores do que os obtidos

para a apo-bLf pressurizada. Ao pressurizar a apo-bLf, pelos experimentos de espectroscopia de fluorescência, observou-se que o retorno à estrutura terciária nativa era parcial. Portanto, o experimento de calorimetria mostrou que a apo-bLf ao ser pressurizada se encontrava menos estável do que a apo-bLf em sua forma nativa.



**Figura 28: Termogramas de DSC de apo-bLf e P- apo-bLf**

A apo e P- apo-bLf foram colocadas no microcalorímetro a fim de verificar diferenças de estabilidade entre essas proteínas. A P- apo-bLf e apo-bLf estavam a uma concentração de 15  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . Os valores de  $C_p$  foram obtidos através da subtração da linha de base.

O calor específico de uma amostra é a quantidade de calor necessária para aumentar 1 °C a temperatura de 1g desta substância. Os valores de calor específico à pressão constante ( $C_p$ ) também são diferentes para apo-bLf e P- apo-bLf. Precisa-se de muito mais energia para aumentar a temperatura da apo nativa do que para a apo pressurizada.

Na maioria dos estudos sobre os efeitos do tratamento a alta pressão hidrostática abaixo de 300 MPa mostram que a essa pressão as mudanças conformacionais podem ser reversíveis, enquanto a pressão acima de 700 MPa leva à total desnaturação da proteína (FRANCO et al., 2013). Neste trabalho, foi utilizada alta pressão hidrostática na lactoferrina bovina nas formas apo, holo e nativa a 400,

500 e 600 MPa, ou seja, pressão acima do que utilizamos neste trabalho (até 2,9 kbar ou 290 MPa). Ao medir os parâmetros térmicos de desnaturação por DSC, o autor obteve que o  $T_m$  de desnaturação da apo-bLf foi de 60,80 °C, diferente dos 61,52 °C que foi obtido nesta dissertação para apo-bLf. Para apo-bLf acima de 500 Mpa, o autor obteve duas faixas de transição, com valores próximos a 61 °C e a 70 °C. Isso não foi verificado para a amostra pressurizada nesta dissertação pois, antes do término da leitura até 75 °C ocorreu agregação da amostra.

#### 4.2. Cinética de internalização da apo e holo-bLf em células Vero

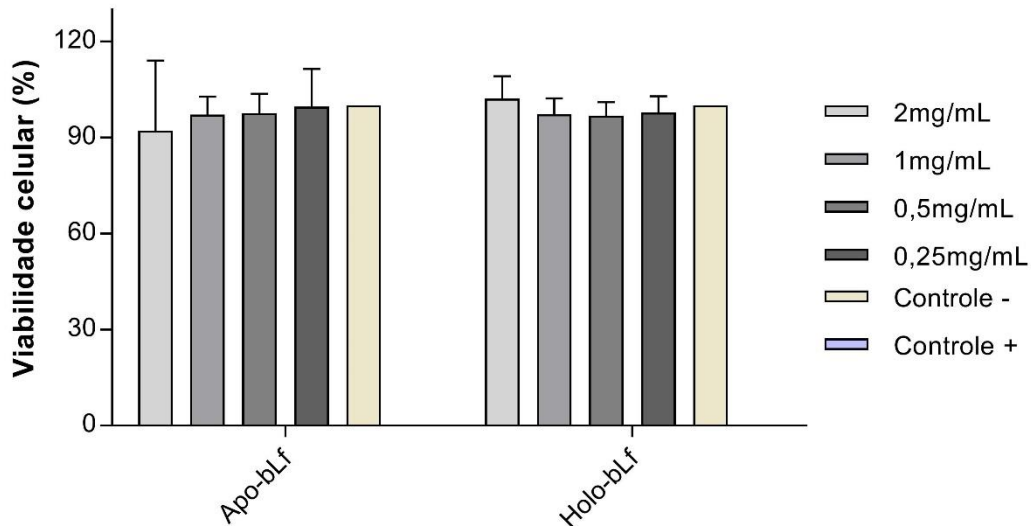
Uma vez que foram identificadas diferenças na estabilidade estrutural e também na conformação das formas apo e holo-bLf, onde a última mostrou-se mais estável, decidimos avaliar a interação entre a lactoferrina bovina nas formas apo e holo em células Vero.

A célula Vero é uma das linhagens mais comumente utilizadas em pesquisa de microbiologia, biologia celular e molecular (AMMERMAN *et al.*, 2008). Essa linhagem celular foi obtida a partir do tecido epitelial de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Essas células são utilizadas para a produção de vacinas antivirais, detecção de toxinas, produção de anticorpos monoclonais, citotoxicidade de biomaterias, entre outros (BARBOSA *et al.*, 2015). Devido a sua tolerância e imunogenicidade a diferentes tipos de vírus, as células Vero são utilizadas para a produção de vacina e estudos com diferentes tipos de patógenos como o vírus influenza H5N1 e diversos arbovírus.

Inicialmente, houve a necessidade de verificar possíveis efeitos citotóxicos da lactoferrina bovina em células Vero. Para tanto, foram realizados testes colorimétricos de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]). As células Vero foram incubadas com lactoferrina bovina nas formas apo e holo em diferentes concentrações (0,25, 0,5, 1 e 2 mg/mL) durante 24 horas a 37 °C (**Figura 29**). A partir destes resultados foi possível verificar que até a concentração de 2 mg/mL a lactoferrina não era tóxica para as células. Desta forma, foi decidido utilizar



a concentração de 1 mg/mL de lactoferrina para os experimentos de microscopia de fluorescência confocal.



**Figura 29: Ensaio de viabilidade celular por MTT**

Para verificar o efeito citotóxico da lactoferrina bovina (apo e holo) em células Vero, foram utilizadas diferentes concentrações desta proteína. O controle negativo representa as células não tratadas com lactoferrina e o controle positivo as células tratadas com Triton X-100 a 0,1%. Esse experimento foi realizado três vezes e a análise foi feita por desvio padrão da média.

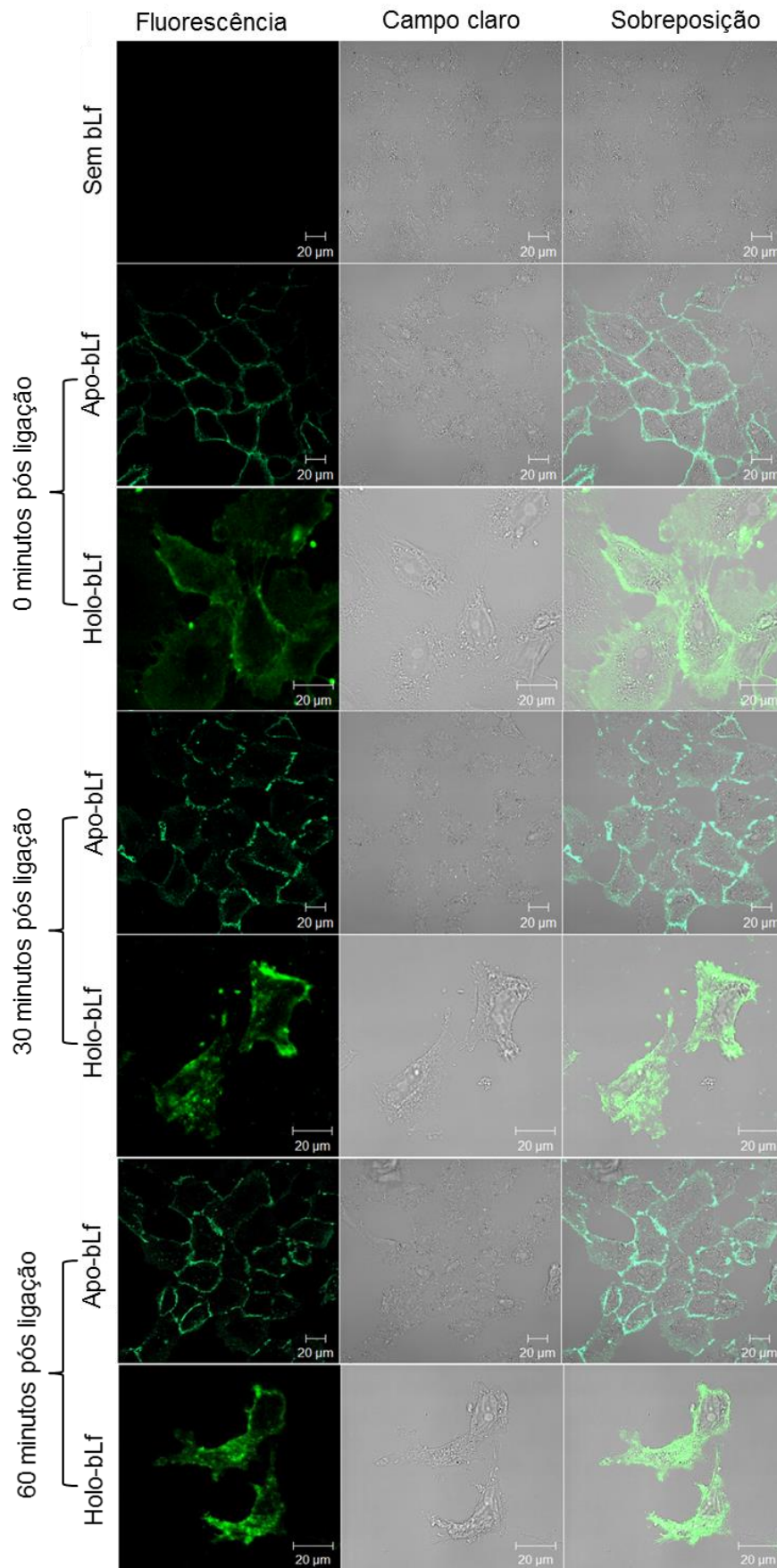
Após esta etapa, foram realizados experimentos de microscopia de fluorescência confocal para verificar se havia interação e/ou internalização da apo e holo-bLf em células Vero. A apo e holo-bLf foram marcadas com FITC e as imagens foram adquiridas em diferentes tempos (0, 30 e 60 minutos) (**Figura 30**).

Pode-se perceber claramente que no tempo 0 minutos, onde a lactoferrina é mantida com a célula sob baixa temperatura, não há internalização. No entanto é importante notar que a fluorescência está concentrada principalmente próxima a membrana celular. Após a mudança de temperatura para 37 °C, o processo de internalização pode ter início. Desta forma, as imagens mostram uma internalização da apo e holo-bLf a partir de 30 minutos de incubação. Apesar de ambas as formas serem internalizadas, a holo-bLf parece cumprir esta etapa de maneira mais rápida,

uma vez que se encontra acumulada em maior quantidade em regiões perinucleares.

Estes resultados deixam claro que a holo-bLf possui uma cinética de internalização mais rápida do que a apo-bLf. Isto pode ser consequência da ligação do íon ferro ou mesmo das diferenças estruturais causadas pela ligação deste metal na forma holo.

Apesar desses resultados mostrarem diferenças na cinética de internalização entre apo e holo-bLf, algumas questões precisam ser melhor endereçadas para que mostrem mais claramente as consequências da estabilidade estrutural da lactoferrina bovina para a sua interação com a célula.



**Figura 30 -  
Microscopia  
Confocal de  
Fluorescência por  
Escaneamento com  
Laser das células  
Vero incubadas  
com apo e holo-bLf  
- FITC.**

Rastreamento das moléculas de lactoferrina bovina conjugadas a FITC após sua administração a células Vero. Imagens registradas após 60 minutos. Realizou-se a marcação de moléculas de bLf com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Após conjugar moléculas de FITC à lactoferrina bovina, administrou-se solução contendo o conjugado com potencial de fluorescência à cultura de células Vero e, depois da preparação da placa contendo as células fixadas após diferentes intervalos de tempo, analisou-se a cinética da entrada e distribuição da lactoferrina no interior das células. A ligação da bLf à superfície da célula foi sincronizada com o abaixamento da temperatura até 4°C. A técnica utilizada foi a microscopia confocal de fluorescência com escaneamento a laser, utilizando, para tanto, laser composto por íons de argônio e analisando camadas menores de 1 micrômetro de espessura.

Os estudos envolvendo a lactoferrina e células Vero são comumente direcionados à atividade antiviral contra vírus como o da Herpes, Zika, Chikungunya, BK, Hantavírus, entre outros (MARCHETTI *et al.*, 1996, 1999; MURPHY, *et al.*, 2000, 2001; LONGHI *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2014, 2017).

Os efeitos antivirais demonstrados pela lactoferrina humana e bovina contra vírus envelopados e não envelopados são estudados desde a década de 1990. Além disso, diversos estudos mostram que a bLf possui um maior efeito antiviral do que a hLf. Contudo, esses estudos mostram que não há diferenças no efeito antiviral da lactoferrina quando ligada ou não ao íon ferro, uma vez que ambas as formas da lactoferrina agem nas fases iniciais da infecção impedindo a interação do vírus com a célula (BERLUTTI *et al.*, 2011). Este dado é corroborado por alguns estudos que mostram que a ligação da lactoferrina ao heparan sulfato presente na superfície celular é essencial para a sua atividade antiviral (JENSSEN *et al.*, 2008, CARVALHO *et al.*, 2014).

A interação da lactoferrina com as células pode ocorrer por meio da carga positiva presente na região N-terminal da lactoferrina com a carga negativa da heparina e glicosaminoglicanos (ANDERSEN *et al.*, 2004, CARVALHO *et al.*, 2014). Além disso, a lactoferrina também pode se ligar a receptores lipoproteicos de baixa densidade e a proteína relacionada ao receptor de lipoproteínas de baixa densidade (CHIEN *et al.*, 2008).

Segundo Marchetti e colaboradores (1996), a apo e holo lactoferrina humana possuem atividade antiviral similar contra o vírus da herpes em células Vero. Outro estudo realizado por Jenssen e colaboradores (2008) mostrou que a apo e holo-Lf possuem a mesma afinidade por heparan sulfato. Muito embora essa afinidade seja igual para as duas formas da lactoferrina, a localização celular de apo e holo-bLf é diferente, onde foi observado mais holo-Lf na superfície celular do que apo-Lf (JENSSEN *et al.*, 2008). Dessa forma concluiu-se que a localização da apo e holo-Lf em células Vero não é tão importante para a habilidade de exercer a sua função antiviral.

As rotas de internalização da lactoferrina nas formas apo e holo precisam ser mais bem entendidas, uma vez que podem ajudar no estudo da lactoferrina como um biofármaco.

## 5 CONCLUSÃO

- Foi verificado que a holo-bLf é estruturalmente mais estável que a apo-bLf a partir da ação de todos os agentes desnaturantes químicos e físicos utilizados neste trabalho. Fica claro o papel da ligação de íons ferro à lactoferrina para esta conclusão;
- A ligação do íon ferro induz mudanças na estrutura terciária, mas não na estrutura secundária, como foi avaliado pelo perfil do espectro de dicroísmo circular;
- A influência da ureia na ligação de ferro, na apo-bLf, e a liberação de ferro, na holo-bLf foi analisada por espectrofotometria. Foi observado que a partir de 4 M de ureia, a apo-bLf perdeu a capacidade de ligação ao íon ferro, o que evidencia uma possível desestruturação do sítio de ligação para este íon. Por outro lado, mesmo altas concentrações de ureia não foram capazes de deslocar a ligação do íon ferro previamente ligado à holo-bLf. Este fato reforça o papel estabilizante do ferro na estrutura da lactoferrina;
- A calorimetria de varredura diferencial foi utilizada para verificar a diferença de estabilidade entre a apo-bLf pressurizada e não pressurizada. Verificou-se que a pressurização desestabiliza a lactoferrina na forma apo;
- Através da utilização da microscopia de fluorescência confocal foi possível verificar que, ambas as formas (apo e holo) da lactoferrina têm a capacidade de ligar-se e serem internalizadas em células Vero. No entanto, fica claro que a cinética de internalização da holo-bLf foi mais rápida quando comparada à internalização da apo-bLf. Isto mostra mais uma vez a influência do íon ferro na estrutura e papel biológico da bLf;
- Como conclusão geral desta dissertação foi possível verificar o efeito estabilizante do ferro na estrutura tridimensional da lactoferrina. Estes efeitos foram mostrados através do uso de uma grande variedade de técnicas. Além disso, foram demonstrados os efeitos do ferro na funcionalidade da bLf através da interação desta proteína com as células Vero, monitoradas por microscopia de fluorescência confocal.

## 6 BIBLIOGRAFIA

ADLEROVA, L.; BARTOSKOVA, A.; FALDYNA, M. Lactoferrin: a review. **Veterinarni Medicina**, 53: 457–468, 2008.

AKIYAMA, Y.; OSHIMA, K.; KUHARA, T.; SHIN, K.; ABE, F.; IWATSUKI, K.; NADANO, D.; MATSUDA, T. A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells. **J. Biochem.**, 1-12, 2013.

ALMEIDA, C.C.; JÚNIOR, C.A.C.; SILVA, A.C.O.; ALVARES, T.S. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p.1840 – 1854, 2013.

AMMERMAN, N.C.; SEXTON, M.B.; AZAD, A.F. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. **Curr Protoc. Microbiol**, Appendix- 4E, 2008.

ANDERSEN, J.H.; JENSSEN, H.; SANDVIK, K.; TORE, J. GUTTEBERG. Anti-HSV Activity of Lactoferrin and Lactoferricin is Dependent on the Presence of Heparan Sulphate at the Cell Surface. **Journal of Medical Virology**, 74:262–271, 2004.

ANDERSON, B.F.; BAKER, H.M.; NORRIS, G.E.; RUMBALL, S.V.; BAKER, E.N. Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrins. **Nature**, 344(6268):784-7, 1990.

ATRI, M.S.; SABOURY, A.A.; YOUSEFI, R.; DALGALARRONDO, M.; CHOBERT, M.; HAERTLE, T.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A. Comparative study on heat stability of camel and bovine apo and holo  $\alpha$ -lactalbumin. **Journal of Dairy Research**, 77: 43–49, 2010.

BAKER H.M.; ANDERSON B.F.; BAKER E.N. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 100: 3579–3583, 2004.

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.; KIDD, R.D. Lactoferrin and transferrin: Functional variations on a common structural framework. **Biochem Cell Biol.**, 80(1):27-34, 2002.

BAKER, H. M. Molecular structure, binding properties and dynamics of Lactoferrin. **Cell Mol Life Sci.**, 62(22):2531-9, 2005.

BAKER, H.M.; BAKER, E.N. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. **BioMetals.**, 17: 209–216, 2004.

BARBOSA, B.S.; SANTOS, F.A.; PIMENTEL, M.M.L.; FERNANDES, D.P.; PREXEDES, E.A.; BEZERRA, M.B. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 9: 334-347, 2015.

BARRECA, D.; LAGANÀ, G.; FICARRA, S.; TELLONE, E.; U. LEUZZI, U.; GALTIERI, A.; BELLOCCO, E. Ornithine carbamoyltransferase unfolding states in the presence of urea and guanidine hydrochloride. **Appl Biochem Biotechnol.**, 172:854–866, 2014.

BERLUTTI, F.; PANTANELLA, F.; NATALIZI, T., FRIONI, A.; PAESANO, R.; POLIMENI, A.; VALENTI, P. Antiviral properties of lactoferrin - a natural immunity molecule. **Molecules**, 16: 6992-7018, 2011.

BIAN, L.; JI, X. Distribution, transition and thermodynamic stability of protein conformations in the denaturant-induced unfolding of proteins. **PLoS One.** 9(3): e91129, 2014.

BOKKHIM, H.; BANSAL, N.; GRØNDAHL, L.; BHANDARI, B. Physico-chemical properties of different forms of bovine lactoferrin. **Food Chemistry**, 141: 3007–3013, 2013.

BROWN, E.M.; PARRY, R.M.; Spectroscopic study of bovine lactoferrin. **Biochemistry**, 13(22): 4560–4565, 1974.



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.

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. **J Gen Virol**, 2017.

CARVALHO, F.A.O.; ALVES, F.R.; CARVALHO, J.W.P.; TABAKA, M. Guanidine hydrochloride and urea effects upon thermal stability of *Glossoscolex paulistus* hemoglobin (HbGp). **International Journal of Biological Macromolecules**, 74: 18–28, 2015.

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

DREYFUSS, J. L.; REGATIERI, C. V.; JARROUGE, T.R.; CAVALHEIRO, R.P.; SAMPAIO, L.O.; NADER, H.B. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 81(3): 409-429, 2009.

ENGLAND, J.L.; HARAN, G. Role of solvation effects in protein denaturation: from thermodynamics to single molecules and back. **Annu Rev Phys Chem.**, 62: 257–277, 2011.

FRANCO, I.; CASTILLO, E.; PÉREZ, M.D.; CALVO, M.; SÁNCHEZ, L. Effect of hydrostatic high pressure on the structure and antibacterial activity of recombinant human lactoferrin from transgenic rice. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 76 (1): 53-59, 2012.

FRANCO, I.; PÉREZ, M.D.; CASTILLO, E.; CALVO, M.; SÁNCHEZ, L. Effect of high pressure on the structure and antibacterial activity of bovine lactoferrin treated in different media. **Journal of Dairy Research**, 80: 283–290, 2013.

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

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

HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.A.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev. Nutr.** vol.19 no.4, 2005.

HAWE, A.; RISPENS, T.; HERRON, J.N.; JISKOOT, W. Probing bis-ANS binding sites of different affinity on aggregated IgG by steady-state fluorescence, time-resolved fluorescence and isothermal titration calorimetry. **J Pharm Sci**, 100(4):1294-305, 2011.

HIROTANI, Y.; IKEDA, K.; KATO, R.; MYOTOKU, M.; UMEDA, T.; IJIRI, Y.; TANAKA, K. Protective effects of lactoferrin against intestinal mucosal damage induced by lipopolysaccharide in human intestinal caco-2 cells. **The Pharmaceutical Society of Japan**, 128: 1363-1368, 2008.

JANCSÓ, A.; SZUNYOGH, D.; LARSEN, F.H.; THULSTRUP, P.H.; CHRISTENSEN, N.J.; GYURCSIK, B.; HEMMINGSEN, L. Towards the role of metal ions in the structural variability of proteins: CdII speciation of a metal ion binding loop motif. **Metallomics**, 3: 1331-1339, 2011.

JENSSEN, H.; SANDVIKA, K.; ANDERSEN, J.H.; HANCOCK, R.E.W.; GUTTEBERGA, T.J. Inhibition of HSV cell-to-cell spread by lactoferrin and lactoferricin. **Antiviral Research**, 79:192–198, 2008.

JIANG, R.; LOPEZ, V.; KELLEHER, S. L.; LONNERDAL, B. Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells. **J. Cell. Physiol.**, 226: 3022–3031, 2011.

JINDAL, S.; NAEEM, A. Consequential secondary structure alterations and aggregation during prolonged casein glycation. **J. Fluoresc.**, 23:367–374, 2013.

JOHNSON, C.M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 531: 100–109, 2013.

KHAN, JA.; KUMAR, P.; PARAMASIVAM, M.; YADAV, R.S.; SAHANI, M.S.; SHARMA, S.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T.P. Camel lactoferrin, a transferrin-cum-lactoferrin: Crystal structure of camel lactoferrin at 2.6 Å resolution and structural basis of its dual role. **J. Mol. Biol.**, 309: 751–761, 2001-a.

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.

LIU, D.; ZHOU, P.; LIU, X.; LABUZA, T.P. Moisture-induced aggregation of alpha-lactalbumin: effects of temperature, cations, and pH. **J Food Sci.** 76(6):C817-23, 2011.

LONGHI, G.; PIETROPAOLO, V.; MISCHITELLI, M.; LONGHI, C.; CONTE, M.P.; MARCHETTI, M.; TINARI, A.; VALENTI, P.; DEGENER, A.M.; SEGANTI, L.; SUPERTI, F. Lactoferrin inhibits early steps of human BK polyomavirus infection. **Antiviral Res.**,72(2):145-52, 2006.

LÖNNERDAL, B.; IYER, S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. **Annu Rev Nutr.**,15:93–110,1995.

LONNERDAL, B.; JIANG, R.; DU, X. Bovine lactoferrin can be taken up by the human intestinal lactoferrin receptor and exert bioactivities. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, 53(6):606-14, 2011.

LORBER, B.; FISCHER, F.; BAILLY, M.; ROY, H.; KERN, D. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. **Biochemistry and Molecular Biology Education.** 40: 372–382, 2012.

MAJKA, G.; ŚPIEWAK, K.; KURPIEWSKA, K.; HECZKO, P.; STOCHEL, G.; STRUS, M.; BRINDELL, M. A high-throughput method for the quantification of iron saturation in lactoferrin preparations. **Anal Bioanal Chem.**, 405(15):5191-200, 2013.

MARCHETTI, M.; LONGHI, C.; CONTE, M.P.; PISANI, S.; VALENTI, P.; SEGANTI, L. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type 1 adsorption to Vero cells. **Antiviral Res.** (2-3):221-31, 1996

MARCHETTI, M.; SUPERTI, F.; AMMENDOLIA, M.G.; ROSSI, P.; VALENTI, P.; SEGANTI, L. Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron-, manganese- and zinc-saturated lactoferrin. **Med Microbiol Immunol.**,187(4):199-204, 1999.

MASON,P.E.; BRADY, J.W.; NEILSON, G.W.; DEMPSEYZ, C.E. The Interaction of Guanidinium Ions with a Model Peptide. **Biophysical Journal: Biophysical Letter**, 2007.

MATA, L.; SA´NCHEZ, L.; HEADON, D.R.; CALVO, M. J. Thermal denaturation of human lactoferrin and its effect on the ability to bind iron. **Agric. Food Chem.**, 46: 3964–3970, 1998.

MATSUO, K.; GEKKO, K. Circular-dichroism and synchrotron-radiation circular-dichroism spectroscopy as tools to monitor protein structure in a lipid environment. **Methods Mol Biol.**, 974:151-76, 2013.

MONTOYA, I.A.G.; CENDÓN, T.S.; GALLEGOS, S.A.; RASCÓN-CRUZ, Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1820: 226–236, 2012.

MOORE, S. A.; ANDERSON, B.F.; GROOM, C.R.; HARIDAS, M.; BAKER, E.N. Three dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, 274(2):222-36, 1997.

MUNIZAGA, T.; GORDON, T.A.; CARVAJAL, R. V.; OSORIO, L.M.; SALAZAR, F.N.; WON, M.P.; ACUÑA, S. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon blanc wine Gipsy. **Food Chemistry**, 155: 214–220, 2014.

MURPHY, M.E.; KARIWA, H.; MIZUTANI, T.; TANABE, H.; YOSHIMATSU, K.; ARIKAWA, J.; TAKASHIMA, I. Characterization of in vitro and in vivo antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. **J Vet Med Sci.**, 63(6):637-45, 2001.

MURPHY, M.E.; KARIWA, H.; MIZUTANI, T.; YOSHIMATSU, K.; ARIKAWA, J.; TAKASHIMA, I. In vitro antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. **Arch Virol.** 145(8):1571-82, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 5. ed. São Paulo: **Savier**, 2010.

O'BRIEN, E.P.; DIMA, R.I.; BROOKS, B.; THIRUMALAI, D. Interactions between hydrophobic and ionic solutes in aqueous guanidinium chloride and urea solutions: lessons for protein denaturation mechanism. **J. AM. CHEM. SOC.** 129, 7346-7353, 2007.

OGUCHI, S.; WALKER, W.A.; SANDERSON, I.R. Iron saturation alters the effect of lactoferrin on the proliferation and differentiation of human enterocytes (Caco-2 cells). **Biol. Neonate.**, 67: 330-339, 1995.

OLIVEIRA, D.F.; BRAVO, C.E.C.; TONIAL, I.B. Whey of milk: a valuable product. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, 67: 64-71, 2013.

PAGANO, B.; RANDAZZO, A.; FOTTICCHIA, I.; NOVELLINO, E.; PETRACCONE, L.; GIANCOLA, C. Differential scanning calorimetry to investigate G-quadruplexes structural stability. **Methods**, 2013.

PERRETT, S.; ZHOU, J.M. Expanding the pressure technique: insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1595: 201-223, 2002.

QUEIROZ, V. A. O.; ASSIS, A. M.; JUNIOR, H. C. R. Efeito protetor da lactoferrina humana no trato gastrointestinal. **Rev. Paul. Pediatr.**, 31(1):90-5, 2013.

REDWAN, E. M.; UVERSKY, V.N.; EL-FAKHARANY, E.M.; AL-MEHDAR, H. Potential lactoferrin activity against pathogenic viruses. **C. R. Biologies.**, 337: 581–595, 2014

ROSSKY, P.J. Protein denaturation by urea: Slash and bond. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 105(44): 16825–16826, 2008.

SANCHEZ, L.; ISMAIL, M.; LIEW, F.Y.; BROCK, J.H. Iron transport across Caco-2 cell monolayers. Effect of transferrin, lactoferrin and nitric oxide. **Biochimica et Biophysica Acta.**, 291-297, 1996.

SHARMA, A.K.; RAJASHANKAR, K.R.; YADAV, M.P.; SINGH, T.P. Crystal structure of mare apo lactoferrin: Structures of the N and C lobes are in the closed form. **Acta Cryst D55**, 1152–1157, 1999-b.

SHIN, K.; WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; YAESHIMA, T.; IWATSUKI, K. Recombinant human intelectin binds bovine lactoferrin and its peptides. **Biol Pharm Bull**, 8):1605-8, 2008.

SILVA, J. L.; FOGUEL, D.; ROYER, C. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. **Trends Bioc. Sci.** 26, 612- 618, 2001.

SILVA, J.L.; OLIVEIRA, A.C.; VIEIRA, T.C.R.G.; OLIVEIRA, G.A.P.; SUAREZ, M.C.; FOGUEL, D. High-Pressure Chemical Biology and Biotechnology. **Chem. Rev**, 2014.

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

SREEDHARA, A.; FLENGSRUD, R.; PRAKASH, V.; KROWARSCH, D.; LANGSRUD, T.; KAUL, P.; DEVOLD, T.G.; VEGARUD, G.E. A comparison of effects of pH on the thermal stability and conformation of caprine and bovine lactoferrin. **International Dairy Journal**, 20: 487-494, 2010.

STANCIUC, N.; APRODU, I.; RAPEANU, G.; PLANCKEN, I.; BAHRIM, G.; HENDRICKX, M. Analysis of the thermally induced structural changes of bovine lactoferrin. **J. Agric. Food Chem**, 61: 2234–2243, 2013.

STRYER, L.; BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. Bioquímica. 6. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.

SUZUKI, Y. A.; LÖNNERDAL, B. Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. **Biochem. Cell. Biol.**, 80: 75–80, 2002.

TIMASHEFF, S.N.; XIE, G. Preferential interactions of urea with lysozyme and their linkage to protein denaturation. **Biophysical Chemistry**, 105: 421–448, 2003.

TOMITA, M.; WAKABAYASHI, H.; SHIN, K.; YAMAUCHI, K.; YAESHIMA, T.; IWATSUKI, T. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. **Biochimie**, 91(1):52-7, 2009.

VALENTI, P.; ANTONINI, G. Lactoferrin: an important host defense against microbial and viral attack. **Cell. Mol. Life Sci.**, 62: 2576–2587, 2005.

VERDINO, P.; KELLER, W. Circular dichroism analysis of allergens. **Methods**, 32(3):241-8, 2004.

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

WAKABAYASHI, H.; YAMAUCHI, K.; YAESHIMA, T.; SHIN, K.; IWATSUKI, K. Recombinant human intelectin binds bovine lactoferrin and its peptides. **Biol. Pharm. Bull.**, 31(8) 1605—1608, 2008.

YU, Z.; REID, J.C.; YANG, Y.P. Utilizing dynamic light scattering as a process analytical technology for protein folding and aggregation monitoring in vaccine manufacturing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 102:4284–4290, 2013.