

INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula acessória do aparelho reprodutor de todos os mamíferos^[1], sendo responsável pela produção e armazenamento do líquido prostático. A motivação para o estudo dos mecanismos de regulação do crescimento e da fisiologia prostática resulta da existência de várias complicações patológicas que afetam essa glândula^[2].

A Clusterina é uma molécula com funções complexas. Na próstata, sua expressão se dá em resposta à castração. Recentemente demonstrou-se que há uma sobreposição entre os picos de apoptose e o pico de expressão de Clusterina^[3]. Uma idéia aceita é que a Clusterina estaria presente nos tecidos sujeitos a remodelação.

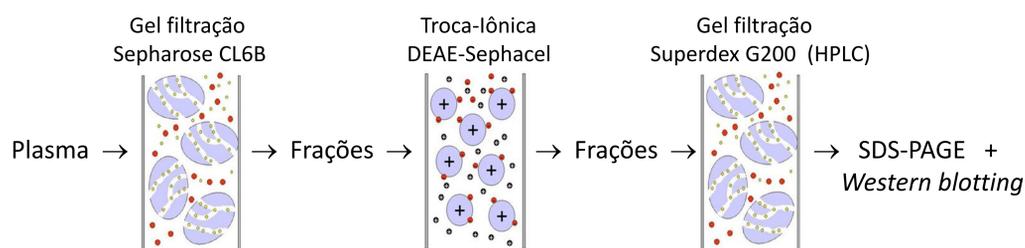
Nossa hipótese é que a forma sulfatada e secretada da Clusterina tem papel modulador da resposta imune, orquestrando a ação de diversos tipos celulares na remodelação tecidual e inibindo a resposta inflamatória. Sua atuação modularia a resposta imune, cooperando assim com o aspecto tolerogênico da apoptose das células epiteliais prostáticas após castração.

OBJETIVO

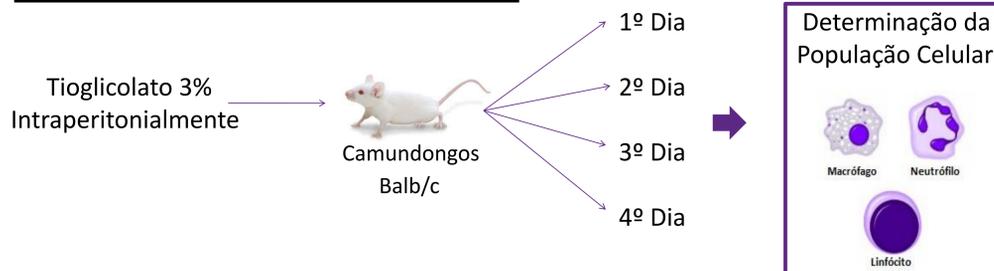
Purificar a Clusterina a partir de plasma humano e testar seus efeitos sobre as atividades de células do sistema imune, mais especificamente a produção de NO, e produção de interleucinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β) por macrófagos *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Purificação da Clusterina: Utilizou-se da técnica de cromatografia, na qual o plasma passou por 3 colunas distintas; a primeira trata-se de uma coluna de gel filtração, que separa os maiores elementos do plasma, a segunda de troca-iônica, que separa as proteínas por carga, e a última, também de gel filtração, para separar os elementos menores.



Recrutamento das Células do Sistema Imune:



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Purificação da Clusterina:

A leitura da absorbância das frações coletadas na coluna de gel filtração Sepharose CL6B apresentou dois picos. No segundo, SDS-PAGE e *Western blotting* nos mostraram possível presença da Clusterina nas frações 32-44, com bandas de massa aproximada de 60 kDa, valor este condizente com o da subunidade da Clusterina descrita na literatura^[4]. No primeiro pico não houve detecção da proteína.

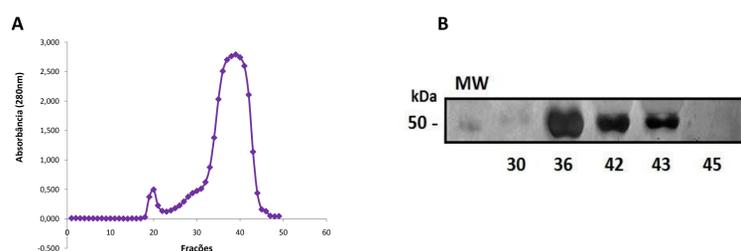


Figura 1) A – Gráfico da leitura da absorbância (280nm) das frações coletadas da Sepharose CL6B; B – *Western Blotting* das frações selecionadas.

Passou-se o *pool* das frações 32-44 pela coluna de troca-iônica DEAE-Sephacel, na qual também aplicou-se um gradiente de concentração para soltar as proteínas aderidas à resina. As frações 30-37 apresentaram possível presença de Clusterina com bandas de massa aproximada de 60 kDa, enquanto as frações anteriores e posteriores não apresentaram.

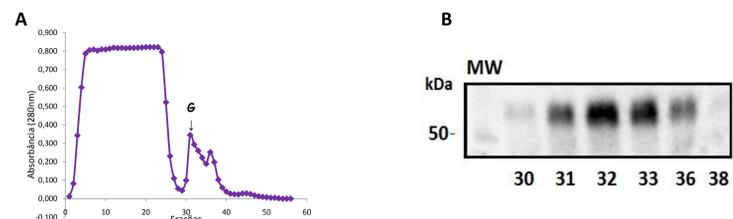


Figura 2) A – Gráfico da leitura da absorbância (280nm) das frações coletadas da DEAE-Sephacel; B – *Western Blotting* das frações selecionadas.

O *pool* das frações 30-37 foi liofilizado e ressuspenso em menor volume para passagem na coluna de gel filtração Superdex G-200. Na leitura espectrofotométrica vê-se maior absorbância na fração 7, a mesma que apresenta maior concentração de proteína pelo Método de Bradford (dada em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). SDS-PAGE mostra presença de proteínas com bandas de massa aproximada de 60 kDa. *Western blotting* revela possível presença da Clusterina, com bandas também em massa aproximada de 60 kDa, nas frações 7 e 8.

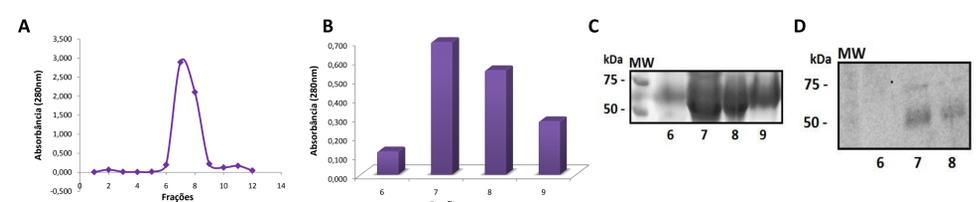


Figura 3) A – Gráfico da leitura da absorbância (280nm) das frações coletadas da Superdex G-200; B – Concentração de proteínas (em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) pelo Método de Bradford; C – SDS-PAGE das frações selecionadas; D – *Western blotting* das frações selecionadas.

Recrutamento das Células do Sistema Imune:

A aplicação intraperitoneal de tioglicolato 3% gera nos camundongos um processo inflamatório inespecífico que recruta as diversas células do sistema imunológico. Sacrificando-os de 24 a 96 horas após a injeção, pôde-se analisar em que período de tempo há maior migração de um tipo celular, de maneira a saber qual o melhor dia para se coletar, e posteriormente cultivar, as determinadas células de interesse.

Neutrófilos (Figura 4A) se apresentam em grande número no primeiro dia, uma vez que são as primeiras células a chegarem ao local de lesão. No entanto, seu número cai de maneira estatisticamente significativa já no segundo dia, diminuindo ainda mais até o quarto dia, pois essas células possuem um tempo de vida muito curto e morrem rapidamente no local da inflamação. Os macrófagos, por sua vez, começam em número mediano, mas crescem de maneira estatisticamente significativa no terceiro dia (Figura 4B), provavelmente devido ao seu papel fagocitário, que atua na “limpeza” da inflamação. Os linfócitos apresentam números semelhantes nos dias 1, 3 e 4, porém aumenta de maneira estatisticamente significativa no segundo dia (Figura 4C), provavelmente porque são recrutados pelos neutrófilos e macrófagos do primeiro dia para a fase mais efetora de controle da inflamação^[5].

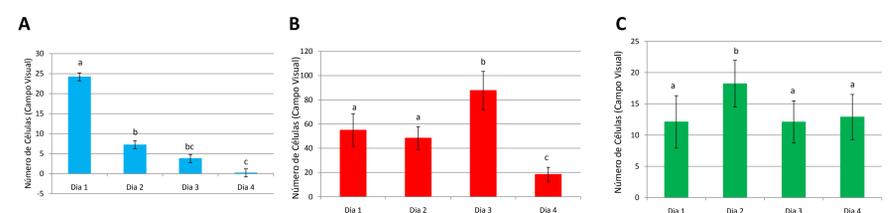


Figura 4) Contagem das células do sistema imune para os 4 dias, sendo A – Gráfico de neutrófilos; B – Gráfico de Macrófagos e C – Gráfico de Linfócitos. Cálculos estatísticos realizados pelo programa InStat3, teste ANOVA com Turkey à *posteriori*. Os valores estatisticamente significativos são aqueles que apresentam valor de $p < 0,05$ para ambos os testes.

CONCLUSÃO

Neste projeto, submeteu-se o plasma humano às análises bioquímicas e imunoquímicas na tentativa de obtermos a purificação da Clusterina. O resultado final nos mostra alta probabilidade de termos alcançado este objetivo, uma vez que o *Western blotting* final revela apenas algumas bandas da possível proteína e o SDS-PAGE não mostra outras bandas referentes à outras proteínas. Além disso, as bandas em questão apresentam massa molecular condizente com a descrita na literatura.

Com relação ao recrutamento das células do sistema imune, definiu-se que a coleta para cultura das células seja efetuada no primeiro dia para os neutrófilos, no terceiro dia para macrófagos e no segundo dia para os linfócitos. Com isso, para se fechar os objetivos gerais do projeto, faz-se necessário testar, *in vitro*, os efeitos da Clusterina purificada nestas células coletadas, de maneira a avaliar como esta proteína irá modulá-las e com isso, entendermos seu papel na remodelação prostática após castração.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Price D (1963) Comparative aspects of development and structure in the prostate. Natl. Cancer Inst Monogr 12: 1-27
- [2] Pfau A, Caine M (1980). In: Spring-Mills E, Hafez ESSE (eds) Male Accessory Sex Glands. Elsevier-North-Holland, New York, p. 357
- [3] Bruni-Cardoso A, Augusto TM, Pravatta H, Damas-Souza DM, Carvalho HF. 2009a. Stromal remodeling is required for rat ventral prostate progressive involution after castration: identification of a matrix metalloproteinase-dependent apoptotic wave. Int J Androl, in press.
- [4] Shannan, B. *et al.* (2006) Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. Cell Death Differ. Jan;13(1):12-9.
- [5] Parham, P. O Sistema Imune. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 14-17.

Financiamento