



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências
Comissão de Graduação

Michele Aramburu Serafini

**Avaliação da expressão da proteína HspB5 no modelo experimental de
colite ulcerativa**

Porto Alegre
Novembro 2016

Michele Aramburu Serafini

Avaliação da expressão da proteína HspB5 no modelo experimental de colite ulcerativa

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.
Orientador: Prof. Dr. Ana Helena da Rosa Paz
Co-orientador: Fernanda Visioli

Porto Alegre
2016

*“O mundo e o universo são lugares extremamente belos,
e quanto mais os compreendemos,
mais belos eles se parecem.”
Richard Dawkins*

Agradecimentos

À professora Ana Helena da Rosa Paz, por me aceitar como orientanda e membro do seu grupo de pesquisa, e também por todo seu esforço, toda sua dedicação e todo seu tempo dispensado ao presente trabalho em meio a tantas outras atividades e compromissos que possui. Sou muito grata por toda a orientação, compreensão, por todo o apoio e o carinho durante a execução deste trabalho. Também agradeço imensamente por tudo o que tenho aprendido trabalhando contigo até hoje.

À professora Fernanda Visioli, por aceitar o convite para ser minha co-orientadora, contribuindo com sua valiosa experiência como patologista. Agradeço enormemente também por ter me ensinado a técnica de análise imuno-histoquímica, algo que exigiu um tempo considerável de treinamento, e por ter estado sempre disposta a solucionar todas as minhas dúvidas.

Ao professor Eduardo Cremonese Filippi-Chiela, por aceitar o convite para integrar a Banca Examinadora deste trabalho, contribuindo com o seu conhecimento no campo da biologia celular. Estou certa de que sua análise crítica dos resultados do presente estudo será enriquecedora para nosso trabalho.

À pesquisadora Emily Ferreira Salles Pilar, por aceitar o convite para integrar a Banca Examinadora deste trabalho, contribuindo com a sua experiência e seu conhecimento na área de patologia e imuno-histoquímica. Tenho convicção de que sua análise experiente trará contribuições inestimáveis para o trabalho.

A minha colega de pesquisa Fabiany Gonçalves, por todo o aprendizado proporcionado pelas atividades em laboratório e pelas trocas de experiências, e também por todo o companheirismo e apoio. Sou grata, ainda, pelo material cedido para o presente estudo. Agradeço também a minha colega de pesquisa Débora Constantino, por todo o companheirismo, apoio e também pelo aprendizado nas nossas trocas de experiências.

Aos meus pais, por todo o apoio que sempre me deram, assim como pelos conselhos, pelo amor incondicional e também pelo constante estímulo ao estudo. Também agradeço ao meu namorado Guilherme Antônio Borges, por todo o carinho, paciência e companheirismo durante a execução deste projeto.

A todas as outras pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a minha formação, o meu mais sincero muito obrigada!

ÍNDICE

RESUMO	5
INTRODUÇÃO	6
MATERIAIS E MÉTODOS	9
<i>Locais de realização</i>	9
<i>Reação de imuno-histoquímica</i>	10
Análise da marcação imuno-histoquímica.....	10
<i>Análise estatística</i>	11
RESULTADOS	12
DISCUSSÃO	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

RESUMO

A colite ulcerativa pertence ao grupo das doenças inflamatórias intestinais, que são inflamações crônicas e recorrentes do trato gastrointestinal cujos sintomas incluem dor abdominal, cólicas, diarreia persistente, fadiga e perda de peso. Na colite ulcerativa, esta inflamação se restringe ao cólon e ao reto, apresentando infiltrado linfocitário e inflamação epitelial na mucosa e submucosa. Durante o processo inflamatório, são expressas no endotélio vascular as moléculas de adesão VCAM-1, MadCAM-1 e E-selectina, que facilitam a transmigração dos leucócitos presentes na corrente sanguínea para o tecido intestinal. Estudos recentes apontam que a proteína HspB5 está envolvida na expressão destas adesinas. Esta proteína faz parte da família de pequenas proteínas de choque térmico, agindo como chaperona molecular. Muito conservada na maior parte das espécies, a HspB5 modula diversos processos celulares, tais como degradação proteica, apoptose, angiogênese, câncer e doenças inflamatórias. Até o presente momento, não há um tratamento capaz de reverter permanentemente o quadro da colite ulcerativa. Neste sentido, na procura por possíveis alvos terapêuticos, objetivamos avaliar a presença da HspB5 por imunohistoquímica nas células endoteliais no tecido intestinal inflamado, utilizando para tal amostras do modelo experimental de colite ulcerativa induzido por DSS (*dextran* sulfato de sódio) a 2%. Foi observada uma tendência do tecido inflamado a apresentar maior quantidade de vasos positivos para HspB5 no citoplasma das células endoteliais ($29,2 \pm 8,1\%$). Além disto, também observamos que o grupo doente apresentou uma quantidade total maior de vasos (média $25,2 \pm 4,2$ por amostra, $p = 0,0325$), sugerindo que possa ter ocorrido angiogênese durante o período de indução da doença. Dando seguimento ao trabalho, pretendemos avaliar a presença das adesinas VCAM-1, MadCAM-1 e E-selectina, a fim de analisar se a expressão das mesmas correlaciona com a presença de HspB5 no tecido inflamado.

INTRODUÇÃO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são inflamações crônicas e recorrentes do trato gastrointestinal, cujos sintomas incluem dor abdominal, cólicas, diarreia persistente, fadiga e perda de peso (Ahmed et al, 2016). Embora a etiologia das DII seja desconhecida, estudos indicam que a disfunção da mucosa intestinal está relacionada à suscetibilidade genética, poluição e alterações na microbiota gastrointestinal (Sartor et al, 2006; Harper & Zisman, 2016). As principais manifestações das DII são a doença de Crohn (CD) e a colite ulcerativa (UC). Enquanto a doença de Crohn pode afetar qualquer segmento do trato gastrointestinal, apresentando um processo inflamatório transmural de aspecto granulomatoso com úlceras, a UC é uma inflamação que se restringe ao cólon e ao reto, apresentando infiltrado linfocitário e inflamação epitelial na mucosa e submucosa (Klein & Eliakim, 2010; Lee & Lee, 2016).

Altas incidências das DII têm sido relatadas no norte da Europa, no Reino Unido e na América do Norte. Atualmente, a incidência anual de DC é mais alta na América do Norte (20,2 para cada 100.000 habitantes), enquanto que a incidência anual da UC é maior na Europa (24,3 a cada 100.000 pessoas). Nesse sentido, a prevalência das DII tem aumentado nos últimos 50 anos, sendo mais alta na Europa (505 para UC e 322 para DC a cada 100.000 habitantes). O Brasil se encontra no grupo de baixa incidência da doença, semelhante à encontrada em outros países da América latina, porém essa classificação pode estar equivocada devido à falta de dados e registros da frequência de DII. As pessoas jovens são as mais afetadas pelas DII; enquanto na UC o pico de incidência é entre 30-40 anos e o sexo masculino é o mais afetado, na DC o pico ocorre entre 20-30 anos, sendo o sexo feminino o mais afetado (Burisch et al. 2013; Ponder et al. 2013).

Os tratamentos atualmente disponíveis para a UC consistem principalmente de aminosalicílicos, corticoesteróides, imunossupressores, e anticorpos monoclonais anti-TNF- α ; entretanto, estes tratamentos visam apenas manter o estado de remissão e aliviar os sintomas clínicos das UC, além de poderem causar uma maior suscetibilidade a infecções intracelulares oportunistas, como tuberculose no caso de agentes anti-TNF- α , além de existir um risco potencial de linfoma e outras malignidades (Pithadia et al, 2011; Vermeire et al, 2011). Estes métodos visam principalmente manter o estado de remissão e aliviar seus sintomas clínicos,

não havendo tratamento disponível que consiga reverter permanentemente o quadro da doença até o momento.

Durante o processo inflamatório, citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), são produzidas pelas células do sistema imunológico residentes no tecido do intestino, levando à ativação das células do endotélio vascular pela via NF κ B (*fator nuclear kappa B*), o qual regula a expressão de moléculas de adesão como E-selectina, VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) e MadCAM-1 (*Mucosal addressin-cell adhesion molecule*) na membrana celular do endotélio vascular (Pober & Sessa, 2007). Enquanto a E-selectina promove uma interação fraca com os leucócitos que passam pelo sangue, diminuindo a velocidade de rolamento destes no fluxo sanguíneo, VCAM-1 promove a adesão dos leucócitos ao vaso, sendo expresso em pacientes com DII e pouco presente no tecido não-inflamado (Dieterich et al, 2013, Habtezion et al, 2016; Lobatón et al, 2014). A proteína MadCAM-1, por sua vez, promove a migração destes leucócitos à mucosa, sendo expressa predominantemente no endotélio vascular intestinal em situação inflamatória (Briskin et al, 1997). Desta forma, estas moléculas de adesão promovem a migração de leucócitos presentes na corrente sanguínea para a mucosa do cólon (Jones et al, 1995), desempenhando assim um papel fundamental no desenvolvimento da inflamação.

A proteína α B-cristalina (HspB5) faz parte da família de pequenas proteínas de choque térmico e auxilia na recuperação celular em situações de estresse (Boelens, 2014). Muito conservada na maioria das espécies – desde procariotos até humanos – esta proteína modula diversos processos celulares, tais como degradação proteica, apoptose, angiogênese, câncer e doenças inflamatórias (Rothboard, 2012). A HspB5 é expressa em diversos órgãos, como na lente ocular, auxiliando na manutenção da transparência da mesma; no coração, atuando na manutenção das células sob o estresse oxidativo; e no cérebro, onde é mais presente na massa branca, possivelmente atuando na proteção das bainhas de mielina. Além disso, essa proteína já foi encontrada em outros órgãos como rim, pulmão, placenta, pele, esôfago, fígado e nos tecidos muscular e adiposo (Horwitz, 1992; Christians et al, 2012; Schmidt et al, 2012; Reddy & Reddy, 2015).

Embora a expressão aumentada de HspB5 tenha sido relatada em algumas doenças inflamatórias (Cherneva et al, 2012; Yeboah & White, 2001; Sreekumar et al, 2010; Rothboard et al 2012; Ousman et al 2007; van Noort et al, 2013; Shao et

al, 2013) seu efeito no processo inflamatório, ainda não está bem elucidado. No estudo de Dieterich e colaboradores (2013), foi demonstrado que HspB5 induziu a superexpressão da molécula de adesão E-selectina em resposta a TNF- α em células endoteliais HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). O mesmo foi observado em linhagem de células endoteliais (MyEnd - *myocardial microvascular endothelial cells*), nocaute para HspB5, que apresentou a redução da expressão de E-selectina e VCAM-1 na presença de TNF- α , em comparação ao grupo *wild type*. Estes dados sugerem que um aumento nos níveis de HspB5 poderia apresentar um efeito pró-inflamatório, devido ao aumento da expressão de adesinas e consequente migração de leucócitos.

O estudo do mecanismo de recrutamento de células inflamatórias para o intestino na UC e a sua relação com HspB5 permitirá uma melhor compreensão dos processos celulares e moleculares envolvidos na doença, para no futuro possibilitar novas estratégias de intervenção terapêutica. De nosso conhecimento, não há estudos na literatura sobre a relação entre alterações na expressão de HspB5 e UC, ressaltando a relevância deste estudo no desenvolvimento de novas terapias. Desta forma, no presente trabalho buscamos avaliar a expressão da proteína HspB5 no cólon de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de indução experimental de UC aguda.

MATERIAIS E MÉTODOS

Locais de realização

O estudo foi desenvolvido na Unidade de Patologia Experimental (UPE) e no Centro de Terapia Gênica do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), bem como na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Análise histopatológica

O escore histológico foi determinado por patologista que desconhecia a composição dos grupos experimentais, conforme Dieleman e colaboradores (1998) (Tabela 1). Cada parâmetro histológico, como severidade da inflamação (0-3), profundidade da inflamação (0-3), regeneração (0-4) e dano à cripta (0-4), foi multiplicado pela porcentagem de comprometimento do tecido (1 ponto para 1-25%, 2 pontos para 26-50%, 3 pontos para 51-75%, 4 pontos para 76-100%). Portanto, a severidade e a profundidade da inflamação tiveram uma escala de pontuações de 0 a 12, a regeneração e o dano à cripta de 0 a 16. O índice histológico da doença foi calculado como a soma dos produtos de todos os parâmetros.

Tabela 1. Graduação histológica da colite		
Características	Grau	Descrição
Inflamação	0	Nenhum
	1	Leve
	2	Moderado
	3	Severo
Extensão	0	Nenhum
	1	Mucosa
	2	Mucosa e submucosa
	3	Transmural
Regeneração	4	Nenhuma reparação tecidual
	3	Superfície epitelial não intacta
	2	Regeneração com depleção de cripta
	1	Regeneração quase completa
	0	Completa regeneração ou tecido normal
Dano à cripta	0	Nenhum
	1	Basal 1/3 danificado
	2	Basal 2/3 danificado
	3	Apenas a superfície do epitélio intacta
	4	Cripta inteira e epitélio perdido
Percentual de Envolvimento	1	1-25%
	2	26-50%
	3	51-75%
	4	76-100%

Fonte: Dieleman et al., 1998.

Reação de imuno-histoquímica

Foram avaliadas 6 amostras de material biológico de camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo experimental de UC aguda, induzida por 2% DSS (*dextran* sulfato de sódio) na água de beber *ad libitum* por 7 dias, bem como de 6 camundongos saudáveis como controle. Tais amostras já se encontravam em blocos de parafina e provêm do projeto GPPG110244 de nosso grupo de pesquisa, previamente aprovado pela CEUA e desenvolvido na Unidade de Experimentação do HCPA.

Cortes longitudinais de 4µm de espessura do intestino grosso foram obtidos no micrótomo na UPE para a realização das reações de imuno-histoquímica, que foram realizadas pelo método da imuno-histoquímica indireta com anticorpo secundário conjugado a Horseadish peroxidase. A desparafinização das amostras foi realizada em banhos consecutivos de álcool e xilol. Para a recuperação antigênica, os cortes foram imersos em tampão citrato pH 6,0 durante 20 minutos, a 95°C. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em banhos consecutivos de peróxido de hidrogênio 5% em metanol (v/v), por 10 minutos, à temperatura ambiente. As reações inespecíficas com foram bloqueadas (ProteinBlock REF DPB-125) por 10 minutos. Em seguida, o anticorpo primário contra a proteína HspB5 (CRYAB, α B-crystallin, Sigma Aldrich, SAB4500485, 1 mg/mL produzido em coelho), diluído em PBS na proporção 1:100, foi adicionado às lâminas que ficaram a 4°C overnight. Após lavagem com água corrente e PBS, o *Goat anti-rabbit IgG HRP conjugate* (Millipore 1 mg/mL) foi adicionado na concentração de 1:200 e mantido por 30 minutos seguido de revelação.

Análise da marcação imuno-histoquímica

Foi analisado 1cm de comprimento da porção mais distal do intestino de cada amostra. As amostras foram analisadas manualmente em microscópio óptico no aumento de 400x, sendo contabilizado o número de vasos sanguíneos positivos e negativos para a marcação imuno-histoquímica (Figura 1). Foram quantificados apenas os vasos conservados que apresentavam lúmen e mínimo de uma célula endotelial com núcleo bem definido.

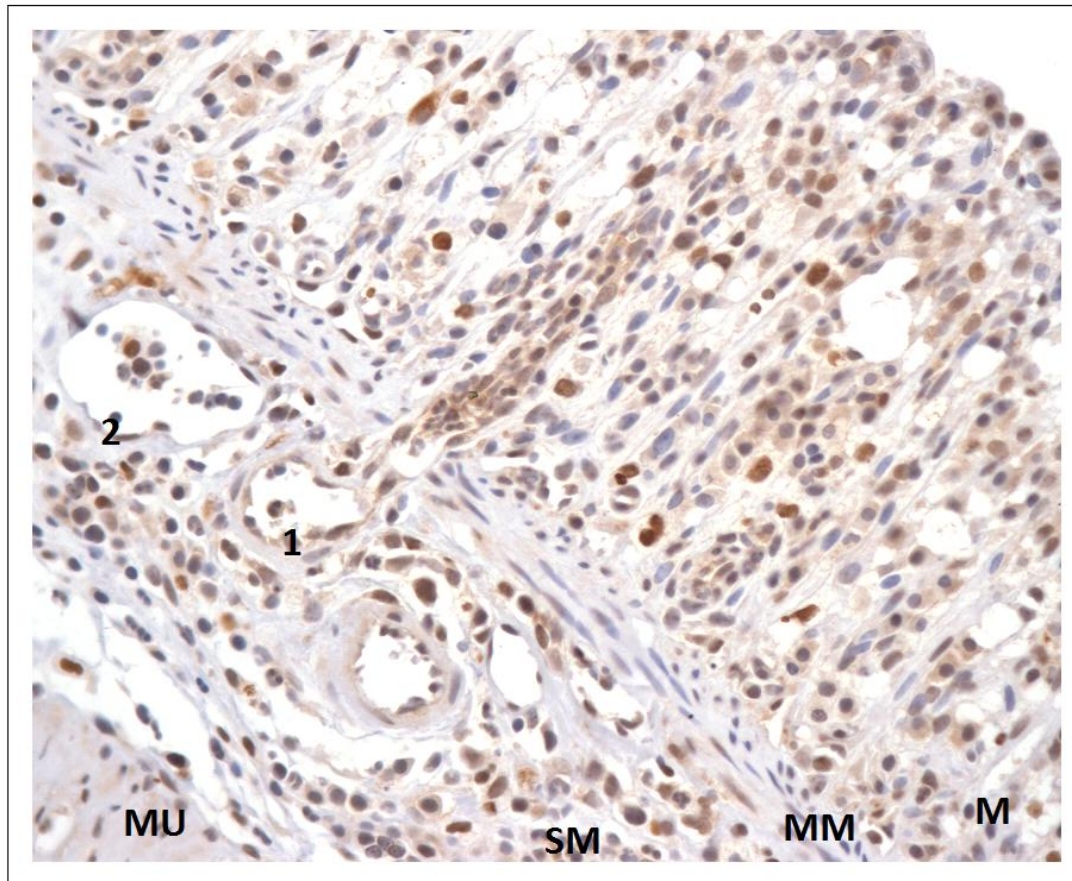


Figura 1: Classificação dos vasos na imunohistoquímica. Os vasos foram classificados em: positivos para HSPB5 (citoplasma positivo) (1) e negativos para HSPB5 (sem marcação) (2).
Legenda: M = camada mucosa, MM= camada muscular da mucosa, SM = camada submucosa, MU = camada muscular. Lâminas de imuno-histoquímica, microscópio óptico, aumento de 400x.

Análise estatística

Os dados foram analisados no *software* estatístico GraphPad utilizando o teste t de *student* não-pareado, sendo utilizado um intervalo de confiança de 95%, ou seja, foram considerados significativos os dados que apresentaram o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A análise histológica demonstrou que o modelo de indução de UC resultou em animais com inflamação intestinal na mucosa e na submucosa, ocorrendo quase completa degeneração da estrutura das glândulas da mucosa no grupo doente. O escore histológico médio dos animais controles foi 0 ± 0 , enquanto o escore dos animais doentes foi em média de 7.8 ± 0.7 , indicando a efetividade do modelo DSS na indução da inflamação (figura 2).

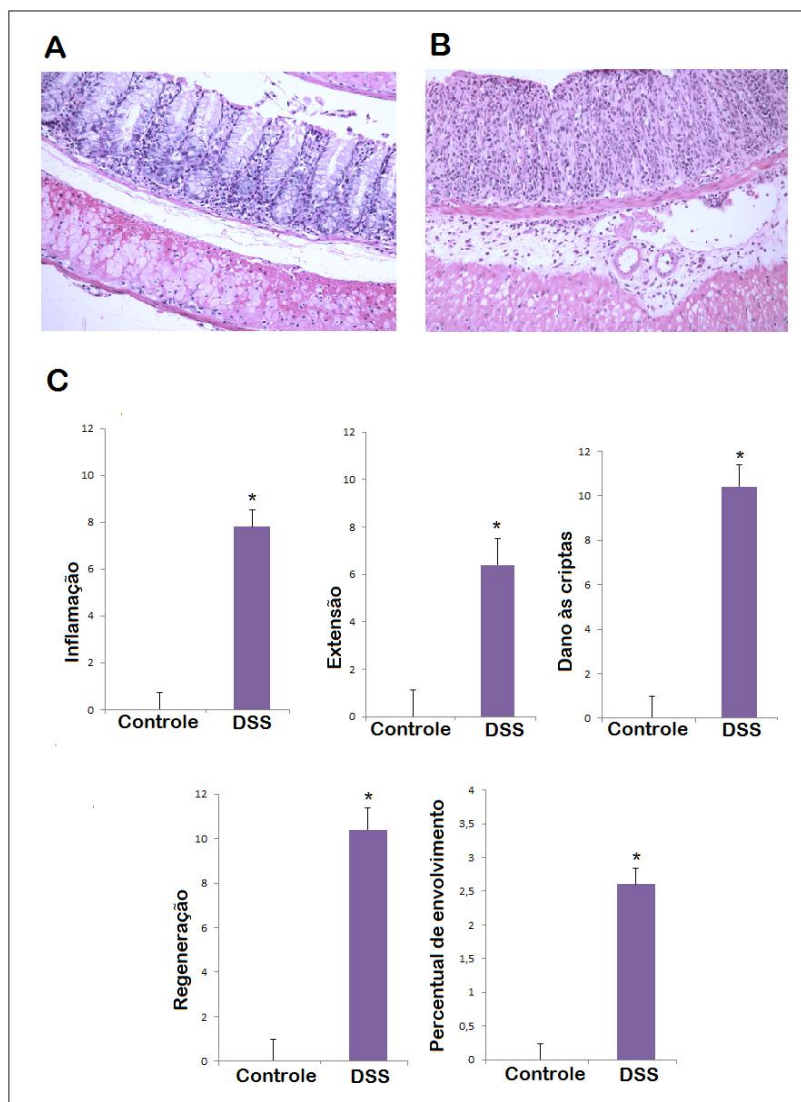


Figura 2: Características histológicas de colite induzida por DSS **A.** Lâmina de HE de indivíduo controle apresentando mucosa do cólon conservada. **B.** Lâmina de HE de indivíduo doente apresentando dano à estrutura das glândulas da mucosa do cólon. Microscopia óptica, aumento 200x. **C.** Gráficos do escore histológico, demonstrando diferença significativa entre animais controle e doentes (DSS). Inflamação, regeneração e dano às criptas $p=0,008$; extensão $p=0,0015$. Fonte: Gonçalves et al., 2014.

A análise imuno-histoquímica demonstrou que no grupo doente $29,19 \pm 8,15\%$ dos vasos apresentavam marcação positiva para HspB5, contra $15,08 \pm 4,22\%$ no grupo controle (figura 3). Tal resultado não obteve significância estatística, entretanto, é importante observar que há uma clara tendência do endotélio vascular a apresentar maior presença desta proteína em processos inflamatórios.

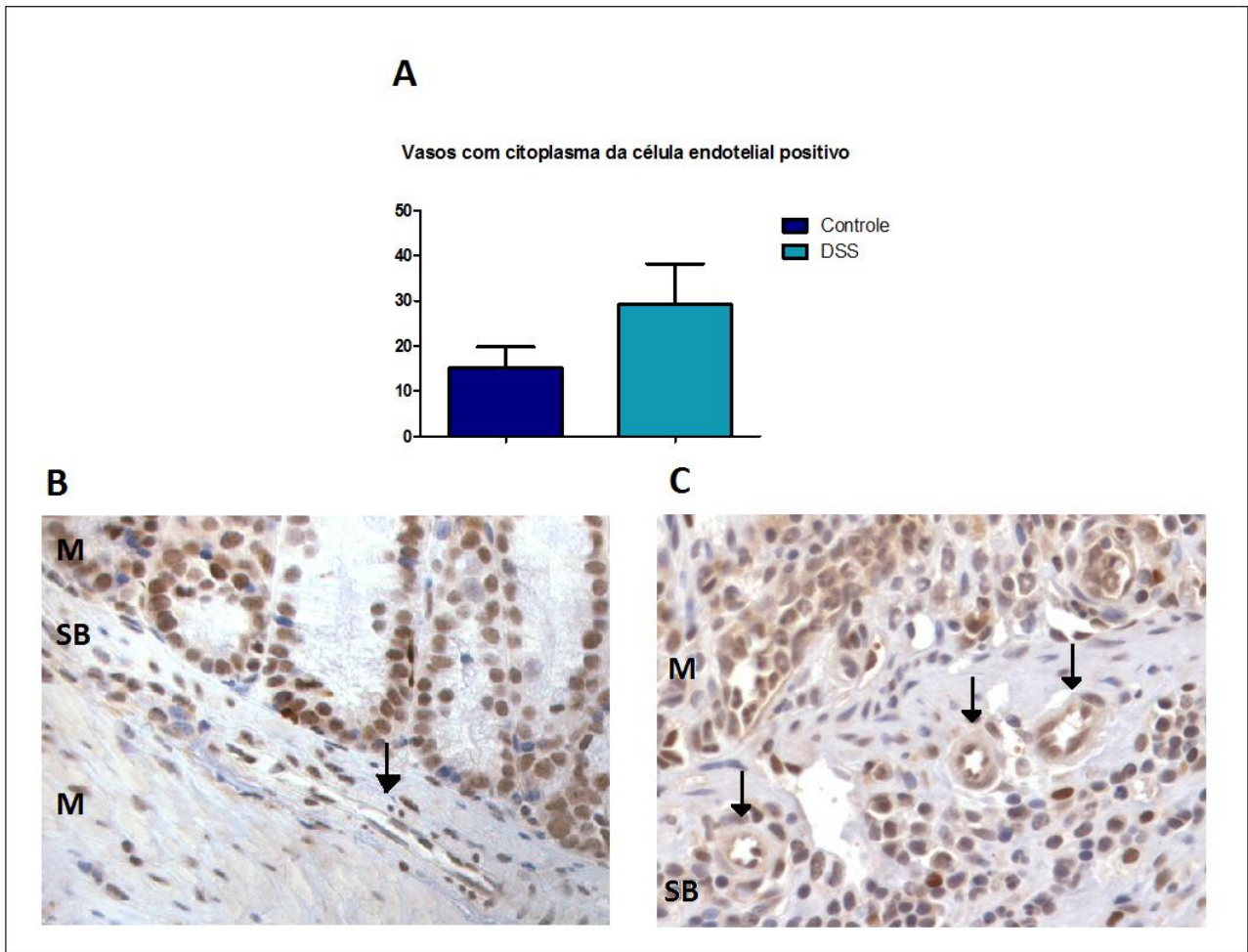


Figura 3: Quantidade de vasos com citoplasma da célula endotelial positivo para HspB5. **A.** Gráfico da quantificação de vasos positivos para a HspB5. **B.** Lâmina de imuno-histoquímica de amostra do grupo controle apresentando um vaso com citoplasma da célula endotelial negativo. **C.** Lâmina de imuno-histoquímica de amostra do grupo doente apresentando três vasos com citoplasma da célula endotelial positivo. Legenda: M = camada mucosa, SB = camada submucosa. Microscopia óptica, aumento 400x.

Durante as análises observamos também uma superioridade no número total de vasos no grupo doente, que apresentou uma média de $25,16 \pm 4,29$ vasos por amostra na porção analisada, comparado a $11,50 \pm 2,61$ vasos nos animais do grupo doente ($p= 0,0325$) (figura 4).

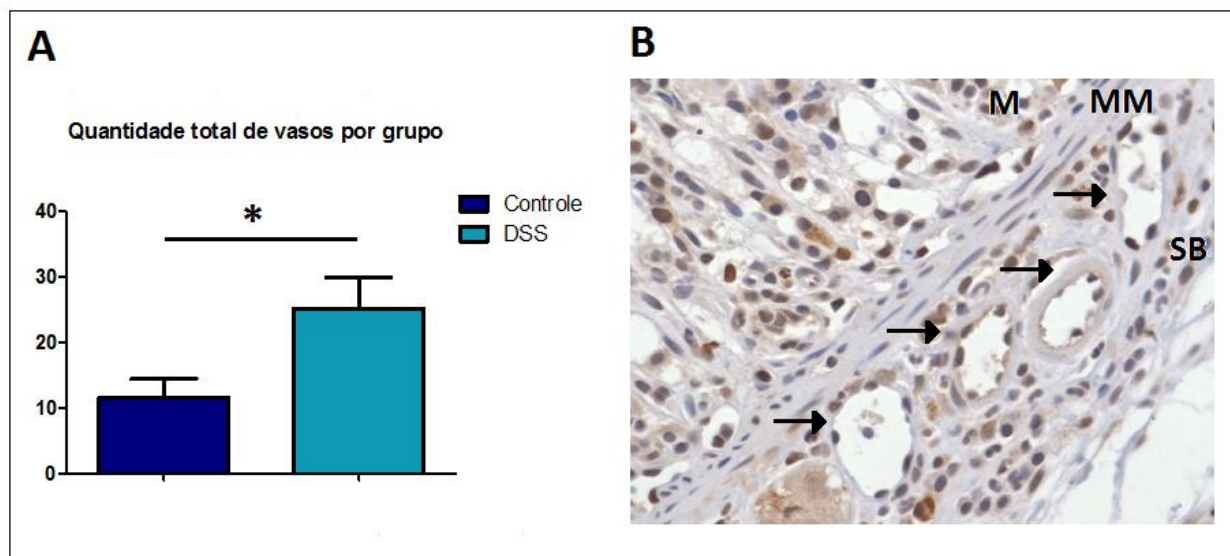


Figura 4: Quantidade total de vasos por grupo. **A.** Gráfico representativo da quantidade total de vasos por grupo **B.** Lâmina de imuno-histoquímica de amostra do grupo doente apresentando quatro vasos em uma mesma imagem. Legenda: M = camada mucosa, MM= camada muscular da mucosa, SB = camada submucosa. Microscopia de luz, aumento de 400x.

DISCUSSÃO

Até o presente momento, pouco é conhecido sobre a atuação da HspB5 em doenças inflamatórias. Em pacientes de doença pulmonar obstrutiva crônica, a HspB5 tem sua expressão aumentada, atuando como um imunossupressor endógeno, na tentativa de controlar a inflamação excessiva (Cherneva et al, 2012). No estudo de Dieterich e colaboradores (2013), a proteína HspB5 induziu a superexpressão de E-selectina em resposta a TNF- α em células endoteliais HUVEC. Na linhagem de células endoteliais MyEnd nocaute para HspB5 se observou a redução da expressão de E-selectina e VCAM-1 na presença de TNF- α , em comparação ao grupo *wild type*. Indicando um envolvimento de HspB5 com o aumento da expressão de adesinas, migração de leucócitos e consequentemente com a inflamação.

Em uma célula em situação não-inflamatória, a via do NfKB é inibida pelo IKB, que o sequestra para o citosol, impedindo que este entre no núcleo e atue como fator de transcrição. Quando citocinas pró-inflamatórias como TNF-a e IL1B se ligam à membrana plasmática, o inibidor de IKB (IKKB) é ativado e irá fosforilar e degradar o IKB. Com isto, NfKB fica livre para ir para o núcleo, onde promove a transcrição de proteínas inflamatórias como VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina. Em um estudo com uma linhagem de mioblastos, observou-se que, em resposta ao tratamento com TNF-a, a HspB5 se liga ao IKKB, ativando sua atividade quinase, facilitando a degradação de IKB, uma etapa inicial da ativação da via do NfKB (Adhikari et al, 2011), conforme ilustrado na figura 6.

Como anteriormente mencionado, foi demonstrado que a expressão ectópica de HspB5 em células endoteliais induziu a superexpressão de E-selectina em resposta a TNF-a, enquanto células nocaute para HspB5 demonstraram inibição da expressão das adesinas E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 mesmo na presença de TNF- α , tal fato foi associado ao alto nível de IKB (*inhibitor of kappaB*) nas mesmas (Dieterich et al, 2013). Assim, acredita-se que a HspB5 atue de forma coadjuvante ao TNF- α na ativação da via do NfKB.

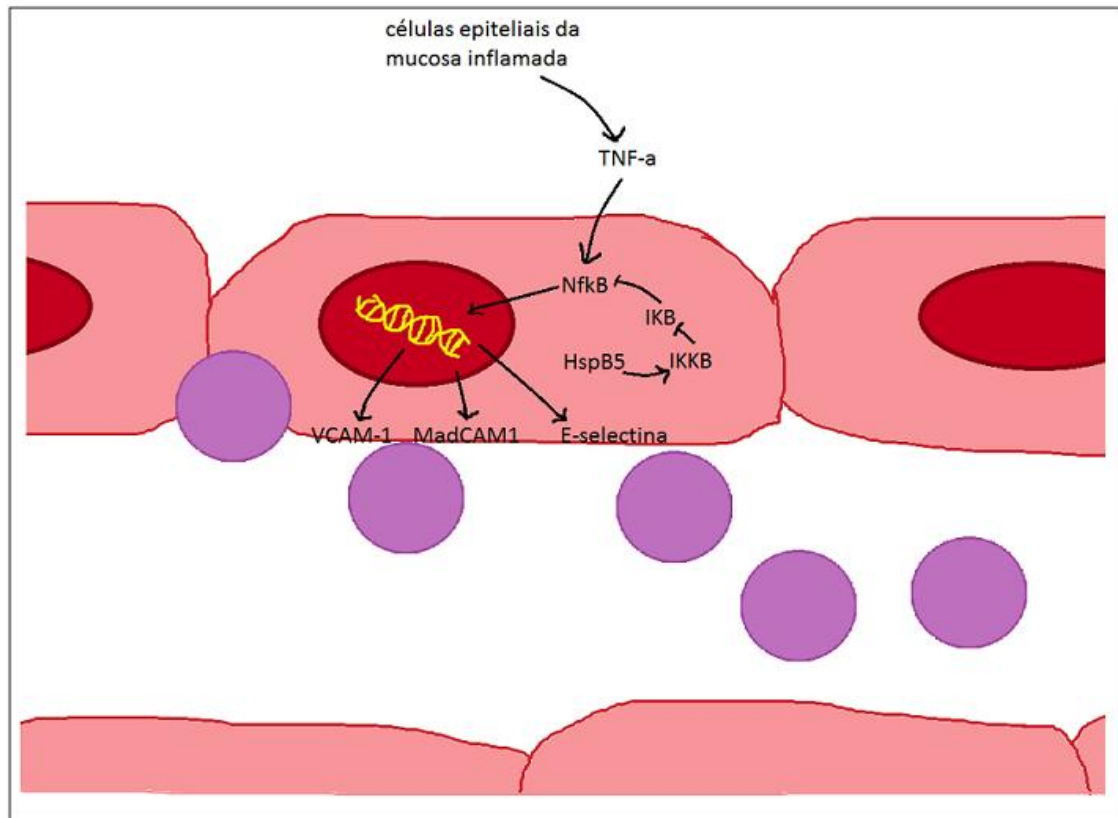


Figura 6: Ilustração da atuação da proteína HspB5 na via do NfκB, mostrando o interior de um vaso sanguíneo. Em rosa: células endoteliais expressando as adesinas VCAM-1, MadCAM1 e E-selectina. Em lilás: leucócitos presentes no fluxo sanguíneo sendo atraídos para dentro do tecido inflamado.

Para que tal processo ocorra, seria necessária a presença da proteína HspB5 no citoplasma da célula, por ser este local em que o NfκB se encontra quando não está ativo. Nossos dados estão de acordo com estes estudos, pois se verificou maior quantidade de HspB5 no citoplasma das células endoteliais no tecido inflamado do que no saudável, indicando uma possível atuação desta proteína nesta via. Estes dados, apesar de não significativos, sugerem uma maior tendência do tecido inflamado a apresentar HspB5 em processo de inflamação intestinal, podendo essa proteína apresentar um efeito pró-inflamatório.

Entretanto, em um modelo experimental de encefalomielite autoimune, foi demonstrado a ligação da proteína HspB5 a moléculas pró-inflamatórias de forma temperatura-dependente no meio extracelular, diminuindo a inflamação do tecido (Rothboard et al, 2012). Por outro lado, foi demonstrado que a ativação *in vitro* de células da micróglia humana com HspB5 desencadeou o aumento da expressão das citocinas IL-6 e IL-1B (pró-inflamatórias) podendo acarretar a ativação de

lesões de esclerose múltipla (Bsibsi et al, 2013). Kore & Abraham (2014) demonstraram que a ativação das células gliais com TNF- α e IL1 β elevou significativamente os níveis de HspB5 intracelular e da secretada via exossomos para o meio extracelular. Tais dados conflitantes parecem sugerir que a HspB5 pode atuar de forma diferenciada conforme o tipo celular onde é encontrada.

Por fim, em nossa análise observamos uma maior quantidade total de vasos no grupo doente em relação ao controle. Tal resultado pode ser relacionado a uma maior angiogênese no tecido durante o breve período de indução do modelo experimental. A angiogênese é estimulada principalmente pelo VEGF-A (*Vascular endothelium growth factor A*), cuja interação com a HspB5 já foi reportada (Kase et al, 2010). É interessante notar que a proteína HspB5 interage com VEGF-A na mesma região com a qual ela reconhece e se liga a proteínas desnaturadas, o que sugere que ela tenha a função de estabilizar o VEGF-A (Kerr & Byzova, 2010).

No interior de tecidos carcinogênicos, costuma existir um ambiente de hipóxia, o que eleva a expressão de HspB5 (Yaung et al, 2008). Em células epiteliais de retina submetidas a hipóxia foi verificado que HspB5 e VEGF-A estão co-localizadas no citoplasma. Neste mesmo estudo, foi visto que camundongos nocaute para HspB5 demonstraram pouca expressão de VEGF-A. Dimberg e colaboradores (2008) observaram que vasos de tumores em camundongos nocaute para a HspB5 apresentaram uma menor formação de vasos, além de altos níveis de apoptose nos vasos existentes, parecendo haver um papel importante da HspB5 na estimulação de neovascularização. Tais dados estão de acordo com nossos resultados, onde tivemos maior presença de HspB5 no citoplasma celular e maior quantidade total de vasos sanguíneos no grupo doente.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Podemos concluir que foi encontrada uma tendência a maior expressão da HspB5 no cólon de camundongos submetidos a modelo experimental de colite ulcerativa. Entretanto, mais estudos são necessários para determinar sua função, bem como a relação desta com as moléculas de adesão VCAM-1 e E-selectina.

Dando continuidade ao trabalho, iremos analisar a presença das adesinas VCAM-1 e E-selectina – os anticorpos já foram padronizados e as lâminas já foram confeccionadas, faltando realizar apenas a contagem e a posterior análise dos dados. Além disto, acreditamos ser interessante avaliar a presença de TNF- α no tecido, a fim de observar se nossos dados condizem com uma possível ativação da via do NfKB na mesma proporção da expressão da HspB5.

Além disto, no que condiz à diferença entre a quantidade de vasos positivos para a proteína HspB5 entre os grupos, o número amostral de apenas 6 indivíduos por grupo pode não ter sido suficiente para evidenciar significância estatística. Sendo assim, pretendemos aumentar o número amostral.

Desta forma, buscamos complementar o presente trabalho, investigando a influência da expressão da proteína HspB5 na inflamação intestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adhikari AS, Singh BN, Rao KS, Rao CM. α B-crystallin, a small heat shock protein, modulates NF- κ B activity in a phosphorylation-dependent manner and protects muscle myoblasts from TNF- α induced cytotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813 (2011) 1532–1542. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.04.009

Ahmed I, Roy BC, Khan SA, Septer S, Umar S. Microbiome, Metabolome and Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms*. 2016 Jun; 4(2): 20. Published online 2016 Jun 15. doi: 10.3390/microorganisms4020020 PMID: PMC5029486

Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, Cochran N, Bloom S, Wilson J, McEvoy LM, Butcher EC, Kassam N, Mackay CR, Newman W, Ringler DJ. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am J Pathol*. 1997 Jul;151(1):97-110.

Bsibsi M, Holtman IR, Gerritsen WH, Eggen BJL, Boddeke E, van der Valk P, van Noort JM, Amor, S. Alpha-B-Crystallin Induces an Immune-Regulatory and Antiviral Microglial Response in Preactive Multiple Sclerosis Lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*. Vol. 72, No. 10. October 2013 pp. 970-979 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182a776bf> 970-979

Burisch J, Munkholm P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013;29:357-362

Boelens WC. Cell biological roles of alphaB-crystallin. *Prog Biophys Mol Biol*. 2014

Cherneva RV, Georgiev OB, Petrova DS, Trifonova NL, Stamenova M, Ivanova V, Vlasov VI. The role of small heat-shock protein α B-crystalline (HspB5) in COPD pathogenesis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012; 7: 633–640. doi: 10.2147/COPD.S34929

Christians ES, Ishiwataa T, Benjamin IJ. Small Heat Shock Proteins in Redox Metabolism: Implications for Cardiovascular Diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 October ; 44(10): 1632–1645. doi:10.1016/j.biocel.2012.06.006

Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*. 1998 Dec; 114(3):385-91.

Dieterich LC, Huang H, Massena S, et al. AlphaB-crystallin/HspB5 regulates endothelial-leukocyte interactions by enhancing NF-kappaB-induced up-regulation of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin. *Angiogenesis*. 2013;16:975-983

Dimberg A, Rylova S, Dieterich LC, et al. AlphaB-crystallin promotes tumor angiogenesis by increasing vascular survival during tube morphogenesis. *Blood*. 2008;111(4):2015-2023.

Gonçalves FC, Schneider N, Pinto FO, Meyer FS, Visioli F, Pfaffenseller B, Lopez PL, Passos EP, Cirne-Lima EO, Meurer L, Paz AH. Intravenous vs intraperitoneal mesenchymal stem cells administration: what is the best route for treating experimental colitis? *World J Gastroenterol*. 2014 Dec 28;20(48):18228-39.

Habtezion A, Nguyen LP, Hadeiba H, Butcher EC. Leukocyte trafficking to the small intestine and colon. *Gastroenterology* 2016;150:340–354 <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.046>

Harper JW, Zisman TL. Interaction of obesity and inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2016 September 21; 22(35): 7868-7881 ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online) © 2016 Baishideng Publishing Group Inc.

Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 1;89(21):10449-53.

Jones SC, Banks RE, Haidar A, et al. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1995;36:724-730

Kase S, He S, Sonoda S, Kitamura M, Spee C, Wawrousek E, Ryan SJ, Kannan R, Hinton DR. α B-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF. *Blood*. 2010 Apr 22; 115(16): 3398–3406. doi: 10.1182/blood-2009-01-197095

Kerr BA; Byzova TV. α B-crystallin: a novel VEGF chaperone. *Blood* 2010 115:3181-3183; doi:10.1182/blood-2010-01-262766

Klein A, Eliakim R. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceuticals* 2010, 3(4), 1084-1092; doi:10.3390/ph3041084

Kore RA, Abraham EC. Inflammatory cytokines, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, upregulated in glioblastoma multiforme, raise the levels of CRYAB in exosomes secreted by U373 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 October 24; 453(3): 326–331. doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.068.

Lee JM, Lee K. Endoscopic Diagnosis and Differentiation of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Endosc.* 2016 Jul; 49(4): 370–375. doi: 10.5946/ce.2016.090

Lobatón T, Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Review article: anti-adhesion therapies for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014 Mar; 39(6):579-94. doi: 10.1111/apt.12639. Review.

Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, Wawrousek EF, O'Connor KC, Hafler DA, Sobel RA, Robinson WH, Steinman L. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature.* Vol 448|26 July 2007| doi:10.1038/nature05935

Pithadia AB, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep.* 2011;63:629-642

Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:803-815

Ponder A, Long MD. A clinical review of recent findings in the epidemiology of inflammatory bowel disease. *Clin Epidemiol.* 2013;5:237-247

Reddy VS, Reddy GB. Emerging role for alphaB-crystallin as a therapeutic agent: pros and cons. *Current Molecular Medicine* 2015, 15, 47-61. Review.

Rothbard JB, Kurnellas MP, Brownell S, et al. Therapeutic effects of systemic administration of chaperone alphaB-crystallin associated with binding proinflammatory plasma proteins. *J Biol Chem*. 2012;287:9708-9721

Sartor, R.B. Mechanisms of disease: Pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis (Review). *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*. Volume 3, Issue 7, July 2006, Pages 390-407. DOI: 10.1038/ncpgasthep0528

Schmidt T, Bartelt-Kirbach B, Golenhofen N. Phosphorylation-dependent subcellular localization of the small heat shock proteins HspB1/Hsp25 and HspB5/aB-crystallin in cultured hippocampal neurons. *Cell Biol* (2012) 138:407–418. DOI: 10.1007/s00418-012-0964-x

Shao W, Zhang S, Tang M, Zhang X, Zheng Z, Yin Y, Zhou Q, Huang Y, Liu Y, Wawrousek E, Chen T, Li S, Xu M, Zhou J, Hu G, Zhou J. Suppression of neuroinflammation by astrocytic dopamine D2 receptors via aB-crystallin. *Nature* 2012, doi:10.1038/nature11748

Sreekumar PG, Kannan R, Kitamura M, Spee C, Barron E, Ryan SJ, Hinton DR. aB Crystallin Is Apically Secreted within Exosomes by Polarized Human Retinal Pigment Epithelium and Provides Neuroprotection to Adjacent Cells. *PLoS ONE*. October 2010 | Volume 5 | Issue 10 | e12578

van Noort JM, Bsibsi M, Nacken PJ, Gerritsen WH, Amor S, Holtman IR, Boddeke E, van Ark I, Leusink-Muis T, Folkerts G, Hennink WE, Amidi M. Activation of an immune-regulatory macrophage response and inhibition of lung inflammation in a mouse model of COPD using heat-shock protein alpha B-crystallin-loaded PLGA microparticles. *Biomaterials* 34 (2013) 831e840 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.028>

Vermeire S, Ghosh S, Panes J, Dahlerup JF, Luegering A, Sirotiakova J, Strauch U, Burgess G, Spanton J, Martin SW, Niezychowski W. The mucosal addressin cell adhesion molecule antibody PF-00547,659 in ulcerative colitis: a randomised study. *Gut* 2011;60:1068e1075. doi:10.1136/gut.2010.226548

Yaung J, Kannan R, Wawrousek EF, Spee C, Sreekumar PG, Hinton DR. Exacerbation of retinal degeneration in the absence of alpha crystallins in an in vivo model of chemically induced hypoxia. *Exp Eye Res.* 2008;86(2):355–365

Yeboah FA, White D. AlphaB-Crystallin Expression in Celiac Disease – A Preliminary Study. *Clinical Sciences.* 42(5):523-526, 2001