



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Thyego Mychell Moreira Santos

**Expressão da *Heat Shock Protein 70* em usuários do
tabaco**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Enfermagem.

Orientador (a): Prof(a). Adjunta Ilda de Godoy.
Coorientador(a): Dr. João Paulo Castro Marcondes
Dra. Suzana Erico Tanni

**Botucatu
2018**

Thyego Mychell Moreira Santos

Expressão da *Heat Shock Protein* 70 em usuários do tabaco.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Enfermagem.

Orientador (a): Profa. Adjunta Ilda de Godoy.

Coorientador(a): Dr. João Paulo Castro Marcondes
Dra. Suzana Erico Tanni

Botucatu
2018

Thyego Mychell Moreira Santos

Expressão da *Heat Shock proteins* 70 (HSPA1A) em usuários do Tabaco

Orientadora: Prof^a. Adjunta *Ilda de Godoy*

Comissão Examinadora:

Dr^a. *Camila Renata Corrêa Camacho*

Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp

Dr^a. *Ilka Lopes Santoro*

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP

Dr^a. *Mariana Gobbo Braz*

Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Dr^a. *Eduardo Montanari Razza*

Faculdade Nove de Julho (Uninove- Bauru)

Botucatu, 29 de junho de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Santos, Thyego Mychell Moreira.

Expressão da *Heat Shock Protein 70* em usuários do tabaco
/ Thyego Mychell Moreira Santos. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ilda de Godoy

Coorientador: João Paulo Castro Marcondes

Coorientador: Suzana Erico Tanni

Capes: 40101126

1. Dano ao DNA. 2. Aparelho respiratório - Doenças. 3. Fumo
- Vício.

Palavras-chave: Danos no DNA; Doenças respiratórias; *Heat Shock Protein 70*; Inflamação sistêmica; Tabagismo.

Epígrafe

A essência do esforço se manifesta no real sentido a qual se busca ultrapassar o seu próprio limite. Se hoje a dificuldade lhe assombra é porque o amanhecer de um caminho brilhante está pra chegar. Lembre-se que a dificuldade é vivenciada por todos, porém a diferença entre aqueles que venceram e aqueles que ficaram pelo caminho, está na capacidade de sonhar, e é essa capacidade que lhe torna habilitado para viver os grandes sonhos.

Thyego Mychell Moreira Santos

Dedicatória

Cada um que passa em nossa vida, não vai só e nem nos deixa só, leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. É por meio dessa frase, que eu dedico em especial todo meu trabalho e esforço. Dedico a mulher mais incrível que conheci, Geralda Moreira dos Santos (minha avó), que me ensinou os melhores valores e princípios que eu poderia ter. Mulher guerreira, sábia, honesta, dedicada a sua família, tolerante, companheira, amiga incondicional, conselheira, paciente, prestativa, competente, carinhosa, amorosa... Sei que devo maioria das minhas conquistas a Deus e a você, pois me incentivou e me ofereceu força onde não havia, dedicou todos os seus atos para o bem dos seus e do próximo, inclusive me criando, fez aflorar em mim os mais belos sentimentos de amor e compaixão e por fim foi o maior exemplo de competência já visto por mim. Essas foram poucas das palavras que no exato momento achei para descrevê-la. Lamento com a dor de ter lhe perdido e por não ter conseguido dizer um último Adeus, e por não ter te abraçado pela última vez, e de não ter dito que meu amor por você era incondicional. E que eu a amo e sempre lhe amarei. O que me resta é apenas as belas e maravilhosas lembranças de ter vivido ao teu lado. Sinto tua falta, a falta de cuidar de ti, de te abraçar, lhe beijar e sentir seu perfume. Saudade Eterna...

Dedico essa tese também a minha família em especial a minha esposa e mãe, pelo apoio e incentivo em todos os momentos. Agradeço a dedicação, e todo o suporte dado durante todos esses anos. Obrigado pela confiança e por acreditar em mim. O amor e a atenção de cada um de vocês foram fundamentais para me impulsionar nessa caminhada em busca de meus ideias e sonhos.

Dedico também aos vários docentes ao qual tive o privilégio de trabalhar diretamente e indiretamente, em especial a minha orientadora, Dr. Felip Burgo e a Dra. Daisy Maria Favero Salvadori, pelo exemplo de pessoas, pelo incentivo e acima de tudo pelo carinho. Obrigado pela oportunidade de trabalharmos junto durante todo esse tempo e pela confiança. Seus ensinamentos e os valores profissionais servirão de exemplo para minha vida profissional.

Agradecimento Especial

A Deus pelo amor incondicional e por me abençoar muito mais do que eu mereço.

Aos pacientes que consentiram a participar desta pesquisa.

As amizades construídas durante toda essa trajetória. Em especial a toda equipe que tive a oportunidade de trabalhar -Equipe da Função Pulmonar da UNESP, Genotox UNESP, laboratório de Diagnóstico Respiratório Barcelona/Espanha.

A Giovana Vencentini (bolsista da Austrália) e Maria Ricco (bolsista de Barcelona) pela amizade durante o doutorado sanduíche.

Ao casal de amigos, Marcelo Cajango e Cintia Takahashi, que me incentivaram com sua amizade verdadeira e pelas palavras de carinho.

A Ivailda Cajango mesmo na distância e em outro plano espiritual, continua me inspirando. Agradeço a Deus por ter traçado os nossos destinos.

Aos meus co-orientadores e a Dra. Irma de Godoy pelas sugestões, orientações e ensinamentos.

A Fapesp pelo incentivo financeiro com o auxílio a pesquisa (processo nº2014/19346-7), bolsa de doutorado (processo nº2014/17983-0) e bolsa de pesquisa no exterior (processo nº2017/11217-1). Bem como a Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A Maria Regina Moretto da Unidade de Pesquisa Experimental-UNIPTEX e Marjorie de Assis laboratório de Citomerria de fluxo, por ter me acompanhando em parte dos experimentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho, e que o nome não foi citado, o meu muito obrigado,

Sumário

Capítulo I – Resumo	19
Introdução	21
Heat Shock Proteins (HSPs).....	25
Família das proteínas HSP70.....	26
Relação entre HSP70 e as doenças causadas pelo cigarro	28
Referências Bibliográficas.....	32
Capítulo II.....	44
Abstract.....	46
Introduction	47
Methods.....	48
Results	53
Discussion	60
References	65
Anexo.....	70
Apêndice	75

Lista de Ilustrações

Capítulo II

Figure 1 - Serum levels of HSP70 (A) and expression of <i>HSP70</i> mRNA in peripheral blood cells (B) of smokers and non-smokers.....	56
Figure 2 - Serum concentrations of IL-8 (pg / ml) (A) and DNA damage (tail intensity) in lymphocytes (B) from smokers and non-smokers.	56
Figure 3 - Analysis of the extracellular anti-HSP70 protein levels in the serum from smokers and non-smokers.....	57
Figure 4 - Flowchart showing the network among the main variables analyzed using the Pearson Correlation. Data are expressed with r and p values.....	58

Lista de Tabelas

Capítulo II

Table 1 - Clinical characteristics of the study population..... 54

Table 2 - Data of blood tests 55

Table 3 - Description of prediction models..... 59

Lista de Abreviaturas

BMI - body mass index;
CS - Complement system;
C3 - Complement protein 3;
C3aR - expression of its receptor;
C5 - Complement protein 5;
CO - exhaled carbon monoxide in the lung;
COPD - chronic obstructive pulmonary disease;
CRP - C-reactive protein;
CXCR2 - C-X-C motif chemokine receptor;
DAMPs - *Damage-associated molecular patterns*;
DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica;
F - Female;
FVC - Forced Vital Capacity;
FEV₁ - Forced Expiratory Volume in the first second;
HDL - high-density lipoprotein;
HSPs - *Heat Shock Proteins*;
HSP70 - *Heat shock proteins 70*;
IL-8 e IL-10 - Interleucina 8 e Interleucina 10;
LDL - low-density lipoprotein;
IPF - Idiopathic Pulmonary Fibrosis;
M - Male;
mDCs - myeloid dendritic cells;
MMPs - matrix metalloproteinases;
PEF - peak expiratory flow maximum;
ROS - Espécies reativas de oxigênio;
RNS - Espécies reativas de nitrogênio;
SpO₂ - oxygen saturation;
SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida;
Th1 - T helper 1 cells;
Th17 - T helper 17 cells;
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa;
TLR2 e TLR-4 - Receptores celulares com *toll like 2* e *4*;
TS - Tobacco smoke;
qPCR - Polymerase Chain Reaction quantitative real-time PCR.

Resumo

Moreira-Santos, TM Expressão da Heat Shock Proteins 70 (HSPA1A) em usuários do Tabaco. 2017. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.

O tabagismo é responsável pelo maior número de mortes evitáveis no mundo, por estar relacionado ao desenvolvimento de diversas enfermidades, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma, doenças cardiovasculares, além de diversos tipos de cânceres, sendo o principal o de pulmão. Desta forma, torna-se relevante a busca de biomarcadores para a identificação precoce de tais doenças. Assim, o presente estudo objetivou avaliar possíveis alterações promovidas pelo tabagismo em parâmetros bioquímicos, imunológicos (hemograma e marcadores de citocinas pró-inflamatória), moleculares (expressão HSP70 e anti-HSP70, danos no DNA), além daqueles relacionados à função pulmonar, que podem estar envolvidas no desenvolvimento de doenças pulmonares. Para tanto, foram coletadas amostras de sangue periférico de 40 tabagistas ativos (carga tabágica >10 anos/maço) e 40 indivíduos não tabagistas (controles). A tese está dividida em 2 capítulos. Capítulo I, trata-se de uma revisão bibliográfica, a qual possibilitou fazer uma análise e síntese de estudos relevantes publicados sobre a *heat shock protein 70* (HSP70) e sua relação com o cigarro e as doenças relacionadas. Capítulo II, apresentamos o artigo submetido a revista *European Respiratory Journal* (*impact factor* 10.569). Propusemos neste artigo avaliar o efeito do uso crônico do cigarro nos níveis séricos da proteína HSP 70 extracelular, a expressão gênica da *HSP70*, juntamente com os níveis de IL-8, quantidade de neutrófilos e dano no DNA. Dessa forma, essa tese buscou compreender os mecanismos moleculares subjacentes à imunopatologia associada ao tabagismo e a proteína HSP70 e seu anticorpo. Como também mostrar os efeitos deletérios promovidos pelo uso do cigarro.

Palavras chaves: Tabagismo, Heat shock Protein 70, Danos no DNA, Inflamação sistêmica

Capítulo I

Revisão Bibliográfica

Introdução

O tabagismo é responsável pelo maior número de mortes evitáveis no mundo e tornou-se tema relevante para estudos nas últimas décadas, principalmente em consequência dos diversos danos causados à saúde. Além disso, gera consequências negativas no âmbito social, econômico e sanitário, decorrentes do aumento da mortalidade. (Fagundes et al., 2014, 2015; World Health Organization - WHO, 2015, WHO, 2017).

A epidemia do tabaco é uma das maiores ameaças à saúde pública enfrentada mundialmente, pois uma em cada 10 mortes em todo o mundo é causada pelo uso de tabaco. Existem mais de um bilhão de fumantes em todo o mundo, de modo que são consumidos em média cerca de seis trilhões de cigarros todos os anos. Aproximadamente, sete milhões de pessoas morrem a cada ano em decorrência do uso do tabaco. Desse total, mais de seis milhões de mortes são decorrentes do uso direto do cigarro, enquanto cerca de 890.000 são o resultado de não fumantes exposto ao fumo passivo (WHO, 2018).

As estimativas futuras sugerem que se a atual tendência de consumo do tabaco se mantiver, em 2030, ocorrerão oito milhões de mortes por ano, 80% dessas mortes evitáveis ocorrerão em países de baixa e média renda (Eriksen et al., 2015). Esses índices são maiores do que as taxas de mortes por alcoolismo, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), acidentes de trânsito, homicídios e suicídios somados (Jha, 2012).

Em 2014, a prevalência de usuários do tabaco no Brasil foi de 21,9 milhões de pessoas, o que equivale a 15% da população. No entanto, esse percentual de fumantes apresentou expressiva queda nos últimos anos, devido às ações

desenvolvidas pela Política Nacional de Controle do Tabaco (Brasil, 2014). Pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde mostra redução de 0,6% ao ano na prevalência do tabagismo. No ano de 2006, essa pesquisa revelou prevalência de 15,7% de fumantes adultos e pesquisas nos anos subsequentes mostram valores de 14,8% (2008), 14,1% (2010), 12,1% (2012), 10,4% (2015) e 10,2% (2016) em média (Vigitel, 2016).

Estimativas epidemiológicas mostram que no Brasil no ano de 2015, morreram mais de 250 mil pessoas por causas relacionadas ao tabaco. Desse total, 35 mil foram vítimas de doenças cardíacas e 31 mil de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). O câncer de pulmão é o quarto motivo de morte relacionado ao tabagismo, com mais de 23 mil casos. Em sequência, as mortes relacionadas ao fumo passivo com mais de 17 mil ocorrências (INCA, 2017).

Segundo a Revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10, 1997), o tabagismo é uma doença que integra o grupo dos transtornos mentais e comportamentais, devido à ação da nicotina que é uma substância psicoativa. É considerado também uma doença crônica e um fator de risco para o desenvolvimento de diversas outras doenças, como DPOC, asma, doenças cardiovasculares (particularmente o infarto agudo do miocárdio), acidente vascular encefálico, hipertensão arterial, além de diversos tipos de cânceres como o de pulmão, bexiga, câncer de mama e câncer de próstata (Asma et al., 2014). Além destas doenças, o uso do cigarro aumenta o risco para o desenvolvimento de insuficiência renal, isquemia intestinal, vários tipos de infecções (pneumonia, tuberculose, etc.) e outras doenças respiratórias como a fibrose cística (Carter et al., 2015). A inclusão dessas doenças aumentou em 17% a taxa de mortalidade causada pelo tabaco (Carter et al., 2015). Ressalta-se também que o uso do cigarro reduz a

expectativa de vida em dez anos em média nos tabagistas (Asma et al., 2014). Portanto, a única forma de diminuir os efeitos deletérios promovidos pelo cigarro é a cessação do tabagismo (WHO, 2018).

Um importante fator para o desenvolvimento dessas doenças é a inalação da fumaça do cigarro que contém mais de 7.000 substâncias químicas de diferentes classes, sendo a maioria tóxica para o organismo humano (U.S. Department of Health and Human Services, 2014). Entre essas substâncias foram identificadas 69 elementos que podem apresentar atividades mutagênica e/ou carcinogênica, que incluem hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos heterocíclicos, hidrocarbonetos voláteis, nitro-hidrocarboneto, aminas aromáticas, N-heterocíclicos aminas, N-nitrosaminas, aldeídos e outros (Hoffmann et al., 2001; Rodman & Perfetti, 2013).

Além desses compostos, podem-se citar os metais pesados cádmio, chumbo e arsênio, como componentes da fumaça do cigarro que tem ações prejudiciais para a saúde humana. Sendo assim, fumar resulta em aumento desses metais nos pulmões e contribuem para o potencial carcinogênico do cigarro (Pinto et al., 2017).

Estudos in vitro mostraram que os produtos químicos da fumaça do cigarro promovem danos mitocondriais que levam à apoptose e necrose das células epiteliais das vias aéreas (Liu et al., 2009, Messner et al., 2012), gerando perda celular progressiva e alargamento dos tecidos pulmonares, o que resulta no desenvolvimento do enfisema pulmonar (Mohamed et al., 2013). Este efeito parece resultar principalmente da atividade de radicais livres da fumaça do tabaco (Bernardo et al., 2015; Kozlowski et al., 2017), que inclui muitos agentes oxidantes e espécies reativas de oxigênio (ROS), capazes de contribuir para o desenvolvimento de várias doenças

degenerativas pulmonares e cardiovasculares, bem como o câncer (Ghoorah et al., 2013).

Dessa forma, os agentes tóxicos do cigarro estimulam a geração de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) das células pulmonares, que por sua vez provocam respostas inflamatórias e resultam na liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas e, posteriormente, estimulam o influxo de leucócitos polimorfonucleares e monócitos para os pulmões, de modo a combater os agentes patogênicos invasores ou agentes tóxicos. Porém, esse processo vai além dos efeitos benéficos, pois as exposições repetidas das substâncias tóxicas e a inflamação crônica levam à lesão das células pulmonares pelo sistema imune (Azad et al., 2008; Gardi & Valacchi, 2012),

Portanto, o tabagismo está associado às alterações nos níveis sistêmicos relacionados ao processo imunológico e à inflamação (Gonçalves et al., 2011; Shiels et al., 2014), caracterizados pelo recrutamento de células inflamatórias, como os neutrófilos e linfócitos CD8⁺, com consequente aumento da produção de citocinas como a interleucina 8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e diminuição da produção de interleucina 10 (IL-10), sugerindo desequilíbrio entre produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (NHLBI/WHO, 2003; Tanni, 2010). De fato, tais alterações desempenham papel importante na patogênese das doenças pulmonares relacionadas ao fumo (Hsiao et al., 2013), uma vez que as citocinas inflamatórias, mediadores lipídicos (leucotrienos e prostaglandinas) e enzimas (elastase) liberados pelos neutrófilos promovem dano tecidual, associando o cigarro ao desenvolvimento da DPOC (Holz et al. 2008, Johannsen et al., 2014).

Portanto, os dados da literatura mostram que os produtos químicos do cigarro

podem causar danos irreversíveis ao organismo e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de doenças pulmonares como a DPOC. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais o cigarro promove o desenvolvimento de doenças ainda não foram completamente elucidados. Sendo observada na literatura escassez de estudos que explicam a influência do cigarro na ação da *heat shock proteins* 70 (HSP70) e a interação dessa proteína no sistema inflamatório sistêmico, imunológico e na indução de danos no DNA.

Heat Shock Proteins (HSPs)

As HSPs são proteínas altamente conservadas durante o processo evolutivo (Mayer et al., 2013), cuja as expressões são induzidas em respostas a uma grande variedade de insultos fisiológicos e ambientais, incluindo temperatura elevada, inflamação, isquemia, exposição a toxinas, estresse oxidativo, hipóxia, entre outras (de Moura et al., 2013, Newkirk et al., 2012, Ikwegbue et al., 2017).

As HSPs são consideradas chaperonas moleculares, pois atuam no dobramento, redobramento e transporte de outras proteínas. Além dessas funções, as HSPs estão envolvidas na montagem de complexo macromolecular, na degradação de proteínas, bem como na dissociação e o redobramento de agregados de proteínas desnaturadas pelo estresse. O estresse pode induzir resposta regulada, o que resulta no aumento da síntese de HSPs, como forma de auxiliar no reequilíbrio da homeostasia (Kakkar et al., 2014).

O genoma humano é capaz de codificar mais de 100 tipos diferentes de HSPs

e, com base na sua função, peso molecular e sequências de aminoácidos, as HSPs dos mamíferos foram classificadas em diferentes famílias, incluindo HSPH (HSP110), HSPC (HSP90), HSPA (HSP70), DNAJ (HSP40), HSPB (HSPs com peso molecular pequeno (HSP27), as chaperoninas humanas HSPD (HSP60) e HSPE (HSP10) (Tang et al. 2005; Kampinga et al., 2009; Ikwegbue et al., 2017).

Família das proteínas HSP70

Os membros da família das HSP70 são expressos constitutivamente, ou regulados por indução e estão presentes em diferentes compartimentos subcelulares. Dentro de cada família, as HSP70 são distribuídas conforme a sua função, peso molecular e o local onde atuam (Santos et al., 2017).

A HSP70 pode ser subdividida em quatro tipos (Santos et al., 2017), sendo eles: HSP72 kDa (HSPA), que apresenta resposta ao estresse induzido (não fisiológico), com um aumento significativo dos seus níveis até seis horas após a exposição aos fatores estressantes (Whitham & Fortes, et al., 2008), indução da resposta imune antitumoral (Rodríguez et al., 2009; Fujii et al., 2018) e a inflamação (Roy et al., 2014; Ikwegbue et al., 2017). A HSP73 kDa (HSPA8) é expressa constitutivamente em todas as células e está presente no citoplasma e núcleo (Beckmann et al., 1990), Facilita o dobramento de peptídeos, inibe a proliferação celular (Nirdé et al., 2010) e tem um papel importante na resposta inflamatória (Rodríguez et al., 2009). A HSP75 kDa (HSPA9) encontrada na mitocôndrias, atua na resposta ao estresse e regula o crescimento celular e metástase de carcinoma

epidermóide oral (Tsuneki et al., 2013) e HSP78 kDa (HSPA5) quando encontrado no retículo endoplasmático e atua na resistência a agentes antiangiogênicos (Kern et al., 2009).

Em condições celulares normais e sem estímulos estressores, as concentrações de HSP correspondem aos níveis comuns de síntese de proteínas normalmente encontradas nas células. Porém, em condições de estresse como, por exemplo, após a exposição a agentes tóxicos ambientais, as proteínas no interior da célula podem sofrer o desdobramento, excedendo a capacidade dos sistemas das chaperonas em evitar a desnaturação (Kakkar et al., 2014). Este estímulo induz aumento da expressão da HSP70, que consequentemente é secretada para o meio extracelular (Lim et al., 2013; Ranek et al., 2018).

Sabe-se que a HSP70 apresenta funções diferentes dependendo do local onde se encontra. Dentro da célula, a HSP70 tem a função de auxiliar no dobramento de outras proteínas em fase de síntese, fazendo com que elas alcancem sua conformação e função correta. A HSP70 pode ligar-se às proteínas desnaturadas para promover a degradação, além de regular respostas imunes (Bhardwaj et al., 2012; Mayer et al., 2013) e minimizar danos teciduais, auxiliando no reparo de tecido danificado e aumentando a resistência celular em várias comorbidades relacionadas a lesão cerebral, como o acidente vascular cerebral (Liebelt et al., 2010), doenças cardiovasculares (Cai et al., 2010; Ranek et al., 2018), diabetes gestacional (Santos et al., 2015), entre outras.

As HSPs são sintetizadas constantemente nos locais de inflamação e secretadas, pelas células sob estresse, para o espaço extracelular (Zonneveld-Huijssoon et al., 2013). Fora da célula, a HSP 70 estimula a expressão de genes pró-

inflamatórios, pois tem a capacidade de se ligar a receptores celulares com *toll like* (TLR2 e TLR-4) em macrófagos, monócitos, neutrófilos (Wheeler et al. 2009), células epiteliais brônquicas (Abreu et al., 2018; Vitenberga & Pilmane, 2018), hepatócitos (Galloway et al. 2008; Huang et al., 2017). Além disso, a HSP70 extracelular atua como "*sinhal de perigo*", levando a ativação do sistema imune em uma resposta regulada (Lim et al., 2013).

De fato, as lesões celulares causadas pelo estresse não fisiológico podem liberar fatores endógenos como os DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*), pelas células danificadas e necróticas, resultando na indução da resposta inflamatória através da ligação aos receptores de reconhecimento padrão como os *toll like receptors* (Roy et al., 2014). As HSPs são consideradas uma das mais importantes DAMPs, podendo ligar-se a receptores celulares, ativando, assim, as células do sistema imune (van Eden et al., 2012). Portanto, as HSP70 podem modular tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa (Binder, 2014), liberando mediadores inflamatórios (proteases, leucotrienos, e citocinas) que promovem o recrutamento de células efectoras leucocitárias (Abraham & John, 2010). Esse processo pode ser prejudicial ao organismo, pois a inflamação exagerada e crônica pode levar à destruição de tecidos e morte celular (Roy et al., 2014).

Portanto, as HSPs apresentam papel protetor quando atuam dentro da célula, mas têm funções potencialmente deletérias quando liberadas no meio extracelular, pois podem iniciar ou manter o processo inflamatório no local onde estão sendo estimuladas (Quintana & Cohen, 2005; de Maio, 2011).

Relação entre HSP70 e as doenças causadas pelo cigarro

Estudos mostram o envolvimento da HSP70 com doenças respiratórias, sendo considerada como marcador para alterações na atividade do sistema imune, lesão celular e processo inflamatório (Xie et al., 2010; Dong et al., 2013; Cappello et al., 2015).

A proteína HSP70 é constitutivamente expressa em muitas linhagens de células tumorais, sendo correlacionada com o mau prognóstico em vários tipos de câncer (Murphy, 2013). Essa proteína desempenha um papel importante no desenvolvimento do tumor, como também na sobrevivência das células com defeito (Yaglom et al., 2007, Sherman, 2010, Leu et al., 2017). Estudo mostra que HSP70 intracelular é uma das proteínas responsáveis pelos efeitos anti-apoptóticos das células cancerígenas pulmonares, contribuindo para sobrevivência da célula. De modo que, a proliferação acelerada e o potencial de angiogênese de carcinomas pulmonares são induzidos pela HSP70, cuja expressão é regulada pela via de sinalização de PI3K / Akt (Nyman et al., 2011; Wan et al., 2016). Assim, inibidores farmacológicos da chaperona HSP70 foram desenvolvidos como agentes anticancerígenos assumindo um papel importante como parte da quimioterapia (Murphy, 2013).

Vários estudos clínicos relevantes apresentados em uma revisão da literatura mostram que os métodos quantitativos para a detecção de HSP70 têm sido utilizados para demonstrar a ligação dessa proteína como biomarcador de desenvolvimento de várias doenças. A HSP70 foi indicada por alguns estudos como parte da patogênese de doenças respiratórias como asma e DPOC (Qu et al., 2015).

Portanto, a condição asmática pode levar a expressão do gene HSP70 (Aron

et al., 1999; Tong & Luo, 2000). Em pacientes com asma brônquica persistente, a HSP70 fora da célula pode ser usada como marcador para avaliar o grau de obstrução das vias aéreas, sendo que os níveis aumentados dessa proteína correlacionam-se positivamente com a gravidade dos pacientes asmáticos (Hou et al., 2011). Além disso, grávidas asmáticas mostram níveis mais elevados da HSP70 em comparação com gestantes saudáveis (Tamási et al., 2010). Estes dados apoiam um papel importante da HSP70 plasmática no desenvolvimento da doença e na progressão da mesma.

Nesse sentido, (Dong et al., 2013) foi observado também aumento da expressão de HSP70 e IL-8 no tecido pulmonar não-tumoral de pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão e DPOC. Além disso, a expressão aumentada de ambas as proteínas correlacionou-se positivamente com a gravidade da doença obstrutiva.

Estudo recente avaliou os níveis de HSP70 no plasma e em linfócitos isolados do sangue periférico de trabalhadores em uma mineração de carvão e que foram diagnosticados com DPOC. Os resultados mostraram que os níveis plasmáticos de HSP70 foram maiores entre os pacientes com DPOC em comparação ao minerador sem DPOC e esses níveis estavam associados com o risco aumentado para o desenvolvimento da doença (Cui et al., 2015).

Estudo experimental (Xie et al. 2010), mostrou que a exposição de ratos *Wistar* à fumaça de cigarro pelo período de um mês estava relacionada ao aumento dos níveis de HSP70 no tecido pulmonar, ao passo que a exposição por três meses causou diminuição dos níveis dessa proteína. Dessa forma, os autores concluíram que a exposição a longo prazo aos produtos químicos do cigarro levam a redução da

expressão da HSP70 intracelular, pois existe mecanismo de adaptação do organismo aos estímulos tóxicos do cigarro (Xie et al., 2010).

Sabe-se que os componentes químicos da fumaça do cigarro também alteram a função celular por interagir com a molécula de DNA. Wu et al. (2013) demonstraram em estudo *in vitro* com células do músculo liso das vias aéreas humanas, ação genotóxica do cigarro e diminuição dos níveis de HSP70 intracelular. Além disso, os autores demonstraram que a diminuição dos níveis de HSP70 intracelular estava relacionada ao aumento dos níveis de danos no DNA, pois com os níveis menores da HSP70 no interior da célula, o mecanismo de proteção também diminui, favorecendo a ação das substâncias tóxicas do cigarro na ocorrência de danos no DNA. Entretanto, os dados a respeito da genotoxicidade do cigarro são controversos, associando (Husgafvel-Pursiainen, 2004; Hoffmann et al., 2005; Huang et al., 2013) ou não (Maluf et al., 2001; Hoffmann and Speit, 2005) o consumo de tabaco ao aumento dos níveis de danos no DNA.

Diante do exposto, propusemos avaliar o efeito do uso crônico do cigarro nos níveis séricos da proteína HSP 70 extracelular e seus anticorpos, a expressão gênica da *HSP70*, juntamente com os níveis de IL-8, quantidade de neutrófilos e dano no DNA, com o objetivo de melhor compreender os mecanismos envolvidos nos efeitos deletérios promovidos pelo uso do cigarro.

Nossa hipótese é que a HSP 70 possa ser um biomarcador precoce de alterações que possam estar ocorrendo devido à exposição prolongada aos produtos químicos do cigarro, de modo que, essas alterações influenciam, também, nos níveis de inflamação sistêmica e consequentemente na ação das células de defesa em fumantes crônicos assintomáticos. Assim, os resultados desse estudo poderão abrir

caminhos para novas pesquisas e contribuir para a elucidação dos mecanismos moleculares relacionados aos processos patológicos promovidos pelo tabagismo, possibilitando o desenvolvimento de novas terapias e a detecção precoce de doenças relacionadas ao cigarro.

Referências Bibliográficas

Abraham SN, St John AL. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(6):440-52.

Abreu PL, Cunha-Oliveira T, Ferreira LMR, Urbano AM. Hexavalent chromium, a lung carcinogen, confers resistance to thermal stress and interferes with heat shock protein expression in human bronchial epithelial cells. *Biometals*. 2018, 16.

Aron Y, Busson M, Polla BS, Dusser D, Lockhart A, Swierczewski E, Favatier F. Analysis of hsp70 gene polymorphism in allergic asthma. *Allergy*. 1999; 54(2):165-70.

Asma S, Song Y, Cohen J, Eriksen M, Pechacek T, Cohen N, Iskander J; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC Grand Rounds: global tobacco control. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014 Apr 4;63(13):277-80.

Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2008; 11(1):1-15.

Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*. 1990; 248(4957):850-4.

Bernardo I, Bozinovski S, Vlahos R. Targeting oxidant-dependent mechanisms for the treatment of COPD and its comorbidities. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2015; 11(1):1-15.

Bhardwaj N, Dormer J, Ahmad F, Strickland AD, Gravante G, Beckingham I, West K, Dennison AR, Lloyd DM. Heat shock protein 70 expression following hepatic radiofrequency ablation is affected by adjacent vasculature. *J Surg Res.* 2012; 173(2):249-57.

Binder RJ. Functions of heat shock proteins in pathways of the innate and adaptive immune system. *J Immunol.* 2014; 193(12):5765-71.

Brasil, Ministério do planejamento, Orçamento e Gestão; Instituto Brasileiro de Geografia e estatística; Diretoria de pesquisa; Condição de trabalho e rendimento. Pesquisa Nacional de Saúde 2013; Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. 2014. Acessado em: 08 de maio de 2017. Disponível em <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv91110.pdf>

Brasil. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2016 Saúde Suplementar : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Saúde Suplementar. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017. 157 p. Acessado em 18 de abril de 2018. Disponível em http://ans.gov.br/images/Vigitel_Saude_Suplementar.pdf

Cai WF, Zhang XW, Yan HM, Ma YG, Wang XX, Yan J, Xin BM, Lv XX, Wang QQ, Wang ZY, Yang HZ, Hu ZW. Intracellular or extracellular heat shock protein 70 differentially regulates cardiac remodelling in pressure overload mice. *Cardiovasc Res.* 2010; 88(1):140-9.

Cappello F, Macario AJ, Di Stefano A. Hsp27 and Hsp70 in chronic

obstructive pulmonary disease: certainties vs doubts. *Cell Stress Chaperones*. 2015; 20(5):721-3.

Carter BD, Abnet CC, Feskanich D, Freedman ND, Hartge P, Lewis CE, Ockene JK, Prentice RL, Speizer FE, Thun MJ, Jacobs EJ. Smoking and mortality—beyond established causes. *N Engl J Med*. 2015 Feb 12;372(7):631-40.

Cui X, Xing J, Liu Y, Zhou Y, Luo X, Zhang Z, Han W, Wu T, Chen W. COPD and levels of Hsp70 (HSPA1A) and Hsp27 (HSPB1) in plasma and lymphocytes among coal workers: a case-control study. *Cell Stress Chaperones*. 2015; 20(3):473-81.

de Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles and the stress observational system. A form of communication during injury, infection and cell damage. *Cell Stress Chaperones* 2011; 16:235–249

de Moura CS, Lollo PC, Morato PN, Carneiro EM, Amaya-Farfan J. Whey protein hydrolysate enhances the exercise-induced heat shock protein (HSP70) response in rats. *Food Chem*. 2013;136(3-4):1350-7.

Dong J, Guo L, Liao Z, Zhang M, Zhang M, Wang T, Chen L, Xu D, Feng Y, Wen F. Increased expression of heat shock protein 70 in chronic obstructive pulmonary disease. *Int Immunopharmacol*. 2013; 17(3):885-93.

Eriksen M, Mackay J, Schluger N, Gomeshtapeh F, Drope J. The tobacco atlas. 5th ed. Brighton, United Kingdom: American Cancer Society; 2015. Acessado em 19 de abril de 2018. Disponível em <http://www.tobaccoatlas.org>

Fagundes LGS, Martins MG, Magalhães SEM, Palmiéri PCR, Júnior SIS. Políticas de saúde para o controle do tabagismo na América Latina e Caribe: uma revisão integrativa. *Ciência & Saúde Coletiva* 2014; 19(2):499-510.

Fujii K, Suzuki N, Jimura N, Idogawa M, Kondo T, Iwatsuki K, Kanekura T. HSP72 functionally inhibits the anti-neoplastic effects of HDAC inhibitors. *J Dermatol Sci.* 2018; 90(1):82-89.

Galloway E, Shin T, Huber N, Eismann T, Kuboki S, Schuster R, Blanchard J, Wong HR, Lentsch AB. Activation of hepatocytes by extracellular heat shock protein 72. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 95(2):514-20.

Gardi C, Valacchi G. Cigarette smoke and ozone effect on murine inflammatory responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2012; 1259:104–111

Ghoorah K, De Soyza A, Kunadian V. Increased cardiovascular risk in patients with chronic obstructive pulmonary disease and the potential mechanisms linking the two conditions: a review. *Cardiol Rev.* 2013; 21(4):196–202

Gonçalves RB, Coletta RD, Silvério KG, Benevides L, Casati MZ, da Silva JS, Nociti FH Jr. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res.* 2011; 60(5):409-24.

Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol.* 2001; 14(7):767-90.

Hoffmann H, Högel J, Speit G. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis.* 2005; 20(6):455-66.

Hoffmann H, Speit G. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res.* 2005; 581(1-2):105-14.

Holz O, Seiler T, Karmeier A, Fraedrich J, Leiner H, Magnussen H, et al.

Assessing airway inflammation in clinical practice -experience with spontaneous sputum analysis. BMC Pulm Med. 2008; 28:5.

Hou C, Zhao H, Li W, Liang Z, Zhang D, Liu L, Tong W, Cai SX, Zou F. Increased heat shock protein 70 levels in induced sputum and plasma correlate with severity of asthma patients. Cell Stress Chaperones. 2011; 16(6):663-71.

Hsiao HM, Sapinoro RE, Thatcher TH, Croasdell A, Levy EP, Fulton RA, Olsen KC, Pollock SJ, Serhan CN, Phipps RP, Sime PJ. A novel anti-inflammatory and pro-resolving role for resolvin D1 in acute cigarette smoke-induced lung inflammation. PLoS One. 2013; 8(3):e58258.

Huang J, Okuka M, Lu W, Tsibris JC, McLean MP, Keefe DL, Liu L. Telomere shortening and DNA damage of embryonic stem cells induced by cigarette smoke. Reprod Toxicol. 2013; 35:89-95.

Huang BP, Lin CS, Wang CJ, Kao SH. Upregulation of heat shock protein 70 and the differential protein expression induced by tumor necrosis factor- α enhances migration and inhibits apoptosis of hepatocellular carcinoma cell HepG2. Int J Med Sci. 2017; 14(3):284-293.

Husgafvel-Pursiainen, K. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. Mutat. Res. 2004, 567, 427–445.

Ikwegbue PC, Masamba P, Oyinloye BE, Kappo AP. Roles of Heat Shock Proteins in Apoptosis, Oxidative Stress, Human Inflammatory Diseases, and Cancer. Pharmaceuticals (Basel). 2017 Dec 23;11(1).

Instituto Nacional de Câncer (INCA). Tabagismo custa R\$ 56,9 bilhões por ano ao Brasil. Acessado em 18 de abril de 2018. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2017>

Jha P. Avoidable deaths from smoking: a global perspective. *Public Health Rev.* 2012, 33: 569–600.

Johannsen A, Susin C, Gustafsson A. Smoking and inflammation: evidence for a synergistic role in chronic disease. *Periodontol 2000.* 2014; 64(1):111-26.

Kakkar V, Meister-Broekema M, Minoia M, Carra S, Kampinga HH. Barcoding heat shock proteins to human diseases: looking beyond the heat shock response. *Dis Model Mech.* 2014; 7(4):421-34.

Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones.* 2009; 14(1):105-11.

Kern J, Untergasser G, Zenzmaier C, Sarg B, Gastl G, Gunsilius E, Steurer M. GRP-78 secreted by tumor cells blocks the antiangiogenic activity of bortezomib. *Blood.* 2009; 114(18):3960-7.

Kozlowski LT, Abrams DB. Obsolete tobacco control themes can be hazardous to public health: the need for updating views on absolute product risks and harm reduction. *BMC Public Health.* 2016; 16:432.

Leu JI, Barnoud T, Zhang G, Tian T, Wei Z, Herlyn M, Murphy ME, George DL. Inhibition of stress-inducible HSP70 impairs mitochondrial proteostasis and function. *Oncotarget.* 2017; 8(28):45656-45669.

Lim WK, Kanelakis KC, Neubig RR. Regulation of G protein signaling by the 70 kDa heat shock protein *Cell Signal.* 2013; 25(2): 389–396

Liu Y, Gao W, Zhang D. Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor-beta1 in a coculture

system. Clin Exp Med. 2009; 10(3):159–167.

Liebelt B, Papapetrou P, Ali A, Guo M, Ji X, Peng C, Rogers R, Curry A, Jimenez D, Ding Y. Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated-kinase 1/2. Neuroscience. 2010; 166(4):1091-100.

Maluf SW, Passos DF, Bacelar A, Speit G, Erdtmann B. Assessment of DNA damage in lymphocytes of workers exposed to Xradiation using the micronucleus test and the comet assay. Environ. Mol. Mutagen. 2001; 38:311–315.

Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. Trends Biochem Sci. 2013; 38(10):507-14.

Messner B, Frotschnig S, Steinacher-Nigisch A, Winter B, Eichmair E, Gebetsberger J, Schwaiger S, Ploner C, Laufer G, Bernhard D. Apoptosis and necrosis: two different outcomes of cigarette smoke condensate-induced endothelial cell death. Cell Death Dis. 2012; 3:e424.

Mohamed Hoesein FA, Zanen P, de Jong PA, van Ginneken B, Boezen HM, Groen HJ, Oudkerk M, de Koning HJ, Postma DS, Lammers JW. Rate of progression of CT-quantified emphysema in male current and ex-smokers: a follow-up study. Respir Res. 2013; 14:55.

Murphy ME. The HSP70 family and cancer. Carcinogenesis. 2013; 34(6):1181-8.

Newkirk MM, Mitchell S, Procino M, Li Z, Cosio M, Mazur W, Kinnula VL, Hudson M, Baron M, Fritzler MJ, El-Gabalawy HS. Chronic smoke exposure induces rheumatoid factor and anti-heat shock protein 70 autoantibodies in susceptible mice and humans with lung disease. Eur J Immunol. 2012; 42(4):1051-61.

Nirdé P, Derocq D, Maynadier M, Chambon M, Basile I, Gary-Bobo M, Garcia M. Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells. *Oncogene*. 2010; 29(1):117-27.

NHLBI/WHO. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, manage and prevention of chronic obstructive lung disease. Bethesda: National Heart. Lung and Blood Institute 2003.

Nyman U, Muppani NR, Zhivotovsky B, Joseph B. Hsp72 mediates TAp73 α anti-apoptotic effects in small cell lung carcinoma cells. *J Cell Mol Med*. 2011; 15(8):1757-68.

Pinto E, Cruz M, Ramos P, Santos A, Almeida A. Metals transfer from tobacco to cigarette smoke: Evidences in smokers' lung tissue. *J Hazard Mater*. 2017; 325:31-35.

Qu B, Jia Y, Liu Y, Wang H, Ren G, Wang H. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress Chaperones*. 2015; 20(6):885-92.

Quintana FJ, Cohen IR. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J Immunol* 2005; 175:2777-82.

Ranek MJ, Stachowski MJ, Kirk JA, Willis MS. The role of heat shock proteins and co-chaperones in heart failure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018; 373(1738).

Rodman A. Perfetti TA. The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke. (2nd ed.) CRC Press (2013).

Rodríguez LS, Barreto A, Franco MA, Angel J. Immunomodulators released during rotavirus infection of polarized caco-2 cells. *Viral Immunol*. 2009; 22(3):163-

Roy A, Ganesh G, Sippola H, Bolin S, Sawesi O, Dagälv A, Schlenner SM, Feyeraabend T, Rodewald HR, Kjellén L, Hellman L, Åbrink M. Mast cell chymase degrades the alarmins heat shock protein 70, biglycan, HMGB1, and interleukin-33 (IL-33) and limits danger-induced inflammation. *J Biol Chem.* 2014; 289(1):237-50.

Santos TM, Sinzato YK, Gallego FQ, Iessi IL, Volpato GT, Dallaqua B, Damasceno DC. Extracellular HSP70 levels in diabetic environment in rats. *Cell Stress Chaperones.* 2015; 20(4):595-603.

Santos TG, Martins VR, Hajj GNM. Unconventional Secretion of Heat Shock Proteins in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(5).

Sherman M. Major heat shock protein Hsp72 controls oncogene-induced senescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1197:152-7.

Shiels MS, Katki HA, Freedman ND, Purdue MP, Wentzensen N, Trabert B, Kitahara CM, Furr M, Li Y, Kemp TJ, Goedert JJ, Chang CM, Engels EA, Caporaso NE, Pinto LA, Hildesheim A, Chaturvedi AK. Cigarette smoking and variations in systemic immune and inflammation markers. *J Natl Cancer Inst.* 2014; 106(11). pii:dju294.

Tang D, Khaleque MA, Jones EL, Theriault JR, Li C, Wong WH, Stevenson MA, Calderwood SK: Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. *Cell Stress Chaperones* 2005; 10(1):46-58.

Tamási L, Bohács A, Tamási V, Stenczer B, Prohászka Z, Rigó J Jr, Losonczy G, Molvarec A. Increased circulating heat shock protein 70 levels in

pregnant asthmatics. *Cell Stress Chaperones*. 2010; 15(3):295-300.

Tanni SE, Pelegrino NRG, Angeleli AYO, Correa C, Godoy I. Smoking status and tumor necrosis factor- α mediated systemic inflammation in COPD patients. *J Inflamm* 2010; 9:7-29.

Tong W, Luo W. Heat shock proteins' mRNA expression in asthma. *Respirology*.2000; 5(3):227-30.

Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, Xu B, Essa A, Abé T, Babkair H, Cheng J, Yamamoto T, Saku T. Extracellular heat shock protein A9 is a novel interaction partner of podoplanin in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 434(1):124-30.

U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking – 50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2014. Acessado em 08 de novembro de 2017. Disponivel em https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/sgr/50th-anniversary/pdfs/executive-summary-spanish.pdf

Xie J, Zhao J, Xiao C, Xu Y, Yang S, Ni W. Reduced heat shock protein 70 in airway smooth muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res*. 2010; 36(4):219-26.

Wan J, Wu W, Huang Y, Ge W, Liu S. Incomplete radiofrequency ablation accelerates proliferation and angiogenesis of residual lung carcinomas via HSP70/HIF-1 α . *Oncol Rep*. 2016; 36(2):659-68.

Wheeler DS, Chase MA, Senft AP, Poynter SE, Wong HR, Page K.

Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. *Respir Res.* 2009;10:31.

Whitham M, Fortes MB. Heat shock protein 72: release and biological significance during exercise. *Front Biosci.* 2008;13:1328-39.

WHO report on the global tobacco epidemic, 2015: raising taxes on tobacco. © World Health Organization 2015. Acessado em 06 de dezembro de 2016. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/178574/1/9789240694606_eng.pdf?ua=1&ua=1

WHO report on the global tobacco epidemic, 2017: monitoring tobacco use and prevention policies. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Acessado em 17 de abril de 2018. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255874/9789241512824_eng.pdf?sequence=1

WHO, Tobacco. Fact sheet; Updated March 2018. Acessado em 17 de abril de 2018. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>

Wu XJ, Luo GX, Zeng X, Lan LL, Ning Q, Xu YJ, Zhao JP, Xie JG. Genotoxicity and reduced heat shock protein 70 in human airway smooth muscle cells exposed to cigarette smoke extract. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2013; 33(6):827-33.

Yaglom JA, Gabai VL, Sherman MY. High levels of heat shock protein Hsp72 in cancer cells suppress default senescence pathways. *Cancer Res.* 2007 Mar 1;67(5):2373-81.

van Eden W, Spiering R, Broere F, van der Zee R. A case of mistaken identity: HSPs are no DAMPs but DAMPERs. Cell Stress Chaperones. 2012; 17(3):281-92.

Vitenberga Z, Pilmane M. Age-related lung tissue remodeling due to the local distribution of MMP-2, TIMP-2, TGF- β and Hsp70. Biotech Histochem. 2018;12:1-10.

Zonneveld-Huijssoon E, Albani S, Prakken BJ, van Wijk F. Heat shock protein bystander antigens for peptide immunotherapy in autoimmune disease. Clin Exp Immunol. 2013; 171(1):20-9.

Capítulo II

Mechanisms of non-physiological stress caused by cigarette smoking and their relationship with pulmonary disease development

Authors:

Thyego Mychell Moreira Santos¹; João Paulo Castro Marcondes²; Daisy Maria Favero Salvadori²; Suzana Erico Tanni³; Felip Burgos⁴⁻⁵; Carlos Andrés Jiménez-Ruiz⁶; Ilda Godoy¹

¹*Departament of Nursing, Botucatu Medical School, Unesp – State University of São Paulo, Botucatu, SP, Brazil.*

²*Departament of Pathology, Botucatu Medical School, Unesp – State University of São Paulo, Botucatu, SP, Brazil.*

³*Departament of Medical Clinic, Botucatu Medical School, Unesp – State University of São Paulo, Botucatu, SP, Brazil.*

⁴*Hospital Clinic de Barcelona, IDIBAPS, Universitat de Barcelona.*

⁵*Center for Biomedical Network Research in Respiratory Diseases (CIBERES), Barcelona.*

⁶*Smoking Cessation Service, Region of Madrid, Madrid, Spain.*

Acknowledgement: Fapesp financial institution for encouraging the development of research (process nº2014/1798-3)

Corresponding author: *Thyego Mychell Moreira Santos¹; Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, Brasil. Phone: (+55) 14 991043232; .*

Abstract

Smoking is responsible for the largest number of preventable deaths in the world, and is related to the development of several diseases, mainly chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Thus, the search for early biomarkers of such diseases becomes relevant for their identification and for successful therapy.

The objectives of our study were to evaluate the concentration of heat shock protein 70 (HSP70), expression of the HSP70 gene, anti-HSP70 auto antibodies, the systemic inflammatory marker through cytokine interleukin-8 (IL-8) and CPR, immunological changes and DNA damage in peripheral blood of chronic asymptomatic smokers and non-smokers.

Our results showed increased serum concentrations of HSP70, anti-HSP70, IL-8, CPR and neutrophils, and DNA damage in blood cells of smokers than in non-smokers. Therefore, cigarette smoking was confirmed as a noxious agent on physiological and molecular parameters associated with the risk for developing COPD and other lung diseases.

Based on the data we suggest that HSP70 can be responsible for the increased levels of inflammatory cytokines, and consequently, the increased influx of neutrophils into the lungs and increased DNA damages e anti-HSP70 auto antibodies.

Introduction

Cigarette smoke contains more than 7,000 substances, most of them toxic to the human organism [1]. It has been shown that these compounds are able to initiate and promote oxidative damage, leading to various lung degenerative diseases, cardiovascular disease and different types of cancer [2]. Among the diseases caused by cigarette smoking, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one the most important [3]. Smoking is associated with changes at systemic levels (immune processes and inflammation) [4], in response to the toxic agents. However, this process goes beyond the beneficial effects, because repeated exposures to toxic substances and chronic inflammation leads to injury of lung cells by the immune system [5].

The molecular mechanisms by which cigarette smoke promotes the development of diseases have not been fully elucidated. There are few studies about cigarette smoking activity causing non-physiological stress. Usually, when cells are exposed to non-physiological insults and to some environmental agents, natural defense increases, including the synthesis of a small group of proteins called Heat Shock Proteins [6]. The Heat Shock Protein 70 (HSP70), may present a protective role when acting within the cell, as well as potentially deleterious functions when secreted outside cells, because where it is stimulated it can initiate or maintain the inflammatory process, causing cell death [7]. The relationship between this protein and pulmonary diseases has been demonstrated by studies that showed the involvement of HSP70 with COPD [8, 9]. Therefore, we hypothesized that cigarette smoking can increase the levels of HSP70 in smokers and their anti-HSP70 auto antibodies, and that this protein is linked to increased inflammatory processes and

neutrophil stimulation, causing pulmonary lesions and the development of diseases such as COPD.

In summary, the objectives of our study were to evaluate the concentration and expression of *HSP70*, anti-*HSP70* levels, systemic inflammatory marker through cytokine IL-8, immunological changes and DNA damage in the peripheral blood of chronic asymptomatic smokers and non-smokers.

Methods

Subjects

The study included 40 active smokers with previous cigarette consumption for greater than 10 years (estimated as packet/years) and without diagnosis of any disease. Subjects were consecutively selected, among those who were followed at the Smoking Cessation Ambulatory Service of the Clinical Hospital of Botucatu / SP/Brazil. Additionally, 40 non-smokers were recruited as the control group. These were selected from among the residents of the city of Botucatu, through informative posters of the research. Individuals in the control group were questioned regarding passive smoking.

The study included only individuals who presented the results of biochemical tests (lipidogram (total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL) and triglycerides), fasting glycemia, insulin, and C-reactive protein (CRP) measured after fasting for 12 hours), blood count (hemoglobin, hematocrit, leukocytes), and spirometry within the values of normality. All procedures were performed according to the criteria established by the Pulmonary Function Laboratory of the Botucatu Clinical Hospital by the automated method (Vitros 950

(Johnson & Johnson) and CELL-DNY Ruby).

Hematological examinations were performed on whole blood samples by counting white blood cells, red blood cells and platelets using automated CELL-DNY Ruby equipment (version 2.1). Biochemicals were performed on serum samples using dry chemistry using the Vitros 950 automated system (Johnson & Johnson).

Patients with a diagnosis of acute or chronic disease, those who used corticosteroids in the last week and illicit drug users were not included in the study. The study protocol was approved by the local ethics committee, and written informed consent was obtained from each subject.

Clinical and lung function assessments

The clinical evaluation of the selected individuals consisted of anamnesis, physical examination and laboratory tests. Attestation of non-use of the cigarette (control group) and active smoking was performed by means of carbonless carbon monoxide emissions (Micro+Smokerlyzer, Bedfont, England, UK). Pulse oximetry (SpO₂) was performed on all subjects using the Onyx portable oximeter (Model 9500 Oximeter; Nonin Medical Inc., Minneapolis, MN, USA). Spirometry was performed through a computerized pulmonary function system (Koko® Spirometer, PDS Instrumentation, Louisville, EUA), according to the criteria of the American Thoracic Society / European Respiratory Society task force guidelines [10]. Forced Vital Capacity (FVC), Forced Expiratory Volume in the first second (FEV₁) and the relationship between the two parameters were calculated following the reference values of Pereira and collaborators [11].

Analysis of HSP70 by the ELISA technique

Dosages of the HSP70 protein (HSP70/HSPA1A, ELISA kit 1 x 96 wells, DuoSet Ancillary Reagent Kit, R&D a bio-technique brand, United Kingdom) were performed in duplicate by means of immunoenzymatic assays, according to the manufacturer's protocol. The experiment was conducted according to the manufacturer's protocol. Briefly, this technique corresponds to solid phase sandwich ELISA, where the cells of the microplate are covered by antibody specific for the protein studied.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Isolation of peripheral blood mononuclear cells (lymphocytes and monocytes) was performed using culture medium (RPMI 1640) and Ficoll-Paque® (Amersham Biosciences).

In summary, a falcon-type tube containing 3 ml of Ficoll was used, which was added 3 ml of whole blood mixed with 3 ml of RPMI and then subjected to centrifugation at 2500 rpm, 4°C for 30 minutes. The leukocyte layer was removed, homogenized in 3 ml of RPMI and again subjected to centrifugation at 1500 rpm for 15 minutes. The supernatant was discarded, and the sediment located at the bottom of the tube (containing mononuclear cells) was resuspended, aliquoted in cryopreservation solution (60% RPMI 1640 medium, 10% fetal bovine serum and 10% DMSO) and stored at -80 ° C.

Comet assay (single cell gel electrophoresis assay)

The comet assay (alkaline version) was carried out according to Tice [12], with some modifications [13]. Aliquots of 60 µl mononuclear cells (lymphocytes and

monocytes) were mixed at 120 μ l low melting point agarose at 0.5% (37 ° C) and placed on pre-coated glass sheet with a 1.5% normal melting point agarose layer. The slides were left at 4 ° C for 5 minutes for polymerization of the agarose. Subsequently, the coverslips were removed and the slides were incubated in lysis solution (2.5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TrisHCl, 1% N-lauroyl sarcosinate, 1% Triton X-100 and 10% DMSO) at 4 ° C overnight. Electrophoresis was conducted in the same alkaline buffer at 4°C, for 20 min, at 25 V (0.86 V cm⁻¹) and 300 mA. After electrophoresis, the slides were neutralized in 0.4 M Tris-HCl (pH 7.5) solution for 15 min, fixed with absolute ethanol and stored at room temperature until analysis. All steps were conducted in the dark to prevent any additional DNA damage. The slides were stained with SYBR Gold (1:10,000; Invitrogen, NY), immediately before analysis. Cell viability was assessed using the trypan blue (0.4% trypan blue; Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) exclusion test, and was never below 90%. A total of 150 randomly selected nucleoids per treatment were analysed under 400 $\times$ magnification, in a fluorescence microscope connected to an image analysis system (Comet Assay IV, Perceptive Instruments; Suffolk, Haverhill, UK). Tail intensity (% DNA in tail) was used to estimate DNA damage. The slides were prepared in duplicate from three independent treatments.

Quantification of IL-8 cytokines by flow cytometry

The Cytometric beads array (BD) - Human Inflammatory Cytokines (Cat. 551811, Becton Dickinson BD) was used to quantify the IL-8 proinflammatory cytokine in the serum of all study participants. Briefly, bead with specific

fluorescence intensities for IL-8 was conjugated to a cytokine-specific capture antibody forming the CBA, which were read on the FACSCalibur (Becton Dickinson and Company, USA) cytometer. The bead was identified according to their respective fluorescence intensities. In CBA, the capture bead of each evaluated cytokines was mixed with the detection antibody conjugated with the fluorochrome PE, and then incubated with the samples to form the "sandwich" assay. The acquisition tubes were prepared with: 50 µL of sample, 50 µL of the beads mixture and 50 µL of the detection reagent, and the same procedure was used to reconstitute the standard curve. After that, the tubes were homogenized and incubated in the dark at a temperature for three hours. CellQuest (BD) software was used to generate the results which were expressed in pg / ml.

HSP70 gene expression

The RNA isolation was performed by blood collection in a PAXgene Blood RNA tube (PreAnalytiX QIAGEN / BD, Hombrechtikon, Switzerland). Total mRNA was isolated using the PAXgene Blood RNA® kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The mRNAs were reverse-transcribed to cDNA using the high capacity cDNA reverse transcription kit and TaqMan® expression Assays mRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, USA), respectively. The cDNA was used as a template for quantitative real-time PCR (qPCR), with specific human primers for *HSP70* (Hs00359163_s1) and endogenous Control *ACTB* gene (Hs99999903_m1). Each tube contained 2 µL cDNA template, 5 µL Master Mix TaqMan 2X (Applied Biosystems) and 0.5 µL of 20× primers/probe (Assays-

onDemand gene expression products; Applied Biosystems). The reaction was performed using the following thermal cyclers conditions: 94°C for 10 min followed by 40 cycles at 94°C for 30 s and 60°C for 1 min. Fluorescence data were collected during each annealing/extension step. The reactions were performed using the Applied Biosystems 7500 FAST RealTime PCR System and the SDS software, version 1.2.3 (Sequence Detection Systems 1.2.3, 7500 Real-Time PCR Systems; Applied Biosystems). For every PCR sample, a negative (no template) control was processed as a routine control. Relative gene expression data were analysed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen 2001). Each silibinin treatment was performed in triplicate.

Statistical analyses

Data are presented as mean (standard deviation) and median (interquartile range), when appropriate. Data were checked for normality and parametric (t-test) or nonparametric (gamma distribution) tests were used for group comparisons. Statistical correlation of the main data was assessed via Pearson correlation. 'We performed multiple linear regression analysis to description of prediction models. P-values <0.05 were considered statistically significant. SAS Statistics (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA, V.9.3) was used for all analyses.

Results

The study included 80 subjects, divided into two groups, a smoking group (males n = 20 and females n = 20, mean age 36 ± 8.39 years) and non-smoking group (males n = 20 and females n = 20, mean age 35 ± 7.8 years), matched by sex and age

(± 2 years). The clinical characteristics of the individuals are described in Table 1. Significant increase of carbon monoxide in exhaled air ($p < 0.001$) and decreased peak expiratory flow ($p = 0.006$) and oxygen saturation ($p < 0.001$) were observed in the smoking group in relation to the control.

Table 1. Clinical characteristics of the study population

	Smokers (n = 40)	Non-smoking (n = 40)	p value
Gender M/F (n)	20/20	20/20	-
Age (years)	36 $\pm$ 8.39	35 $\pm$ 7.89	-
BMI (kg/m²)	23.27 $\pm$ 4.23	23.95 $\pm$ 2.94	0.40
COex (ppm)	11.32 $\pm$ 5.20	1.22 $\pm$ 1.07	<0.001*
PEF (L/min)	430.8 $\pm$ 130.3	508 $\pm$ 116.2	0.006*
SPO₂ at rest (%)	97.50 $\pm$ 0.93	98.17 $\pm$ 0.71	<0.001*
FEV₁ (Liter)	4.15 $\pm$ 0.92	4.37 $\pm$ 1.07	0.34
FEV₁ (% of predicted)	98.87 $\pm$ 10.72	98.70 $\pm$ 11.97	0.94
FVC (Liters)	3.41 $\pm$ 0.74	3.65 $\pm$ 0.75	0.16
FVC (% of predicted)	97.50 $\pm$ 12.46	98.55 $\pm$ 9.33	0.67
FEV₁/FVC (%)	0.82 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.05	0.08

Values are presented as mean $\pm$ standard deviation. M: male; F: female; BMI: body mass index; CO: exhaled carbon monoxide in the lung; PEF: peak expiratory flow maximum; SpO₂: oxygen saturation; FEV₁: forced expiratory volume in the first second; FVC: forced vital capacity; * $p \leq 0.05$ for the Student T test.

Table 2 presents the results of the blood chemical tests performed in the sample studied. The smoking patients presented a significant increase of CRP ($p = 0.02$), leukocytes ($p < 0.001$) and neutrophils ($p < 0.001$) in peripheral blood when compared to the non-smoker group. There was a significant decrease in the HDL values (p

<0.001) in the smoking group in relation to non-smokers.

Table 2. Data of blood tests

	Smokers (n=40)	Non-smokers (40)	p value
Cholesterol (mg/dL)	180.4 ± 31.94	184.3 ± 29.68	0.57
Glucose (mg/dL)	83.00 ± 10.62	79.15 ± 11.20	0.11
HDL (mg/dL)	44.62 ± 11.25	57.15 ± 16.17	<0.001*
LDL (mg/dL)	114.70 ± 25.14	115.10 ± 27.14	0.95
CRP (mg/dL)	0.83 (0.5 – 1.0)	0.60 (0.5 – 0.7)	0.02**
Triglycerides (mg/dL)	105.6 ± 36+81	93.30 ± 41.04	0.16
Hemoglobin (g/dL)	15.06 ± 1.35	14.57 ± 1.36	0.10
Hematocrit (%)	44.33 ± 3.70	42.10 ± 6.04	0.05
Platelets (mm³)	255.40x10 ³ ± 6.91	264.40x10 ³ ± 43.45	0.45
Leukocytes (mm³)	9.97x10 ³ ± 2.60	6.10x10 ³ ± 1.36	<0.001*
Neutrophils (mm³)	4.79 ± 1.69	3.57 ± 0.91	<0.001*
Lymphocytes (mm³)	2.31 ± 0.74	2.04 ± 0,55	0.07
Monocytes (mm³)	0.38 ± 0.22	0.38 ± 0.21	0.97
Eosinophils (mm³)	0.26 ± 0.18	0.18 ± 0.09	0.84
Basophils (mm³)	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.95

Values are presented as mean ± standard deviation or median (quartile 1 - quartile 3). HDL: High density lipoproteins; LDL: Low density lipoproteins; CRP: C-Reactive Protein; * p≤0.05 for the t test or ** p ≤ 0.05 for the gamma test.

Figure 1 presents the extracellular HSP70 protein concentrations in serum samples from smokers and non-smokers. Data show a significant increase of HSP70 (2613.4±1675.5 vs 5149.9±6225.3; p = 0.01) in smokers compared to non-smokers. Non-significant difference was observed in the *HSP70* mRNA expression (1.23±1.06 vs 1.31±1.16; p = 0.77) in peripheral blood cells.

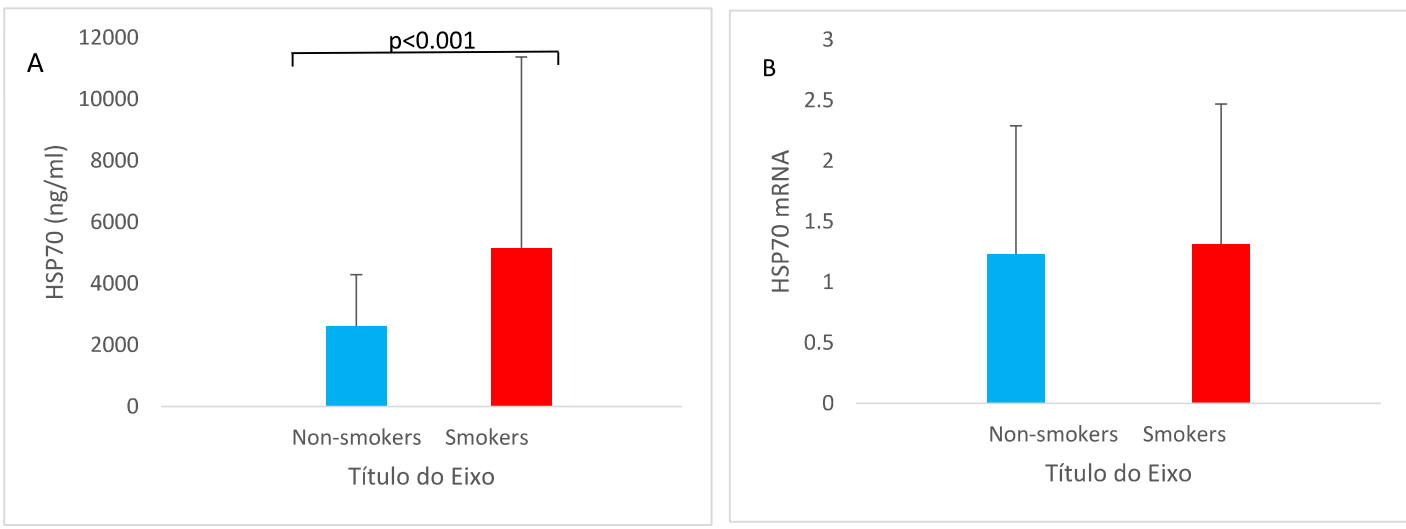


Figure 1. Serum levels of HSP70 (A) and expression of *HSP70* mRNA in peripheral blood cells (B) of smokers and non-smokers. Data presented as mean ± standard deviation.

Figure 2 presents the proinflammatory cytokine concentrations and DNA damage in blood samples collected from all subjects. Results showed a significant increase of IL-8 (6.93 ± 3.75 vs 9.56 ± 5.29 ; $p = 0.02$) and DNA damage (40.80 ± 13.89 vs 54.40 ± 10.07 ; $p < 0.001$) in smokers compared to non-smokers.

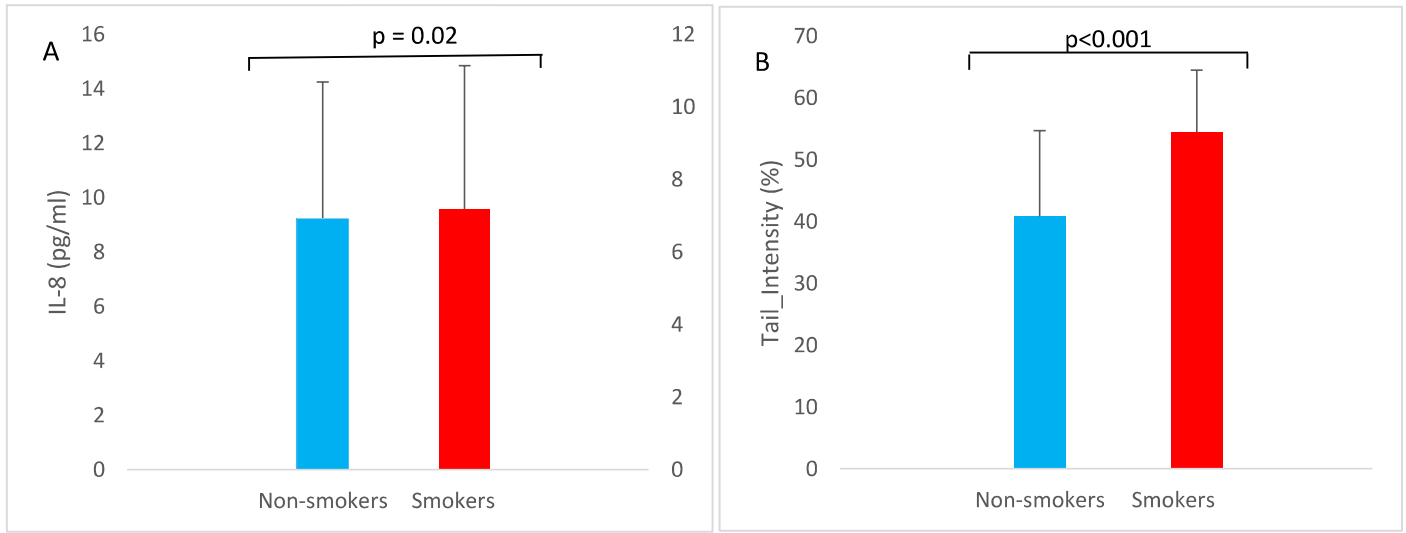


Figure 2. Serum concentrations of IL-8 (pg / ml) (A) and DNA damage (tail intensity) in lymphocytes (B) from smokers and non-smokers.

Figure 3 shows the levels of extracellular anti-HSP70 protein concentrations assessed in the serum from smokers and non-smokers. The data showed a significant increase in anti-HSP levels in the serum of smokers compared to non-smokers (582.0 ± 904.3 vs 256.2 ± 190.1 ; $p=0.03$).

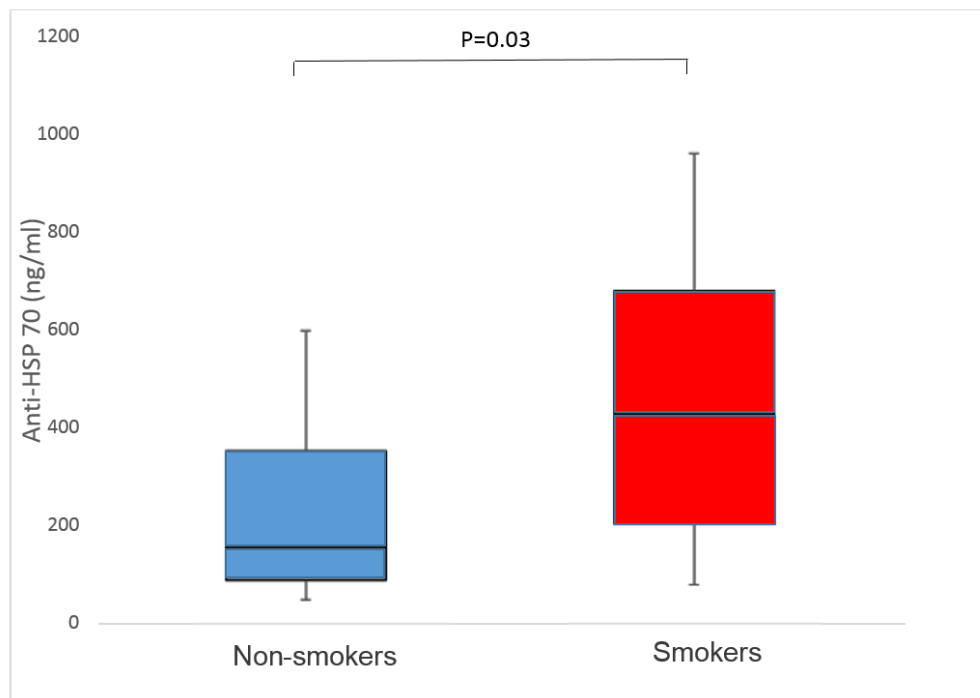


Figure 3. Analysis of the extracellular anti-HSP70 protein levels in the serum from smokers and non-smokers.

A network of interactions between the studied variables was created, based on Pearson correlation analysis. Figure 4 shows the statistically significant correlations. The most important data were the positive correlation between CO and HSP70, IL-8, neutrophils and leukocytes; between HSP70 and IL-8; IL-8 and DNA damage;

HSP70 mRNA expression and leukocytes; and leukocytes and neutrophils. No significant difference was observed between the number of cigarette packs per year or mean number of cigarettes consumed per day or the degree of cigarette dependence, and the mean of cigarettes consumed per day and degree of cigarette dependence in relationship *HSP70*, *HSP70* mRNA expression, IL-8, DNA damage, neutrophils and leukocytes.

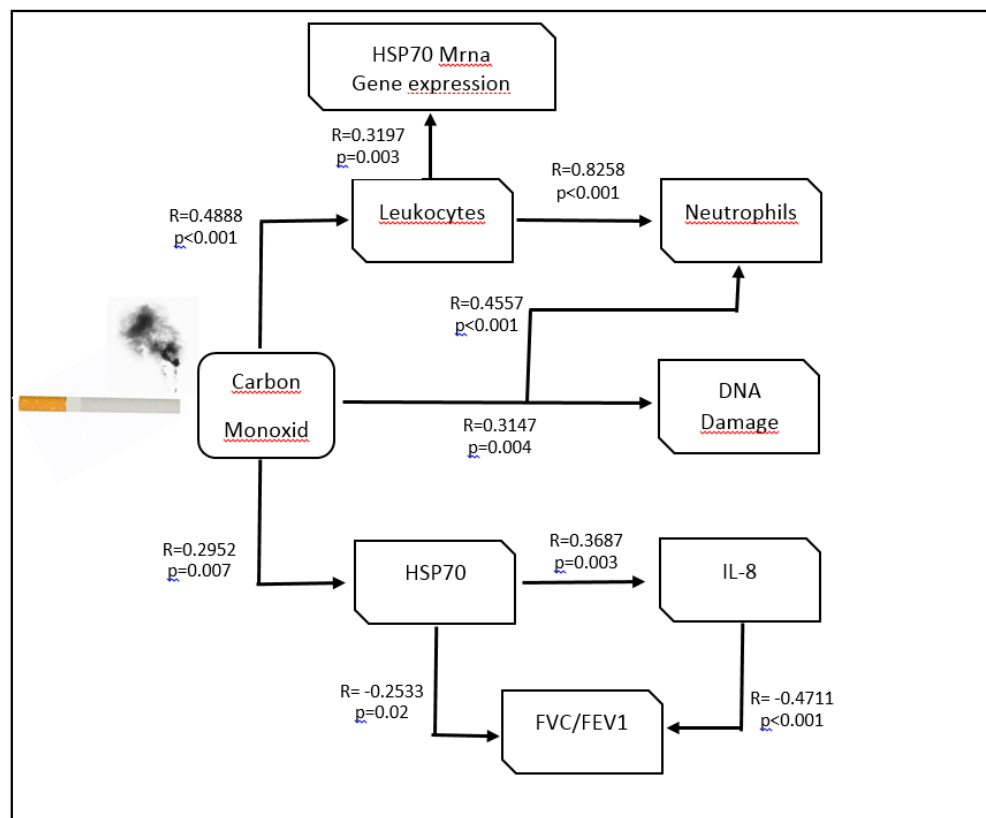


Figure 4. Flowchart showing the network among the main variables analyzed using the Pearson correlation. Data are expressed with R and p values.

Table 3 shows the analysis of the predictors of non-physiological stress caused by cigarette chemicals. It was possible to observe a positive association between the level of *HSP70* and IL-8 ($p = 0.0001$); IL-8 and neutrophils ($p = 0.01$)

and IL-8 and DNA damage ($p = 0.004$). The model presented by linear regression was constructed and demonstrated according to our hypothesis.

Table 3. Description of prediction models

Dependent Variable	Variable	Parameter Estimation (95% IC)	p value
HSP70 ($R^2 = 0.36$)	Intercept	-1480.487(-10393 – 7431.866)	0.74
	Carbon monoxide	86.914 (-88.912 – 262.742)	0.32
IL-8 ($R^2 = 0.46$)	Intercept	6.996 (-3.295 – 17.288)	0.17
	Carbon monoxide	0.064 (-0.190 – 0.319)	0.61
	HPS70	0.0005 (0.0002 – 0.0008)	0.0001*
Neutrophil ($R^2 = 0.77$)	Intercept	0.684 (-1.509 – 2.878)	0.53
	Carbon monoxide	0.002 (-0.051 – 0.055)	0.93
	IL-8	0.069 (0.012 – 0.127)	0.01*
DNA damage ($R^2 = 0.24$)	Intercept	35.583 (22.623 – 48.543)	<0.0001*
	Carbon monoxide	0.735 (-0.044 – 1.514)	0.06
	HPS70	-0.0008 (-0.0018 – 0.00007)	0.07
	IL-8	1.325 (0.431 – 2.220)	0.004*
	Neutrophils	-2.841 (-7.395 – 1.713)	0.21

IC: regression coefficient; * $p \leq 0.05$ for linear regression.

Discussion

Our results demonstrated that the compounds in cigarette smoke may lead to changes in physiological and molecular parameters, generating an imbalance of the

protective factors of the organism and consequent break in homeostasis. These findings were confirmed by the increased serum concentration of HSP70, anti-HSP70, IL-8, CRP and neutrophils. Such parameters might be linked with the risk of lung disease development.

These data, together with the results from previous studies allow us to suggest that the compounds in cigarette smoke have toxic effects and can be considered important factors in generating non-physiological stress. Indeed, in our study positive correlations were observed between exhaled CO levels and serum concentrations of HSP70, leukocytes, neutrophils and DNA damage. Similar results were reported in the literature, showing that carbon monoxide may increase the levels of antibodies against HSP70. The extent of DNA damage measured in lymphocytes was higher in workers from the high temperature and carbon monoxide-exposed groups [14]. Another study showed that the lung cells of rats exposed to cigarette compounds are able to increase the levels of HSP70 protein [15, 16].

In our study no significant difference was observed between the studied groups regarding the abundance of RNA message of the HSP70 protein. However, a study conducted in vitro on cells of human and rodent cell lines shows that tobacco smoke (TS) induces expression of HSP70 [17].

Another study showed that cigarette smoke water extract in primary human lung fibroblasts increased expression of *HSP70* and that HSP70 participates in the cigarette smoke-induced inflammatory process through the MAPK-EGR-1-HSP70 pathway [18]. Microarray analysis was used to carry out an unbiased survey of the differences in gene expression profiles in the alveolar macrophages of phenotypically normal, ~20 pack-year smokers compared to healthy nonsmokers, and this study

observed that 75 genes were modulated by smoking, among them is *HSP70* [19]. Smoking increases the genetic expression of *HSP70*, which can lead to the activation of signaling pathways that promote development of disease and chronic inflammation [20].

The increase of the intracellular HSP70 stimulates the cell to secrete it into the extracellular medium, by non-physiological stress stimulation, which leads to increased IL-8 synthesis by fibroblasts and pulmonary endothelial cells [18, 21]. Indeed, cigarette smoke is responsible for stimulating systemic inflammation, demonstrated by the increased levels of IL-8 and CRP, which may lead to increased levels of neutrophils in the blood of smokers [22, 23]. Our data are consistent with those from other studies demonstrating a clear increase of neutrophils [24, 25] IL-8 and CRP in smokers [26, 27].

Another factor that can explain the relationship between the substances present in cigarette smoke and the increase in inflammatory process is linked to oxidative stresses, and their ability to activate the intracellular signaling cascade that leads to increased IL-8 synthesis in the pulmonary epithelium [28, 29, 30]. The circulating neutrophils in the blood are subsequently recruited to the lungs by the action of IL-8 on the receptors CXCR1 and CXCR2 (C-X-C motif chemokine receptor) [31]. In the lung, neutrophils produce elastase and matrix metalloproteinase, which degrade the extracellular matrix proteins, leading to tissue destruction, and consequently to development of pulmonary disease [32, 33].

Based on this information and on our results, it is shown that the substances in cigarette smoke promote increased levels of HSP70, inducing systemic inflammatory processes and consequent neutrophilic stimulation to the lung region.

Neutrophils in contact with the inhaled cigarette substances release enzymes as a defense mechanism. However, these factors lead to the occurrence of lung lesions, because the enzymes released in the lung do not have the capacity to distinguish the organism's own structures from the foreign cigarette substances, which causes damage that may be irreversible. This process can in part explain the risk of cigarette smoking in relation to the development of lung diseases, such as COPD.

According to previous studies, HSP70 can be used as a marker of diagnosis in patients with COPD [8, 9, 34, 35]. However, the data related to this protein and the use of cigarettes in asymptomatic smokers are still conflicting, because experimental and in vitro studies have shown a significant increase of HSP70 in conditions simulated by cigarette products. Contrary to our results, the previous cited studies did not find significant difference in the levels of HSP70 between smokers (non-COPD) and non-smokers. Despite this, we can emphasize that one of the limitations of such studies was the low number of participants and the criteria used for selecting the study subjects.

Our data showed that the chemical substances present in the cigarette smoke can elevate the levels of anti-HSP70 autoantibody in the serum from chronic asymptomatic smokers, when compared to non-smokers. We believe that these changes associated with failure of the anti-HSP70 to maintain the balance between HSP70 levels may result in deleterious effects on smoking, can be considered one of mechanisms leading to the development of pulmonary diseases. Furthermore, data on literature showed that the levels of anti-HSP70 increase in response to high levels of extracellular HSP70, playing an important role in the pathophysiology of various pulmonary diseases [36, 37, 38, 39].

Cellular DNA often undergoes several lesions caused by exogenous factors, such as the genotoxic chemical substances and the intrinsic products that are results of cellular metabolism, such as reactive oxygen species (ROS) [40]. These substances can cause different types of DNA damage, including breaking of single-stranded DNA as well as double-stranded DNA, single base modifications and cross links. Recent studies show that the intracellular HSPs are needed to stabilize the main components of DNA repair mechanisms, because they have cytoprotective functions that are explained by their antiapoptotic role. However, altered levels of HSPs, as shown by our study, can lead to failures in detection, as well as delayed untimely repair of damaged DNA [41].

Accordingly, our study showed increased DNA damage in smokers. Therefore, chemical substances present in cigarette smoke lead to a decrease of antioxidant capacity of lung cells, generating an increase in the production of ROS [42]. Additionally, several studies have shown that cigarette smoke has been associated with increased ROS production in neutrophils, in conjunction with the inflammatory response, which leads to damage of the pulmonary tissues, contributing to the pathogenesis of COPD [30, 43] and the development of lung cancer [44].

Thus, we can suggest that the increase of levels of extracellular HSP70 in smokers and all the mechanisms triggered by their action outside the cell possibly exceeds the protection action of this protein inside the cell, which could explain in part the genotoxic action of the cigarette. However, the mechanisms that maintain genome stability within the nucleolus and the actions of HSP70 within the process of DNA cytotoxicity are still poorly understood and the findings are inconclusive.

In relation to our results, some limitations must be taken into account. Thus,

some studies show that the peak levels of HSP70 found in blood occur around 8 hours after exposure of the stressor. Thus, this may be a factor that interferes with the variability of HSP70 levels in the blood of smokers, which could explain in part the high standard deviation in this group. Second, the *HSP70* gene expression was performed with peripheral blood, which may have interfered with the result of no significant difference between the groups, because being investigation of the peripheral blood constitutes a systemic analysis and not at the pulmonary level. Therefore, this result needs to be confirmed in cell samples directly linked to the pulmonary system. If the result remains, a possible explanation for the increase of the peripheral blood protein of the smoker, without increased gene expression, can be related to the occurrence of necrosis with rupture of the cell membrane and release of the protein into the extracellular environment. Although comparisons of estimated value gave some levels of statistical significance, we believe that increasing the sample number will improve some results of this study, mainly linked to correlation and association analyses.

In conclusion, we have shown that asymptomatic chronic smokers have high HSP70 levels in peripheral blood, favoring the development of a systemic inflammatory process, demonstrated by the increased levels of IL-8, CRP, neutrophils and DNA damage. Increased levels of the autoantibody anti-HSP70 failed in decrease the high HSP70 levels and the inflammatory process in chronic asymptomatic smokers. Probably, this process can be responsible for stimulating a deleterious response in the lung, can cause tissue damage due to the action of auto-reactivity of the immune system and increased inflammatory process and a possible predisposition to the development of pulmonary diseases.

REFERENCES

1. U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2014. https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/sgr/50th-anniversary/pdfs/executive-summary-spanish.pdf Date last updated: 2014 Date last accessed: 2017
2. Ghoorah K, De Soyza A, Kunadian V. Increased cardiovascular risk in patients with chronic obstructive pulmonary disease and the potential mechanisms linking the two conditions: a review. *Cardiol Rev* 2013; 21: 196–202.
3. GBD 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Respir Med* 2017; 5: 691-706.
4. Shiels MS, Katki HA, Freedman ND, *et al.* Cigarette smoking and variations in systemic immune and inflammation markers. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106: 1-8.
5. Gardi C, Valacchi G. Cigarette smoke and ozone effect on murine inflammatory responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2012; 1259: 104–111.

6. Jegou G, Hazoumé A, Seigneuric R, *et al.* Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 2013; 332: 275-85.
7. Calderwood SK, Gong J, Murshid A. Extracellular HSPs: The Complicated Roles of Extracellular HSPs in Immunity. *Front Immunol* 2016; 7:159.
8. Cui X, Xing J, Liu Y, *et al.* COPD and levels of Hsp70 (HSPA1A) and Hsp27 (HSPB1) in plasma and lymphocytes among coal workers: a case-control study. *Cell Stress Chaperones* 2015; 20: 473-81.
9. Dong J, Guo L, Liao Z, *et al.* Increased expression of heat shock protein 70 in chronic obstructive pulmonary disease. *Int Immunopharmacol* 2013;17:885-93.
10. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, *et al.* Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005; 26: 948-68.
11. Pereira CAC, Barreto SP, Simões JG, *et al.* Valores de referência para espirometria em uma amostra da população brasileira adulta. *J Pneumol* 1992; 18: 10-22.
12. Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol* 1991; 283: 157-64.
13. DE Oliveira DT, Savio AL, Marcondes JP, *et al.* Cytotoxic and toxicogenomic effects of silibinin in bladder cancer cells with different TP53 status. *J Biosci* 2017; 42: 91-101.
14. Wu TC, Tanguay RM, Wu Y, *et al.* Presence of antibodies to heat stress proteins and its possible significance in workers exposed to high temperature and carbon monoxide. *Biomed Environ Sci* 1996; 9: 370-390.
15. Kim HP, Wang X, Zhang J, *et al.* Heat shock protein-70 mediates the cytoprotective effect of carbon monoxide: involvement of p38 beta MAPK and heat shock factor-1. *J Immunol.* 2005; 175: 2622-2629.
16. Goebel U, Mecklenburg A, Siepe M, *et al.* Protective effects of inhaled carbon monoxide in pig lungs during cardiopulmonary bypass are mediated via an induction of the heat shock response. *Br J Anaesth* 2009; 103: 173–184.

17. Vayssier M, Banzet N, François D, *et al.* Tobacco smoke induces both apoptosis and necrosis in mammalian cells: differential effects of HSP70. *Am J Physiol.* 1998; 275:L771-9.
18. Li CJ, Ning W, Matthay MA, *et al.* MAPK pathway mediates EGR-1-HSP70-dependent cigarette smoke-induced chemokine production. *AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: L1297-303.
19. Heguy A, O'Connor TP, Luetlich K, *et al.* Gene expression profiling of human alveolar macrophages of phenotypically normal smokers and nonsmokers reveals a previously unrecognized subset of genes modulated by cigarette smoking. *J Mol Med (Berl).* 2006; 84:318-28.
20. Ospelt C, Camici GG, Engler A, *et al.* S. Smoking induces transcription of the heat shock protein system in the joints. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73:1423-6.
21. Holz O, Seiler T, Karneier A, *et al.* Assessing airway inflammation in clinical practice -experience with spontaneous sputum analysis. *BMC Pulm Med* 2008; 28: 5.
22. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyathan V. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2008; 11:1-15.
23. Gardi C, Valacchi G. Cigarette smoke and ozone effect on murine inflammatory responses. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1259: 104–111.
24. Lakshmi A, Lakshmanan A, Ganesh Kumar P, *et al.* Effect of Intensity of Cigarette Smoking on Haematological and Lipid Parameters Journal of Clinical and Diagnostic Research. *J Clin Diagn Res* 2014; 8: BC11–BC13.
25. Marano KM, Kathman SJ, Jones BA, *et al.* Study of cardiovascular disease biomarkers among tobacco consumers. Part 3: evaluation and comparison with the US National Health and Nutrition Examination Survey. *Inhal Toxicol* 2015; 27: 167-73.
26. Lutfioglu M, Aydogdu A, Sakalliglu EE, *et al.* Gingival crevicular fluid interleukin-8 and lipoxin A levels of smokers and nonsmokers with different periodontal status: a cross-sectional study. *J Periodontal Res* 2016; 51: 471–480.

27. Bunaes DF, Mustafa M, Mohamed HG, *et al.* The effect of smoking on inflammatory and bone remodeling markers in gingival crevicular fluid and subgingival microbiota following periodontal therapy. *J Periodontol Res* 2017; 52: 713-724.
28. Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res* 2012; 91: 142-9. doi:10.1177/0022034511421200.
29. Rom O, Avezov K, Aizenbud D, *et al.*, Cigarette smoking and inflammation revisited. *Respir Physiol Neurobiol* 2013; 187: 5-10.
30. Zuo L, He F, Sergakis GG, *et al.* Interrelated role of cigarette smoking, oxidative stress, and immune response in COPD and corresponding treatments. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 307: L205-218.
31. Sabbione F, Keitelman IA, Iula L, *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Stimulate Proinflammatory Responses in Human Airway Epithelial Cells. *J Innate Immun.* 2017; 9: 387-402.
32. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, *et al.* Mechanisms of action of environmental factors tobacco smoking. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 180-195.
33. Johannsen A, Susin C, Gustafsson A. Smoking and inflammation: evidence for a synergistic role in chronic disease. *Periodontol 2000.* 2014; 64: 111-126.
34. Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K, *et al.* Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 alpha in chronic obstructive pulmonary disease: markers for immune activation and tissue destruction. *Clin Lab* 2009; 55: 31-40.
35. Qu B, Jia Y, Liu Y, *et al.* Wang H, Ren G, Wang H. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress Chaperones* 2015;20:885-92.
36. Cappello F, Caramori G, Campanella C, *et al.* Convergent sets of data from in vivo and in vitro methods point to an active role of Hsp60 in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis. *PLoS One.* 2011; 6: e28200.
37. Newkirk MM, Mitchell S, Procino M, *et al.* Chronic smoke exposure induces rheumatoid factor and anti-heat shock protein 70 autoantibodies in susceptible

- mice and humans with lung disease. *Eur J Immunol*. 2012; 42: 1051-61.
38. Kahloon RA, Xue J, Bhargava A, *et al*. Patients with idiopathic pulmonary fibrosis with antibodies to heat shock protein 70 have poor prognoses. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013; 187: 768-75.
39. Hoyne GF, Elliott H, Mutsaers SE, Prêle CM. Idiopathic pulmonary fibrosis and a role for autoimmunity. *Immunol Cell Biol*. 2017; 95: 577-583.
40. Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell*. 2017;168:644-656.
41. Sottile ML, Nadin SB. Heat shock proteins and DNA repair mechanisms: an updated overview. *Cell Stress Chaperones*. 2017; 1-13.
42. Bakhtiari S, Azimi S, Mehdipour M, *et al*. Effect of Cigarette Smoke on Salivary Total Antioxidant Capacity. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2015; 9: 281–284.
43. McGuinness AJ, Sapey E. Oxidative Stress in COPD: Sources, Markers, and Potential Mechanisms. *J Clin Med* 2017; 6(2). pii: E21
44. Durham AL, Adcock IM. The relationship between COPD and lung cancer. *Lung Cancer* 2015 ;90:121-127.
-

Anexo

Anexo 1

Supplementary Material Chapter I

Hematological examinations

Hematological examinations were performed on whole blood samples through the white cell count, red and platelets, using automated equipment CELL-DNY Ruby (version 2.1). Biochemicals were performed on serum samples, by dry chemistry using the automated system 950 Vitros (Johnson & Johnson).

Collection, processing and storage of samples

Participants selected for the study were referred to the Laboratory of Pulmonary Function of HC / UNESP / Botucatu / SP for blood collection and completing the questionnaire and term of free and informed consent. Peripheral blood was collected in 5 ml vacutainer dry tube, centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes at 18 ° C, being alicotado in 1.5 ml microtubes and serum was stored under -80 °C until HSP70 determinations by ELISA and and detection of cytokines by flow cytometry.

Approximately 3 mL of peripheral blood were collected in vacutainer® tubes with anticoagulant ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA), for lymphocyte isolation for analysis of DNA damage by the comet test. Isolation of the mononuclear cells was performed within a period of up to 4 hours and subsequently aliquoted and stored at -80 ° C.

ANEXO 2

NÍVEL DE DEPENDÊNCIA (Fagerström)

Tempo do primeiro cigarro:

- (3) 5min.
- (2) 6 a 30min.
- (1) 31 a 60min.
- (0) Após 60min.

É difícil não fumar em locais proibidos:

- (1) Sim
- (0) Não

O cigarro do dia com mais satisfação:

- (1) Primeiro da manhã
- (0) Outros

Cigarros/dia:

- (0) Menos de 10
- (1) 11 a 20
- (2) 21 a 30
- (3) Mais de 31

Fuma mais pela manhã:

- (1) Sim
- (0) Não

Fuma mesmo doente:

- (1) Sim
- (0) Não

PONTUAÇÃO: _____ GRADUAÇÃO: < 4: Leve; 4 – 6: Moderada; > 6: Elevada

Anexo 3

 Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997	FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DA HEAT SHOCK PROTEINS 70 EM USUÁRIOS DO TABACO

Pesquisador: thyego mychell moeira santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35323014.0.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Enfermagem

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 820.706

Data da Relatoria: 06/10/2014

Apresentação do Projeto:

Em resposta aos produtos da fumaça do cigarro ocorrem apoptose e necrose das células pulmonares, gerando estresse oxidativo, com consequente processo inflamatório que conduz à lesão tecidual e disfunção. Essa inflamação acarreta em agressão constante e alterações dos tecidos pulmonares por meio da exposição acumulativa e diária à fumaça do cigarro com aumento de células do sistema imune e desequilíbrio na produção de citocinas. Dentro desse processo ocorre estimulação também das Heat Shock Proteins 70 (HSP 70), que dependendo do estímulo tem funções diferentes, e podem atuar dentro ou fora da célula. No meio extracelular, HSP70 estimula a síntese, por outras células, citocinas pró-inflamatórias que irão ter a função de quimiotaxia e efeitos deletérios para o tecido pulmonar. Trata-se de um estudo transversal no qual serão comparados dois grupos: tabagistas e não tabagistas quanto a uma série de aspectos relacionados a HSP70. A avaliação ocorrerá por meio de aplicação de questionários, coleta e análise de sangue e avaliação clínica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: avaliar os níveis de HSP 70 no plasma de sangue periférico e a sua expressão gênica em tabagistas e comparar com controles saudáveis.

Objetivo Secundário:

Endereço: Chácara Bulgnolli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608	E-mail: capettup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 820.706

- Determinar e analisar as concentrações da HSP 70 no plasma de sangue periférico de tabagistas e controles saudáveis.
- Determinar e analisar a expressão gênica da HSP 70 do plasma de sangue periférico de tabagistas e controles saudáveis.
- Correlacionar os valores da HSP 70 e a expressão gênica da HSP 70 com quantidade da exposição tabágica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Para o sujeito - Desconforto (dor) no momento da punção venosa e possível risco de infecção por ser um procedimento invasivo. Para o Pesquisador - Infecção por patógeno transmitido pelo sangue na falha do equipamento de proteção individual.

Benefícios:

Por meio da análise da HSP 70, esta pesquisa pode permitir a identificação precoce de fator de risco em tabagista saudáveis, sendo que as identificações desses biomarcadores responsáveis pelo processo inflamatório poderiam auxiliar na monitoração desses indivíduos, assim como no planejamento de estratégias de prevenção secundária e propor novas abordagens terapêutica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de doutorado no qual serão incluídos apenas sujeitos com 18 anos ou mais, que consentam em participar. O projeto é factível dentro do tempo proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta todos os termos necessários e suficientes.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada mais a acrescentar.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 06 de Outubro de 2014, sem

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
Bairro: Rubião Junior
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 CEP: 18.618-970
E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Apêndice

Apêndice

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O sr(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada “*Expressão da Heat Shock Protein 70 em usuários do tabaco*”, que pretende estudar os níveis de HSP 70 no soro de sangue periférico e a sua expressão gênica em tabagistas em paciente com DPOC. O sr(a). foi selecionado(a) a participar dessa pesquisa por utilizar o cigarro ou não utilizar o cigarro. A pesquisa consta de um questionário que avaliará o nível de dependência do cigarro e de coleta de pequena quantidade de sangue, colhido por materiais esterilizados e avaliados pela Anvisa. Todo o procedimento será realizado em torno de 10 minutos. A pesquisa tem por finalidade permitir a identificação precoce de fatores de risco em tabagista saudáveis como também propor planejamento de estratégias de prevenção secundária e novas abordagem terapêuticas. Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito e isso não vai interferir com seu tratamento ou preferência de agendamento médico, assim como interferências trabalhistas. Você poderá retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo. É garantido total sigilo do seu nome, imagem, resultado de exame ou doença, em relação aos dados relatados nesta pesquisa. Você receberá uma via deste termo, e outra via será mantida em arquivo pelo pesquisador por cinco anos.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Nome: _____

Assinatura: _____

_____ Data: ____/____/____

Orientador: Dados do orientador

Pesquisador: Dados do pesquisador

Assinatura: _____