

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 29/12/2020.



**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: Profª. Adjunta *Ílida de Godoy*

Comissão Examinadora:

Drª. *Camila Renata Corrêa Camacho*

Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp

Drª. *Ilka Lopes Santoro*

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP

Drª. *Mariana Gobbo Braz*

Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Drª. *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 *HSP70* 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

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.
-