

Impacto do fumo do cigarro passivo no proteoma humano: em busca de biomarcadores precoces de risco para a saúde

Impact of secondhand smoke on the human proteome: searching for early health-risk biomarkers

Sofia Neves^{1,2}, Solange A. Pacheco¹, Fátima Vaz^{1,2}, Cristina Valentim-Coelho¹, Joana Saraiva^{1,2}, Peter James³, Tânia Simões⁴, Deborah Penque^{1,2}

sofia.neves@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório de Proteómica. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Comprehensive Health Research Centre. NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

(3) Protein Technology Laboratory. Department of Immunotechnology, Lund University, Suécia

(4) CECAD Cologne-Excellence in Aging Research, University of Cologne, Alemanha

_Resumo

Os não-fumadores expostos ao fumo do cigarro passivo ou, simplesmente fumo passivo (FP), apresentam um risco acrescido de desenvolver diversas doenças graves. No entanto, os mecanismos moleculares que explicam estes efeitos continuam pouco esclarecidos, o que reforça a necessidade de identificar biomarcadores capazes de avaliar o risco associado a esta exposição.

Neste estudo, analisámos o proteoma do epitélio nasal e do plasma de indivíduos não-fumadores saudáveis expostos ao FP no local de trabalho, num contexto ainda enquadrado pela Lei n.º 37/2007, utilizando uma abordagem proteómica 'shotgun' por espectrometria de massa.

No epitélio nasal, observámos um aumento de proteínas envolvidas em vias centrais do metabolismo energético, como a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a Triosefosfato isomerase (TPI1), sugerindo uma possível reprogramação metabólica induzida pela exposição. Identificámos também uma diminuição da tubulina beta-4B (TUBB4B), relacionada com a organização do citoesqueleto, e um aumento da proteína anti-apoptótica SERPINB3, apontando para alterações em processos de morte e sobrevivência celular.

No plasma, destacaram-se o aumento da Butirilcolinesterase (BChE) e a diminuição da Proteína de ligação à vitamina D (GC), ambas associadas à resposta a xenobióticos e a processos de lesão tecidual. Foram ainda detetadas alterações em proteínas reguladoras da inflamação sistémica, como C1R, C1QC, HRG e PROS1. A expressão diferencial de APOA4 e SERPINF2 sugere, adicionalmente, a ativação de mecanismos relacionados com risco aterotrombótico. Em conjunto, estes resultados contribuem para aprofundar a compreensão das vias biológicas que ligam a exposição ao fumo passivo ao risco acrescido de cancro e de doenças cardiovasculares, e apresentam um conjunto promissor de potenciais biomarcadores para avaliação do risco associado à exposição ao FP.

_Abstract

Non-smokers exposed to secondhand smoke (SHS) have an increased risk of developing several serious diseases. However, the molecular mechanisms underlying these effects remain poorly understood, underscoring the need to identify biomarkers capable of assessing the risk associated with this exposure.

In this study, we analysed the nasal epithelial and plasma proteomes of healthy non-smokers exposed to SHS in the workplace, in a context still regulated by Law No. 37/2007, using a shotgun proteomics approach by mass spectrometry.

In the nasal epithelium, we observed an increase in proteins involved in key energy metabolism pathways, such as Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and Triosephosphate Isomerase (TPI1), suggesting a possible metabolic reprogramming induced by exposure. We also identified a decrease in beta-tubulin 4B (TUBB4B), related to cytoskeletal organisation, and an increase in the anti-apoptotic protein SERPINB3, indicating alterations in cell death and survival pathways.

In plasma, we found an elevation of Butyrylcholinesterase (BChE) and a reduction of Vitamin D-binding Protein (GC), both linked to xenobiotic response and tissue injury processes. We also detected changes in regulators of systemic inflammation, such as C1R, C1QC, HRG, and PROS1. Additionally, the differential expression of APOA4 and SERPINF2 suggests activation of mechanisms related to atherothrombotic risk.

Together, these findings deepen our understanding of the biological pathways linking secondhand smoke exposure to the increased risk of cancer and cardiovascular disease, and highlight a promising set of potential biomarkers for assessing SHS-related health risk.

_Introdução

O fumo passivo (FP) é constituído por um complexo conjunto de elementos tóxicos, alguns deles carcinogénicos e como tal trata-se de um poluente ambiental perigoso, especialmente quando concentrado em espaços interiores. Estudos epidemiológicos demonstraram que a exposição prolongada ao FP está associada a doenças graves como a doença coronária, o acidente vascular cerebral (AVC) e o cancro do pulmão ⁽¹⁾.

A Lei n.º 37/2007 estabeleceu em Portugal uma proibição parcial de fumar em espaços públicos, permitindo zonas para fumadores em estabelecimentos de restauração com mais de 100 m². Reformulações posteriores, culminando na Lei n.º 63/2017, introduziram requisitos técnicos que extinguíram, na prática, essas áreas interiores. No período intermédio, o nosso grupo

artigos breves_ n. 12

elaborou um estudo que demonstrou que as zonas para fumadores apresentavam concentrações elevadas de PM2.5 compatíveis com fumo de tabaco, mesmo sob cumprimento das normas legais, e que trabalhadores não-fumadores expostos exibiam níveis aumentados de cotinina, confirmando exposição ao FP (2).

_Objetivo

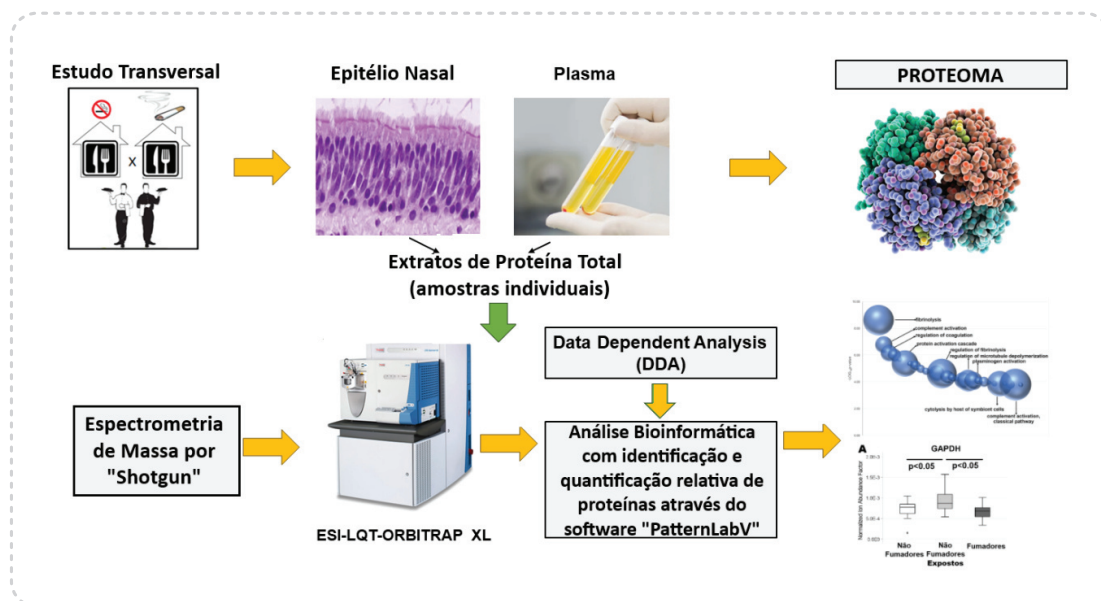
Com o intuito de melhor conhecer as alterações da biologia molecular e simultaneamente descobrir biomarcadores para avaliação precoce do risco de exposição ao FP, estudou-se os proteomas do epitélio nasal e do plasma de sangue periférico dos trabalhadores. Para o efeito foi realizada uma análise proteómica shotgun por espectrometria de massa, seguida de uma avaliação bioinformática integrada, através da qual foram descobertos perfis de expressão proteica e vias biológicas associados aos efeitos da exposição ao FP.

_Materiais e métodos

O presente trabalho constituiu um estudo transversal num bio-banco de amostras de epitélio nasal e plasma de sangue venoso periférico, obtidas de trabalhadores de um conjunto de 25 restaurantes e cantinas de Lisboa, com e sem salas onde era permitido fumar ainda sob a legislação, Lei n.º 37/2007. Foram selecionadas amostras de 48 trabalhadores saudáveis, categorizados com base no hábito tabágico e na sua exposição ao FP no local de trabalho: fumadores (S, n=8) e não-fumadores (n=40), sendo que nestes últimos 19 não estavam expostos (NS) e 21 estavam expostos ao FP (NSE). O grupo NS foi subdividido em 11 "Nunca Fumadores" (N) e 8 "Ex-Fumadores" (F), enquanto o grupo NSE foi subdividido em 11 "Nunca Fumadores Expostos" (NE) e 10 "Ex-Fumadores Expostos" (FE).

Para o estudo proteómico, foi utilizada uma abordagem de espectrometria de massa por "Shotgun" recorrendo a um espectrómetro de massa ESI-LTQ-Orbitrap XL e à plataforma bioinformática "PatternLabV" (figura 1). As proteínas diferencialmente abundantes entre grupos foram determinadas através da aplicação do teste estatístico não paramétrico Mann U-Whitney.

Figura 1: Esquema da metodologia adotada no estudo.



_Resultados e discussão

Modulação do proteoma do epitélio nasal

A exposição ao fumo do cigarro compromete a função mitocondrial, reduzindo a atividade das subunidades da cadeia respiratória e a produção de ATP (3,4). Nas células epiteliais das vias respiratórias, foi também descrito um aumento da produção de lactato, sugerindo maior atividade glicolítica (5). Curiosamente neste estudo, observámos que no epitélio nasal de não-fumadores expostos ao FP, proteínas glicolíticas como a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a Triosefosfato isomerase (TPI1) apresentavam níveis de abundância aumentados (6).

No nosso trabalho, foi observado que a expressão da Cadeia beta-4B da tubulina (TUBB4B) se encontrava diminuída no epitélio nasal de não-fumadores expostos ao FP (6). Estudos demonstraram que fumar aumenta a permeabilidade do epitélio das vias respiratórias através de alterações na organização do citoesqueleto e nos complexos juncionais apicais (7,8). A desregulação da rede tubulina-microtúbulo induzida pelo fumo do cigarro tem sido também associada a uma disfunção da atividade ciliar (9,10).

A Serpina B3 (SERPINB3) pode induzir a transição epitélio-mesenquima (EMT) e inibir a apoptose, promovendo assim a sobrevivência celular (11,12). O nosso trabalho revelou uma sobre-expressão de SERPINB3 nos indivíduos expostos ao FP (6). Um resultado que parece apoiar a hipótese de que a exposição ao FP contribui para a persistência e sobrevivência celular num contexto de dano tecidual.

Modulação do proteoma do plasma de sangue venoso periférico

A proteína butirilcolinesterase (BChE), envolvida na detoxificação de compostos tóxicos (13), foi identificada no nosso estudo (14). Embora a exposição a inibidores geralmente reduza os níveis plasmáticos desta enzima (13,15), incluindo em populações expostas a organofosforados (16,17), observámos um aumento no plasma de BChE em não-fumadores expostos ao FP (14).

A Proteína de Ligação à Vitamina D (GC) e a gelsolina participam na remoção dos filamentos de F-actina libertados durante a lesão celular (18,19). No nosso estudo, ambas apresentaram níveis diminuídos no plasma dos indivíduos expostos ao FP (14,20). Estes dados sugerem que a exposição ao FP poderá induzir lesão celular, levando à libertação de actina e ao seu subsequente sequestro pela GC e pela gelsolina, seguido da eliminação hepática do complexo. Esta interpretação está em concordância com a redução da GC descrita previamente em fumadores (21).

Sabe-se que o fumo do cigarro possui a capacidade de alterar a resposta do sistema imunitário, incluindo a resposta inflamatória (22). Neste estudo, o plasma dos indivíduos expostos ao FP apresentou um perfil de expressão compatível com um estado pró-inflamatório na presença de autoanticorpos resultantes de lesão tecidual (14). Um perfil caracterizado pelo aumento da abundância da Glicoproteína rica em histidina (HRG) e da proteína S dependente da vitamina K (PROS1), associado à remoção de células apoptóticas (23,24) e pela redução do Subcomponente C1q do complemento, subunidade C (C1QC) e do Subcomponente C1r do complemento (C1R) elementos centrais da via clássica do complemento cuja diminuição pode comprometer a depuração de complexos imunes (25,26).

Foi identificado nos indivíduos expostos ao FP um conjunto de proteínas no plasma cujo perfil de expressão sugere um estado pró-aterogénico e pró-trombótico (14). Entre estas, destacou-se o aumento da Alfa-2-antiplasmina (SERPINF2) (14), cuja sobre-expressão está associada a maior risco de aterosclerose e trombose e, conseqüentemente, ao AVC isquémico e enfarte do miocárdio (27), devido à sua acção anti-fibrinolítica, interferindo com a atividade da plasmina (28). Também se observou uma diminuição da Apolipoproteína A-IV (APOA4) nos indivíduos expostos ao FP (14). Esta proteína inibe a agregação plaquetária e, assim, quando ocorre um desequilíbrio na atividade da APOA4 (diminuição), a trombose é favorecida, aumentando o risco de enfarte do miocárdio ou AVC (29,30).

Conclusões

Neste trabalho identificámos no epitélio nasal dos indivíduos não-fumadores expostos ao FP, um perfil de expressão compatível com uma reprogramação energética, com uma perturbação na permeabilidade do epitélio nasal, devido a um efeito negativo no citoesqueleto e cílios, e com uma propensão para a persistência e sobrevivência celular num contexto de dano tecidual. Simultaneamente, foi observado no plasma perfis de expressão de proteínas que demonstram a ocorrência de uma resposta fisiológica à presença de substâncias xenobióticas com a ocorrência de lesão celular. Tendo também sido detetado perfis de expressão de proteínas envolvidas na promoção de um estado pró-inflamatório, em contexto de autoimunidade, pró-aterosclerótico e pró-trombótico.

Serão necessários estudos adicionais de validação dos resultados aqui apresentados. Todavia, o conjunto das proteínas aqui discutidas constitui um potencial painel de biomarcadores de risco e/ou preditivos da exposição ao FP (dados completos em (6,14)).

Referências bibliográficas:

- (1) Flor LS, Anderson JA, Ahmad N, et al. Health effects associated with exposure to secondhand smoke: a Burden of Proof study. *Nat Med.* 2024 Jan;30(1):149-67. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02743-4>
- (2) Pacheco SA, Aguiar F, Ruivo P, et al. Occupational exposure to environmental tobacco smoke: a study in Lisbon restaurants. *J Toxicol Environ Health A.* 2012;75(13-15):857-66. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.690690>
- (3) Agarwal AR, Zhao L, Sancheti H, et al. Short-term cigarette smoke exposure induces reversible changes in energy metabolism and cellular redox status independent of inflammatory responses in mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012 Nov 15;303(10):L889-98. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00219.2012>
- (4) Aghapour M, Remels AHV, Pouwels SD, et al. Mitochondria: at the crossroads of regulating lung epithelial cell function in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2020 Jan 1;318(1):L149-L164. Epub 2019 Nov 6. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00329.2019>
- (5) Tulen CBM, Wang Y, Beentjes D, et al. Dysregulated mitochondrial metabolism upon cigarette smoke exposure in various human bronchial epithelial cell models. *Dis Model Mech.* 2022 Mar 1;15(3):dmm049247. <https://doi.org/10.1242/dmm.049247>
- (6) Neves S, Pacheco S, Vaz F, et al. Occupational second-hand smoke exposure: A comparative shotgun proteomics study on nasal epithelia from healthy restaurant workers. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2024 Jun;108:104459. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104459>
- (7) Olivera D, Knall C, Boggs S, et al. Cytoskeletal modulation and tyrosine phosphorylation of tight junction proteins are associated with mainstream cigarette smoke-induced permeability of airway epithelium. *Exp Toxicol Pathol.* 2010 Mar;62(2):133-43. Epub 2009 Apr 18. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.03.002>
- (8) Shaykhiev R, Otaki F, Bonsu P, et al. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Mar;68(5):877-92. Epub 2010 Sep 6. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0500-x>
- (9) Leopold PL, O'Mahony MJ, Lian XJ, et al. Smoking is associated with shortened airway cilia. *PLoS One.* 2009 Dec 16;4(12):e8157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.000815>
- (10) Simet SM, Sisson JH, Pavlik JA, et al. Long-term cigarette smoke exposure in a mouse model of ciliated epithelial cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010 Dec;43(6):635-40. Epub 2009 Dec 30. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0297OC>
- (11) Katagiri C, Nakanishi J, Kadoya K, et al. Serpin squamous cell carcinoma antigen inhibits UV-induced apoptosis via suppression of c-JUN NH2-terminal kinase. *J Cell Biol.* 2006 Mar 27;172(7):983-90. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508064>
- (12) Lauko A, Volovetz J, Turaga SM, et al. SerpinB3 drives cancer stem cell survival in glioblastoma. *Cell Rep.* 2022 Sep 13;40(11):111348. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111348>
- (13) Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol Ther.* 2015 Apr;148:34-46. Epub 2014 Nov 20. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.011>
- (14) Neves S, Pacheco SA, Vaz F, et al. Second-hand smoke exposure modulates plasma proteins linked to detoxification, inflammation and atherothrombosis. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2025 Nov 8;120:104864. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104864>
- (15) Sun T, Zhen T, Harakandi CH, et al. New insights into butyrylcholinesterase: Pharmaceutical applications, selective inhibitors and multitarget-directed ligands. *Eur J Med Chem.* 2024 Sep 5;275:116569. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116569>
- (16) Mishra GA. The effect of tobacco consumption on blood cholinesterase levels among workers exposed to organophosphorus pesticides. *Toxicol Ind Health.* 2006 Oct;22(9):399-403. <https://doi.org/10.1177/0748233706073418>
- (17) Sutoluk Z, Kekec Z, Daglioglu N, et al. Association of chronic pesticide exposure with serum cholinesterase levels and pulmonary functions. *Arch Environ Occup Health.* 2011;66(2):95-99. <https://doi.org/10.1080/19338244.2010.506496>
- (18) Lisowska-Myjak B, Józwiak-Kisieleska A, Łukaszewicz J, et al. Vitamin D-binding protein as a biomarker to confirm specific clinical diagnoses. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020 Jan;20(1):49-56. Epub 2019 Dec 3. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1699064>
- (19) Lee WM, Galbraith RM. The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N Engl J Med.* 1992 May 14;326(20):1335-41. <https://doi.org/10.1056/NEJM199205143262006>
- (20) Pacheco SA, Torres VM, Louro H, et al. Effects of occupational exposure to tobacco smoke: is there a link between environmental exposure and disease? *J Toxicol Environ Health A.* 2013;76(4-5):311-27. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.757269>
- (21) Bortner JD Jr, Richie JP Jr, Das A, et al. Proteomic profiling of human plasma by iTRAQ reveals down-regulation of ITI-HC3 and VDBP by cigarette smoking. *J Proteome Res.* 2011 Mar 4;10(3):1151-9. <https://doi.org/10.1021/pr100925p>
- (22) Gonçalves RB, Coletta RD, Silvério KG, et al. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res.* 2011 May;60(5):409-24. <https://doi.org/10.1007/s00011-011-0308-7>
- (23) Thielens NM, Tedesco F, Bohlson SS, et al. C1q: A fresh look upon an old molecule. *Mol Immunol.* 2017 Sep;89:73-83. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.025>
- (24) Pan Y, Deng L, Wang H, et al. Histidine-rich glycoprotein (HRGP): Pleiotropic and paradoxical effects on macrophage, tumor microenvironment, angiogenesis, and other physiological and pathological processes. *Genes Dis.* 2020 Aug 8;9(2):381-92. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.07.015>
- (25) McMurray JC, Schornack BJ, Weskamp AL, et al. Immunodeficiency: Complement disorders. *Allergy Asthma Proc.* 2024 Sep 1;45(5):305-09. <https://doi.org/10.2500/aap.2024.45.240050>

artigos breves_ n. 12

- (26) Yuan X, Chang CY, You R, et al. Cigarette smoke-induced reduction of C1q promotes emphysema. *JCI Insight*. 2019 May 21;5(13):e124317. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.124317>
- (27) Humphreys SJ, Whyte CS, Mutch NJ. "Super" SERPINS-A stabilizing force against fibrinolysis in thromboinflammatory conditions. *Front Cardiovasc Med*. 2023 Apr 19;10:1146833. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1146833>
- (28) Carpenter SL, Mathew P. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia*. 2008 Nov;14(6):1250-54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01766.x>
- (29) Peng J, Li XP. Apolipoprotein A-IV: A potential therapeutic target for atherosclerosis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2018 Nov;139:87-92. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2018.10.004>
- (30) Qu J, Ko CW, Tso P, et al. Apolipoprotein A-IV: A Multifunctional Protein Involved in Protection against Atherosclerosis and Diabetes. *Cells*. 2019 Apr 5;8(4):319. <https://doi.org/10.3390/cells8040319>