



**Universidade Estadual Paulista - “Júlio de
Mesquita Filho” - Faculdade de
Odontologia de Araçatuba - Departamento
de Ciências Básicas
Programa Multicêntrico de Pós-Graduação
em Ciências Fisiológicas**



LUIS CEZAR FARIAS DE OLIVEIRA

***STEM CELL FACTOR ESTIMULA CÉLULAS DA
MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA A PRODUZIR
TGF- β , FGF-2 E CCL3/MIP-1 α .***

**ARAÇATUBA-SP
2012**



LUIS CEZAR FARIAS DE OLIVEIRA

***STEM CELL FACTOR ESTIMULA CÉLULAS DA MUSCULATURA
LISA DA TRAQUEIA A PRODUZIR TGF- β , FGF-2 E CCL3/MIP-1 α .***

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” – UNESP, como
parte parcial dos requisitos para a
obtenção do título de “Mestre em
Ciências Fisiológicas”.

Orientadora: Prof. Adj. Sandra Helena
Penha de Oliveira

ARAÇATUBA - SP
2012

LUIS CEZAR FARIAS DE OLIVEIRA

Nascimento: 25 de julho de 1959

Localidade: Araçatuba – São Paulo

Filiação: Ladislau de Oliveira Noce e Dalva Maria de Farias Oliveira

1977 – 1980: Graduação em Farmácia e Bioquímica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP

2003 – 2004: Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA)

DEDICATÓRIAS

À minha estrela... **Dalva**, luz eterna do meu caminho.

Ao meu pai, **Ladislau**, modelo de sabedoria, honestidade e amor incondicional.

À minha esposa, **Mara**, minha cúmplice, meu porto seguro... meu amor.

Aos meus netos, **Luiza e João Pedro**, aos meus filhos, **Vivian e Daniel**, inspiração e principais destinatários de mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Sandra Helena, pela orientação efetiva, dedicação, perseverança, garra, responsabilidade e competência na realização de seu trabalho.

À família, pelo suporte, paciência e admiração que alimenta minha vaidade, me enche de orgulho e me motiva a enfrentar grandes desafios como o que estou prestes a superar.

Aos meus amigos de laboratório, Taís, Antonio, Daniel, Ariane, Caril, Tamine, Grazi, Jéssica... pela cooperação e companheirismo que facilitaram por demais meu percurso na pós.

Aos demais amigos de departamento e programa, que não influenciados pela enorme diferença de idade, me trataram como um deles, de maneira respeitosa e companheira, me fazendo sentir bem à vontade em seu meio.

Aos professores do departamento de Ciências Fisiológicas, que não influenciados pela minha idade, me trataram como um aluno, de modo respeitoso e companheiro, me fazendo sentir à vontade durante o curso.

À Prof^a Ana Cláudia, pelos 12 anos de confiança, motivação, incentivo e amizade.

Às Prof^{as} Ana Paula Campanelli e Tereza Cristina Cardoso da Silva, pela receptividade e colaboração com a realização do trabalho.

À diretoria, colegas coordenadores, funcionários e alunos da UNIP-Araçatuba, pelo apoio e constante incentivo, que me ajudaram a superar os desafios do tempo.

À todos os funcionários da UNESP pelo empenho e cooperação.

À FAPESP pelo apoio financeiro

*"Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser.
Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter
êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de
palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o
palácio se não o fizerem ali?"*

Fernando Pessoa

OLIVEIRA, L.C.F. **STEM CELL FACTOR ESTIMULA CÉLULAS DA MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA A PRODUZIR TGF- β , FGF-2 E CCL3/MIP-1 α** . 2012. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Farmacologia – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UNESP Araçatuba – 2012.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o mecanismo envolvido na produção de TGF- β , FGF-2 e CCL3/MIP-1 α induzida por *Stem cell factor* (SCF) em células da musculatura lisa de traqueia (CMLT) e as vias de transdução de sinalização ativadas. Traqueias de camundongos normais foram coletadas, fragmentadas e colocadas em garrafas contendo meio de cultura DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino. CMLT foram estimuladas com SCF (1, 10 and 100 ng/mL) e avaliadas após 1, 6 e 24 horas. Características fenotípicas das CMLT foram analisadas por imunofluorescência para α -actina de músculo liso (α -AML), α -citoqueratina e α -proteína de ativação de fibroblastos (α -FAP). Ativação de c-kit em CMLT estimuladas por SCF foi avaliada por citometria de fluxo. A expressão de RNAm para TGF- β foi observada pela reação de polimerase em cadeia-transcriptase reversa (RT-PCR) e a produção da proteína, por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). A produção de FGF-2 foi avaliada por immunoblot e a produção de CCL3/MIP-1 α por ELISA. Em outro conjunto de experimentos, CMLT foram pré-tratadas com inibidores de MAPK p42/44(PD 98059 [PD]), p38(SB 202190[SB]), e JNK (SP 600125 [SP]) por 30 minutos seguidos de estimulação com SCF (10 ng/mL) por 24 horas. Células pré-tratadas com anticorpos específicos não revelaram qualquer marcação para citoqueratina nem para α -FAP, contudo, ocorrendo a marcação para α -AML, indicando a pureza da linhagem celular primária. SCF induziu a expressão de receptores c-kit em CMLT. CMLT estimuladas por 10 ng/mL de SCF expressaram TGF- β mRNA e produziram TGF- β proteína, FGF-2 e CCL3/MIP-1 α após 24 horas. O pré-tratamento com SB, PD e SP inibiu estas produções. Estas produções foram mediadas pela ativação das vias p42/44, p38, e JNK. CMLT parecem ser importantes células residentes envolvidas na ativação e reparo tecidual, visto que são capazes de produzir fatores de crescimento e quimiocinas, adicionando novas informações sobre o papel da musculatura lisa de traqueia na inflamação alérgica.

Palavras-chave: SCF, asma, TGF- β , FGF-2, CCL3, traqueia.

OLIVEIRA, L.C.F. **STEM CELL FACTOR STIMULATES TRACHEAL SMOOTH MUSCLE CELLS TO PRODUCE TGF- β , FGF-2 AND CCL3/MIP-1 α** . 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Farmacologia – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Araçatuba – 2012.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the mechanism involved in SCF-induced TGF- β , FGF-2 and CCL3/MIP-1 α production in tracheal smooth muscle cells (tSMC) and the activated signaling transduction pathway. Normal mouse tracheas were collected, fragmented and placed in bottles containing the culture medium DMEM with 10% Fetal Bovine Serum. tSMC primary cultures were stimulated with SCF (1, 10 and 100 ng/mL) and evaluated at 1, 6 and 24 hours. The phenotypic characteristic of tSMC in primary culture was analyzed using immunofluorescence staining for α -smooth muscle actin (α -SMA), α -cytokeratin and α -Fibroblast Activation Protein (α -FAP). c-Kit activation in SCF-stimulated tSMC was evaluated by flow cytometric. The TGF- β mRNA expression was observed by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and protein production by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). FGF-2 production was evaluated by immunoblot and CCL3/MIP-1 α production by ELISA. In other set of experiment, tSMC were pretreated p42/44 inhibitor (PD 98059 [PD]), p38 inhibitor (SB 202190[SB]), or JNK inhibitor (SP 600125 [SP]) for 30 minutes followed by stimulation with SCF (10 ng/mL) for 24 hour. Cells treated with specific antibodies, showing neither labeling for cytokeratin nor either FAP, however, labeling for α -SMA indicating purity of the primary cell line. SCF induces c-Kit expression on tSMC. SCF-stimulated tSMC express TGF- β mRNA expression and FGF-2 and CCL3/MIP-1 α production at 10 ng/mL after 24 hours. SB, PD and SP pre-treatment inhibited these productions. These productions were mediated by activation pathways p42/44, p38, and JNK. tSMC seems to be important resident cells involved in the cell activation and tissue repair, since they are capable of producing growth factors and chemokines and added new information about the role of tracheal smooth muscle cells in the allergic inflammation.

Keywords: Key words: SCF, asthma, TGF- β , FGF-2, CCL3, trachea.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Procedimentos para explante de traqueia de camundongo BalbC macho saudável..... 22
- Figura 2** – Células da musculatura lisa de traqueia de camundongos em estágios de proliferação em meio DMEM completo, coradas por Hematoxilina/Eosina e após análise por Imunofluorescência para pesquisa de marcadores de α -citoqueratina, α -proteína de ativação de fibroblastos e α -actina de músculo liso..... 30
- Figura 3** – Histograma duplo obtido após análise das CMLT por Citometria de Fluxo, marcadas com anticorpo para receptor c-Kit..... 32
- Figura 4** – Ensaio dose-resposta, através da técnica de PCR-RT demonstrando a expressão gênica de TGF- β em CMLT estimuladas por concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL de SCF, nos tempos de 1, 6 e 24 horas após estimulação..... 34
- Figura 5** - Ensaio dose-resposta, através da técnica de ELISA demonstrando a produção de TGF- β proteína em CMLT estimuladas por concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL de SCF, nos tempos de 1, 6 e 24 horas após estimulação..... 35
- Figura 6** - Ensaio dose-resposta, através da técnica de Western Blott demonstrando a produção de FGF-2 em CMLT estimuladas por concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL de SCF, nos tempos de 1, 6 e 24 horas após estimulação..... 37

Figura 7 - Ensaio dose-resposta, através da técnica de ELISA demonstrando a produção de CCL3/MIP-1 α em CMLT estimuladas por concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL de SCF, nos tempos de 1, 6 e 24 horas após estimulação..... 39

Figura 8 – Expressão gênica e produção proteica de TGF- β em CMLT pré-tratadas com inibidores de MAP quinases SB 202190 (SB), PD98059 (PD) e SP 600125 (SP) e estimuladas com SCF 10 ng/mL por 24 h..... 41

Figura 9 - Produção de FGF-2 e CCL3/MIP-1 α em CMLT pré-tratadas com inibidores de MAP quinases SB 202190 (SB), PD98059 (PD) e SP 600125 (SP) e estimuladas com SCF 10 ng/mL por 24 h..... 42

LISTA DE ABREVIATURAS

α -AML = α -actina de músculo liso

ACh - *acetylcholine*

BSA = *bovine serum albumin*

bp = *base pairs* – pares de base

CCL3 = *Chemokine(C-C motif) ligand 3*

cDNA = *complementary DNA* – DNA complementar

CMLT = Células da musculatura lisa de traqueia

CMLVA = Células da musculatura lisa das vias aéreas

DA = Dalton

DAPI = 4,6-diamidino-2-fenilindol

DEPC = Dimetil pirocarbonato

DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNase = Nuclease que catalisa a degradação do DNA

dNTP = *2' – deoxynucleoside 5'- triphosphate*

DTT = DL-Dithiothreitol

EDTA = etilenodiaminotetracético

EGTA = *ethylene glycol tetraacetic acid*

ELISA = *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

ERK = *extracellular-signal-regulated kinases*

α -FAP = *Fibroblast activation Protein alpha*

FGF-2 = *Fibroblast growth fator 2* – Fator de crescimento de fibroblastos 2

FITC = fluoresceína

H&E = Hematoxilina & eosina

IFN- δ = Interferon- δ

IgE = Imunoglobulina E

IgG = Imunoglobulina G

IL- = Interleucina

JNK = *c-Jun N-terminal kinases*

LTC = Cisteinil Leucotrienos

MAPK = *Mitogen Activated Protein Kinases* – Proteína quinases ativadas por mitógeno

MIP-1 α = *Macrophage inflammatory protein-1 α* – Proteína inflamatória de macrófagos 1 α

Oligo-DT = sequência curta de *deoxy-thymine nucleotids*

PBS = Tampão fosfato salino

PBS+BSA 1% = Tampão fosfato salino + Albumina sérica bovina 1%

PCR = *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase

PMSF = *phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethanesulfonyl fluoride*

PVDF = *polyvinylidene difluoride*

RNA_m = *RNA messenger* – RNA mensageiro

RNAse = Nuclease que catalisa a degradação do RNA

RPE – R-ficoeritrina

RT-PCR = *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* – Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia de polimerase

SCF = *Stem cell factor* – Fator de células tronco

SDS = sulfato dodecil de sódio

SFB = soro fetal bovino

α -SMA – *alpha smooth muscle actin* – alfa-actina de músculo liso

TAE 50x = Tampão (TRIS – Acetato – EDTA).

TGF- β = *Transforming growth factor* - Fator transformador de crescimento β

TMB 0,5% = *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*

TNF- α = *Tumor necrosis factor- α*

SUMÁRIO

1.	Introdução	13
2.	Proposição	20
3.	Materiais e Métodos	21
3.1	Animais e aspectos éticos	21
3.2	Isolamento e cultura primária de CMLT de camundongos	21
3.3	Análise e caracterização por imunofluorescência da cultura primária de células da musculatura lisa da traqueia.	22
3.4	Análise histológica de CMLT por coloração H&E	23
3.5	Estimulação das CMLT	23
3.6	Análise da expressão de <i>c-Kit</i> em CMLT por Citometria de Fluxo	24
3.7	RT-PCR e análise da expressão de TGF- β em CMLT	24
3.8	Western Blot e análise de detecção imunológica de FGF-2 em CMLT	26
3.9	Determinação de TGF- β e CCL3/MIP-1 α por ELISA	27
3.10	Efeito de SB 202190, PD 98059 e SP 600125 sobre a produção de FGF-2 e CCL3/MIP-1 α e expressão de TGF- β por CMLT estimuladas por SCF	28
3.11	Análise estatística	28
4.	Resultados	29
4.1	Caracterização de células da musculatura lisa de traqueia.	29
4.2	CMLT estimuladas por SCF expressam receptores <i>c-Kit</i>	31
4.3	SCF induz expressão de RNAm para TGF- β e produção proteica de TGF- β em CMLT	33
4.4	SCF induz produção de FGF-2 proteína em CMLT	36
4.5	SCF induz produção de CCL3/MIP-1 α em CMLT	38
4.6	SB, PD e SP inibem a expressão de RNAm para TGF- β e produção das proteína TGF- β , FGF-2 e CCL3/MIP-1 α em CMLT	40
5	Discussão	43
6	Conclusão	52
	Referências	53
	Anexos	69

1 Introdução

Asma é uma patologia que promove alterações nas vias aéreas, sendo responsável pelos processos de inflamação, hiper-reatividade e remodelamento que acometem essas estruturas (PAGE et al., 2001), além de ser caracterizada pela contração espástica da musculatura lisa dos bronquíolos, decorrente da hipersensibilidade contrátil dos mesmos, em resposta a uma variedade de alergenios presente no meio ambiente (BOUSQUET et al., 2000; VIGNOLA et al., 2000; ELIAS et al., 2000; STEWART et al., 2001). Etiologicamente, a asma é uma doença heterogênea, aparecendo muitas vezes como uma forma de hipersensibilidade imediata (RENAULD et al., 2001), envolvendo episódios recorrentes de obstrução das vias aéreas e respiração ofegante, processos decorrentes da presença nas vias aéreas de resposta inflamatória alérgica que envolve extensa infiltração leucocitária, superprodução de muco e contração da musculatura lisa (SHUM et al., 2008).

De acordo com a ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), 300 milhões de pessoas são afetadas pela asma no mundo (MASOLI et al., 2004), enquanto que nos países ocidentais, seus índices têm alcançado um platô desde os anos de 1990, especialmente em adultos (VON HERTZEN et al., 2006), incidência significativa que representa um grande problema sob o ponto de vista socioeconômico (WEISS, et al., 2001).

É clara a sobreposição das manifestações clínicas da asma com outras afecções alérgicas, em especial aos da rinite alérgica e anafilaxia. No entanto, talvez o paradigma mais aceito para sua patogênese é baseado na inflamação das vias aéreas, por mecanismos que foram sendo investigados ao longo do tempo, fornecendo subsídios para esta proposta e desenvolvendo o conceito de que a inflamação era causa importante no fenótipo da asma (WALTER et al., 2005). Além da associação com a alergia, em função da elevação da IgE plasmática, a presença de proteínas liberadas pelos eosinófilos na reação inflamatória, pode danificar o epitélio das vias aéreas e contribuir para a hiper-reatividade (GANONG, 2006).

O remodelamento das vias aéreas na asma é delimitado por variações na estrutura de sua parede, incluindo hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa,

as quais crescem com a severidade da doença e, portanto, são associadas com a obstrução do fluxo de ar (SAUNDERS et al., 2009). Apesar de significativos avanços na compreensão da patologia, as abordagens terapêuticas, apesar de existirem, são limitadas. Alguns pacientes não respondem bem ou param de responder ao uso de corticosteroides (ANTONICELLI et al., 2004) e mesmo diante de adequada terapia anti-inflamatória, observa-se a perda em longo prazo da função pulmonar em pacientes asmáticos (LANGE et al., 1998), o que aumenta a relevância na pesquisa visando obter novas drogas e terapias adequadas a esta morbidade.

Muitos doentes com asma têm outras manifestações associadas, como rinite e eczema, aonde a fisiologia da constrição das vias aéreas é semelhante, levantando a hipótese de que a degranulação dos mastócitos pode ser a base da doença (RENAULD, 2001). No entanto, é improvável que apenas uma célula seja responsável pela iniciação e perpetuação desta doença, sendo que os mastócitos humanos libertam mediadores responsáveis por gerarem intensa broncoconstrição, induzindo a proliferação de células da musculatura lisa, recrutamento e ativação de células inflamatórias, contribuindo desta maneira para os aspectos característicos da asma (PAGE, 2001).

Diversas células do interior dos pulmões estão implicadas na doença, as quais são responsáveis pelo início e perpetuação do processo inflamatório, incluindo mastócitos, eosinófilos, linfócitos T e B, fibroblastos e células da musculatura lisa das vias aéreas (PAGE, 2001). A densidade de mastócitos é alta no músculo liso das vias aéreas e nas glândulas mucosas e sua degranulação é aumentada na asma fatal (ALRASHDAN et al., 2012) e essa densidade, associada às mudanças em sua distribuição nos tecidos pulmonares, contribuem significativamente para a fisiopatologia da asma (VAN DER VELDEN et al., 2012). Linfócitos estão envolvidos com a asma alérgica atópica, bem como com a não atópica e profissional, com potencial para modular a inflamação das vias aéreas, através da liberação de IL-13 e outras citocinas, induzindo a hiper-responsividade das vias aéreas independentemente do IgE e eosinofilia em modelos animais (KAY A., 2006). Fibroblastos bronquiais de pacientes com asma induzem maior expressão de proteínas da matriz extracelular, sendo que mais de 50% foram definidos como miofibroblastos, com maior potencial para fibrose tecidual (NAM et al., 2012) A atividade mastocítica na asma, levando ao

recrutamento de eosinófilos, torna relevante a análise de seu papel durante a inflamação, relacionado com a expressão de várias citocinas, quimiocinas e seus receptores, importantes durante o processo inflamatório alérgico associado, bem como para a compreensão dos determinantes da severidade desta patologia e o desenvolvimento de novas terapias (OLIVEIRA, et al, 2003). As descobertas relativamente recentes do papel central das células da musculatura lisa das vias aéreas (CMLVA) na síntese desses mediadores, bem como de moléculas de adesão (JOHNSON et al., 1995), permitem atribuir a essas substâncias, ampla capacidade de promover e perpetuar os mecanismos inflamatórios presentes na patologia (CHUNG, 2000).

Novos estudos revelam que CMLVA são fontes importantes de inúmeras citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento biologicamente ativos, demonstrando que a liberação de mediadores pró-inflamatórios por elas, pode estimular eosinófilos, células epiteliais, linfócitos, mastócitos, macrófagos, neutrófilos e plaquetas, auxiliando no recrutamento e ativação dessas células da inflamação, aumentando, portanto, a cascata inflamatória (McKAY et al., 2001).

As células recrutadas ou residentes presentes nas vias aéreas respondem, portanto, pela iniciação ou perpetuação da doença, por secretarem mediadores inflamatórios ou por expressarem moléculas de adesão celular sendo que, a interação célula-célula contribui para a hiper-reatividade das vias aéreas no distúrbio, evidenciando supor que a células T, mastócitos e as células do músculo liso, interagem diretamente, via estas moléculas de adesão celular (DAMERA et al., 2009). Estes processos permitem evidenciar que as células da musculatura lisa das vias aéreas (CMLT) são também uma potencial fonte de produção de fatores de crescimento implicados no espessamento da parede das vias aéreas (MCKAY et al., 2001).

O envolvimento da traqueia nos processos inflamatórios alérgicos relacionados às vias aéreas, especialmente na asma, foi objeto de estudos envolvendo proliferação celular (MALAVIA et al., 2009); hipertrofia, hiperplasia e deposição da matriz extracelular (JAMES et al., 2012); relaxamento induzido por Óxido Nítrico (PEREZ-ZOGHBI et al., 2010); fenômenos fisiopatológicos envolvidos na remodelação das vias aéreas na asma (BARA et al, 2010) e expressão de IL-8 (MULLAN et al., 2008). Todos esses estudos foram realizados com células epiteliais ou musculares lisas de traqueia humana. Outros trabalhos

mostram o papel de células musculares lisas de traqueia de porcos em modelo experimental de asma simulada *in vitro*, avaliando mecanismos de resistência e adaptação (MCPARLAND et al 2005); expressão gênica em ratos de Pré-protaquinina-A derivada de nervo e receptores de Neurokinin-1 (MAGHNI et al, 2003); e aumento de IL-13 na contratilidade do músculo liso traqueal de camundongos (FARGHALY et al, 2008).

Um dos fatores de crescimento relevantes na compreensão dos fenômenos que envolvem a participação e aumento dos mastócitos nas vias aéreas asmáticas é o Fator de Crescimento de Mastócitos, conhecido como *Stem cell factor* (SCF) ou c-Kit ligante (HUANG et al., 1990; MARTIN et al., 1990), uma glicoproteína com interação por receptores tirosina-quinase denominados c-Kit, protooncogenes expressos em células-tronco primitivas hematopoiéticas (GEISLER et al., 1988), melanócitos (NOCKA et al., 1989), células germinativas (MANOVA et al., 1990) eosinófilos do sangue periférico (YUAN et al., 1997) e mastócitos (GALLI et al., 1995). SCF é expresso *in vitro* por várias células das vias aéreas, incluindo aquelas do epitélio brônquico (WEN et al., 1996), fibroblastos pulmonares (KASSEL et al., 1998), células da musculatura lisa brônquica (KASSEL et al., 1999), dentre outras. O SCF é importante na manutenção e sobrevivência dos mastócitos por inibir sua apoptose, induzindo quimiotaxia e tendo papel essencial em sua adesão à matriz extracelular (MEININGER et al., 1992; DASTYCH et al., 1994).

A ativação dos mastócitos pelo SCF faz com que muitos mediadores pré-formados sejam liberados, induzindo interação entre leucócitos circulantes e o endotélio das vênulas pós-capilares (KUBES, 1996). Desta forma, SCF pode estar relacionado com muitas doenças associadas com aumento local do número e/ou ativação de mastócitos e interação com outras células, como ocorre na asma (KASSEL et al., 2001). Estudos prévios (OLIVEIRA et al., 2001) demonstraram que o SCF está diretamente envolvido na produção de leucotrienos e na indução de hiper-reatividade das vias aéreas, via ativação de mastócitos. O Fator de Crescimento de Fibroblastos básico (FGF-2) e o Fator transformador do crescimento beta (TGF- β), também são mediadores sintetizados pelas células da musculatura lisa das vias aéreas, com atividades relacionadas à promoção, diferenciação e ativação de eosinófilos; produção e

liberação de IgE e expressão de receptores de IgE em mastócitos e eosinófilos (COKER et al., 1996; CHU et al., 2004, YUM et al., 2011).

TGF- β é uma citocina caracterizada como uma superfamília de vias de sinalização (CHIBA et al., 2003; BERGHORN et al., 2006) que incluem activinas, proteínas morfogenéticas ósseas, fator de diferenciação de crescimento e proteínas TGF- β , mediadores secretados que regulam uma série de funções biológicas em vários tipos celulares (SHI et al., 2003; DERYNCK et al., 2003; MASSAGUE et al., 2005). O TGF- β está relacionado à importante papel na regulação da inflamação e remodelação das vias aéreas na asma (BOTTOMS et al., 2010), sendo caracterizados como fatores de crescimento pleiotrópicos com relevante função na manutenção da homeostase dos tecidos (MASSAGUE, 2000). Possui todas as isoformas conhecidas em mamíferos, TGF- β , TGF- β 1 e TGF- β 3 expressas nas vias aéreas e TGF- β e TGF- β 2 com sua síntese aumentada na asma (BOTTOMS et al., 2010). No pulmão humano normal, todas as três isoformas são expressas no epitélio bronquial, sendo TGF- β 1 e TGF- β 3 expressas por macrófagos e o TGF- β 1 também expresso pelo endotélio vascular, músculo liso e fibroblastos (AUBERT et al., 1994; COKER et al., 1996; CHU et al., 2004). No entanto, os mecanismos envolvidos na expressão deste mediador em CMLT induzida pelo SCF necessitam ser mais bem estudados.

O FGF-2 é membro de uma família de proteínas reguladoras de função, da proliferação e da diferenciação celular, possuindo 17.000 DA de peso molecular e que tem sido reconhecido como potente fator angiogênico (FOLKMAN et al., 1987), mitogênico e quimiotático para fibroblastos e células endoteliais (TERRANOVA et al., 1985). O FGF-2 possui também importante papel na inflamação e na cicatrização de feridas (MOHAN et al., 2010), sendo que sua expressão ocorre em rins humanos, células da musculatura lisa vascular, fibroblastos, cérebro e retina (CHOTANI et al., 2000), estando ainda relacionado com a resposta imune modulada pelos odontoblastos, principalmente no processo de reparo tecidual envolvendo a polpa dental (OLIVEIRA et al, 2011).

Alguns estudos relacionados à atividade do TGF- β e do FGF-2 na inflamação e remodelação das vias aéreas (YUM et al., 2011) ainda são incipientes e o papel específico destas citocinas dentro da cascata de células e mediadores presentes na asma ainda é pouco conhecido.

Outra proteína investigada nos processos fisiopatológicos relacionados às doenças inflamatórias alérgicas das vias aéreas é CCL3/MIP-1 α , quimiocina associada com atividade quimiotática para células mononucleares *in vitro* e *in vivo* (OPPENHEIM et al., 1991; SCHALL et al., 1991), sendo envolvida de modo crítico na patogênese de inflamações pulmonares em camundongos infectados experimentalmente com o Vírus sincicial respiratório (HAEBERLE et al., 2001). Sua produção pode ser significativamente up-regulada em resposta à produção de citocinas inflamatórias como IL-1, IFN- δ e IL-10 em processos patológicos como granulomas fibroblásticos (LUKACS et al., 1994), contribuindo na exacerbação da injúria pulmonar (TOKUDA et al., 2000; ISHIDA et al., 2007) e sendo relacionada também com a capacidade de estimular macrófagos e fibroblastos para produzir IL-1, IL-6 e TNF (OPPENHEIM et al., 1991). Halwani et al. (2011) propõe que CCL3/MIP-1 α , dentre outras citocinas e quimiocinas, pode influenciar diretamente o aumento da taxa de proliferação de células da musculatura lisa das vias aéreas e de sua sobrevivência, no processo de mudanças estruturais associadas à asma, sugerindo ainda ocorrer uma redução na distância entre essas células e o epitélio, através de um possível processo de migração celular.

A ativação de células residentes, linfócitos e a produção destas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento variados, promovem a diferenciação e ativação de eosinófilos; produção e liberação de IgE; expressão de receptores de IgE em mastócitos e eosinófilos. O papel das células da musculatura lisa das vias aéreas sobre a sua síntese é descrito em alguns trabalhos recentes, já citados acima não sendo, porém, encontrados estudos sobre a possível relação entre o SCF, TGF- β , FGF-2 e CCL3/MIP-1 α nestas estruturas. Avaliar o papel do SCF sobre a expressão destas proteínas nas células da musculatura lisa das vias aéreas, bem como elucidar as possíveis vias de transdução de sinal relacionadas a esse processo, pode ser uma importante ferramenta no controle da resposta inflamatória alérgica na asma, principalmente tendo em vista a possibilidade de utilização de fármacos mais seletivos no tratamento desta patologia.

O processo de injúria tecidual em relação a processos inflamatórios alérgicos como, por exemplo, a asma, é complexo e requer uma inter-relação entre infiltração de leucócitos, endotélio, epitélio residente, macrófagos

alveolares e células da musculatura lisa da traqueia. Estes processos, isolados ou conjuntamente, requerem uma série de sinais orquestrados. Uma das principais vias de sinalização utilizadas é a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (HERLAAR et al., 1999), um dos maiores sistemas sinalizadores utilizados pelos organismos eucarióticos, para transdução de sinais extracelulares gerando respostas intracelulares (HUANG et al., 2004).

Os receptores ligados a quinases medeiam às ações de uma ampla variedade de proteínas mediadoras, incluindo fatores de crescimento e citocinas, além de hormônios como a Insulina e a Leptina, cujos efeitos são exercidos principalmente ao nível da transcrição gênica, possuindo importante papel no controle da divisão, crescimento e diferenciação celulares, assim como na inflamação, reparação tecidual, apoptose e respostas imunológicas (RANG et al., 2007).

Aspectos comuns a todas as isoformas de MAPKs é a fosforilação de resíduos de Treonina (Thr) e Tirosina (Tyr) e apresentarem a sequência de aminoácidos Thr-Xxx-Tyr, na qual X difere de acordo com a isoforma, podendo ser Ácido Glutâmico (Glu) na MAPK tipo ERK (p44/42), prolina (Pro) na MAPK tipo JNK e glicina (Gly) na MAPK p38, os três maiores grupos de MAPK conhecidos (HERLAAR et al., 1999). Uma vez ativadas, as MAPKs podem fosforilar e ativar outras quinases ou proteínas nucleares e como tal, fatores de transcrição no citoplasma ou no núcleo, sendo que estas substâncias atuam via MAPK p38 e o aumento ou decréscimo na expressão de determinados genes-alvo, resultam na resposta biológica específica (HERLAAR et al., 1999).

TGF- β , FGF-2 e CCL3/MIP-1 α regulam importantes respostas endógenas em vários tecidos, e os mecanismos de sua expressão e produção nos músculos lisos das vias aéreas em processos inflamatórios como a asma, ainda carecem de estudos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de TGF- β , FGF-2 e CCL3/MIP-1 α por CMLT de camundongos saudáveis estimuladas por SCF e os mecanismos envolvidos na expressão destes mediadores.

2 PROPOSIÇÃO:

O objetivo do presente estudo foi avaliar os mecanismos envolvidos na expressão e produção de FGF-2, TGF- β e CCL3/MIP-1 α em CMLT de camundongos estimuladas pelo SCF, além de avaliar as possíveis vias de sinalização intracelular relacionadas às MAPKs ativadas no processo.

Assim sendo, as estratégias utilizadas no presente estudo foram:

- 1- Avaliar a presença do receptor c-Kit, ligante do SCF em CMLT;
- 2- Investigar se CMLT de camundongos estimuladas por SCF produzem TGF- β , FGF-2 e CCL3/MIP-1 α ;
- 3- Investigar qual a via de sinalização intracelular (p42/44, p38 ou JNK) envolvida na expressão de TGF- β , FGF-2 e CCL3/MIP-1 α em CMLT estimuladas por SCF.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais e aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais que envolveram o uso de animais foram revistos e aprovados pelo Comitê Institucional de Bem-estar animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Paulista, Araçatuba, SP (protocolo nº 2010-003463). Um total de 5 camundongos Balb/c machos saudáveis, pesando entre 20 e 25g foram utilizados, sendo mantidos em sala com temperatura controlada, com livre acesso à água e ração. Com o propósito de obter todos os explantes das amostras de traqueia utilizadas neste estudo, os camundongos foram sacrificados com uma overdose de Halotano (Tanohalo, Cristália, Campinas, SP, Brasil).

3.2 Isolamento e cultura primária de células da musculatura lisa da traquéia de camundongos

Células da musculatura lisa da traqueia (CMLT) foram obtidas usando técnica de explante (Fig. 1). Após excisão, as traqueias foram transferidas para capela de fluxo laminar, onde o tecido conectivo e o epitélio das vias aéreas foram removidos por cuidadosa raspagem da superfície luminal. As estruturas foram picadas com uma lâmina de bisturi em fragmentos pequenos em placas de petri, centrifugadas e adicionadas em garrafas pequenas de cultura contendo meio Dulbecco's eagle modificado (GIBCO, Life Technologies, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), 4 mM L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina (GIBCO, Life Technologies, USA), e 0,25 mg/mL de anfotericina (GIBCO, Life Technologies, USA). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ até a densidade celular adequada aos repiques necessários para a realização dos experimentos. As garrafas com os fragmentos foram mantidas nas condições citadas por cerca de uma semana, tempo suficiente para que as células possam migrar dos mesmos e aderirem no fundo das garrafas. Após, os fragmentos foram retirados, permitindo uma livre proliferação das células, com trocas do meio de cultura a

cada 48 horas. A cada passagem, as células em confluência foram repicadas, sendo descoladas das garrafas com 0,25% de tripsina e 0,05% de EDTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) por 5 minutos. CMLT foram utilizadas entre a 4^a e 6^a passagens para todos os experimentos.



Fig.1 – Traqueia exposta de camundongo Balb/c macho para explante.

3.3 Análise e caracterização por imunofluorescência da cultura primária de CMLT.

CMLT foram preparadas em cultura e semeadas sobre lamínulas circulares (20 mm de diâmetro), colocadas em placa de cultura com 24 poços, até a adesão em sua superfície, o que ocorreu após cerca de 18h. As lamínulas foram removidas dos poços e pré-fixadas em acetona gelada, sendo armazenadas a -20°C. No momento da marcação, as células foram fixadas com acetona gelada por 2 minutos, sendo, em seguida, lavadas com tampão PBS. As lamínulas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente com PBS/soro de coelho para o bloqueio de ligações inespecíficas. Os anticorpos primários Anti- α -Smooth muscle actin mouse monoclonal (α SMA; 1:200; A5228 Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA); Anti-Cytokeratin 10/13 mouse monoclonal antibody (1:100; MMS-157S Covance Inc. Dallas, TX, USA) and anti-FAP- α goat polyclonal antibody (anti-FAP- α ; 1:100; sc-54538 Santa Cruz, SC, CA, USA) foram incubados por 18h a 4°C. Após nova lavagem, as células foram incubadas com os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG H+L

antibody (1:200; A11001 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and rabbit anti-goat IgG-FITC antibody (1:200; sc- 2777 Santa Cruz, SC, CA, USA), sendo, em seguida, montadas em lâminas para microscopia imersas em meio de montagem contendo DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) (H-1200- Vector Labs, California, USA). A análise e captura das imagens foram realizadas em microscópio confocal invertido sistema a laser LEICA TCS-SPE (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha), equipado com objetiva para óleo de imersão em plano apocromático (1.3 CS) com contraste de interferência diferencial. O software LAS AF 2.5.1 foi utilizado para captação das imagens.

3.4 Análise histológica de CMLT

Para o experimento, CMLT (3×10^6 células/mL) foram semeadas em placas com 6 poços até alcançar aderência, o que ocorreu após cerca de 12h . Em seguida, as células foram coradas pela técnica de Hematoxilina/Eosina (Panóptico rápido – Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) e analisadas por microscopia ótica com captura de imagens por Câmera Digital Olympus acoplada ao microscópio.

3.5 Estimulação das CMLT

Para os experimentos, CMLT entre 4 a 6 passagens (3 a 4 semanas de incubação), foram plaqueadas até a densidade de 3×10^6 células/mL células em meio DMEM com 10% de Soro fetal bovino. As células foram tripsinizadas e subcultivadas em placas de 24 poços para preparo dos ensaios para avaliação por Western blot, Citometria de fluxo, ELISA e extração de RNA. Após a obtenção da confluência, as células foram estimuladas em presença ou ausência de SCF nas concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL (Recombinant mouse SCF 250-03 PEPROTECH, Colônia Narvarte, México, DF) e examinadas após 1h, 6h e 24h. As células e os sobrenadantes livres de células foram coletados e armazenados em freezer a -80°C até sua utilização.

3.6 Análise da expressão de *c-Kit* em CMLT por Citometria de Fluxo.

A expressão do receptor para SCF foi avaliada em CMLT obtidas após metodologia descrita anteriormente. CMLT foram estimuladas com SCF (10 ng/mL) por 24h. As células foram coletadas em tampão PBS, contendo 0.1% de BSA em água deionizada. O total de 10×10^6 células foram coletadas após desprendimento da placa com Tripsina (Sigma-Aldrich®) 0,25%, lavadas em PBS e incubadas por 18 h a 4°C com 10 mg/mL de anticorpo monoclonal *c-Kit* Rato anti-camundongo CD117:RPE (MCA1365PE AbD Serotec, Kidlington, Oxford, OX5 1 GE, UK). Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS mais Triton X-100 0,1%. Uma diluição a 1:50 de anticorpo policlonal secundário Coelho F(ab')₂ anti-rato IgG:RPE (STAR20A AbD Serotec, Kidlington, Oxford, OX5 1 GE, UK) foi adicionada a 100 µL de suspensão celular e incubada a 37°C por 30 min. A suspensão celular foi lavada com PBS como previamente descrito, e após a lavagem final, as células foram fixadas com 4 % de paraformaldeído. Os dados foram obtidos com Attune™ sistema fotométrico de foco acústico (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). O padrão negativo foi examinado por aplicação da mesma suspensão celular com a primeira incubação, sendo o resultado incluído na compensação global para excluir a autofluorescência. Um filtro A BL1-A (488 nm) foi usado em cada análise.

3.7 RT-PCR e análise da expressão de TGF-β em CMLT

O RNA total foi obtido das CMLT, com o uso do reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY) de acordo com as instruções do fabricante. À suspensão foi adicionado 200 µL de clorofórmio em cada tubo de amostra, e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a solução aquosa foi transferida para novos tubos e 500 µL de álcool isopropílico foi adicionado a cada tubo da amostra e armazenado a -20°C até o dia seguinte. Após, as amostras foram retiradas do freezer e centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e 500 µL de etanol 75% foi adicionado à cada amostra que foram centrifugadas novamente a 13.000 rpm durante 10 minutos a

4°C. Em seguida, todo o sobrenadante foi descartado e os tubos foram vertidos para baixo até o pellet estar completamente seco. Após esta etapa, o pellet foi ressuspenso em 20 µL de água de DEPC a 0,1% por amostra, e em seguida armazenados a -80°C. A concentração do RNA foi determinada em espectrofotômetro com a leitura sendo realizada utilizando absorvância de 260/280nm (OD260 equivalente a cada unidade). As amostras de RNA foram armazenadas a -80°C e usadas subsequentemente em procedimentos de transcriptase reversa. A síntese de cDNA foi realizada pelo método do RT-PCR e subsequente eletroforese em gel de agarose para avaliar a expressão do gene constitutivo de β -actina e de TGF- β . Para a realização da transcriptase reversa, 1 µg de RNA total foi utilizado em uma reação contendo 1 µL de oligo-DT (0,5 µg/µL, Invitrogen), 4 µL de dNTP (2,5 µM, Invitrogen), 2 µL de DTT (0,1m/500 µl, Invitrogen), 4 µL de 5x first-standard buffer (250 mM, Invitrogen) e 1 µL de transcriptase reversa (Super Script II, 200 U/µL, Invitrogen). A reação de transcriptase reversa foi realizada de acordo com o seguinte perfil de amplificação: pré-desnaturação a 70°C durante 10 minutos, amplificação (desnaturação a 4 °C durante 5 minutos; anelamento a 42 °C durante 60 minutos; e extensão a 90°C durante 5 minutos). Após a termociclagem as amostras foram armazenadas a 4°C para posteriores análises. Para a realização do PCR, 1 µL de cDNA foi usado em uma reação contendo 4 µL de água de DEPC, 2 µL de dNTP (2,5 µM, Invitrogen), 2,5 µL de 10x PCR Rxn Buffer (-MgCl₂, Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ (50 nM, Invitrogen), 1 µL de primer 10 nM, 12,8 µL de água ultrapura (Invitrogen) e 0,1 µL de Taq DNA polymerase (5 U/µL, Invitrogen). A condição padrão para PCR de β -actina foi 94°C (10 min.), 30 ciclos a 94°C (1 min.), 56°C (1 min.) e 72°C (1 min.) seguida de curva de desnaturação. A condição padrão para PCR de TGF- β foram 94°C (4 min.), 35 ciclos a 94°C (1min.), 58°C (1 min.) e 72°C (1 min.) seguida de curva de desnaturação. O conjunto de primers (camundongos) utilizados foram: β -actina (sense: 5' TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C - 3'; antisense: 5' TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G - 3', 445 bp) e TGF- β (5' CGG AAG CGC GCC ATC GAA ATC C - 3'; antisense: 5' GCA GCA GCT CTG AGC CAC GG - 3', 350 bp). A detecção de mRNA para β -actina foi usada como controle interno. Para detecção dos produtos amplificados, uma alíquota de 13 µL de cada amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Life

Technologies, Grand Island, NY, USA): 196 mL de água ultrapura (livre de DNase e RNase), 3,6 gramas de agarose e 4 mL de tampão TAE (50X), corado com brometo de etídio 10 mg/mL (Sigma, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA). A eletroforese foi realizada a 90 volts, por 150 minutos, em uma cuba horizontal, e o cDNA foi visualizado através de luz ultravioleta em um transiluminador (GE Healthcare - ImageQuant 100). O peso molecular dos produtos da RT-PCR foi determinado pela comparação com marcador de peso molecular conhecido (DNA ladder, 100-1500 bp, Invitrogen). A fotodocumentação dos géis de agarose foi realizada com a utilização de uma máquina fotográfica acoplada ao transiluminador (Olympus SP-500 UZ). O Gel de agarose foi escaneado e analisado utilizando-se o programa Scion Image (Scion Corp., Frederick, MD, USA), para obter um valor numérico que permitiu uma comparação semi-quantitativa entre o alvo TGF- β e o controle constitutivo β -actina.

3.8 Western Blotting e análise de detecção imunológica de FGF-2 em CMLT

Neste conjunto de experimentos, após 1h, 6h, e 24 h, os sobrenadantes livres de células foram coletados para quantificação de FGF-2 usando a técnica de Western blotting. CMLT foram cultivadas e preparadas sob as mesmas condições experimentais descritas anteriormente. Após os respectivos tratamentos e períodos experimentais, as células cultivadas foram lisadas para pesquisa da expressão constitutiva de β -actina e FGF-2, após estimulação. Lisados celulares foram obtidos com tampão de lise Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), Tween 20 1%, deoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, O-Vanadato 1 mM, NaF 1 mM e inibidores de proteases (aprotinina 1 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml e PMSF 1 mM), sendo deixados em banho de gelo por 2h. Em seguida o extrato foi clarificado por centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos e a concentração de proteína determinada pelo Método de Lowry modificado. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado tampão de amostra na proporção de 1:1 [Tris-HCl 100 mM (pH 6,8), DTT 200 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,1 % e glicerol 20%]. As amostras foram fervidas por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida (10-12%) contendo SDS (SDS-PAGE). Após a corrida, realizou-se a transferência para membranas de PVDF. As membranas foram bloqueadas com leite (1%) ou com BSA (1%)

preparados em tampão Tris contendo tween 20 (0,05%-TBST) e incubadas "overnight" com anticorpos primários FGF-2 Goat polyclonal (1:1000 sc-1360 Santa Cruz, SC, CA, USA), β -actin Mouse monoclonal (1:1000 sc-81178 Santa Cruz, SC, CA, USA). Em seguida, foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpos secundários Rabbitt anti-goat (1:3000 sc-2768 Santa Cruz, SC, CA, USA) and Goat anti-mouse (1:3000; sc-2005 Santa Cruz, SC, CA, USA) por 1 hora. Após lavagem das membranas com TBS, as bandas foram detectadas por quimiluminescência (ECL). Para a análise densitométrica das bandas obtidas, foi utilizado o software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA), apropriado para esse fim. O nível de expressão foi determinado através da razão da intensidade do sinal da proteína em relação à β -actina. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média. Em subsequente experimento usando inibidores de MAP quinases, e após estimulação com SCF, o mesmo protocolo foi realizado.

3.9 Determinação de TGF- β e CCL3/MIP-1 α por ELISA em CMLT

A detecção das proteínas analisadas no sobrenadante das CMLT foi realizada. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até o momento do uso. Uma placa de 96 poços para cada proteína analisada (CCL3/MIP-1 α e TGF- β (kit R&D Systems – TGF- β 1 controle) foi revestida com anticorpo monoclonal de captura (50 μL por poço), sendo em seguida armazenada a 4°C (geladeira) durante 18 horas. No dia seguinte, a placa foi lavada com solução de lavagem. Em seguida foram adicionados 100 μL de PBS+BSA 1% em cada poço, e as placas foram mantidas em incubação por 2 horas em temperatura ambiente. Após, as placas foram lavadas novamente e adicionado 50 μL proteína recombinante diluída em PBS+BSA 1% no primeiro poço nas seguintes concentrações: (CCL3/MIP-1 α (4000pg) e TGF- β (2000 pg/mL, kit R&D Systems – TGF- β 1 padrão), do segundo poço até o décimo primeiro as concentrações foram diluídas à metade e mantidas incubando por 2 horas a temperatura ambiente. Após 2 horas, as placas foram lavadas, sendo adicionado 50 μL de anticorpo biotilado diluído em PBS+BSA 1% para CCL3/MIP-1 α e TGF- β (kit R&D Systems – TGF- β conjugado) e mantidas em incubação durante 1 hora. Após, as placas foram lavadas, adicionado 50 μL do reagente TMB (Sigma, CA,

USA) em cada poço e incubadas durante 30 minutos em ambiente livre de luz a temperatura ambiente. Após os 30 minutos, 100 μ L de solução de H₂SO₄ 4N foi adicionado a cada poço para a paralisação da reação enzimática. A quantificação dos resultados foi feita pela leitura da densidade óptica das amostras usando um espectrofotômetro com absorvância de 450nm. A concentração do CCL3/MIP-1 α e TGF- β foi calculada a partir de uma curva padrão em pg/mL.

3.10 Efeito de SB 202190, PD 98059 e SP 600125 sobre a produção de FGF-2 e CCL3/MIP-1 α e expressão de TGF- β por CMLT estimuladas por SCF.

Neste grupo de experimentos, CMLT foram pré-tratadas com os inibidores de MAP quinases p38 SB202190 (SB, 25 mmol/L; Calbiochem) (OLIVEIRA et al., 2011), p42/44 (ERK1/2) PD98059 (PD, 30mmol/L; Calbiochem) (OLIVEIRA et al., 2011) e JNK SP600125 (SP, 10 mmol/L; Calbiochem) (MARCHAND-ADAM et al., 2005) por 30 minutos seguidos por estimulação com SCF (10 ng/mL) por 24 horas. O sobrenadante livre de células foi armazenado para avaliação de CCL3/MIP-1 α e TGF- β por ELISA, e as células foram coletadas para a detecção da produção de FGF-2 usando a técnica de Western blotting e expressão de RNA mensageiro para TGF- β usando RT-PCR.

3.11 Análise estatística

Os dados foram obtidos a partir de, pelo menos, três séries independentes de experimentos e as análises foram realizadas usando o programa estatístico GraphPad Prism (versão 5.0). Os dados foram expressos como média \pm SEM e as comparações entre os grupos foram feitas usando o teste ANOVA com correção de Bonferroni. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização de células da musculatura lisa de traqueia.

CMLT começaram a migrar dos fragmentos da traqueia após uma semana, iniciando o processo de aderência à superfície das placas e proliferação no meio de cultura. Suas características foram identificadas por microscopia ótica e coloração pela técnica de Hematoxilina/Eosina (H&E). As células apresentaram aspecto fusiforme com núcleo central oval, e quando em confluência, assumindo o aspecto denominado “montanha & vale”, característico de células musculares lisas em cultura, identificadas por microscopia ótica (Fig. 2A e 2B) e coloração por H&E (Fig. 2C). Para confirmar as características fenotípicas das CMLT em cultura primária *in vitro*, e excluir possível contaminação com fibroblastos e células epiteliais, coloração por imunofluorescência para α -actina de músculo liso, α -citoqueratina e α -FAP foram realizadas. Células tratadas com anticorpos específicos, não apresentaram marcação para citoqueratina (Fig. 2D) nem para FAP (Fig. 2E) e marcação para α -actina de músculo liso (Fig. 2F). Estes resultados demonstraram que CMLT expressam marcadores para α -actina de músculo liso, indicando pureza da linhagem celular primária produzida.

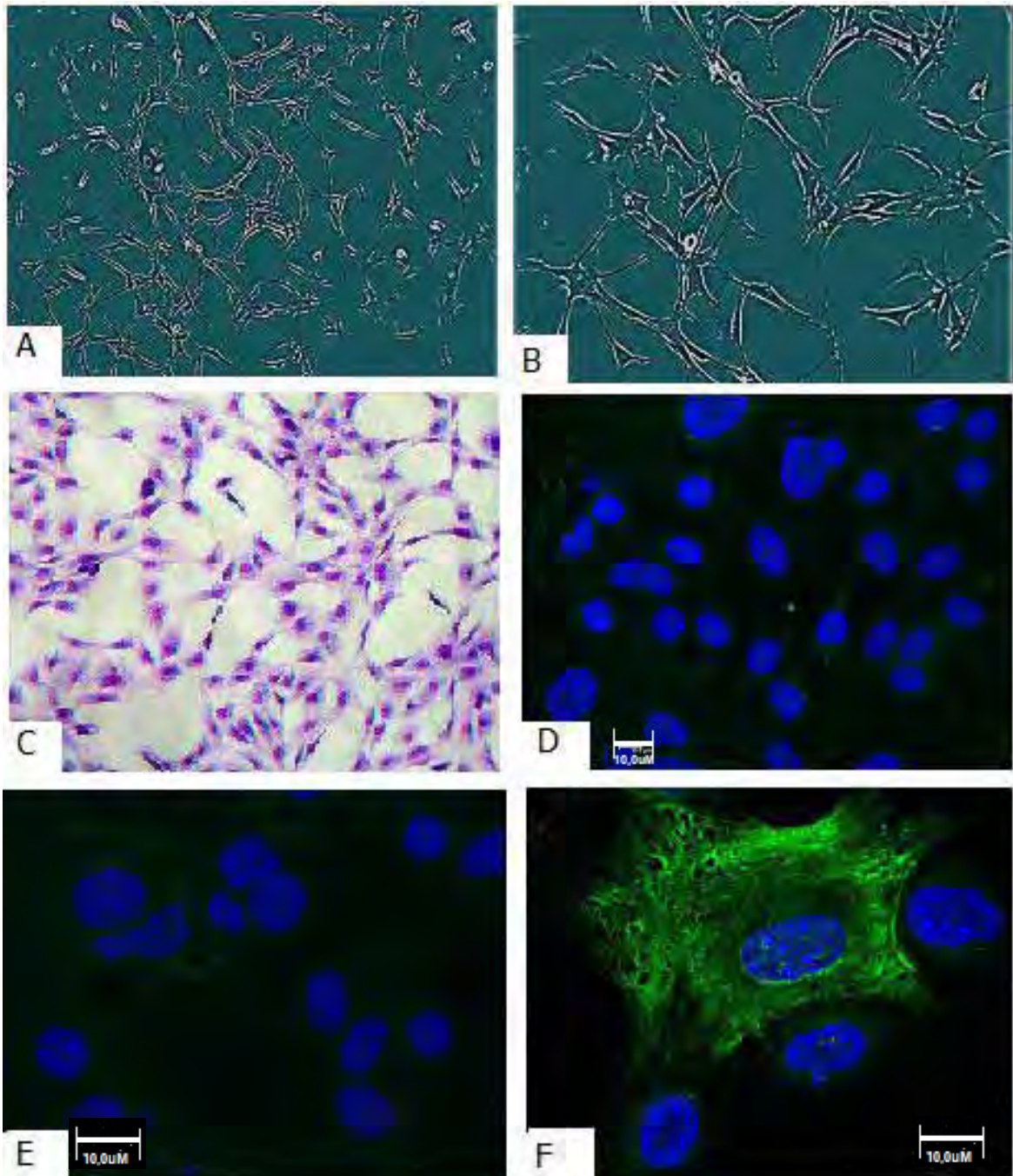


Fig. 2 - CMLT de camundongos cultivadas em DMEM completo. Imagens de cultura de célula com aumento de 100x(A) e 200x(B), e cultura de célula após coloração com Hematoxilina/Eosina com aumento de 200x (C) obtidas por Microscópio de Contraste de Fase acoplado com Câmera digital Olympus. Imagens obtidas por Imunofluorescência revelando ausência de células marcadas para anticorpos anti-citoqueratina com aumento de 400x(D) e anti-FAP com aumento de 400x(E), e presença de células marcadas para anticorpos Anti- α -actina de músculo liso com aumento de 800x(F).

4.2 CMLT estimuladas por SCF expressam receptores c-Kit

CMLT foram estimuladas com 10 ng/mL de SCF e a expressão de c-Kit em sua superfície foi avaliada pela técnica de Citometria de Fluxo. Após tratamento com anticorpo monoclonal CD117-RPE para receptor de SCF (c-Kit), 50000 eventos foram computados com número de células acima de 10^3 , considerado o ponto de corte para positividade. A análise do controle de IgG Isotípico com o anticorpo policlonal coelho F(ab')₂ anti-rato IgG-RPE mostrou ausência de marcação, não demonstrando autofluorescência com relação às amostras examinadas. 23,45% das células não estimuladas com SCF são imunorreativas (Fig 3A). As CMLT estimuladas com 10 ng/mL de SCF por 24 h. demonstraram alta reatividade ao marcador utilizado (Fig. 3B) e a proporção real para o CD117-RPE positivo corresponde à 95,74% dos 50.000 eventos positivos analisados, conforme demonstrado no histograma duplo derivado da sobreposição das imagens A e B, com resultados incluídos na compensação global para excluir a autofluorescência (Fig. 3C). A fig. 3D apresenta a proporção relativa das CMLT que apresentaram imunorreatividade ao anticorpo anti-c-Kit CD-117RPE.

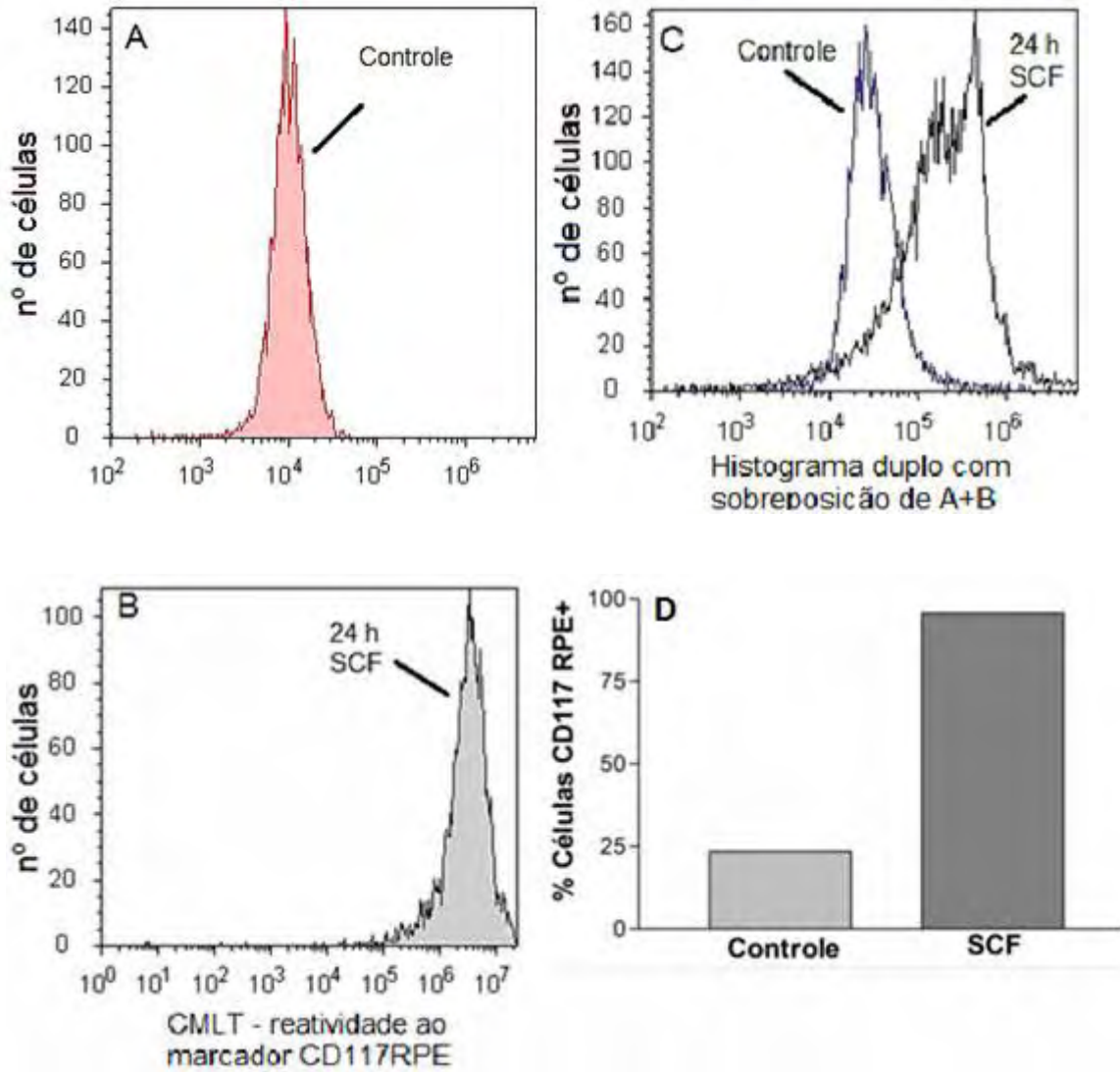


Fig. 3 – Caracterização da expressão do receptor c-kit em células da musculatura lisa da traquéia. Células foram incubadas com anticorpos específicos controle e anti-c-Kit para marcadores de superfície. Células não estimuladas (fig.A) e estimuladas com 10ng/mL de SCF por 24h (fig. B) apresentaram-se imunorreativas ao anticorpo CD117-RPE. Histograma duplo mostra a proporção verdadeiramente positiva para CD117-RPE em células estimuladas e não estimuladas (fig.C). Do total de 50.000 eventos positivos, 23,45% corresponde à imunorreatividade das CMLT não estimuladas com SCF, enquanto 95,74% das células estimuladas com SCF apresentaram-se imunorreativas (fig.D). Dados foram obtidos com Attune™ sistema fotométrico de foco acústico (Applied Biosystems®).

4.3 SCF induz expressão de RNAm para TGF- β e produção proteica de TGF- β em CMLT.

Para examinar os efeitos do SCF sobre a expressão e produção de TGF- β , CMLT foram estimuladas com concentrações crescentes de SCF (1, 10 e 100 ng/mL) e a avaliação da expressão de RNAm para TGF- β e produção desta proteína foram observados em 1h, 6h e 24h. Como mostrado na figura 4, observamos expressão constitutiva de TGF- β no grupo controle, 1h e 6h após estimulação, sendo reduzida após estimulação com SCF 1, 10 e 100 ng/mL (Fig. 4A e 4B). Notamos que, contrariamente ao ocorrido nos tempos de 1h e 6h, com 24h, a expressão de TGF- β aumentou com SCF10 ng/mL, chegando ao nível do controle com SCF100 ng/mL (Fig. 4C). A produção de TGF- β proteína mostra aumento significativo já com 6h após a estimulação com SCF na concentração de 100ng/mL (Fig. 5B), alcançando o pico após 24h com 10 e 100 ng/mL de SCF (Fig. 5C).

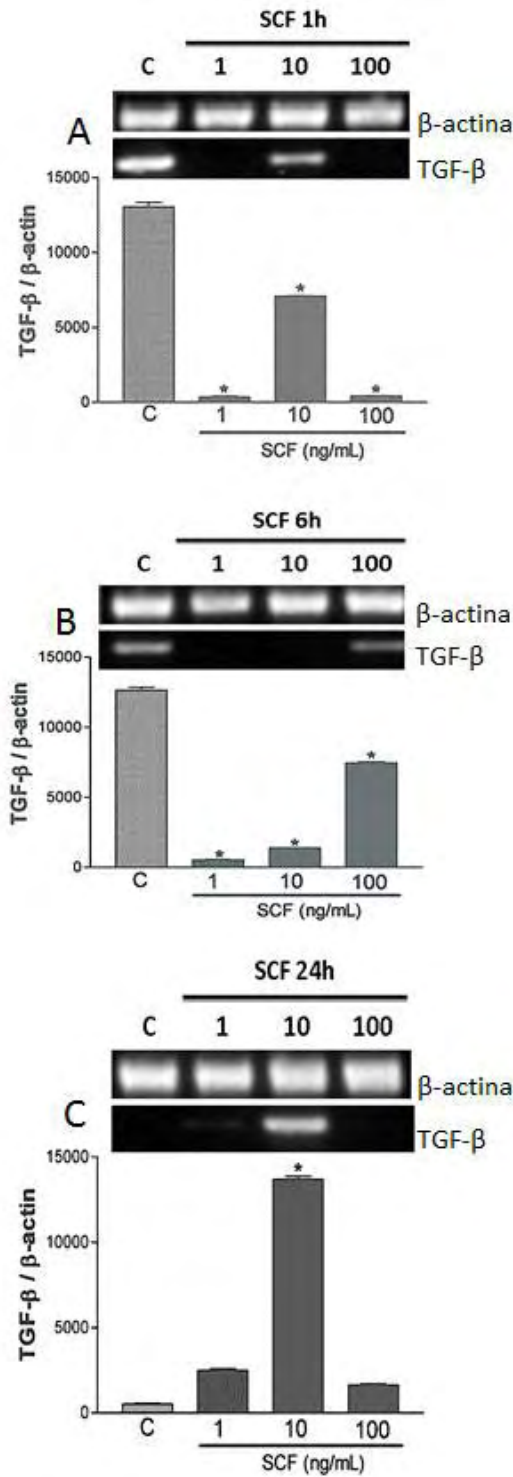


Fig. 4 - Expressão gênica de TGF-β por CMLT estimuladas com SCF. CMLT de camundongos em confluência e aderidas em placas de 24 poços, foram incubadas com SCF por 1h (A), 6h (B) e 24h (C) após estímulo com concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL. Níveis de TGF-β mRNA foram mensurados por RT-PCR. O gel é representativo de três experimentos com resultados similares. A representação da relação TGF-β/ β-actina foi determinada por meio de análise de densitometria. Os resultados representam a média ± EPM obtida em três experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada vez. (ANOVA com teste de múltipla comparação de Bonferroni), * p <0,001 comparado com controle não tratado.

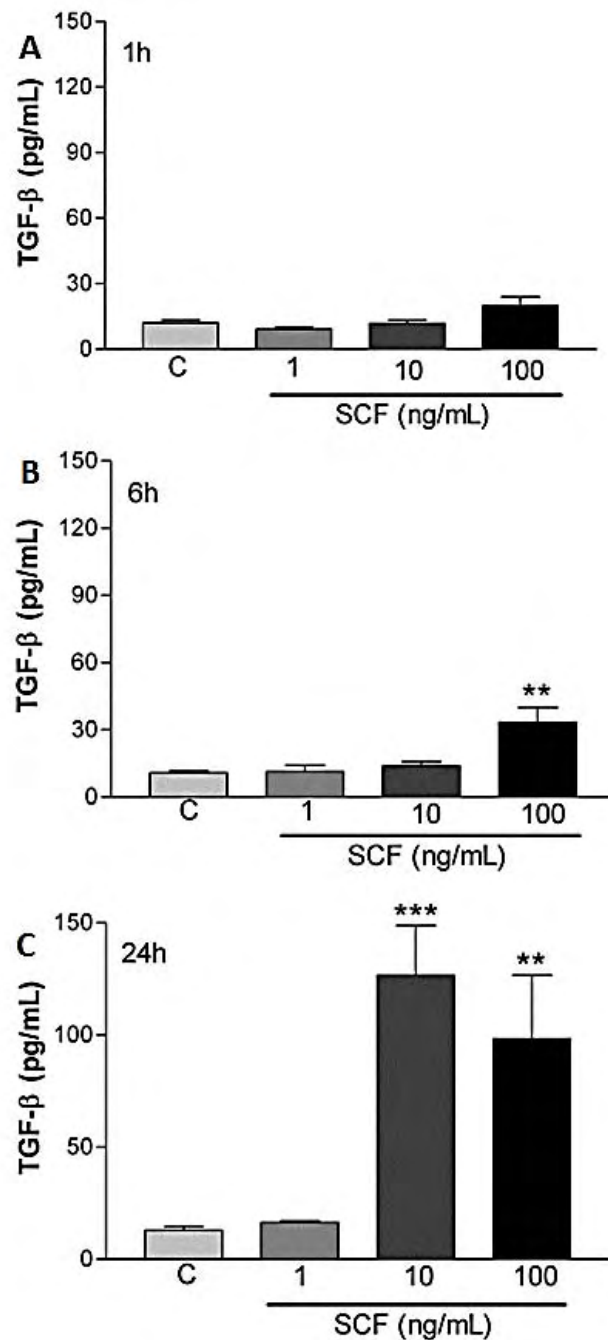


Fig. 5 - Concentração proteica de TGF- β por CMLT estimuladas com SCF. CMLT de camundongos em confluência e aderidas em placas de 24 poços, foram incubadas com SCF por 1h (A), 6h (B) e 24h (C) após estímulo com concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL. A produção de TGF- β em pg/mL no sobrenadante livre de células estimuladas pg/mL foi avaliada por ELISA. Os resultados representam a média \pm EPM obtida em três experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada vez. (ANOVA com teste de múltipla comparação de Bonferroni), ** p < 0,05 e *** p < 0,01 comparados com controle não tratado.

4.4 SCF induz produção de FGF-2 proteína em CMLT.

Nossos resultados demonstram produção constitutiva de FGF-2 no grupo controle de 1h após estimulação, sendo reduzida após estimulação com SCF (1, 10 e 100 ng/mL) (Fig. 6A). A produção constitutiva de FGF-2 decresce após 6h e nós já observamos que a produção após o estímulo por SCF (1, 10 e 100 ng/mL) aumenta significativamente em modo dose-resposta, quando comparada com o grupo controle, sendo mais significativa na concentração de 100 ng/mL (Fig. 6B). É notado finalmente que a produção de FGF-2, embora seja significativa no grupo estimulado de 24h, decresce em comparação ao grupo de 6 h após estimulação (Fig. 6C).

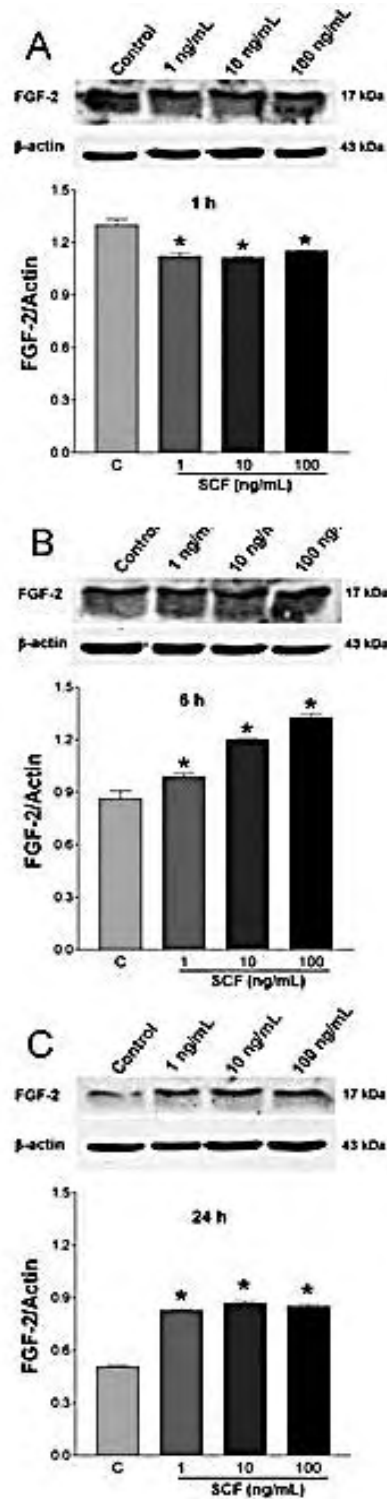


Fig. 6 - Produção proteica de FGF-2 induzida por SCF. CMLT foram incubadas em placas de 24 poços e tratadas com 1, 10 e 100 ng/mL, em 1h (A), 6h (B) e 24h (C). Proteínas extraídas do lisado celular foram analisadas para FGF-2 e β -actina Western blott. A representação da relação FGF-2/ β -actina foi determinada por meio de análise densitométrica. Os resultados representam a média \pm EPM obtida em três experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada vez. (ANOVA com teste de múltipla comparação de Bonferroni) * $p < 0,05$ comparado com o controle não tratado.

4.5 SCF induz produção de CCL3/MIP-1 α em CMLT.

Nossos dados demonstram que 1h estimulação por SCF, não houve aumento significativo na produção de CCL3/MIP-1 α por CMLT (Fig. 7A). O pico da produção de CCL3/MIP-1 α ocorreu 6h após estimulação com 10 ng/mL de SCF, diminuindo no grupo de 24h, no entanto, no entanto, SCF (1 e 10 ng/mL) foram capazes de estimular de modo significativo CMLT a produzir CCL3/MIP-1 α quando comparados ao grupo controle (Fig. 7B e 7C).

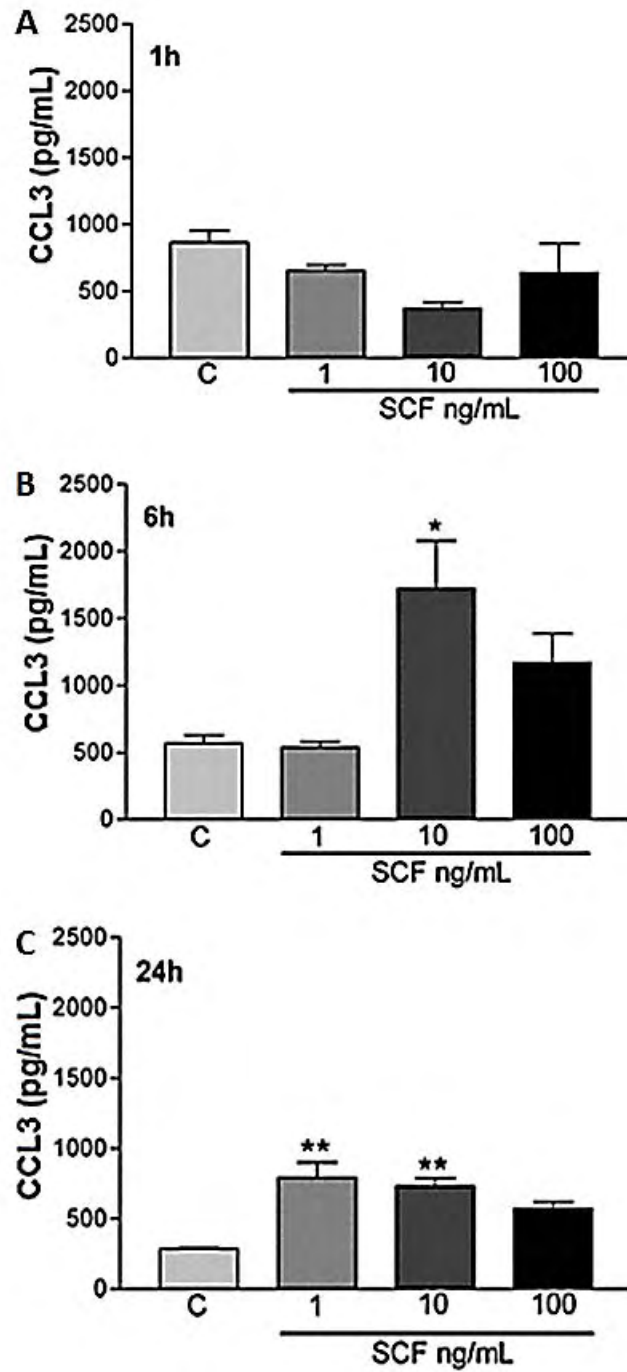


Fig. 7 - Produção de CCL3/MIP-1 α em sobrenadante de CMLT estimuladas por SCF para 1h (A), 6h (B) e 24h (C) nas concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL. A concentração de CCL3/MIP-1 α em pg/mL foi avaliada por ELISA. Os resultados representam a a média \pm EPM obtida em três experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada vez. (ANOVA com teste de múltipla comparação de Bonferroni) ** p < 0,01 e * p < 0,05 comparadas com o controle não tratado

4.6 SB, PD e SP inibem a expressão de RNAm para TGF- β e produção das proteína TGF- β , FGF-2 e CCL3/MIP-1 α em CMLT

Para determinar se as vias de sinalização intracelular p38, ERK1/2 e JNK estavam envolvidas na expressão gênica e proteica de TGF- β , produção de FGF-2 e CCL3/MIP-1 α , células em incubação no mesmo meio utilizado nos experimentos anteriores, foram pré-tratadas com os inibidores de MAP quinases PD (30 μ M), SB (10 μ M) ou SP (10 μ M) por 30 minutos seguidos por estimulação com 10 ng/mL de SCF. Nós podemos observar que a inibição da fosforilação das três vias reduziu significativamente a expressão gênica de TGF- β (Fig. 8A) e sua produção proteica (Fig. 8B) nas CMLT estimuladas com SCF. Em relação à produção proteica de FGF-2, nós observamos uma inibição parcial na fosforilação das vias p38 e JNK, e completa inibição da fosforilação da via ERK1/2 com relação ao grupo controle, nas CMLT estimuladas com SCF (Fig. 9A). A produção de CCL3/MIP-1 α foi completamente inibida por SB, PD e SP (Fig. 9B).

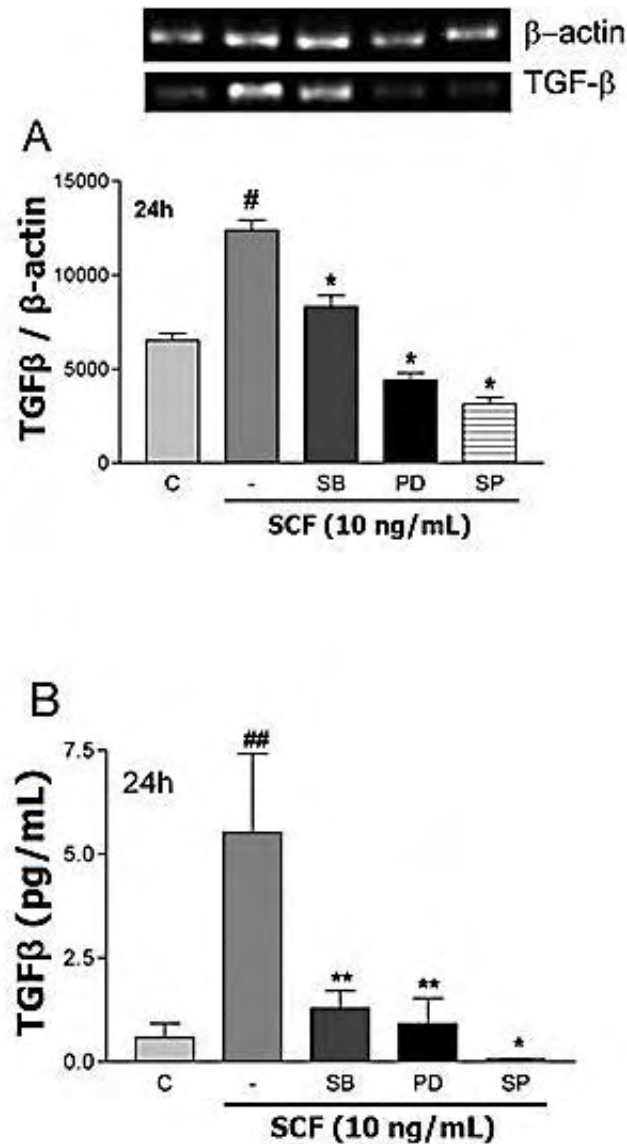


Fig. 8 – Drogas SB 202190, PD98059, SP 600125 inibem a produção proteica e expressão de TGF- β mRNA em CMLT estimuladas por SCF. CMLT em confluência foram pré-tratadas por 30 minutos com SB 202190 (SB), PD98059 (PD) e SP 600125 (SP) e estimuladas com SCF 10 ng/mL por 24 h. A expressão gênica de TGF- β analisada por Western Blott. A representação da relação TGF- β / β -actina foi determinada por meio de análise densitométrica (A). O nível da concentração proteica de TGF- β foi avaliado por ELISA (B). Os resultados representam a média \pm EPM obtida em três experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada vez. (ANOVA com teste de múltipla comparação de Bonferroni). ## $p < 0,01$ e # $p < 0,001$ comparadas com controle não tratado; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,001$ comparados com grupo tratado somente com SCF.

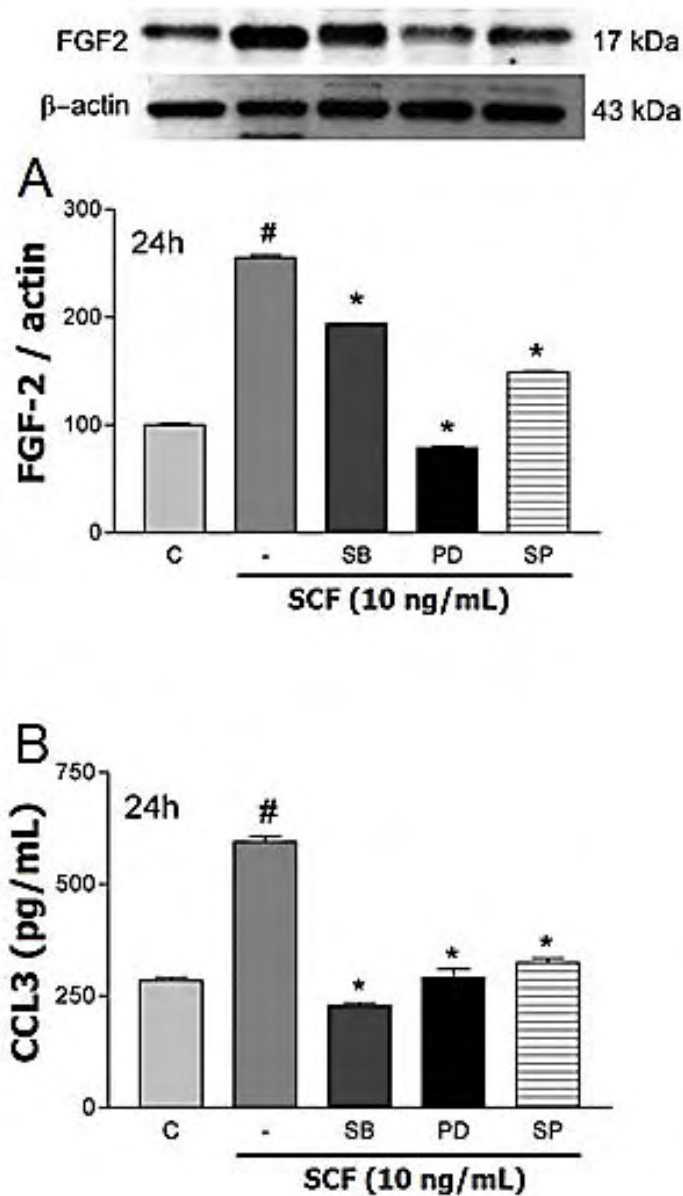


Fig. 9 – Drogas SB 202190, PD98059, SP 600125 inibem a produção de FGF-2 e CCL3/MIP-1 α em CMLT estimuladas com SCF. CMLT em confluência foram pré-tratadas por 30 minutos com SB 202190 (SB), PD98059 (PD) e SP 600125 (SP) e estimuladas com SCF 10 ng/mL for 24 h. A expressão proteica de FGF-2 foi analisada por Western Blott. A representação da relação FGF-2/ β -actina foi determinada por meio de análise densitométrica (A). O nível de concentração de CCL3/MIP-1 α foi mensurado por ELISA (B). Os resultados representam a média \pm EPM obtida em três experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada vez. (ANOVA com teste de múltipla comparação de Bonferroni). # $p < 0,001$ comparado com o controle não tratado; * $p < 0,001$ comparado com o grupo tratado somente com SCF.

5 Discussão

Nossos estudos mostram que células da musculatura lisa da traqueia estimuladas por SCF, produzem FGF-2, TGF β e CCL3/MIP-1 α , via ativação das MAP quinases p38, ERK1/2 e JNK. Além disso, demonstramos pela primeira vez que estas células expressam o receptor de tirosina-quinase c-Kit, ligante do SCF.

A caracterização da cultura das células primárias obtidas da traqueia de camundongos foi determinada, sendo observadas células do tipo fusiforme com núcleo central ovalado (CHAMLEY-CAMPBELL *ET AL.*, 1979; CAMPBELL & CAMPBELL, 1993), que, em alta densidade, tendem a assumir a disposição morfológica denominada “montanha & vale”, característica de células musculares lisas em cultura, aspecto demonstrado em resultados de prévios estudos (WONG et al., 1998; PANG et al., 1997 e AN et al., 2006). Células epiteliais da traqueia de camundongos, avaliadas no processo de transição para células mesenquimais, em doenças envolvendo remodelamento de vias aéreas (KUROISHI et al., 2009), por análise de imunofluorescência, revelaram a presença de α -actina de músculo liso imunorreativa, após diferenciação por estímulo fibrogênico. WONG et al. (1998) demonstrou que esse marcador e outros filamentos de proteínas, também são imunorreativos na musculatura lisa traqueal e que este processo é regulado por condições apropriadas de cultura. Em nossos estudos, utilizamos a técnica de coloração por imunofluorescência para detecção de α -actina de músculo liso, para nos certificarmos da ausência de células epiteliais e fibroblastos e, deste modo, confirmar a pureza da linhagem celular obtida em cultura primária.

CMLT tem revelado, em vários estudos, ser importante como origem de mediadores tais como citocinas, quimiocinas e derivados lipídicos (JOHNSON et, 1995), com habilidade para promover e perpetuar os mecanismos inflamatórios presentes em patologias como o asma (CHUNG, 2000). Nosso trabalho apresenta alguns possíveis mecanismos relacionados à ativação das CMLT por SCF em produzir substâncias envolvidas no processo inflamatório alérgico das vias aéreas. Os mediadores secretados podem estimular vários tipos celulares, induzindo ao recrutamento celular e à ativação da cascata inflamatória (MCKAY

et al, 2001). As células recrutadas ou as células residentes podem ser, portanto, responsáveis por iniciar e perpetuar os processos patológicos e, a interação célula-célula contribui para a hiper-reatividade nos distúrbios das vias aéreas, demonstrando que os linfócitos T, mastócitos e células da musculatura lisa interagem diretamente, via moléculas de adesão celular (DAMERA et al., 2009). Esta inter-relação parece evidenciar que CMLT também são potenciais fontes da produção de fatores de crescimento envolvidos no espessamento da parede das vias aéreas (MCKAY et al., 2001).

Em nossos estudos, utilizamos o SCF como um fator ativador para as células da musculatura lisa da traqueia.

SCF está envolvido nas condições inflamatórias e não inflamatórias na asma (DA SILVA et al, 2005), sendo produzido por vários tipos celulares incluindo CMLT, em resposta a variados estímulos, tendo um papel importante como fator quimiotático para mastócitos durante a inflamação alérgica (KASSEL et al, 1999). Dados da literatura demonstram que a expressão de SCF está aumentada em experimentos prévios realizados *in vitro* com CMLT em condições inflamatórias induzidas com Interleucinas, associadas ao aumento no número e na ativação de mastócitos no processo asmático (DA SILVA et al, 2006).

A produção de SCF durante a inflamação alérgica pode contribuir significativamente para indução da resposta inflamatória eosinofílica e hiper-reatividade, via ativação da população local de mastócitos, sendo identificado que os mediadores primários liberados durante este processo são os metabólitos de Cisteinil-leucotrienos LTC₄ e LTE₄ (OLIVEIRA et al., 2001). Linhagens primárias de mastócitos foram submetidas a cultivo, crescimento, manutenção e incubação com IL-3 e SCF, mostrando positividade para receptores c-Kit por Citometria de Fluxo, apresentando proliferação em resposta à simples estímulos com SCF, IL-3, IL-4, ou IL-10 (LUKACS et al., 1996). Estes estudos demonstram a atividade importante de participação do SCF dentro do processo inflamatório alérgico das vias aéreas e, portanto, justifica-se sua utilização em nosso estudo, demonstrando o papel ativador do SCF sobre as CMLT, induzindo a produção de outros mediadores, bem como a identificação de seu receptor nessas células.

Numerosos estudos têm detectado a expressão de receptor c-Kit em vários tipos celulares que respondem ao SCF, como melanócitos (NOCKA et al., 1989), células germinativas (MAYRHOFER et al., 1987), células progenitoras hematopoiéticas e linhagens linfoides (GEISSLER et al., 1988; AYE et al., 1992; BROUDY et al., 1992; GODFREY et al., 1992; NOCKA et al., 1989; OGAWA et al., 1991), eosinófilos (YUAN et al., 1997), basófilos (COLUMBO et al., 1992) e mastócitos (NOCKA et al., 1989; MAYRHOFER et al., 1987), aonde são caracterizados como receptores com domínio transmembrânico e com atividade de tirosina-quinase intrínseca (JIANG et al., 2000). Nossos estudos identificaram a presença de c-Kit em CMLT com aumento de sua expressão após estimulação com SCF, em análises realizadas por Citometria de fluxo, entretanto este padrão de resposta difere da observada em células megacarioblásticas humanas (CMK), onde a estimulação com SCF regula negativamente a expressão do c-Kit através do sistema de degradação endolisossomal (TANAKA et al., 2012). Nosso resultado demonstrou, pela primeira vez, que CMLT podem responder diretamente ao estímulo do SCF e, possivelmente, pela ativação do receptor c-Kit.

Foi observado em nossos estudos que CMLT estimuladas por SCF, expressam o gene e produzem a proteína TGF- β , produzindo também a proteína FGF-2. Tanto a expressão do RNAm quanto a produção da proteína, foram analisadas 1, 6 e 24h após o estímulo com concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL do SCF.

Estudos relacionando a atividade do TGF- β e FGF-2 na inflamação e remodelamento das vias aéreas ainda são incipientes (YUM et al., 2011) e o papel específico destas citocinas na cascata de células e mediadores presentes na asma permanece pouco conhecido. O papel das CMLT sobre a síntese destes mediadores é descrito em alguns estudos recentes, não sendo, no entanto, encontrados estudos sobre a possível relação entre o SCF, TGF- β e FGF-2 nestas estruturas, especialmente em células da musculatura lisa isoladas de traqueia, no entanto, vários estudos mostraram ser a musculatura lisa da traqueia, importante estrutura orgânica vinculada aos eventos inflamatórios alérgicos relacionados à asma.

CMLT de porcos em modelos experimentais de asma simulada *in vitro*, foram utilizadas para avaliar os mecanismos de resistência e adaptação ao processo inflamatório (MCPARLAND et al., 2005). A expressão gênica de receptores de neuroquinina-1 em músculo liso traqueal de ratos aumenta a resposta alérgica relacionada às vias aéreas (MAGHNI et al., 2003). A IL-13 aumenta a contratilidade de músculo liso de traqueia em camundongos (FARGHALY et al., 2008). Outros estudos demonstrando a relação da traqueia com a asma revelam envolvimento desta estrutura, envolvida na proliferação celular (MALAVIA et al., 2009); na hipertrofia, hiperplasia e deposição da matriz extra-celular (JAMES et al., 2012); no relaxamento induzido por óxido nítrico (PEREZ-ZOGHBI et al., 2010); no remodelamento das vias aéreas (BARA et al., 2010); e na expressão de IL-8 (MULLAN et al., 2008). Todos estes estudos foram realizados com células epiteliais ou de musculatura lisa traqueal humana.

Nossos estudos buscaram avaliar o papel de CMLT de camundongos obtidas em cultivo primário, com o objetivo de examinar, inicialmente, os efeitos do SCF na expressão gênica e proteica de TGF- β . A expressão de RNAm para TGF- β ocorreu constitutivamente nos grupos controle de 1h e 6 h após o estímulo, ficando reduzido nas amostras estimuladas com SCF. Estes dados sugerem que, por razões ainda não bem esclarecidas, a expressão constitutiva de RNAm para TGF- β pode ser devido à possível interação entre fatores inibitórios produzidos pelas células ou após acesso ao estado excitado das células, que precisam de um tempo maior para retornarem ao estado basal após aderência aos poços da placa com o meio de cultura.

Estudos realizados por outros autores revelam também ocorrer expressão constitutiva de TGF- β em células musculares lisas das vias aéreas, com aumento significativo em processos fisiopatológicos como a asma. COKER et al. (1996) demonstra a expressão de RNAm para TGF- β em pulmão de humanos e camundongos normais, sugerindo que estes peptídeos tem importante papel na homeostase das vias aéreas, resultados corroborados por BOTTOMS et al. (2010) que relacionou a importância do TGF- β na remodelação das vias aéreas por meio de ensaios imunohistoquímicos. AUBERT et al. (1994) já demonstrou a expressão constitutiva de RNAm para TGF- β , bem como de seu nível proteico e, além disso, sugere que nesta proteína, aparentemente, não tem sua expressão muito aumentada em pacientes com asma ou doença pulmonar

obstrutiva crônica, em ensaios realizados com tecidos pulmonares. No entanto, nenhum dado relacionado à diminuição da expressão constitutiva do TGF- β , em função do tempo, em CMLT foi encontrado. Portanto, novos estudos podem ser necessários para explicar este fenômeno. No período experimental de 24 horas, o grupo controle mostrou mínima expressão do RNAm para TGF- β mas, no grupo estimulado com 10 ng/mL de SCF, a expressão mostrou significativo aumento. Esta relação entre os níveis de TGF- β e a via SCF/c-Kit foi também observada no modelo de remodelamento das vias aéreas superiores em camundongos sensibilizados com ovalbumina, onde o inibidor tirosina-quinase imatinibe diminuiu os níveis de TGF- β 1 e SCF (RHEE et al., 2011).

O aumento da expressão de RNAm para TGF- β foi acompanhado pelo aumento na produção desta proteína, particularmente durante o período de 6h após a estimulação com 100 ng/ml e 24 h após estimulação com 10 e 100 ng/mL de SCF. O fenômeno da expressão constitutiva do RNAm para TGF- β , observada nos grupos controle de 1h e 6h, não se repetiu com relação à produção da proteína. Diferenças observadas entre a expressão gênica e proteica de um mesmo mediador, podem ser devidas a atividade das proteínas reguladoras que podem inibir ou ativar a transcrição do RNAm, bem como o sequente processo de sua tradução a nível citoplasmático. Não encontramos na literatura, estudos que demonstrem a relação do SCF no aumento da expressão gênica e proteica de TGF- β em CMLT.

Estudos prévios relacionados ao tema revelam que a infiltração de neutrófilos e mastócitos no músculo liso das vias aéreas tem sido observada em pacientes sensíveis a alergias comuns e asma e que esse fenômeno pode ser devido à liberação de TGF- β pela musculatura lisa de brônquios humanos (LEE et al, 2006). CHAKIR et al. (2003) sugere que a atividade do TGF- β e de outros mediadores estão relacionadas com a severidade dos processo patológico relacionado à asma, em análise de biópsias bronquiais de humanos. MINSHALL et al. (1997) mostra que pode ser atribuído ao TGF- β 1, importante papel não alterações fibróticas que ocorrem nas vias aéreas asmáticas também em ensaios com biópsias bronquiais humanas. Células da musculatura lisa das vias aéreas de modelos humanos e de camundongos estimuladas *in vitro*, induzem significativa atividade quimiotática para mastócitos e produção de TGF- β e SCF (BERGER et al., 2003), e o número de mastócitos infiltrados tardiamente no

músculo liso em pacientes asmáticos é correlacionado com a expressão de TGF- β nestes tecidos (BERGER et al., 2005). CMLT bovina em cultura teve sua proliferação aumentada após estimulação por TGF- β na ausência de soro fetal bovino (CHEN et al., 2006). WONG et al., (2006) utilizou o SCF como estímulo para ativação de linhagem de mastócitos em experimentos *in vitro*, demonstrando a liberação de TNF- α , MCP-1, RANTES, regulada pelas MAPK p38 e ERK. Estudos que mostram a modulação da expressão e secreção de TGF- β em CMLT após estímulo por SCF são inéditos, contudo células da musculatura lisa das vias aéreas superiores provenientes de biópsias brônquicas, quando devidamente estimuladas, podem aumentar a secreção de TGF- β 1, a expressão da α -actina em células musculares lisa e a contração agonista provocada, contribuindo para a desordem fisiológica das vias aéreas que caracteriza a asma (WOODMAN et al., 2008)

Nosso estudo também procurou investigar a produção de FGF-2 por CMLT estimuladas com SCF. Demonstramos que a produção de FGF-2 por CMLT foi significativamente aumentada nos períodos de 6h e 24h após estímulo com SCF. YUM et al. (2011), investigando aspectos da remodelação das vias aéreas usando camundongos desafiados de forma crônica com OVA, revelou aumento da co-expressão de FGF-2 e TGF- β por macrófagos no fluido bronco-alveolar. ZOU et al. (2008) demonstraram que FGF-2 pode estimular diretamente a proliferação e migração de células da musculatura lisa brônquica e, apesar disto, a expressão do fenótipo de células contráteis diminuiu. FOLKMAN et al. (1987), em ensaio de proliferação e diferenciação celular atribuiu importante papel angiogênico, mitogênico e quimiotático para fibroblastos ao FGF-2, enquanto MOHAN et al. (2010) o relaciona à inflamação e cicatrização de feridas. CHOTANI et al. (2000) relaciona ao FGF-2 um papel fundamental na divisão, proliferação e migração celulares em células renais, células da musculatura lisa e fibroblastos pulmonares, cérebro e retina. KRANENBURG et al. (2002), em experimentos "in vivo" e "in vitro", reporta o FGF-2, como um importante participante no processo de remodelamento vascular em doenças pulmonares obstrutivas crônicas. Em complemento, BOSSÉ et al. (2005) estabeleceu possíveis efeitos sinérgicos "in vitro" entre FGF-2 e TGF- β na atividade fibrogênica em processos patológicos e hiperplásicos das vias aéreas, enquanto SONG et al. (2002) sugere que, apesar da atividade do TGF- β no

processo de remodelamento ocorrer mais rapidamente do que o FGF-2, a resposta sinérgica de ambos os fatores contribuem para uma reparação mais tardia associada com a migração das células.

Os resultados deste nosso estudo sugerem que a expressão gênica e a produção proteica de TGF- β e FGF-2 e sua atividade coordenada, depende dentre outros fenômenos, da mediação do SCF em CMLT.

Nosso estudo investigou a possibilidade do SCF estimular CMLT a produzir CCL3/MIP-1 α . Os efeitos dessa quimiocina parecem diferir de acordo com o tipo celular e a espécie testada. Estudos prévios já citados demonstraram que esta quimiocina pode contribuir para a remodelação das vias aéreas na asma, por aumento no número e sobrevivência de células musculares lisas traqueais humanas (HALWANI et al., 2011). Primariamente, o CCL3/MIP-1 α é associado com atividade quimiotática atribuída às células mononucleares (OPPENHEIM et al., 1991), mas também pode ser localizado em granulomas fibroblásticos (LUKACS et al., 1994), células epiteliais bronquiolares e alveolares de camundongos infectados com o Vírus sincicial respiratório (HAEBERLE et al., 2001) e fibrose pulmonar (RUSSO et al., 2011).

Nossos dados demonstram que CMLT estimuladas com SCF produzem CCL3/MIP-1 α , nos tempos de 6h e 24h após o estímulo, sugerindo um possível papel desta quimiocina no processo de migração destas células até o epitélio, como previamente proposto para células de musculatura lisa bronquial (HALWANI et al., 2011). Novos estudos devem ser realizados para avaliar se o aumento da produção de TGF- β e FGF-2 em CMLT estimuladas com SCF, como previamente citado, pode ser influenciado pela síntese de CCL3/MIP-1 α por essas células, assim como se CCL3/MIP-1 α poderia contribuir para o remodelamento das vias aéreas característico da asma na região da traqueia.

Em conjunto, nossos dados mostram um aumento na produção de FGF-2, TGF- β e CCL3/MIP-1 α por CMLT estimuladas por SCF e que esse processo é possivelmente regulado pela ativação dos receptores c-Kit presentes nas mesmas.

Diante destes resultados, foi objetivo de nossa pesquisa científica, avaliar algumas das possíveis vias de sinalização intracelulares envolvidas na interação do SCF com seu receptor na resposta de incremento da expressão de

TGF- β , FGF-2 e MIP-1 α por CMLT. As células foram pré-tratadas com inibidores das vias de MAPK p38, ERK1/2 e JNK e estimuladas com SCF.

Nós observamos que houve uma significativa diminuição na expressão de RNAm para TGF- β , com respeito às três vias analisadas. O mesmo ocorreu com relação à expressão proteica deste alvo, processos em que parece ter ocorrido uma maior tendência para inibição da JNK, não sendo estatisticamente significativa, via principalmente ativada por estresse celular e estímulos inflamatórios em vários tipos celulares, como já demonstrado na literatura (DAVIS et al., 2000; KYRIAKIS & AVRUCH, 2001), bem como em experimentos envolvendo músculo liso das vias aéreas de pacientes asmáticos com aumento da produção de CXCL10 (ALRASHDAN et al., 2012).

Com relação à produção de FGF-2, detectamos significativa redução na expressão desta proteína com relação às três vias de sinalização investigadas, entretanto, os dados sugerem que em relação à rota da ERK1/2 parece ocorrer uma maior inibição nesse processo, contrário aos conceitos já estabelecidos por outros autores (MIYAZAWA et al., 1991; DAVIS et al., 2000; KYRIAKIS & AVRUCH et al., 2001). ZHOU et al. (2002), relaciona a ativação desta via a estímulos mitogênicos, característicos da atividade fibrogênica atribuída ao FGF-2, com um aumento na diferenciação de fibroblastos e fosforilação de numerosas citocinas e fatores de crescimento, o que pode, por analogia, corroborar nossos resultados, em função do papel fibrogênico desta proteína no processo de remodelamento relacionado às inflamações alérgicas das vias aéreas.

No que diz respeito à produção de CCL3/MIP-1 α , nossos dados demonstraram uma significativa inibição das três vias analisadas, especialmente com relação à da MAPK p38, também relacionada ao estímulo estressante e produção de citocinas inflamatórias, como já demonstrado com relação à expressão de VEGF em doenças alérgicas das vias (KIM et al., 2012). A atividade quimioatraente desta proteína sugere que talvez ela possa ser expressa anteriormente e, deste modo, participar da cascata que promove a ativação de outros fatores. Mais estudos serão necessários para determinar essa possível relação.

Nossos resultados sugerem que as três vias de sinalização analisadas, são importantes na ativação das CMLT estimuladas por SCF e sua interação

com os receptores c-Kit, para produzir TGF- β , FGF-2 e CCL3/MIP-1 α , não sendo encontrados na literatura, dados que demonstrem processos semelhantes. No entanto, dados análogos a esse aspecto de nossa investigação, foram citados em trabalhos prévios de alguns autores demonstrando que SCF induz a dimerização os receptores c-Kit produzidos em células intactas do endotélio aórtico de porcos via atividade de proteínas-quinase (BLUME-JENSEN et al., 1991), enquanto ROTTAPPEL et al. (1991) mostra que ocorre atividade tirosina-quinase intrínseca em domínios catalíticos que levam à fosforilação de receptores c-Kit de mastócitos murinos. Estas interações promovem a ativação da proteína RAS com posterior estimulação de várias proteínas-quinases citoplasmáticas, dentre elas a ERK1/2, p38 e JNK, o que, por sua vez, migram para o núcleo celular, onde fosforilam um número de moléculas responsáveis pela transcrição gênica, assim iniciando a proliferação celular (SEGER et al., 1995; ISHIZUKA, 1998; ISHIZUKA, 1999; SEGER et al., 1995). RONNSTRAND et al. (2004) afirma que, a compreensão dos mecanismos de sinergia entre SCF e várias citocinas também é um campo desafiador para futuras pesquisas. Outros estudos foram direcionados a esta linha de investigação, mostrando que a via p38 MAPK regula a resposta de IL-1 β em culturas de células de músculo liso traqueal humano (LAPORTE et al., 2000). SAKAI et al. (2004) sugere o envolvimento da via ERK1/2, que fosforilada promoveu aumento da proteína RhoA na contração em tecido liso bronquial induzido por TNF- α em ratos. Estudo com fibroblastos pulmonares sugerem que sua proliferação é mediada por TGF- β 1, induzindo a liberação de FGF-2 extracelular e fosforilação da via p38 e JNK (KHALIL et al., 2005). CHEN et al. (2006) demonstra que TGF- β 1 aumenta a proliferação de CMLT bovina por fosforilação de MAPK e XIE et al. (2007), mostra que a via ERK1/2 modula o fenótipo de células da musculatura lisa bronquial em modelo de asma crônica em rato.

Tomados em conjuntos, nossos dados mostram que as células da musculatura lisa da traqueia estimuladas por SCF produzem TGF- β , FGF-2 e CCL3/MIP-1 α e aumentam o receptor c-kit. Além disso, as vias das MAP quinases podem ser importantes alvos terapêuticos para o controle da inflamação das vias aéreas mediadas pela ativação das células da musculatura lisa da traqueia.

Resumo dos Resultados

- ❖ Células da musculatura lisa da traqueia estimuladas com SCF induzem a presença de receptores c-Kit;
- ❖ As células da musculatura lisa da traqueia de camundongos Balb/c estimuladas com SCF produzem TGF- β , FGF-2 e CCL3/MIP-1 α ;
- ❖ Os mecanismos envolvidos nesta expressão, provavelmente são mediados pela ativação das vias de sinalização intracelular p38, ERK1/2 e JNK;

Conclusão Final

- Células da musculatura lisa da traquéia estimuladas por SCF produzem TGF- β , FGF-2 e CCL3 via ativação das vias de sinalização p38, ERK1/2 e JNK.
- Receptores c-Kit e MAPK podem ser importantes alvos farmacológicos para novas formas de tratamento das inflamações alérgicas das vias aéreas.
- Novas informações foram adicionadas com relação ao papel do músculo liso traqueal na inflamação alérgica.

Referências

ALRASHDAN YA, ALKHOURI H, CHEN E, LALOR DJ, PONIRIS M, HENNESS S, BRIGHTLING CE, BURGESS JK, ARMOUR CL, AMMIT AJ, HUGHES JM. Asthmatic airway smooth muscle CXCL10 production: mitogen-activated protein kinase JNK involvement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 2012, 302: 1118–1127.

AN SS, FABRY B, TREPAT X, WANG N, FREDBERG JJ. Do Biophysical properties of de Airway Smooth Muscle in culture predict airway hyperresponsiveness? *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2006, 35: 55–64.

ANTONICELLI L, BUCCA C, NERI M, DE BENEDETTO F, SABBATANI P, BONIFAZI F, EICHLER H-G, ZHANG Q, YIN DD. Asthma severity and medical resource utilization. *Eur Respir J*; 2004, 23: 723-729.

AUBERT, J.D.; DALAL, B.I.; BAI, T.R.; ROBERTS, C.R.; HAYASHI, S. et al. Transforming growth factor beta 1 gene expression in human airways. *Thorax*; 1994, 49: 225-232.

AYE MT, HASHEMI S, LECLAIR B, ZEIBDAWI A, TRUDEL E, HALPENNY M, FULLER V, CHENG G. Expression of stem cell factor and c-kit mRNA in cultured endothelial cells, monocytes and cloned human bone marrow stromal cells (CFU-RF). *Exp Hematol.*; 1992, 20:523-527.

BARA I, OZIER A, TUNON DE LARA JM, MARTHAN R, BERGER P: Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Eur Respir J*; 2010, 36: 1174-1184.

BERGER P, GIRODET PO, BEGUERET H, OUSOVA O, PERNG DW, MARTHAN R, WALLS AF, LARA JMT. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *Faseb*; 2003, 10: 3-41.

BERGER P, GIRODET PO, TUNON-DE-LARA JM: Mast cell myositis: a new feature of allergic asthma? *Allergy*; 2005, 60: 1238–1240.

BERGHORN KA, CLARK-CAMPBELL PA, HAN L, MCGRATTAN M, WEISS RS, ROBERSON MS. Smad6 represses D1x3 transcriptional activity through inhibition of DNA binding. *J. Biol. Chem.*; 2006, 281: 20357-20367.

BLUME-JENSEN P, CLAEISSON-WELSH L, SIEGBAHN A, ZSEBO KM, WESTERMARK B, HELDIN CH. Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *EMBO J*; 1991, 10: 4121–4128.

BOSSÉ Y, THOMPSON C, STANKOVA J, ROLA-PLESZCZYNSKI M. Fibroblast Growth Factor2 and Transforming Growth Factor β 1 synergism in Human Bronchial Smooth Muscle Cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2006, 34: 746-753.

BOTTOMS SE, HOWELL JE, REINHARDT AK, EVANS IC, MCANULTY R. TGF- β Isoform Specific Regulation of Airway Inflammation and Remodelling in a Murine Model of Asthma. *PLoS. One*; 2010, 5: n.3, 9674.

BOUSQUET J, JEFFERY PK, BUSSE WW, JOHNSON M, VIGNOLA AM. Asthma - From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*; 2000, 161: 1720-1745.

BROUDY VC, LIN N, ZSEBO KM, BIRKETT NC, SMITH KA, BERNSTEIN ID, PAPAYANNOPOULOU T: Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. *Blood.*; 1992, 15: 338-346.

CAMPBELL JH, CAMPBELL GR. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle. *Clin. Sci*; 1993, 85: 501-503.

CHAKIR J, SHANNON J, MOLET S, FUKAKUSA M, ELIAS J. et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J. Allergy Clin. Immunol*; 2003, 111:1293-1298.

CHAMLEY-CAMPBELL J, CAMPBELL G, ROSS R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol. Res*; 1979, 59: 1-61.

CHEN G, KHALIL N. TGF- β 1 increases proliferation of airway smooth muscle cells by phosphorylation of map kinases. *Respiratory research*; 2006, 7: p:2.

CHIBA S, TAKESHITA K, IMAI Y, KUMANO K, KUROKAWA M, MASUDA S. et al. Homeoprotein DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*; 2003, 100: 15577-15582.

CHOTANI M A, TOUHALISKY K, CHIU I. The Small GTPases Ras, Rac, and Cdc42 Transcriptionally Regulate Expression of Human Fibroblast Growth Factor 1. *J. Biol. Chem*; 2000, 275: 30432–30438.

CHU HW, BALZAR S, SEEDORF GJ, WESTCOTT JY, TRUDEAU JB et al. Transforming growth factor-beta2 induces bronchial epithelial mucin expression in asthma. *Am. J. Pathol*; 2004, 165: 1097-1106.

CHUNG KF. Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur. Respir. J*; 2000, 15: 961-968.

COKER RK, LAURENT GJ, SHAHZEIDI S, HERNANDEZ-RODRIGUEZ NA, PANTELIDIS P et al. Diverse cellular TGF-beta 1 and TGF-beta 3 gene expression in normal human and murine lung. *Eur. Respir. J*; 1996, 9: 2501-2507.

COLUMBO M, HOROWITZ EM, BOTANA LM The human recombinant c-kit receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *J. Immunol*; 1992, 149: 599–608.

DAMERA G, TLIBA O, PANETTIERI JR RA. Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell. *Pulm. Pharmacol. & Therapeutics*; 2009, 22: 353-359.

DA SILVA CA, FROSSARD N. Regulation of stem cell factor expression in inflammation and asthma – Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 2005, 100, suppl:1.

DA SILVA CA, REBER L, FROSSARD N. Stem cell factor expression, mast cells and inflammation in asthma – Review. *Fundamental & Clinical Pharmacology*; 2006, 20: 21-39.

DASTYCH JD, METCALFE DD. Stem cell factor induces mast cell adhesion to fibronectin. *J. Immunol*; 1994, 152: 213-219.

DAVIS RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*; 2000,103: 239-252.

DERYNCK R, ZHANG YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature*; 2003, 425: 577-584.

ELIAS JA: Airway remodeling in asthma. Unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med*; 2000, 161: S168-S171.

FARGHALY HSM, BLAGBROUGH IS, MEDINA-TATO DA, WATSON ML. Interleukin 13 Increases Contractility of Murine Tracheal Smooth Muscle by a Phosphoinositide 3-Kinase p110 δ -Dependent Mechanism. *Mol Pharmacol*; 2008, 73: 1530-1537.

FOLKMAN J, KLAGSBRUN M. A family of angiogenic peptides. *Nature*; 1987, 329: 671 – 672.

GALLI SJ, ZSEBO KM, GEISLER EM. The Kit ligand, stem cell factor. *Adv. Immunol*; 1995, 55: 1-96.

GANONG WF. Adaptações da função respiratória em condições normais e patológicas. In GANONG, W.F. GANONG: Fisiologia Médica. 22^a Ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2006: 613-626.

GEISLER EM, RYAN MA, HOUSMANN DE. The dominant white spotting (W) locus on the mouse encodes the c-Kit protooncogene. *Cell*; 1988, 55: 185-192.

GODFREY DI, ZLOTNIK A, SUDA T. Phenotypic and functional characterization of c-kit expression during intrathymic T cell development. *J Immunol*; 1992, 1: 149(7):2281-5.

HAEBERLE HA, KUZIEL WA, DIETERICH H-J, CASOLA A, GATALICA Z, GAROFALO RP: Inducible expression of inflammatory chemokines in Respiratory Syncytial Virus-Infected Mice: role of MIP-1 α in lung pathology. *Journal of virology*; 2001, 75: 878-890.

HALWANI R, AL-ABRI J, BELAND M, AL-JAHDALI H, HALAYKO AJ, LEE TH, AL-MUHSEN S, HAMID Q. CC and CXC Chemokines Induce Airway Smooth Muscle Proliferation and Survival. *The Journal of immunology*; 2011, 186: 4156-4163.

HERLAAR E, BROWN Z. p38 MAPK signaling cascades in inflammatory disease. *Review. Mol. Med. Today*; 1999, 5, n. 10: 439-447.

HYE YY, CHO JY, MILLER M, BROIDE DH. Allergen-induced coexpression of bFGF and TGF- β 1 by Macrophages in a Mouse Model of Airway Remodeling: bFGF induces Macrophage TGF β 1 expression in vitro. *Allergy Immunology*; 2010, 155: 12-22.

HUANG E, NOCKA K, BEIER DR, CHU T-Y, BUCK J, LAHM HW, WELLNER D, LEDER P, BESMER P. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the SL locus and is the ligand of the c-Kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell*; 1990, 63: 225-233.

HUANG C, JACOBSON K, SCHALLER MD. MAP kinases and cell migration. *Journal of Cell Science*; 2004, 117: 4619-4628.

ISHIDA Y, KIMURA A, KONDO T, HAYASHI T, UENO M, TAKAKURA N, MATSUSHIMA K, MUKAIDA N. Essential roles of the CC chemokine ligand 3–CC chemokine receptor 5 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte infiltration. *Am J Pathol*; 2007, 170: 843–854.

ISHIZUKA T, KAWASOME H, TERADA N: Stem cell factor augments Fc epsilon RI-mediated TNF-alpha production and stimulates MAP kinases via a different pathway in MC/9 mast cells. *J. Immunol*; 1998, 161: 3624–3630.

ISHIZUKA T, CHAYAMA K, TAKEDA K. Mitogen-activated protein kinase activation through Fc epsilon receptor I and stem cell factor receptor is differentially regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and calcineurin in mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol*; 1999, 162: 2087–2094.

JAMES AL, ELLIOT JG, JONES RL, CARROLL ML, MAUAD T, BAI TR, ABRAMSON MJ, MCKAY KO, GREEN FH: Airway Smooth Muscle Hypertrophy and Hyperplasia in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; epub ahead of print, 2012.

JIANG X, GUREL O, MENDIAZ EA, STEARNS GW, CLOGSTON CL, LU HS, OSSLUND TD, SYED RS, LANGLEY KE, HENDRICKSON WA. Structure of the active core of human stem cell factor and analysis of binding to its receptor kit. *Embo J*; 2000, 19(13): 3192-203.

JOHNSON PRA, ARMOUR CL, CAREY D, BLACK JL. Heparin and PGE2 inhibit DNA synthesis in human airway smooth muscle cells in culture. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*; 1995, 269: 514-519.

KASSEL O, SCHMIDLIN F, DUVERNELLE C, DE BLAY F, FROSSARD N. Up- and down-regulation by glucocorticoids of the constitutive expression of the mast cell growth factor SCF by human lung fibroblasts in culture. *Mol. Pharmacol*; 1998, 54: 1073-1079.

KASSEL O, SCHMIDLIN F, DUVERNELLE C, GASSER B, MASSARD G, FROSSARD N. Human bronchial smooth muscle cells in culture produce stem cell factor. *Eur Respir J*; 1999, 13: 951-954.

KASSEL O, DA SILVA C, FROSSARD N. The stem cell factor, its properties and potential role in the airways. *Pulm. Pharmacol. Ther*; 2001, 14 n. 4: 277-288.

KAY A. Allergy and Asthma in Modern Society: A Scientific Approach. The Role of T Lymphocytes in Asthma. *Chem Immunol Allergy*; 2006, 91: 59-75.

KIM SR, LEE KS, PARK SJ, JEON MS, LEE YC. Inhibition of p38 MAPK Reduces Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Allergic Airway Disease. *J Clin Immunol*; 2012, 32: 574-586.

KHALIL N, XU YD, O'CONNOR R, DURONIO V. Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK: *J Biol Chem*; 2005, 30: 430-439.

KRANENBURG AR, DE BOER WI, VAN KRIEKEN JHJM, MOOI WJ, WALTERS JE, SAXENA PR, STERK PJ, SHARMA HS. Enhanced of Fibroblast Growth Factors and receptor FGFR-1 during Vascular Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2002, 27: 517-525.

KUBES P, GRANGER D. Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovasc. Res*; 1996, 32: 699 – 708.

KUROISHI S, SUDA T, FUJISAWA T, IDE K, INUI N, NAKAMURA Y, NAKAMURA H, CHIDA K. Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β 1 in mouse tracheal epithelial cells. *Respirology*; 2009, 14: 828-837.

KYRIAKIS JM, AVRUCH J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*; 2001, 81: 807-869.

LANGE P, PARNER J, VESTBO J, SCNOHR P, JENSEN G. A 15-Year Follow-Up Study of Ventilatory Function in Adults with Asthma. *The New Engl. J. of Medicine*; 1998, 339: 1194-1200.

LAPORTE JD, MOORE PE, LAHIRI T, SCHWARTZMAN IN, PANETTIERI RA JR, SHORE SA. p38 MAP kinase regulates IL-1 beta responses in cultured airway smooth muscle cells; 2000, 279: 932-941.

LEE KY, HO SC, LIN HC, LIN SM, LIU CY, HUANG CD, WANG CH, CHUNG KF, KUO HP. Neutrophil-Derived Elastase induces TGF- β 1 secretion in Human Airway Smooth Muscle via NF- κ B pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2006, 35: 407-414.

LUKACS NW, CHENSUE SW, SMITH RE, STRIETER RM, WARMINGTON K, WILKE C, KUNKEL SL. Production of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Macrophage Inflammatory Protein-1 α by Inflammatory Granuloma Fibroblasts. *American Journal of Pathology*; 1994, 144: 711-718.

LUKACS NW, KUNKEL SL, STRIETER RM, EVANOFF HL, KUNKEL RG, KEY ML, TAUB DD. The Role of Stem Cell Factor (*c-kit* Ligand) and Inflammatory Cytokines in Pulmonary Mast Cell Activation. *Blood*; 1996, 87: 2262-2268.

MAGHNI K, MICHOUD MC, ALLES M, RUBIN A, GOVINDARAJU V, MELOCHE C, MARTIN JG. Airway Smooth Muscle Cells Express Functional Neurokinin-1 receptors and the Nerve-Derived Preprotachykinin-A gene. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 28: 103-110.

MALAVIA NK, RAUB CB, MAHON SB, BRENNER M, PANETTIERI RA, GEORGE SC. Airway Epithelium Stimulates Smooth Muscle Proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2009, 41: 297-304.

MANOVA K, NOCKA K, BESMER P, BACHVAROVA RF. Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development*; 1990, 110: 1057-1069.

MARCHAND-ADAM S, PLANTIER L, BERNUAU D, LEGRAND A, COHEN M, MARCHAL J, SOLER P, LESE`CHE G, MAL H, AUBIER M, DEHOUX M, CRESTANI B. Keratinocyte Growth Factor Expression by Fibroblasts in Pulmonary Fibrosis Poor Response to Interleukin-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 32: 470–477.

MARTIN FH, SUGGS SV, LANGLEY KE, LU HS, TING J, OKINO KH, MORRIS CF, MCNIECE IK, JACOBSEN FW, MENDIAZ EA et al. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell*; 1990, 5 n. 63: 203-211.

MASOLI M, FABIAN D, HOLTG S. The Global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *European Journal of Allergy and clin. Immun*; 2004, 59: 469 – 478.

MASSAGUE J, SEOANE J, WOTTON D. Smad transcription factors. *Genes Dev*; 2005, 19: 2783-2810.

MASSAGUE J. How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*; 2000, 1: 169-178.

MAYRHOFER G, GADD S.J, SPARGO LD, ASHMAN LK. Specificity of a mouse monoclonal antibody raised against acute myeloid leukaemia cells for mast cells in human mucosal and connective tissues. *Immunol. Cell. Biol*; 1987, 65: 241–250.

MCKAY S, SHARMA HS. Autocrine regulation of asthmatic airway inflammation: role of airway smooth muscle. *Respir. Res*; 2001, 3 n.1: 11, 2002, Published online, 2001.

MCPARLAND BE, TAIT RR, PARÉ PD, SEOW CY. The role of Airway Smooth Muscle during an Attack of Asthma simulated *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2005, 33: 500-504.

MEININGER CJ, YANA H, ROTTAPPEL R, BERSTEIN A, ZSEBO KM, ZETTER BR. The c-Kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood*; 1992, 79: 958-963.

MIYAZAWA K, HENDRIE PC, MANTEL C, WOOD K, ASHMAN LK, BROXMEYER HE. Comparative analysis of signaling pathways between mast cell growth factor (c-kit ligand) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in a human factor-dependent myeloid cell line involves phosphorylation of Raf-1, GTPase-activating protein and mitogen-activated protein kinase. *Exp Hematol*; 1991, 19: 1110-1123.

MINSHALL EM, LEUNG DY, MARTIN RJ, SONG YL, CAMERON L et al. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir. Cell Mol Biol*; 1997, 17: 326-333.

MOHAN SK, RANI SG, YU C. The hetero-hexameric complex structure: A component in the non-classical pathway for fibroblast growth factor 1 (FGF1) secretion. *JBC Papers in Press*; Published on March 10, 2010 as Manuscript M109.066357.

MULLAN CS, RILEY M, CLARKE D, TATLER A, SUTCLIFFE A, KNOX AJ, PANG L. β -Tryptase regulates IL-8 expression in Airway Smooth Muscle Cells by a PAR-2-independent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2008, 38: 600-608.

NAM YH, LEE SK, SAMMUT D, DAVIES DE, HOWARTH PH. Preliminary study of the cellular characteristics of primary bronchial fibroblasts in patients with asthma: expression of alpha-smooth muscle actin, fibronectin containing extra type III domain A, and smoothelin. *J Investig Allergol Clin Immunol*; 2012, 22 (1): 20-27.

NOCKA K, MAJUMDER S, CHABOT B, RAY P, CERVONE M, BERNSTEIN A, BESMER P. Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W. mutations in normal and W mice- evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev*; 1989, 3: 816-826.

OGAWA M, MATSUZAKI Y, NISHIKAWA S, HAYASHI S, KUNISADA T, SUDO U, KINA T, NAKAUCHI H, NISHIKAWA S. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *JEM*; 1991, 174: 63-71.

OLIVEIRA SHP, HOGABOAM CM, BERLIN A, LUKACS NW. SCF-induced airway hyperreactivity is dependent on leukotriene production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 2001, 280:1242-1249.

OLIVEIRA SHP, LUKACS, NW: The Role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 2003, 36: 1455-1463.

OLIVEIRA SHP, SANTOS, VCA. Studies on the expression of Fibroblast Growth Factor-2 from Odontoblast-like cells. *JOE*; 2011, 11:1520-1524.

OPPENHEIM JJ, ZACHARIAE COC, MUKAIDA N, MATSUSHIMA K. Properties of the novel proinflammatory 'intercrine' cytokine family. *Annu Rev Immunol*; 1991, 9: 617.

PAGE S, AMMIT AJ, BLACK JL, ARMOUR ACL. Human Mast cell and airway smooth muscle cell interactions: implications for asthma. *AJP Lung Cell Mol. Physiol*; 2001, 281: L1313-L1323.

PANG L, KNOX AJ: Effect of interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α and interferon- γ on the induction of cyclo-oxygenase-2 in cultured human airway smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*; 1997, 121: 579–587.

PEREZ-ZOGHBI JF, BAI Y, SANDERSON MJ. Nitric oxide induces airway smooth muscle cell relaxation by decreasing the frequency of agonist-induced Ca²⁺ oscillations. *JPG*; 2010, 135: 247-259.

RANG, H P et al. Como agem os Fármacos; aspectos moleculares. In: RANG, H. P. et al. RANG E DALE: farmacologia. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 24-52.

RENAULD JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*; 2001, 54(8):577-589, 2001.

RHEE CK, KIM JW, PARK CK, KIM JS, KANG JY, KIM SJ, KIM SC, KWON SS, KIM YK, PARK SH, LEE SY. Effect of imatinib on airway smooth muscle thickening in a murine model of chronic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*; 2011, 155(3): 243-51. Epub 2011 Feb 2.

RÖNNSTRAND L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci*; 2004, 61: 2535-2548.

ROTTAPEL R, REEDIJK M, WILLIAMS DE. The steel/W transduction pathway: kit autophosphorylation and its association with a unique subset of cytoplasmic signaling proteins is induced by the steel factor. *Mol. Cell. Biol*; 1991, 11: 3043–3051.

RUSSO RC, ALESSANDRI AL, GARCIA CC, CORDEIRO BF, PINHO V, CASSALI GD, PROUDFOOT AE, TEIXEIRA MM. Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2011, 45: 72-80.

SAKAI H, OTOGOTO S, CHIBA Y, ABE K, MISAWA M. Involvement of p42/44 MAPK and RhoA protein in augmentation of ACh-induced bronchial smooth muscle contraction by TNF-alpha in rats. *J Appl Physiol*; 2004, 97: 2154-2159.

SAUNDERS R, SUTCLIFFE A, KAUR D, SIDDIQUI S, HOLLINS F, WARDLAW P, BRADDING P, BRIGHTLING C. Airway smooth muscle chemokine receptor expression and function in asthma. *Clinical et Experimental Allergy*; 2009, 38: 1684-1692.

SCHALL TJ. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine*; 1991, 3: 165-183.

SEGER R, KREBS EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*; 1995, 9: 726-35.

SHI Y, MASSAGUE J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*; 2003, 113: 685-700.

SONG QH, KLEPEIS VE, NUGENT MA, TRINKAUS-RANDALL V. TGF- β 1 regulates TGF- β 1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing. *J Clin Pathol: Mol Pathol*; 2002, 55: 164-176.

SHUM BOV, ROLPH MS, SEWELL WA. Mechanisms in allergic airway inflammation – lessons from studies in the mouse. *Expert reviews in molecular medicine*; 2008, 10: e15.

STEWART AG: Airway wall remodelling and hyperresponsiveness: modelling remodelling *in vitro* and *in vivo*. *Pulm Pharmacol Ther*; 2001, 14: 255-265.

SUTCLIFFE A, KAUR D, PAGE S, WOODMAN L, ARMOUR CL, BARAKET M, BRADDING P, HUGHES JM, BRIGHTLING CE *Thorax*; 2006, 61: 657-662.

TANAKA C, KAJI H, HE J, HAZAMA R, YOKOYAMA K, KINOSHITA E, TSUJIOKA T, TOHYAMA K, YAMAMURA H, NISHIO H, TOHYAMA Y. Rab27b regulates c-kit expression by controlling the secretion of stem cell factor. *Biochem Biophys Res Commun*; 2012 Mar 9, 419(2): 368-73. Epub 2012 Feb 13.

TERRANOVA VP, DsFLORIO R, LYALL RM, HIC S, FRIESEL R, MACIAG T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J. Cell Biol*; 1985, 101, n. 6: 2330-2334.

TOKUDA A, ITAKURA M, ONAI N, KIMURA H, KURIYAMA T, MATSUSHIMA K. Pivotal role of CCR1-positive leukocytes in bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Immunol*; 2000, 164: 2745–2751.

VAN DER VELDEN J, BARKER D, BARCHAM G, KOUMOUNDOUROS E, SNIBSON K. Increased Mast Cell Density and Airway Responses to Allergic and Non-Allergic Stimuli in a Sheep Model of Chronic Asthma. *PLoS ONE*; 2012, 7 Issue 5: e37161.

VIGNOLA AM, KIPS J, BOUSQUET J. Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*; 2000, 105: 1041-1053.

VON HERTZEN L, HAAHTELA L. Disconnection of man and the soil: reason for the asthma and atopy epidemic? *J Allergy Clin Immunol*; 2006, 117(2): 334-344.

XIE M, LIU X-S, XU Y-J, ZHANG Z-X, BAI J, NI W, CHEN S-X. ERK1/2 signaling pathway modulates the airway smooth muscle cell phenotype in the rat model of chronic asthma. *Respiration*; 2007, 74: 680-690.

WALTER MJ, HOLTZMAN MJ. A Centennial History of Research on Asthma Pathogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 2005, 32(6): 483–489.

WEISS KB, SULLIVAN SD. The Health economics of asthma and rhinitis. I. Assessing the economics impact. *J. Allergy Clin. Immunol*; 2001, 107: 3-8.

WEN L-P, FAHRNI JA, MATSUI S, ROSEN GD. Airway epithelial cells produce stem cell factor. *Mol. Cell Research*. 1996, 1314: 183-186.

WOODMAN L, SIDDIQUI S, CRUSE G, SUTCLIFFE A, SAUNDERS R, KAUR D, BRADDING P, BRIGHTLING C. Mast cells promote airway smooth muscle cell differentiation via autocrine up-regulation of TGF-beta 1. *J Immunol*; 2008 Oct 1; 181(7): 5001-5007.

WONG JZ, WOODCOCK-MITCHELL J, MITCHELL J, RIPPETOE P, WHITE S, ABSHER M, BALDOR L, EVANS J, MCHUGH KM, LOW, RB. Smooth muscle actin and myosin expression in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 1998, 18: L786-L792.

WONG CK, TSANG CM, IP WK, LAM CWK. Molecular mechanisms for the release of chemokines from human leukemic mast cell line (HMC)-1 cells activated by SCF and TNF- α : roles of ERK, p38 MAPK, and NF- κ B. *Allergy*; 2006; 61: 289–297.

YUAN Q, AUSTEN KF, FRIEND DS, HEIDTMAN M, BOYCE A. Human peripheral blood eosinophils express a functional c-kit receptor for stem cell factor that stimulates very late antigen 4(VLA-4) mediated cell adhesion to fibronectin and vascular cell adhesion molecule &(VCAM-1). *J. Exp. Med*; 1997, 186: 313-323.

YUM HY, CHO JY, MILLER M, BROIDE DH. Allergen-Induced Coexpression of bFGF and TGF- β 1 by Macrophages in a Mouse Model of Airway Remodeling: bFGF Induces Macrophage TGF- β 1 Expression in vitro. *Int Arch Allergy Immunol*; 2011, 155: 12–22.

ZOU H, NIE XH, ZHANG Y, HU M, ZHANG YA. Effect of basic fibroblast growth factor on the proliferation, migration and phenotypic modulation of airway smooth muscle cells. *Chin Med J (Engl)*; 2008, Mar 5, 121(5): 424-429.

ZHOU X, HU H, BALZAR S, TRUDEAU JB, WENZEL SE. MAPK Regulation of IL-4/IL-13 Receptors Contributes to the Synergistic Increase in CCL11/Eotaxin-1 in Response to TGF- β 1 and IL-13 in Human Airway Fibroblasts. *J Immunol*; 2012 May 9. [Epub ahead of print].

Stem cell Factor stimulates tracheal smooth muscle cells to produce TGF- β , FGF-2 and CCL3/MIP-1 α .

Luis Cezar F. de Oliveira^a, Antonio Hernandes Chaves Neto^a, Ana Paula Campanelli^b, Tereza Cristina Cardoso da Silva^c, Sandra Helena Penha Oliveira^{a*}

^a The Multicentric Graduate Studies Program in Physiological Sciences – SBFis, Dept. of Basic Sciences, School of Dentistry of Araçatuba, Univ. Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba, SP, Brazil.

^b Dept. of Biological Sciences, School of Dentistry of Bauru, São Paulo University- USP, Bauru, SP, Brazil.

^c Laboratory of Animal Virology and Cell Culture, School of Medicine Veterinary of Araçatuba, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Araçatuba, SP, Brazil.

* Corresponding author:

Sandra Helena Penha Oliveira

Dept. of Basic Sciences

School of Dentistry of Araçatuba

Univ. Estadual Paulista-UNESP

Rua: José Bonifácio 1193 - CEP: 16015-050 - Araçatuba, SP, Brazil

Tel: +55-18-3636-28146/ Fax: +55-18-3636-3200

e-mail: shpoliv@foa.unesp.br

Running title: SCF stimulates tracheal smooth muscle cells

Abstract

The aim of this study was to evaluate the mechanism involved in SCF-induced FGF-2, TGF- β and CCL3/MIP-1 α production in tracheal smooth muscle cells (tSMC) and the activated signaling transduction pathway. tSMC primary cultures were stimulated with SCF (1, 10 and 100 ng/mL) and evaluated at 1, 6 and 24 hours. The phenotypic characteristic of tSMC in primary culture was analyzed using immunofluorescence staining for α -SMA, α -cytokeratin and α -FAP. c-kit activation in SCF-stimulated tSMC was evaluated by flow cytometry. TGF- β mRNA expression was observed by PCR-RT and protein production by ELISA. FGF-2 production was evaluated by immunoblot and CCL3/MIP-1 α production by ELISA. In other set of experiments, tSMC were pretreated with p42/44 inhibitor (PD 98059 [PD]), p38 inhibitor (SB 202190[SB]), or JNK inhibitor (SP 600125 [SP]) for 30 minutes followed by stimulation with SCF (10 ng/mL) for 24 hours. Cells treated with specific antibodies, did not show any labeling for cytokeratin or FAP, but showed labeling for α -SMA indicating purity of the primary cell line. SCF induced c-kit expression in tSMC. tSMC stimulated with 10ng/mL of SCF after 24 hours, promotes TGF- β mRNA expression and TGF- β , FGF-2 and CCL3/MIP-1 α production. Pre-treatment with SD, PD and SCF- inhibited these productions. These responses produce activation p42/44, p38, and JNK pathways. tSMC seem to be important resident cells involved in cell activation and tissue repair and added new information about the role of tracheal smooth muscle cells in allergic inflammation. Development of inhibitors targeting MAPK could thus be an attractive strategy for the treatment of asthma.

Key words: SCF, asthma, TGF- β , FGF-2, CCL3, trachea.

Introduction

Asthma is a disorder responsible for promoting inflammation, hyperresponsiveness and airway remodeling, involving recurrent episodes of airway obstruction and wheezing. These are processes arising from the presence of an allergic inflammatory response in the airways, involving extensive leukocyte infiltration, mucus overproduction and hyper-reactivity (1, 2, 3). Furthermore, several cell types present in the airways are involved in the disease, and are responsible for the initiation and perpetuation of inflammation, including mast cells, eosinophils, T and B lymphocytes, fibroblasts and smooth muscle cells of the airways (1)

Airway smooth muscle cells (ASMC) play a central role in asthma because of its recognition activity for synthesis (4, 5, 6). These cells are recognized as having great potential for active participation in airway inflammation by synthesis of cytokines, chemokines and adhesion molecules, all with capacity to promote and perpetuate the inflammatory mechanisms (7). Recent studies have shown that ASMC are important sources of many cytokines, chemokines and growth factors. They are biologically active and it has been shown that the proinflammatory mediators released by them can stimulate eosinophils, epithelial cells, lymphocytes, mast cells, macrophages, neutrophils and platelets, inducing adhesion molecule expression to allow the recruitment and activation of these cells, thereby increasing the inflammatory cascade. These potent inflammatory mediators released by ASMC induce airway wall thickening in patients with asthma (8, 9, 10, 11).

Stem cell Factor (SCF) is an important cytokine known to be a mast cell growth factor (12). Given the potential SCF autocrine or paracrine activity, its functional role in eosinophils, neutrophils, epithelial cells, and lung fibroblast activation has attracted the attention of many researchers. SCF expression is

enhanced during inflammation and expressed *in vitro* by various cells of the airways, including bronchial epithelium (13), lung fibroblasts (14) and bronchial smooth muscle cells (15). Previous studies have demonstrated that the SCF is directly involved in leukotriene production and the induction of airway hyper-reactivity via mast cell activation (16). Data from literature have demonstrated that SCF evoked bronchial smooth muscle contraction (17), however, up to now they have not been associated with tracheal smooth muscle cell activation.

Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) and Transforming Growth Factor- β (TGF- β) are recognized as important mediators involved in the regulation of inflammation, cytokine and/or chemokine production and airway remodeling in asthma (18). The role of ASMC in their synthesis has been described in some recent studies (10, 19), but the possible relationship between SCF, TGF- β and FGF-2 have not yet been described.

The mitogen-activated protein kinase (MAPk) signal transduction system has been extensively studied because these kinases take part in numerous cellular functions including apoptosis, chemotaxis, cell activation and proliferation, and cytokine and chemokine production (20, 21). In this context, the aim of this study was to evaluate whether SCF induces FGF-2, TGF- β expression and CCL3/MIP-1 α production in tracheal smooth muscle cells (tSMC) and to investigate the signaling transduction pathway involved to this process.

Materials and Methods

Animals and Ethical aspects.

All experimental procedures involving the use of animals were reviewed and approved by the Institutional Animal Welfare Committee of the School of Dentistry, of Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brazil, protocol# 2010-003463. A total of 5 male Balb/c mice weighing from 20-25 g were used. These animals were housed in temperature-controlled rooms and received water and food *ad libitum*. In order to obtain all the tracheal sample explants used in this study, mice were euthanized with an overdose of halothane (Tanohalo, Cristalia, Campinas, SP, Brazil).

Isolation and primary culture of murine tracheal smooth muscle cells.

tSMC were obtained using an explant technique. Tracheas were transferred to a laminar flow hood, where the connective tissue and airway epithelium were removed by firmly scraping the luminal surface. The trachea strips were minced into small fragments using a blade, and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), with 4 mM L-glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 0.25 mg/mL amphotericin). Cultures were maintained at 37⁰C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. Confluent cells were detached with 0.25% trypsin and 0.05% EDTA for 5 minutes. tSMC were used between passages four and six for all experiments and their characteristics were identified by light microscopy, histological analysis and immunofluorescence of smooth muscle α -actin.

Immunofluorescence staining analysis of alpha-smooth muscle actin, cytokeratin and fibroblast activation protein- α in tracheal smooth muscle cells.

tSMC were prepared in culture and the immunofluorescence staining was performed according to previously published methods (22). Primary antibodies and dilutions were as follows: α -Smooth muscle actin mouse monoclonal antibody (α SMA; 1:200; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Cytokeratin 10/13 mouse monoclonal antibody (1:100; Covance Inc. Dallas, TX, USA) and fibroblast activation protein- α goat polyclonal antibody (anti-FAP- α ; 1:100; Santa Cruz, SC, CA, USA). Secondary antibodies were as follows: Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG H+L antibody (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and rabbit anti-goat IgG-FITC antibody (1:200; Santa Cruz, SC, CA, USA). Images were captured with a Leica TCS SPE confocal laser system equipped with a 63 oil immersion plan apochromatic objective (1.3 CS) with differential interference contrast. LAS AF 2.5.1 software was used for image acquisition.

Histological analysis of tracheal smooth muscle cells.

For the experiment, tSMC (3×10^6 /mL) were seeded in 6-well plates until confluence was reached. After that, cells were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed by light microscopy.

Tracheal smooth muscle cell stimulation.

For the experiments, tSMC in passages 4-6 were plated at a density of 3×10^6 /mL in complete DMEM with 10% FBS. Cells were trypsinized and subcultured in 24-well plates to prepare the assays for evaluation by western blot, flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and RNA extractions. After confluence was

reached cells were stimulated either in the presence or absence of SCF (1, 10 and 100 ng/mL) (Recombinant mouse SCF R&D Systems, MN, USA) and examined after 1, 6 and 24 hours. The cells and the cell-free supernatants were collected and kept in a freezer at -80°C until use.

Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Using Trizol reagent (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY), the total RNA was extracted from tSMC stimulated with or without SCF according to the protocol recommended by the manufacturer (Invitrogen, California, USA). cDNA synthesis was performed by the RT-PCR method and subsequent agarose gel electrophoresis to evaluate the expression of constitutive gene β -actin, and TGF- β . Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (PCR-RT) was performed as previously described (23). The standard conditions for PCR of β -actin were 94°C (10 min), 30 cycles at 94°C (1 min), 56°C (1 min) and 72°C (1 min) followed by a denaturation curve. The standard conditions for PCR for TGF- β were 94°C (4 min), 35 cycles at 94°C (1min), 58°C (1 min) and 72°C (1 min) followed by a denaturation curve. The set of primers used was: β -actin (sense: 5' TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C - 3'; antisense: 5' TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G - 3', 445 bp) and TGF- β (5' CGG AAG CGC GCC ATC GAA ATC C - 3'; antisense: 5' GCA GCA GCT CTG AGC CAC GG - 3', 350 bp). β -actin mRNA detection was used as internal control. The PCR products were electrophoresed and visualized under ultraviolet light on 1.8% agarose gel (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) containing 10 mg/mL ethidium bromide (Sigma, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA). The agarose gel was scanned and densitometry analysis was evaluated using Scion Image software (Scion Corp., Frederick, MD, USA) to obtain a numerical value

that allowed semi quantitative comparison between target TGF- β and the constitutive control β -actin.

Western Blot and immune detection analysis of FGF-2 in tracheal smooth muscle cells.

In this set of experiments, after 1, 6, and 24 hours, the cell-free supernatants were collected for FGF-2 quantification using western blot analysis. tSMC were grown and prepared under the same experimental conditions previously described. Cellular lysates were prepared and Western Blot analysis was performed as previously described (24). Briefly, tSMC were incubated with primary FGF-2 goat polyclonal antibody, β -actin Mouse monoclonal (1:1000 Santa Cruz, SC, CA, USA) antibody, and secondary rabbit anti-goat and goat anti-mouse antibodies (1:3000; Santa Cruz, SC, CA, USA). After the respective treatments and experimental periods, cell cultures were collected and lysed for research into the constitutive expression of β -actin and FGF-2, after stimulation. In subsequent experiments using MAPk inhibitors and after stimulation with SCF, the same protocol was performed. At the end, the bands obtained were detected by chemiluminescence (ECL). At least three Western blots were performed for each protein and the bands were quantified by densitometric analysis using Scion Image software (Scion Corp., Frederick, MD, USA). The protein levels were expressed relative to β -actin.

Flow cytometric analysis of c-Kit in tracheal smooth muscle cells

SCF receptor expression was evaluated in tSMC obtained after the previously described methodology. tSMC was stimulated with SCF (10 ng/mL) for 24h. The cells were collected in PBS, containing 0.1% deionized BSA. 1×10^6 cells were harvested

after detachment with 0.25 % trypsin (Sigma-Aldrich®), washed in PBS and incubated for 18 h at 4°C with 10 mg/mL of c-kit Rat anti mouse monoclonal antibody (CD117:RPE; AbD Serotec, Kidlington, Oxford, OX5 1 GE, UK). Next, cells were washed three times with PBS plus 0.1 % Triton X-100 and, a 1:50 dilution of Rabbit F (ab')₂ Anti-Rat polyclonal secondary antibody (IgG:RPE, AbD Serotec, Kidlington, Oxford, OX5 1 GE, UK) was added to 100 µL of cell suspension and incubated at 37°C for 30 min. The cell suspension was washed in PBS as previously described, and after the final wash, the cells were fixed with 4 % paraformaldehyde. Data were acquired with the Attune™ acoustic focusing cytometer system (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). The negative pattern was examined by applying the same cell suspension with the first incubation, and the result was included in the global compensation to exclude the auto fluorescence. A BL1-A (488 nm) filter was used in each analysis.

Determination of TGF-β and CCL3/MIP-1α by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Tracheal smooth muscle cell-free supernatants were collected in order to measure TGF-β and CCL3/MIP-1α. The supernatant was collected and kept at -80°C until use. The 96-well plate was coated with monoclonal antibody (R&D Systems, Minneapolis, USA) to TGF-β and CCL3/MIP-1α. Samples and recombinant TGF-β and chemokine were added to the wells and after 2 h, unbound proteins were washed away and an enzyme-linked polyclonal antibody was added to the wells. This antibody acted as a link between the TGF-β or chemokine and a dying agent. A color change proportional to the amount of TGF-β and CCL3/MIP-1α was observed. This was quantified by comparing the optical densities of the samples with those of known dilutions using a

plate reader at 450 nm. The concentration of each TGF- β and CCL20/MIP-1 α was calculated from a standard curve in pg/mL.

The Effect of SB 202190, PD 98059 and SP 600125 on FGF-2 and CCL3/MIP-1 α production and TGF- β expression by SCF-stimulated tracheal smooth muscle cells.

In this set of experiments, tASMC were pretreated with the mitogen-activated protein kinase p38 inhibitor SB 202190 (SB, 25 mmol/L; Calbiochem) (23), the mitogen-activated protein kinase p42/44 (ERK1/2) inhibitor PD 98059 (PD, 30mmol/L; Calbiochem) (23), and the selective inhibitor of c-Jun N-terminal kinase (JNK)-1, -2 and -3 SP 600125 (SP, 10 mmol/L; Calbiochem) (25) for 30 minutes followed by stimulation with SCF (10 ng/mL) for 24 hours. The cell-free supernatant was stored for CCL3 measurement by ELISA, and cells were collected for the detection of FGF-2 production using western blot analysis and TGF- β expression using RT-PCR.

Statistical analysis

Data were obtained from at least three independent series of experiments and analyses were performed using the statistical program GraphPad Prism (version 5.0). Data were expressed as mean \pm SEM, and intergroup comparisons were made using the simple one-way ANOVA with Bonferroni correction. p values $<$ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Characterization of Tracheal smooth muscle cells.

tSMC began to migrate out of the fragments after 1 week and their characteristics were identified by light microscopy and stained with hematoxylin and eosin (H&E). tSMC were spindle-shaped with central oval nuclei, while the confluent cells depicted the “hill and valley” appearance which is characteristic of smooth muscle cells in culture identified by light microscopy (Fig. 1A, 1B) and H&E stain (Fig. 1C). To confirm the phenotypic characteristic of tSMC in primary culture *in vitro*, and exclude the possible contamination with fibroblasts and epithelial cells, immunofluorescence staining for α -SMA, α -cytokeratin and α -FAP was performed. Cells treated with specific antibodies, did not show any labeling for cytokeratin (Figure 1D) or FAP (Figure 1E), but showed labeling for α -SMA (Figure 1F). These results demonstrated that tSMC expressing α -SMA markers, indicated purity of the primary cell line produced.

Tracheal smooth muscle cells express c-Kit receptors

In Figure 2, tSMC were stimulated with 10 ng/mL of SCF and the c-kit expression on the surface was evaluated by flow cytometry. After treatment with CD117-RPE antibody for SCF receptor (c-kit), 50000 events were computed with 75% of cells above 10^3 , considered the cutoff for positivity. The analysis of isotypic control IgG showed that 15% of the cells are immunoreactive with 75% of negative cells for the target molecule. The true proportion of positive CD117, corresponds to 89% of 50000 positive events analyzed and an apparent increase could be observed in the c-kit receptor expression in SCF-stimulated in comparison with un-stimulated cells.

SCF induces TGF- β mRNA expression and production in tracheal smooth muscle cells.

To examine the effects of SCF on TGF- β expression and production, tSMC were stimulated with increasing concentrations of SCF (1, 10 and 100 ng/mL) and the evaluation of TGF- β mRNA expression and production was observed at time intervals of 1, 6 and 24 hours. As shown in Figure 3, constitutive expression of TGF- β was observed in the control group at 1 h and 6 h after stimulation, being reduced by 1, 10 and 100 ng/mL after stimulation with SCF (Fig. 3A and B). It was noted that differently from 1 and 6 hours, at 24 hours TGF- β expression increased after SCF stimulation (10 ng/mL), and then decreased again to the level of the control with SCF (100 ng/mL) (Fig. 3C). TGF- β production was observed at 6 hours after SCF stimulation (100 ng/mL) but the peak of TGF- β production was observed at 24 hours with 10 and 100 ng/mL of SCF (Fig. 3F).

SCF induces FGF-2 protein production in tracheal smooth muscle cells.

The results of this study demonstrated constitutive production of FGF-2 in the control group as early as 1h after culture, and it was reduced after SCF stimulation (1, 10 and 100 ng/mL) (Fig. 4A). The constitutive production of FGF-2 decreased at 6 hours and FGF-2 production was observed after SCF stimulation (1, 10 and 100 ng/mL) increasing significantly in a dose-dependent manner when compared with control group. Production was more significant at the concentration of 100 ng/mL of SCF (Fig. 4B). Finally, it was noted that there was FGF-2 production in stimulated group at 24h, but it was lower in comparison with that of the 6 h group after SCF-stimulation (Fig. 4C).

SCF-induced CCL3/MIP-1 α production in tracheal smooth muscle cells.

The results of this study demonstrated that 1h after SCF stimulation, there was no significant increase in CCL3/MIP-1 α production by tSMC (Fig. 5A). The peak of CCL3/MIP-1 α production occurred after SCF stimulation (10 ng/mL) at 6 hours. At 24 hours, CCL3/MIP-1 α production was observed after SCF stimulation (1 and 10 ng/mL) when compared with the control group, however the production it was lower when compared with that of the 6 h group (Fig. 5B and C).

SB, PD and SP inhibit TGF- β mRNA expression and production, FGF-2 protein production and CCL3/MIP-1 α production in tracheal smooth muscle cells.

To determine whether the p38, ERK1/2, and JNK pathways were involved in TGF- β mRNA expression and production, FGF-2 protein production and CCL3/MIP-1 α production cells were pretreated with PD, SB, or SP for 30 minutes followed by stimulation with SCF (10 ng/mL) and evaluated 24 hours later. It was observed that the inhibition of phosphorylation of p38 (SB), ERK1/2 (PD), and JNK (SP) significantly reduced TGF- β gene expression (Fig. 6A) and protein production (Fig. 6B) in SCF-stimulated tSMC. With regard to FGF-2 protein production, the partial inhibition of phosphorylation of p38 and JNK, and complete inhibition of ERK1/2 phosphorylation was observed to reach the level of the control group in SCF-stimulated tSMC (Fig. 6C). CCL3/MIP-1 α production was completely inhibited by SB, PD and SP (Fig. 6D).

DISCUSSION

The present studies indicate that FGF-2 and TGF- β production in mouse tSMC activity is regulated by the SCF through their specific receptors; that the MAP kinases pathways play an important role in the intercellular signal-related process, and that the experimental conditions of collection, culture and cell growing, are critical in obtaining the results. The proper cultivation of tissues taken from the trachea of healthy young mice revealed proliferation of spindle shaped cells with central oval nuclei, characteristics such as those disclosed in other studies (26, 27). In the same culture, cells in high densities tended to form a monolayer with a *hill-and-valley* morphology, appeared to be smaller, and had fewer processes visible at the light microscope level, aspects also demonstrated in the results of previous studies (27, 28, 4). Tracheal epithelial cells of mice, used to evaluate the process of transition to mesenchymal cells in diseases involving airway remodeling (29), by immunofluorescence analysis, revealed the presence of immunoreactive α -SMA after differentiation by fibrogenic stimuli. WONG et al., 1998 (28) demonstrated that the α -SMA and other filamentous proteins are also immunoreactive in the tracheal smooth muscles, process regulated by appropriate culture conditions. In our studies, assessment of α -SMA immunofluorescence was used to confirm the purity of the primary lineage obtained, excluding the presence of epithelial cells and fibroblasts.

In experiments with bronchial smooth muscle cells of humans, it has been proved that there is chemotactic activity that promotes the survival and infiltration of mast cells promoted by SCF (15) and that this process may be responsible for modification of structural and functional properties of myocytes (30). SCF is involved in inflammatory and non-inflammatory conditions in asthma (31) and is produced by

various cell types, including bronchial smooth muscle cells in response to various stimuli, releasing important chemotactic factors for recruitment of allergic cells (15). For the first time, our studies have identified the presence of c-kit in tSMC with increased expression after SCF stimulation analyzed by flow cytometry. Numerous studies have identified the expression of c-kit receptor in various cell types that respond to SCF, such as melanocytes (32), germinal cells (33), haematopoietic progenitor cells, lymphoid lines (34, 35, 32, 36) and mast cells (32, 33). It is characterized as a receptor with transmembrane domain and intrinsic tyrosine kinase activity (37). Recently, our group demonstrated that odontoblast-cell line stimulated by SCF produced FGF-2 (23). Based on these results, SCF was used as a stimulus to identify whether tSMC is able to produce TGF- β , FGF-2 and CCL3, important mediators involved in allergic inflammation.

Studies related to the activity of TGF- β and FGF-2 in inflammation and airway remodeling are still incipient and the specific role of these cytokines and growth factors in the cascade of cells and mediators present in asthma remains unknown. The role of ASMC in their synthesis has been described in some recent studies; however, no studies were found on the possible relationship between the SCF, TGF- β and FGF-2 in these structures, especially in isolated smooth muscle cells of the trachea.

The involvement of the trachea in airway-related allergic inflammatory conditions, especially in asthma, has been the subject of relatively recent experiments involving airway remodeling in asthma (38); prostaglandin E₂ expression (28), IL-8 expression (5), all studies with smooth muscle of the trachea. Other studies have shown the role of smooth muscle cells of porcine trachea in an experimental model of asthma simulated *in vitro*, evaluating mechanisms of resistance and

adaptation (39) and neurokinin-1 receptor (9). Gastric fluid-stimulated tSMC induced interleukin 4, interleukin 6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and the chemokines, lipopolysaccharide-induced CXC chemokine (LIX/CXCL5), cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2 (CINC-2), CINC-3, fractalkine, ciliary neurotrophic factor (CNTF) production and vascular endothelial growth factor (40) demonstrating that tracheal smooth muscle cells are important targets to be evaluated and in the future could possibly be a tool in the control of the airway inflammatory process.

Initially, the aim of the present study was to examine the effects of SCF on the gene expression and protein production of TGF- β in tracheal smooth muscle cells. Expression of TGF- β mRNA occurred constitutively in the control groups 1 and 6 hours after the stimulus, was reduced in the control group 24 hours after the stimulus with SCF. These data suggest, for reasons yet to be evaluated, that tSMC constitutively express TGF- β mRNA. In the experimental period of 24 hours after the stimulus, expression of TGF- β mRNA showed significant increase at a dose of 10 ng/mL. Data from literature demonstrated that smooth muscle, endothelial and mesothelial cells, as well as the sub-epithelial cells from control lung cells produced TGF- β (18). According to our data SCF stimulation was able to inhibit TGF- β mRNA expression at 1 and 6 hours after stimulation. This decrease may be due to possible interaction between inhibitory factors produced by SCF-stimulated cells or after access to the excited state of the cells that need a longer time to reach their resting state after handling, to adhere to a 24 well plate. Increased TGF- β mRNA expression in SCF-stimulated tSMC was accompanied by the increase in protein production at 24 h after stimulation. The relationship between SCF and TGF- β in allergic inflammation has not yet been exhaustively studied. Data from the literature has demonstrated that tryptase-stimulated ASMC in humans and mice, *in vitro*, induced

significant mast cell chemotactic activity through the production of TGF- β and to less extent to SCF (41), and the number of mast cell infiltrates in the smooth muscle in asthma patients is correlated with a TGF- β expression in these tissues (30). Another study related that the interaction of fibroblasts from chronic allergen-challenged mice with eosinophils, increased alpha-smooth muscle cell actin and procollagen I expression as well as inducing transforming growth factor-beta. The changes in myofibroblast activation were dependent on SCF-mediated pathways because anti-SCF antibody treatment reduced the expression of all three of these latter fibrosis-associated markers (42). However, this is the first time that we have observed studies showing TGF- β production mediated by SCF in tSMC of mice.

Our studies also demonstrated that FGF-2 protein production by tSMC was significantly increased in the 6 and 24 hours periods after SCF stimulation. FGF-2, a member of a family of regulatory proteins, involved in proliferation and cell differentiation and has functioned as a potent angiogenic factor (43) with a role in airway remodeling in asthma, inflammation and wound healing (44). In addition, Bossé et al, 2006 (19) established possible synergistic effects "in vitro" between FGF-2 and TGF- β fibrogenic activity in hyperplastic and pathological processes of the airways, while Song et al, 2002 (45) states that although the activity of TGF-B in the remodeling process occurs faster than that of FGF-2, the synergistic response of the two factors contribute to a repair later associated with cell migration. The results of this study suggest that TGF- β gene expression and protein production, and FGF-2 production are dependent on, among other phenomena, the mediation of SCF-stimulated tSMC, and might be important during the airway repair.

In the present study it was observed that SCF stimulate tSMC to produce CCL3. Halwani et al, 2011 (46) demonstrated that MIP-1 α may contribute to airway

remodeling in asthma by increasing the number and survival of human bronchial tSMC. Primarily, CCL3 is associated with chemotactic activity attributed to mononuclear cells, but it can also be located in epithelial cells of the bronchioles and alveoli in mice infected with respiratory syncytial virus (47) and pulmonary fibrosis (48). The data of the present study demonstrate that SCF-stimulated tSMC produce CCL3 as early as 6h and 24 hours after stimulation, suggesting a possible role of this chemokine in the process of cell migration into the epithelium, as has previously been proposed for bronchial smooth muscle cells (46). New studies are being carried out to assess whether the increased production of TGF- β and FGF-2 in tSMC stimulated with SCF, previously mentioned, is mediated by CCL3.

As has been demonstrated, the data of the present study show increased production of growth factors FGF-2 and TGF- β , and the chemokine CCL3 by SCF-stimulated tSMC. This process is regulated by c-Kit receptor activation present in these cells. A scientific research should be conducted to evaluate and study the possible signaling pathways that regulate each metabolic process, in order to complement the understanding of the mechanisms shown.

At present, the involvement of MAPKs is being investigated for therapeutic use of MAPK inhibitors in different types of inflammation. In this study, the signaling pathways possibly involved in the interaction of SCF with its c-kit receptor in tSMC activation were evaluated with regard to TGF- β mRNA expression and FGF-2 protein production. The pre-treatment of the cells with MAPK inhibitors p38, ERK1/2 and JNK significantly decreased TGF- β mRNA expression and FGF-2 protein production. Several recent studies have conducted research in this direction, showing that the proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by TGF- β 1, which induces release of extracellular FGF-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK

(49). TGF- β 1 increases proliferation of bovine trachea tSMC by phosphorylation of MAPK (50). FGF-2 autocrine contributes to changing the phenotype in endothelial pulmonary hypertension, mainly regulated by a process via ERK1 / 2 (51). The decrease in TGF- β mRNA and FGF-2 protein production in cells pretreated with MAPK inhibitors suggests an important relationship between these pathways and regulates the biological processes mediated by these mediators, such as resident cell activator and/or tissue repair, as mentioned above. In the data of the present study, the inhibition of the ERK1/2 seems to demonstrate a more marked decrease in the FGF-2 production, and this pathway could perhaps be the main one involved in the regulation of epithelial tissue repair in the tSMC. Recent studies have demonstrated that the participation of MAPK transduction pathways in FGF-2 production is an important modulator in the cytokine/chemokine production and tissue repair involved in odontoblast activation in dental pulp (23, 52).

As regards CCL3 production, the data of the present study demonstrated significant inhibition of the three pathways analyzed, especially with regard to MAPK p38, also related to stress stimuli and inflammatory cytokine production in allergic airway disease (53) suggesting that it could perhaps be expressed earlier, or participate in the cascade promoting the activation of other factors. Studies have shown that activation of eosinophils by IL-25, for the release of MIP-1 α and other chemokines and cytokines is mediated by the combined activation of NF- κ B and JNK and P38 MAPK pathways (54). Further studies are needed to evaluate the direct or indirect effect of CCL3 on TGF- β or FGF-2 production in SCF-stimulated tSMC.

In conclusion, for the first time, the activation of c-kit receptor in SCF-stimulated tSMC was demonstrated, to produce TGF- β , FGF-2 and CCL3, important

mediators involved in resident cell activation and tissue repair, and new information was added about the role of tracheal smooth muscle cells in allergic inflammation.

Acknowledgments

We acknowledge the collaborative team effort of the Department of Biological Sciences, School of Dentistry of Bauru-SP for assistance with immunoblotting and the department of animal virology and cell culture, the School of Medicine Veterinary of Araçatuba-SP for assistance with flow cytometry.

Grants

This work was supported by São Paulo State Research Foundation- FAPESP (Grant# 2006/59794-2 to SHPO).

Disclosures

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

Author contributions

Author contributions: L.C.F.O., and S.H.P.O. conception and design of research; L.C.F.O., A.H.C.N., A.P.C., T.C.C.S., and S.H.P.O. performed and interpreted of experiments; L.C.F.O., and S.H.P.O. analyzed data; L.C.F.O. and S.H.P.O edited, revised and approved final version of manuscript; L.C.F.O., A.H.C.N., and S.H.P.O. prepared figures; S.H.P.O drafted manuscript.

LEGENDS

Fig. 1. Primary murine tracheal smooth muscle cells cultured in DMEM complete medium. In the process of proliferation after the 5th passage, showing Hill & Valley appearance. Cell culture image at 100x (A), 200x (B) and H&E cell culture image at 200x magnification (C) taken with an Olympus Digital Camera. Immunofluorescence images revealed absence of labeling cells for anti-cytokeratin antibody at 400x(D) and anti-FAP antibody at 400x(E), and presence of labeling cells for Anti- α SMA antibody at 800x(F).

Fig. 2. Flow cytometric analysis of the tSMC lines. 1×10^6 cells were incubated with specific antibodies for specific cell surface markers. These included control and c-Kit antibodies. tSMC were incubated with the individual antibodies on ice in PBS buffer containing 0.2% sodium azide. Cells were washed and fixed with 4% paraformaldehyde. Data were acquired with the Attune™ acoustic focusing cytometer system (Applied Biosystems®). The negative control results were included in the global compensation to exclude auto fluorescence.

Fig. 3. Gene expression and protein production of TGF- β by tSMC stimulated with SCF. Confluent and growth-arrested murine tSMC in 24-well plates were incubated with SCF for 1h (3A), 6h (3B) and 24 hours (3C) after stimulation with SCF at the concentrations of 1, 10 and 100 ng/mL. mRNA levels of TGF- β were measured by RT-PCR. Production of TGF- β in cell-free supernatant of tSMC stimulated by SCF for 1h (3D), 6h (3E) and 24 hours (3F) at the concentrations of 1, 10 and 100 ng/mL. The concentration of TGF- β in pg/mL was evaluated by ELISA. The gel is representative of three experiments with similar results. A representation of the TGF-

β /b-actin ratio determined by means of densitometry analysis. The results represent the mean \pm SEM of the mean of 3 independent experiments, with similar results obtained each time (ANOVA with the Bonferroni multiple comparison test) * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$ and *** $p < 0.01$ compared with untreated control.

Fig. 4. Induction of FGF-2 protein production by SCF. tSMC were incubated in 24-well plates and treated with 1, 10 and 100 ng/mL, at 1h (4A), 6h(4B) and 24h (4C). Protein extracted from the lysed cells was analyzed for FGF-2 and β -actin by immunoblot. A representation of the FGF-2/ β -actin ratio determined by means of densitometry analysis. The results represent the mean \pm SEM of 3 experiments with similar results obtained each time (ANOVA with the Bonferroni multiple comparison test) * $p < 0.05$ compared with untreated control.

Fig. 5 CCL3/MIP-1 α production in cell-free supernatant of tSMC stimulated by SCF for 1h (5A), 6h (5B) and 24 hours (5C) at the concentrations of 1, 10 and 100 ng/mL. The concentration of CCL3/MIP-1 α in pg/mL was evaluated by ELISA. The results represent the mean \pm SEM of three experiments with similar results obtained each time (ANOVA with the Bonferroni multiple comparison test) ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ compared with untreated control.

Fig. 6. SB 202190, PD98059, SP 600125 drugs inhibit TGF- β mRNA expression, FGF-2 and CCL3/MIP-1 α production in SCF-stimulated tSMC. tSMC in confluence were pre-treated for 30 minutes with SB 202190 (SB), PD98059 (PD) and SP 600125 (SP) and stimulated with SCF 10 ng/mL for 24 h. The level of TGF- β and CCL3/MIP-1 α protein was measured by ELISA. TGF- β and FGF-2 gene expression was

measured by immunoblot. Representation of the TGF- β / β -actin and FGF-2/ β -actin ratio determined by means of densitometric analysis. The results represent the mean \pm SEM of three experiments with similar results obtained each time (ANOVA with the Bonferroni multiple comparison test) ## $p < 0.01$ and # $p < 0.001$ compared with untreated control; ** $p < 0.01$ and * $p < 0.001$ compared with SCF-treated group

References

1. **Page S, Ammit AJ, Black JL, Armour ACL.** Human Mast cell and airway smooth muscle cell interactions: implications for asthma. *AJP Lung Cell Mol Physiol* 281: 1313-1323, 2001.
2. **Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM.** Asthma - From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1720-1745, 2000.
3. **Shum BOV, Rolph MS, Sewell WA.** Mechanisms in allergic airway inflammation – lessons from studies in the mouse. *Expert reviews in molecular medicine* 10: e15, 2008.
4. **An SS, Fabry B, Trepas X, Wang N, Fredberg JJ.** Do Biophysical properties of de Airway Smooth Muscle in culture predict airway hyperresponsiveness? *Am J Respir Cell Mol Biol* 35: 55–64, 2006.
5. **Mullan CS, Riley M, Clarke D, Tatler A, Sutcliffe A, Knox AJ, Pang L.** β -Tryptase regulates IL-8 expression in Airway Smooth Muscle Cells by a PAR-2-independent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38: 600-608, 2008.
6. **Willems-Widyastuti A, Alagappan VK, Arulmani U, Vanaudenaerde BM, de Boer WI, Mooi WJ, Verleden GM, Sharma HS.** Transforming growth factor-beta 1 induces angiogenesis in vitro via VEGF production in human airway smooth muscle cells. *Indian J Biochem Biophys* 48: 262-269, 2011.

7. **Chung KF.** Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J* 15: 961-968, 2000.
8. **Mckay S, Sharma HS.** Autocrine regulation of asthmatic airway inflammation: role of airway smooth muscle. *Respir Res* 3: 1-13, 2002.
9. **Michaeloudes C, Chang PJ, Petrou M, Chung KF.** Transforming growth factor- β and nuclear factor E2-related factor 2 regulate antioxidant responses in airway smooth muscle cells: role in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 184: 894-903, 2011.
10. **James AL, Elliot JG, Jones RL, Carroll ML, Mauad T, Bai TR, Abramson MJ, McKay KO, Green FH.** Airway Smooth Muscle Hypertrophy and Hyperplasia in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* epub ahead of print, 2012.
11. **Vignola AM, Kips J, Bousquet J.** Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 105: 1041-1053, 2000.
12. **Anderson DM, Williams DE, Tushinski R, Gimpel S, Eisenman J, Cannizzaro LA, Aronson M, Croce CM, Huebner K, Cosman D, Lyman SD.** Alternate splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22–q24. *Cell Growth Differ* 2: 373–378, 1991.
13. **Wen L-P, Fahrni JA, Matsui S, Rosen GD.** Airway epithelial cells produce stem cell factor. *Mol. Cell Research* 1314: 183-186, 1996.

14. **Kassel O, Schmidlin F, Duvernelle C, De Blay, F, Frossard, N.** Up-and down-regulation by glucocorticoids of the constitutive expression of the mast cell growth factor SCF by human lung fibroblasts in culture. *Mol. Pharmacol* 54: 1073-1079, 1998.
15. **Kassel O, Schmidlin F, Duvernelle C, Gasser B, Massard G, Frossard N.** Human bronchial smooth muscle cells in culture produce stem cell factor. *Eur Respir J* 13: 951-954, 1999.
16. **Oliveira SHP, Hogaboam CM, Berlin A, Lukacs NW.** SCF-induced airway hyperreactivity is dependent on leukotriene production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: 1242-1249, 2001.
17. **Udem BJ, Lichtenstein LM, Hubbard WC, Meeker S, Ellis JL.** Recombinant Stem Cell Factor-induced Mast Cell Activation and Smooth Muscle Contraction in Human Bronchi. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 646-650, 1994.
18. **Bottoms SE, Howell JE, Reinhardt AK, Evans IC, Mcanulty R.** TGF- β Isoform Specific Regulation of Airway Inflammation and Remodelling in a Murine Model of Asthma. *PloS. One* 5: 3 e:9674, 2010.
19. **Bossé Y, Thompson C, Stankova J, Rola-Pleszczynski M.** Fibroblast Growth Factor2 and Transforming Growth Factor β 1 synergism in Human Bronchial Smooth Muscle Cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 746-753, 2006.

20. **Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG.** Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74: 49–139, 1998.
21. **Wada T, Penninger JM.** Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 26: 3100–3112, 2007.
22. **Ramos RN, Oliveira CE, Gasparoto TH, Malaspina TSS, Belai EB, Cavassani KA, Garlet GP, Da Silva JS, Campanelli AP.** CD25+ T Cell depletion impairs murine squamous cell carcinoma development via modulation of antitumor immune responses. *Carcinogenesis* 33: 902-909, 2012.
23. **Oliveira SHP, Santos VAC.** Studies on the Expression of Fibroblast Growth Factor-2 from Odontoblasts-like cells. *J. Endod* 37: 1520-1524, 2011.
24. **Chaves Neto AH, Queiroz KC, Milani R, Paredes-Gamero EJ, Justo GZ, Peppelensbosch MP, Ferreira CV.** Profiling the Changes in Signaling Pathways in Ascorbic Acid/ b-Glycerophosphate-Induced Osteoblastic Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 112: 71-77, 2011.
25. **Marchand-Adam S, Plantier L, Bernuau D, Legrand A, Cohen M, Marchal J, Soler P, Lese`che G, Mal H, Aubier M, Dehoux M, Crestani B.** Keratinocyte Growth Factor Expression by Fibroblasts in Pulmonary Fibrosis Poor Response to Interleukin-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 470–477, 2005.

26. **Chamley-Campbell J, Campbell G, Ross R.** The smooth muscle cell in culture. *Physiol Res* 59: 1- 61, 1979.
27. **Campbell JH, Campbell GR.** Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle. *Clin Sci* 85: 501-503, 1993.
28. **Wong JZ, Woodcock-Mitchell J, Mitchell J, Rippetoe P, White S, Absher M, Baldor L, Evans J, McHugh KM, Low, RB.** Smooth muscle actin and myosin expression in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol* 274: 786-792, 1998.
29. **Kuroishi S, Suda T, Fujisawa T, Ide K, Inui N, Nakamura Y, Nakamura H, Chida K.** Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β 1 in mouse tracheal epithelial cells. *Respirology* 14: 828-837, 2009.
30. **Berger P, Girodet PO, Tunon-de-Lara JM.** Mast cell myositis: a new feature of allergic asthma? *Allergy* 60: 1238–1240, 2005.
31. **Da Silva CA, Reber I, Frossard N.** Stem cell factor expression, mast cells and inflammation in asthma. *Fundam Clin Pharmacol* 20: 21–39, 2006.
- 32 **Nocka K, Majumder S, Chabot B, Ray P, Cervone M, Bernstein A, Besmer P.** Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes & development* 9: 816-826, 1989.

33. **Mayrhofer G, Gadd S.J, Spargo LD, Ashman LK.** Specificity of a mouse monoclonal antibody raised against acute myeloid leukaemia cells for mast cells in human mucosal and connective tissues. *Immunol Cell Biol* 65: 241–250, 1987.
34. **Geissler EN, Ryan MA, Housman DE.** The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 7: 185-192, 1988.
35. **Aye MT, Hashemi S, Leclair B, Zeibdawi A, Trudel E, Halpenny M, Fuller V, Cheng G.** Expression of stem cell factor and c-kit mRNA in cultured endothelial cells, monocytes and cloned human bone marrow stromal cells (CFU-RF). *Exp Hematol* 20: 523-527, 1992.
36. **Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, Hayashi S, Kunisada T, Sudo U, Kina T, Nakauchi H, Nishikawa S.** Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *JEM* 174: 63-71, 1991.
37. **Jiang X, Gurel O, Mendiaz EA, Stearns GW, Clogston CL, Lu HS, Osslund TD, Syed RS, Langley KE, Hendrickson WA.** Structure of the active core of human stem cell factor and analysis of binding to its receptor kit. *Embo J* 19: 3192-3203, 2000.
38. **Bara I, Ozier A, Tunon de Lara JM, Marthan R, Berger P.** Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Eur Respir J* 36: 1174-1184, 2010.

39. **McParland BE, Tait RR, Paré PD, Seow CY**: The role of Airway Smooth Muscle during an Attack of Asthma simulated *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 500-504, 2005.
40. **Chiu HY, Chen CW, Lin HT, Hsieh CC, Lin SS, Cheng CM**. Study of gastric fluid induced cytokine and chemokine expression in airway smooth muscle cells and airway remodeling. *Cytokine* 56: 726-731, 2011.
41. **Berger P, Girodet PO, Begueret H, Ousova O, Perng DW, Marthan R, Walls AF, Tunon de Lara JM**. Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis. *Faseb Journal* 10: 03-41, 2003.
42. **Dolgachev V, Berlin AA, Lukacs NW**. Eosinophil activation of fibroblasts from chronic allergen-induced disease utilizes stem cell factor for phenotypic changes. *Am J Pathol* 172: 68-76, 2008.
43. **Folkman J, Klagsbrun M**. A family of angiogenic peptides. *Nature* 329: 671–672, 1987.
44. **Yum HY, Cho, JY, Miller M, Broide DH**. Allergen-Induced Coexpression of bFGF and TGF- β 1 by Macrophages in a Mouse Model of Airway Remodeling. bFGF Induces Macrophage TGF- β 1 Expression *in vitro*. *Int Arch Allergy Immunol* 155: 12–22, 2011.

45. **Song QH, Klepeis VE, Nugent MA, Trinkaus-Randall V.** TGF β 1 regulates TGF β 1 and FGF2 mRNA expression during fibroblast wound healing. *J Clin Pathol Mol Pathol* 55: 164-176, 2002.
46. **Halwani R, Al-Abri J, Beland M, Al-Jahdali H, Halayko AJ, Lee TH, Al-Muhsen S, Hamid Q.** CC and CXC Chemokines Induce Airway Smooth Muscle Proliferation and Survival. *The Journal of immunology* 186: 4156-4163, 2011.
47. **Haeberle HA, Kuziel WA, Dieterich H-J, Casola A, Gatalica Z, Garofalo RP.** Inducible expression of inflammatory chemokines in Respiratory Syncytial Virus-Infected Mice: role of MIP-1 α in lung pathology. *Journal of virology* 75: 878-890, 2011.
48. **Russo RC, Alessandri AL, Garcia CC, Cordeiro BF, Pinho V, Cassali GD, Proudfoot AE, Teixeira MM.** Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 72-80, 2011.
49. **Khalil N, Xu YD, O'Connor R, Duronio V.** Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK. *J Biol Chem* 30: 430-439, 2005.
50. **Chen G, Khalil N.** TGF- β 1 increases proliferation of airway smooth muscle cells by phosphorylation of map kinases. *Respiratory Research* 7: 1186-1465, 2006.

51. **Tu L, Dewachter L, Gore B, Fadel E, Dartevelle P, Simonneau G, Humbert M, Eddahibi S.** Autocrine Fibroblast Growth Factor-2 Signaling Contributes to altered Endothelial Phenotype in Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 311-322, 2011.
52. **Kim YS, Min KS, Jeong DH, Jang JH, Kim HW, Kim EC.** Effects of Fibroblast Growth Factor-2 on the Expression and Regulation of Chemokines in Human Dental Pulp Cells. *J Endod* 36: 1824-1830, 2010.
53. **Kim SR, Lee KS, Park SJ, Jeon MS, Lee YC.** Inhibition of p38 MAPK Reduces Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Allergic Airway Disease. *J Clin Immunol* 32: 574-586, 2012.
54. **Wong CK, Cheung PFY, Ip WK, Lam CWK.** Interleukin-25–Induced Chemokines and Interleukin-6 Release from Eosinophils Is Mediated by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, c-Jun N-Terminal Kinase, and Nuclear Factor- κ B. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 186–194, 2005.

Fig. 1

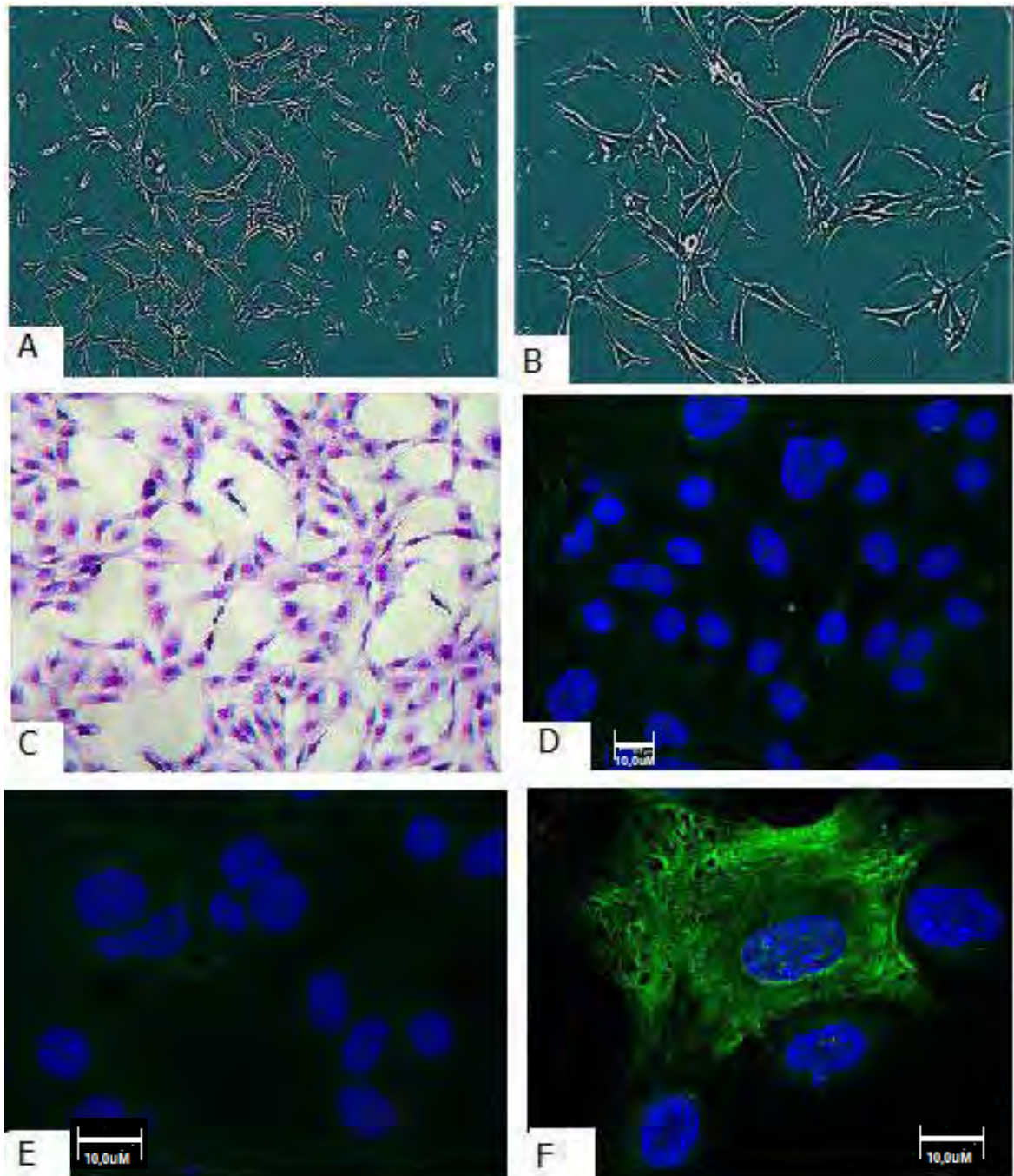


Fig. 2

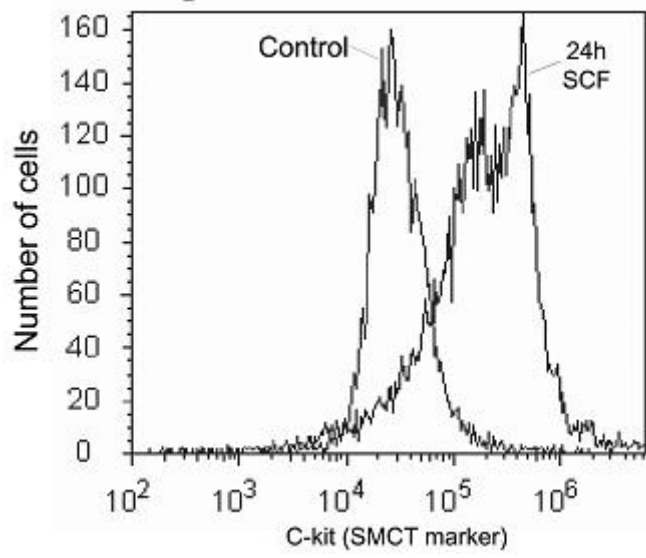


Fig. 3

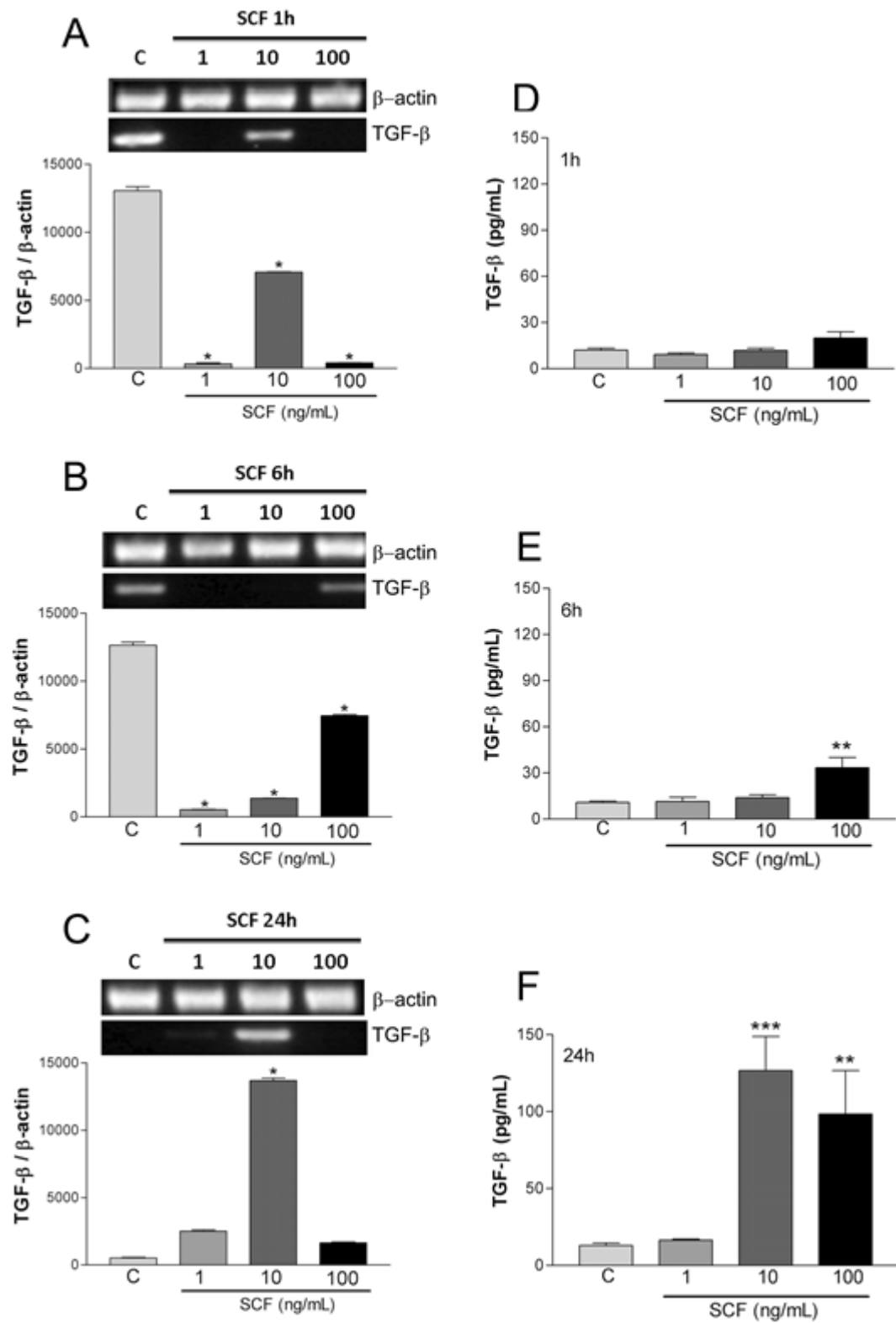


Fig. 4

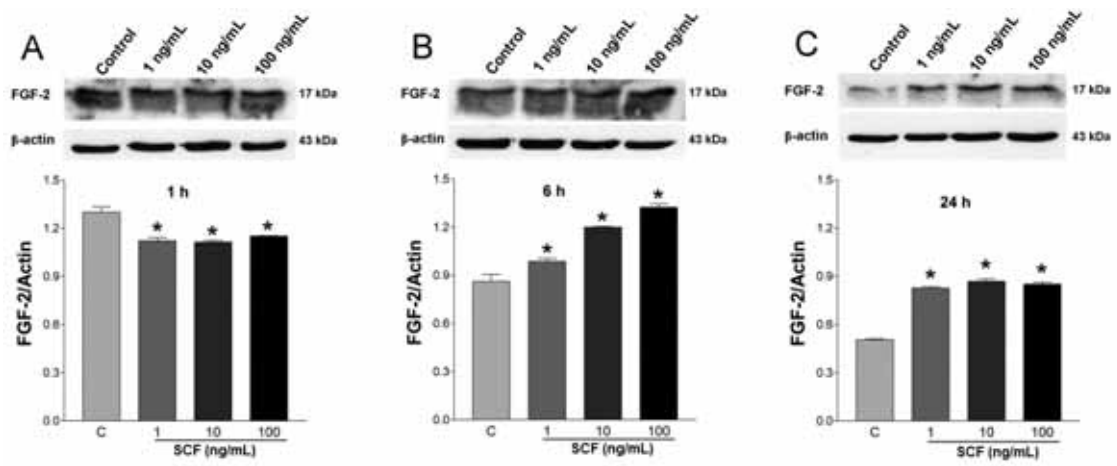


Fig. 5

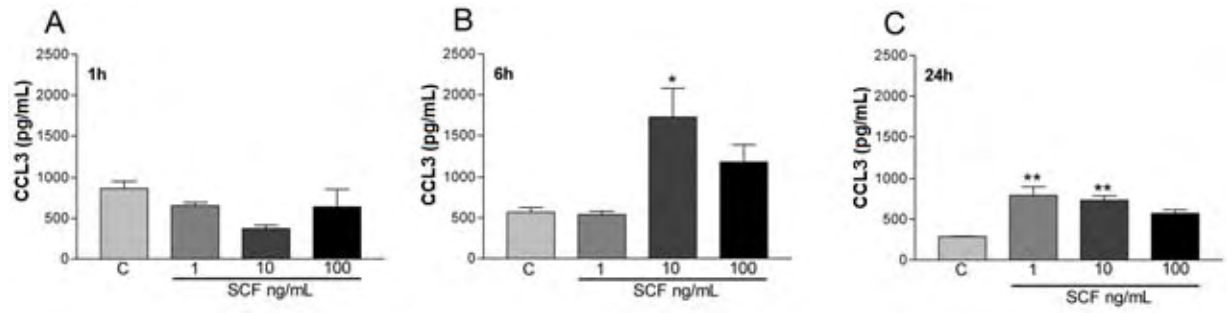
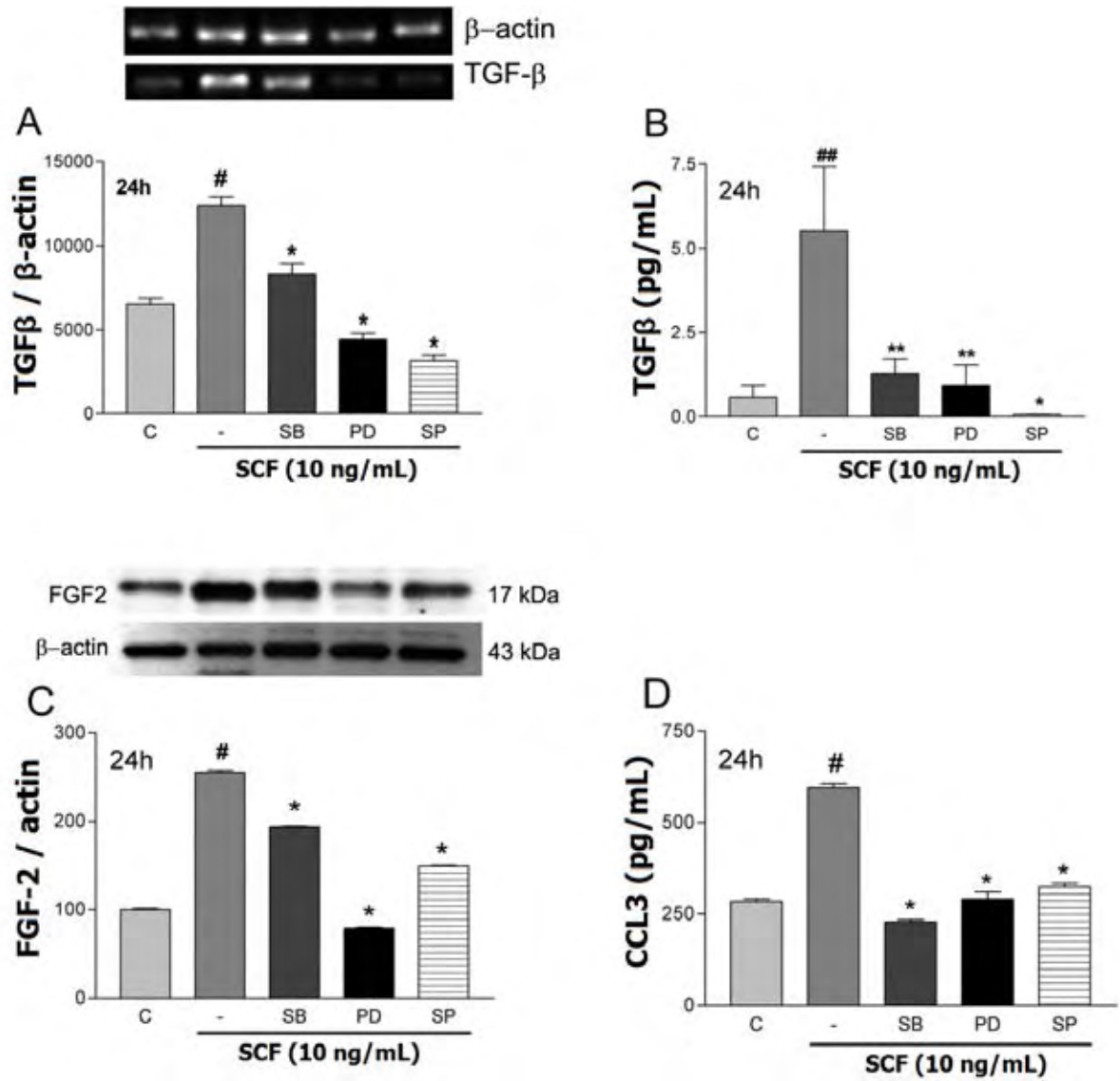


Fig. 6





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RINITE ALÉRGICA INDUZIDA POR CCL₅ EM CAMUNDONGOS**" sob responsabilidade do **Prof. Adj. Sandra Helena Penha de Oliveira** e colaboração de **Ariane Cristina Araujo dos Santos, Luiz Cesar Farias de Oliveira** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) foi aprovado pela CEEA em 21/06/2010 de acordo com os protocolos 2010-003463.

Araçatuba, 21 de Junho de 2010

Prof.^a Adj Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP