



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

**TAÍS MAROLATO DANILUCCI**

**CXCL12 ESTIMULA FIBROBLASTOS PULMONARES A  
PRODUZIR CCL3, CXCL2, LTB4 E LTC4  
VIA p38, MEK1/2, PI-3K E JNK**

**ARAÇATUBA-SP**

**2013**

**TAÍS MAROLATO DANILUCCI**

**CXCL12 ESTIMULA FIBROBLASTOS PULMONARES A**

**PRODUZIR CCL3, CXCL2, LTB4 E LTC4**

**VIA p38, MEK1/2, PI-3K E JNK**

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**

**2013**

## **TAÍS MAROLATO DANILUCCI**

**Nascimento:** 27 de Julho de 1987

**Localidade:** Braúna – São Paulo

**Filiação:** José Luiz Danilucci e Adriana Marolato Danilucci

**2006 – 2009:** Graduação em Farmácia e Bioquímica

Universidade Paulista – UNIP *Campus* Araçatuba - SP

**2010 – 2012:** Pós-Graduação em Farmacologia

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

Presidente - Prudente – SP

# ***DEDICATÓRIA***

## DEDICATÓRIA

A minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda de meus amáveis e eternos pais José Luiz e Adriana, que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus à força maior para o meu desenvolvimento como ser humano. Por essa razão, dedico a vocês, minha imensa gratidão por me guiarem incondicionalmente na realização da primeira etapa de um grande sonho.

# ***AGRADECIMENTOS***

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

À Professora Sandra pela paciência na orientação, incentivo e dedicação que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, a meu irmão e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos meus colegas de Laboratório, em especial, Daniel, Antonio, Carla, Thamine, Camila, Carluci e Victor, pelo apoio e incentivo constantes.

Aos colegas dos demais laboratórios, pelo carinho e atenção.

A todos os professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, pelo convívio e apoio.

À Professora Ana Paula Campanelli pela receptividade e colaboração com a realização do trabalho.

Aos funcionários da UNESP, que de alguma forma, fizeram parte para que esse trabalho fosse realizado.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

***ΕΠΪΓΡΑΦΕ***



***“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande.***

***Se não puder andar, rasteje,***

***Mas continue em frente de qualquer jeito”.***

**Martin Luther King**

***RESUMO***

**DANILUCCI, T.M. CXCL12 ESTIMULA FIBROBLASTOS PULMONARES A PRODUZIR CCL3, CXCL2, LTB4 E LTC4 VIA p38, MEK 1/2, PI-3K E JNK.**

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Farmacologia – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. UNESP-Universidade Estadual Paulista / Araçatuba-2013.

**RESUMO**

A quimiocina C-X-X motif ligand 12 (CXCL12) e seu receptor de quimiocina 4 (CXCR4) desenvolvem um papel crítico na inflamação das vias aéreas. No entanto, os efeitos da ativação da via CXCL12/CXCR4 sobre fibroblastos pulmonares ainda são desconhecidos. Neste estudo, investigamos o efeito da via CXCL12/CXCR4 sobre a quimiocina (C-C motif) ligante 3 (CCL3) e (C-X-C motif) ligante 2 (CXCL2) e sobre os mediadores lipídicos leucotrienos B4 (LTB4) e C4 (LTC4) por fibroblastos pulmonares e a sinalização intracelular envolvida neste processo. CXCL12 foi capaz de induzir a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4; a produção de CCL3 não é dependente da produção de CXCL2, mas a produção de CXCL2 é dependente da produção de CCL3. A produção de LTB4 pode ser parcialmente regulada por CXCL2 e CCL3 e a produção de LTC4 é dependente da produção de CCL3 e CXCL2. Fibroblastos pulmonares constitutivamente expressam CXCR4 e a estimulação com CXCL12 induz sua expressão. Análises de Western blot mostraram que CXCL12 aumenta a expressão proteica de CXCR4 e induz a fosforilação da S339 do CXCR4. A expressão gênica constitutiva e induzida de CXCR4 foram inibidas pelo anticorpo anti-CXCL2. No entanto, o anticorpo anti-CCL3 e o inibidor farmacológico MK886 foram capazes de diminuir a expressão gênica induzida de CXCR4. Os fibroblastos pulmonares foram pré-tratados com MK886, dexametasona (Dexa) e/ou loratadina (Lor). MK886 e Lor promoveram a diminuição da produção de LTC4 e LTB4, mas não a de CCL3 e CXCL2. Dexa diminuiu níveis de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4, e quando associado com Lor esta diminuição foi mais eficaz. Identificamos que as vias de sinalização intracelular PI-3K e JNK estão envolvidas na produção CCL3; p38, MEK1 / 2, PI-3K e JNK estão envolvidas na produção de CXCL2 e as vias p38 e MEK1/2 estão envolvidas na produção de LTB4 por meio da ativação do eixo CXCL12/CXCR4 em fibroblastos pulmonares. CXCL12 induz o aumento de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 em fibroblastos pulmonares, ativam diferentes mecanismos intracelulares e desempenham um papel importante na produção de mediadores pró-inflamatórios envolvidos na regulação do processo alérgico.

**Palavras-chave:** CXCL12, CXCR4, Fibroblastos pulmonares, CCL3, CXCL2, Leucotrienos.

***ABSTRACT***

**DANILUCCI, T.M. CXCL12 STIMULATES PULMONARY FIBROBLASTS TO PRODUCE CCL3, CXCL2, LTB4 AND LTC4 VIA p38, MEK 1/2, PI-3K AND JNK.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Farmacologia – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. UNESP- Universidade Estadual Paulista / Araçatuba-2013.

#### **ABSTRACT**

C-X-X motif ligand 12 (CXCL12) and its specific receptor Chemokine receptor 4 (CXCR4) play a critical role in airway inflammation. However, the effects of CXCL12/CXCR4 axis on pulmonary fibroblast activation are unknown. In this study, we investigated the effect of CXCL12/CXCR4 axis on chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3), chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), leukotrienes B4 (LTB4) and C4 (LTC4) production by pulmonary fibroblasts and the intracellular signaling involved in the process. CXCL12 induced CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 production, and CCL3 production is not dependent on CXCL2; but CXCL2 production is dependent on CCL3 production. LTB4 production can be partially down-regulated by CXCL2 and CCL3 production and LTC4 production is dependent on CCL3 and CXCL2 production. Pulmonary fibroblasts constitutively expressed CXCR4, and CXCL12 stimulation up-regulated its expression. Western blot analysis showed that CXCL12 increased protein expression of CXCR4 and induced phosphorylation at S339 of CXCR4. Constitutive CXCR4 expression was decreased by anti-CCL3 antibody or MK 886. Inducible CXCR4 was inhibited by anti-CXCL2 antibody. Indeed pulmonary fibroblasts were pretreated with MK886, dexamethasone (Dexa) and loratadine (Lor). MK886 and loratadine was able to reduced LTB4 and LTC4 production but not CCL3 and CXCL2. Dexa decreased CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 production, and when associated with Lor this decrease was more effective. We found that PI-3K and JNK intracellular signaling play a role in CCL3 production; p38, MEK1/2, PI-3K and JNK are involved in CXCL2 production and p38 and MEK1/2 pathways are involved in LTB4 production by CXCL12/CXCR4 axis activation in pulmonary fibroblasts. Taken together, our results suggest that CXCL12 increased CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 production in pulmonary fibroblasts, activating different intracellular mechanisms, and playing an important role in production of pro-inflammatory mediators involved in the regulation of allergic processes.

**Key words:** CXCL12, CXCR4, Pulmonary fibroblast, CCL3, CXCL2, Leukotrienes.

# ***LISTA DE FIGURAS***

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Citologia e fenótipo dos fibroblastos pulmonares; imagens de cultura celular em contraste de fase e após coloração com H & E a 200x, obtidas por câmera digital Olympus acoplada ao microscópio de contraste de fase e imagens de imunofluorescência para pesquisa de marcadores de FAP- $\alpha$ ,  $\alpha$ -SMA e citoqueratina a 400x **47**

**Figura 2.** Produção de CCL3 por fibroblastos pulmonares estimulados com CXCL12 (1, 10, 50 e 100 ng/mL) avaliada por ELISA, em 1, 6 e 24 horas após o estímulo **49**

**Figura 3.** Produção de CXCL2 por fibroblastos pulmonares estimulados com CXCL12 (1, 10, 50 e 100 ng/mL) avaliada por ELISA, em 1, 6 e 24 horas após o estímulo **50**

**Figura 4.** Produção de LTB4 por fibroblastos pulmonares estimulados com CXCL12 (1, 10, 50 e 100 ng/mL) avaliada por ELISA, em 1, 6 e 24 horas após o estímulo **51**

**Figura 5.** Produção de LTC4 por fibroblastos pulmonares estimulados com CXCL12 (1, 10, 50 e 100 ng/mL) avaliada por ELISA, em 1, 6 e 24 horas após o estímulo **52**

**Figura 6.** Envolvimento de CCL3 e CXCL2, na produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 **54**

<b>Figura 7.</b> Expressão gênica e proteica de CXCR4 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12	<b>56</b>
<b>Figura 8.</b> Efeito do $\alpha$ -CCL3, $\alpha$ -CXCL2 e MK886 sobre a expressão gênica de CXCR4 em fibroblastos	<b>58</b>
<b>Figura 9.</b> Inibidores farmacológicos MK886, Dexametasona e/ou Loratadina sobre a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4	<b>60</b>
<b>Figura 10.</b> Envolvimento das vias de sinalização p38, MEK1/2, PI-3K e JNK na produção proteica de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4	<b>62</b>
<b>Figura 11.</b> Efeito de CXCL12 sobre a expressão proteica e a fosforilação das vias p38, MEK1/2, PI-3K e JNK	<b>63</b>
<b>Figura 12.</b> Diagrama esquemático das vias de sinalização envolvidas na produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 induzida por CXCL12 em fibroblastos pulmonares	<b>75</b>



# ***LISTA DE ABREVIATURAS***

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO = 5-lipoxigenase  
AA = Ácido araquidônico  
BSA = Soro albumina bovina  
CCL3 = Quimiocina (C-C motif) ligante 3  
cDNA = Ácido desoxirribonucleico complementar  
Cis-LTs = Cisteínil-leucotrienos  
CO<sub>2</sub> = Gás carbônico  
CXCL12 = C-X-X motif ligand 12  
CXCL2 = Quimiocina (C-X-C motif) ligante 2  
CXCR4 = Receptor de quimiocina 4  
DAPI = 4,6-diamidino-2-fenilindol  
DEPC = Dimetil pirocarbonato  
Dexa = Dexametasona  
DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DNase = Nuclease que catalisa a degradação do DNA  
dNTP = 2' – *deoxynucleoside 5' - triphosphate*  
DTT = DL-Dithiothreitol  
ECL = Quimiluminescência  
ELISA = *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*  
EPM = Média ± erro padrão da média  
FAP-α = Proteína ativadora de fibroblastos alfa  
H&E = Hematoxilina & Eosina  
HCl = Ácido clorídrico  
HIV = Vírus da imunodeficiência humana  
IgE = Imunoglobulina E  
IL = Interleucina  
JNK = c-Jun N-terminal quinase  
LBA = Lavado broncoalveolar  
Lor = Loratadina  
LPS = Lipopolissacarídeo  
LTs = Leucotrienos

MEC = Matriz extracelular  
MMP = Metaloproteinase  
NF-kB = Fator nuclear kappa B  
nm = Nanômetros  
Oligo-DT = Sequência curta de deoxi-thymine nucleotids  
PBS = Tampão fosfato salino  
PGEs = Prostaglandinas  
PI-3K = Fosfatidilinositol 3-quinase  
PMSF = Phenylmethanesulfonylfluoride  
MEK 1/ 2 = Proteína quinase ativada por mitógeno MEK1 / 2  
p38 = Proteína quinase ativada por mitógeno p38  
PVDF = Polyvinylidene difluoride  
RNA = Ácido ribonucleico  
RNAm = Ácido ribonucleico mensageiro  
RNase = Nuclease que catalisa a degradação do RNA  
RT-PCR = *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* –  
Transcriptase reversa de reação em cadeia de polimerase  
SCF= Fator de células-tronco  
SDS = Sulfato dodecil de sódio  
SFB = Soro fetal bovino  
TGF-β = Fator de transformação de crescimento beta  
Th2 = Células T-helper 2  
TNF-α = Fator de necrose tumoral  
VEGF = Fator de crescimento endotelial vascular  
αSMA = Alfa-actina do músculo liso

# ***SUMÁRIO***

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>23</b>
<b>2. PROPOSIÇÃO</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
3.1 Animais e aspectos éticos	35
3.2 Estabelecimento de cultura primária de fibroblastos pulmonares	35
3.3 Análise e caracterização dos fibroblastos pulmonares obtidos de culturas primárias de pulmão murino	36
3.4 Análise citológica dos fibroblastos obtidos de culturas primárias de pulmão murino	37
3.5 Estimulação dos fibroblastos pulmonares por CXCL12	37
3.6 Detecção da produção de CXCL2 e CCL3 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12 por ELISA	38
3.7 Detecção da produção de LTB4 e LTC4 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12 por ELISA	38
3.8 Detecção da expressão do receptor CXCR4 por fibroblastos pulmonares estimulados ou não por CXCL12 por RT-PCR	38
3.9 Pré-tratamento dos fibroblastos pulmonares com anti-CXCL2 e anti-CCL3	41
3.10 Pré-tratamento dos fibroblastos pulmonares com inibidores farmacológicos MK886, dexametasona e/ou loratadina	42
3.11 Pré-tratamento dos fibroblastos pulmonares com inibidores da sinalização intracelular	42
3.13 Western Blot e análise de detecção imunológica de CXCR4, p38, ERK1/2, PI-3K e JNK 1/2 em fibroblastos pulmonares	43
3.12 Análise estatística	44
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
4.1 Caracterizações de fibroblastos pulmonares em cultura	46
4.2 CXCL12 induz a produção de CCL3, CXCL2, LTB4, LTC4 em fibroblastos pulmonares	48
4.3 A produção de CXCL2 e LTC4 é dependente da produção de CCL3 em fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12	53

4.4 Expressão de CXCR4 em fibroblastos pulmonares estimulados com CXCL12	55
4.5 Anti-CXCL2, anti-CCL3 e MK886 inibiram a expressão de CXCR4 em fibroblastos pulmonares estimulados com CXCL12	57
4.6 Efeitos farmacológicos dos inibidores MK886, dexametasona e/ou loratadina sobre a indução da produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 em fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12	59
4.7 Inibidores de vias de sinalização sobre a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4, em fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12	61
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>94</b>

***INTRODUÇÃO E  
SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA***

## 1. INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas em que muitas células desempenham um importante papel. É caracterizada por obstrução reversível do fluxo aéreo, hiper-reatividade brônquica e inflamação das vias aéreas (1-3). A asma representa sério problema de saúde pública, pois afeta indivíduos de todas as idades e pode ser grave ou até mesmo fatal. Mundialmente, cerca de que 300 milhões de indivíduos sofrem da doença (3). As manifestações clínicas da asma envolvem diferentes fatores ambientais que interagem com as vias aéreas para causar a inflamação, resultando em mudanças estruturais da arquitetura das vias respiratórias, incluindo espessamento da membrana basal, hiperplasia de células produtoras de muco, hiperplasia do músculo liso, hipertrofia de células epiteliais, proliferação exacerbada de fibroblastos, influxo de miofibroblastos, deposição de colágeno e formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese); coletivamente referidos como remodelamento das vias aéreas, os quais contribuem amplamente para a patogênese, severidade e progressão da doença (2, 4-8).

A cascata alérgica é fundamental no desenvolvimento da inflamação das vias aéreas. Inicialmente, alérgenos inalados se ligam a moléculas de Imunoglobulina E (IgE) presentes na superfície de mastócitos, causando a ativação da membrana e vias citosólicas que subsequentemente promovem a liberação de mediadores como, histamina, prostaglandinas (PGEs) e leucotrienos (LTs) e a transcrição de citocinas por mastócitos (9, 10). Em paralelo a esse mecanismo, alérgenos são processados por células dendríticas e os apresentam a células T causando a atração de células T-helper 2 (Th2) (11-13). As células Th2 desempenham um importante papel na inflamação



alérgica através da liberação de citocinas como interleucina-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 (14). Por meio da produção de tais citocinas, células efetoras secundárias, tais como macrófagos, basófilos e eosinófilos são recrutadas para sítios inflamatórios. Essas células são então ativadas e secretam mediadores inflamatórios (2, 13), como LTs, histamina, prostanóides, citocinas, quimiocinas, entre outros, responsáveis por induzir uma série de efeitos sobre as vias aéreas e contribuir para as características patológicas das doenças alérgicas (15).

Os LTs pertencem a uma família de mediadores lipídicos sintetizados a partir do ácido araquidônico (AA) por meio da via 5-lipoxigenase (5-LO). Um produto intermediário instável, o leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>), é formado e convertido a leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e a uma categoria separada de LTs, que por conterem aminoácidos em sua estrutura são chamados cisteinil-leucotrienos (Cis-LTs) - leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), leucotrieno D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) e leucotrieno E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) (16-19). Os LTs possuem propriedades imuno-modulatórias e pró-inflamatórias, além de desempenharem papel importante na quimiotaxia, adesão endotelial, ativação de leucócitos, produção de quimiocinas, bem como a contração da musculatura lisa do trato respiratório e da microcirculação, aumenta a síntese de colágeno por fibroblastos e promove a proliferação de células epiteliais brônquicas e musculares lisas das vias aéreas (17, 20-22).

Um grande número de quimiocinas foi identificado na asma, cuja produção está relacionada à gravidade da inflamação alérgica e a respostas reativas das vias aéreas (23). As quimiocinas representam uma grande família de proteínas e são divididas em quatro grupos baseados em sua estrutura molecular e posição dos resíduos de cisteína, e são eles: o grupo das CC

quimiocinas, das CXC quimiocinas, das C quimiocinas e das CX3C quimiocinas (13).

As quimiocinas induzem a maior parte dos seus efeitos biológicos ligando-se a receptores específicos acoplados à proteína G e conduzem à ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular (24, 25).

Atualmente tem sido dada muita atenção a um determinado membro do grupo das CXC quimiocinas e seu receptor específico, CXCL12 e CXCR4, respectivamente. CXCL12 induz várias funções incluindo, quimiotaxia de linfócitos para sítios inflamatórios, posicionamento do blastocisto no endométrio, migração de células-tronco embriogênicas e hematopoiéticas, proliferação e migração de células progenitoras neurais e recrutamento de células derivadas da medula óssea para aéreas de formação vascular (26). Recentemente foi descoberto o papel da CXCL12 em processos tumorais nas doenças oncológicas, estimulando a proliferação e a migração de células tumorais (26). Além disso, CXCL12 possui mecanismos de ações em doenças imunes e autoimunes como, em respostas causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), no recrutamento de fibrócitos para os pulmões na fibrose idiopática pulmonar, no recrutamento de células T ativadas para locais inflamatórios na artrite reumatóide e na acumulação de leucócitos nos pulmões em doenças alérgicas das vias aéreas (26-30). Dados na literatura demonstram que CXCL12/CXCR4 desempenham um papel no desenvolvimento da inflamação pulmonar, da hiper-reatividade das vias aéreas, da eosinofilia peribrônquica, da angiogênese e do remodelamento das vias aéreas (31-35). CXCL12/CXCR4 são funcionalmente expressados em diversos tecidos e células tais como medula óssea, linfonodos, células-tronco

hematopoiéticas, células musculares, células endoteliais, células epiteliais, células pulmonares, células renais, células hepáticas, células neurais, entre outras (13, 36-39).

Além disso, o desenvolvimento do estado asmático foi associado a níveis significativamente mais elevados de CCL2, CCL3 e CCL5 no lavado broncoalveolar (LBA) quando comparado com amostras de pacientes com formas mais leves da doença (40). Há evidências que CCL3 possui atividade quimiotática para células inflamatórias e células efetoras imunes (41), tais como monócitos, linfócitos e eosinófilos em respostas alérgicas das vias aéreas (42-44). Além disso, CCL3 é produzida e secretada por uma variedade de tipos celulares incluindo monócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células epiteliais e fibroblastos (41, 45, 46). A produção de CCL3, observada durante a interação com tais tipos celulares, pode servir como um mecanismo importante na manutenção do recrutamento celular e de mediadores inflamatórios durante a resposta inflamatória (41, 46).

A quimiocina CXCL2 também está relacionada à intensidade da resposta asmática através da sua capacidade indutora e ativadora de populações celulares dentro dos pulmões (13). CXCL2 é considerada um potente fator quimiotático para neutrófilos (47, 48). A atividade biológica de CXCL2 foi relacionada ao recrutamento de linfócitos e à produção de IgE em um modelo animal de asma alérgica, desempenhando importante papel no recrutamento celular e na resposta imune sistêmica (47). Células hematopoiéticas, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, monócitos e neutrófilos expressam CXCL2 (13, 41). Além disso, a secreção de CXCL2 é induzida por uma variedade de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas,

dentre outros (13, 41). As múltiplas fontes, bem como os fatores que estimulam a produção de CXCL2, indicam que esta quimiocina está envolvida na via sinalizadora que orchestra várias respostas inflamatórias (41).

As quimiocinas também podem ser produzidas por células estruturais como células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais (13). Fibroblastos são importantes células sentinelas do sistema imune e desempenham um papel crítico em respostas inflamatórias (49). Na inflamação pulmonar estão envolvidos na deposição e remodelamento da matriz extracelular (MEC), através da liberação de colágeno I, III e IV, em resposta a IL-1 $\beta$  e fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), e metaloproteinases 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9), através da ativação de IL-6 (5, 6, 49-51). Os fibroblastos são sítios chaves de citocinas, quimiocinas e prostanóides. Tomadas em conjunto, tais características evidenciam que os fibroblastos são capazes de transformar respostas imunes em reações crônicas inflamatórias (49). Dados da literatura demonstraram que CXCL12 pode ser liberado a partir de células ativadas, no entanto, CXCL12 agindo como indutor celular tem sido pouco observado. Além disso, o papel de CXCL12/CXCR4 na produção de quimiocinas e de mediadores inflamatórios e as vias sinalizadoras envolvidas nesta produção em fibroblastos pulmonares ainda não foi descrito.

A ligação de CXCL12 com CXCR4 ativa várias vias de sinalização intracelular. Evidências sugerem que, após a ligação com o CXCR4, CXCL12 desencadeia a dimerização do receptor e conduz a ativação CXCR4 e a dissociação do complexo proteína G heterotrimérica (G $\alpha\beta\gamma$ ) que resulta na fosforilação dos resíduos de tirosina do terminal-C via JAK 2 e JAK 3 quinase. Este processo termina com a sinalização de CXCR4 ativando assim as vias de

sinalização, incluindo, influxo de cálcio, componentes de adesão local, p38, MEK1/2, PI-3K, JNK e fator nuclear kappa B (NF-κB) (26, 36, 52). A identificação da função de cada quimiocina durante a resposta asmática e a natureza dos sinais transdutores são essências para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (53).

Os glicocorticóides, os anti-histamínicos e os antileucotrienos estão dentre os tratamentos farmacológicos utilizados no tratamento da asma.

Os glicocorticoides são considerados os fármacos mais efetivos para o tratamento da asma e seus efeitos terapêuticos são associados a ações anti-inflamatórias por meio da estimulação ou inibição da transcrição de diversos genes e pela inibição da produção de citocinas responsáveis pelo início e persistência das respostas inflamatórias (54-58). Eles possuem também, efeito inibidor direto sobre muitas células envolvidas na inflamação das vias aéreas, incluindo, macrófagos, linfócitos T, eosinófilos, e células epiteliais das vias aéreas (57). Em adição a esses efeitos supressivos sobre as células inflamatórias, os glicocorticoides também inibem a exsudação do plasma, a secreção de muco e a hiper-reatividade na inflamação das vias aéreas (57, 59-61).

A histamina é um mediador inflamatório que participa de respostas patológicas agudas associadas à asma alérgica (62, 63). Sua produção induz a obstrução das vias aéreas por meio de contração do músculo liso, edema, vasodilatação e hipersecreção de muco (64, 65). As ações da histamina são mediadas por vários receptores de histamina, incluindo o receptor de tipo 1 (H1R) (62). Os compostos anti-histamínicos ligam-se competitivamente a esses receptores impedindo a ligação da histamina e a sua ativação, inibindo assim

os efeitos patológicos da histamina (66). Tradicionalmente os anti-histamínicos H1 têm sido considerados ineficazes no tratamento da asma ao menos que utilizados em altas doses (67, 68). Contudo, recentemente, em doses recomendadas para o tratamento de rinite alérgica intermitente, os anti-histamínicos de segunda geração como a cetirizina, a desloratadina e a loratadina foram relatadas em melhorar os sintomas da asma leve "sazonal", em reduzir a necessidade de corticosteróides e de agonistas- $\beta$ 2, e até mesmo em melhorar a função pulmonar de forma significativa (67, 69). No entanto, são necessários estudos adicionais com anti-histamínicos H1 em pacientes com alergia e asma.

Os medicamentos antileucotrienos também foram implantados na prática clínica da asma brônquica e rinite alérgica e incluem os antagonistas específicos de receptores de leucotrienos e inibidores da biossíntese de leucotrienos (70). Os agentes antileucotrienos são recomendados para o tratamento em longo prazo da asma e são capazes de reduzir os sintomas clínicos, como a tosse, melhoram a função pulmonar por meio da dilatação brônquica, reduzem a inflamação da mucosa brônquica, e diminuem a frequência de exacerbação asmática (71-73).

Drogas que atuam como inibidoras de citocinas e quimiocinas, bem como de seus respectivos receptores, têm sido amplamente estudadas na asma. Por exemplo, uma versão modificada do CCL5, Met-RANTES, no qual o N-terminal de CCL5 é estendido pela retenção de um resíduo de metionina, foi capaz de inibir as funções efectoras de eosinófilos humanos, após a estimulação com CCL5, CCL7 e CCL11 (74). Várias pequenas moléculas antagonistas de CCR3 foram desenvolvidos por diversas empresas farmacêuticas, no entanto,

os dados *in vivo* não foram publicados com a utilização destes compostos (75). O AMD3100, antagonista do receptor CXCR4 significativamente reduz a hiperreatividade brônquica, a eosinofília peribronqueolar e os níveis de IL-4, IL-5, CCL22, CC17 em um modelo de asma alérgica (31).

Neste sentido, tratamentos alvos direcionados a quimiocinas e seus receptores geralmente são utilizados por afetarem a ligação quimiocina-receptor, os quais podem ser de diversas maneiras como: utilizando anticorpos bloqueadores, antagonizando receptores de quimiocinas e pelo uso de inibidores farmacológicos. Sendo assim, entender os mecanismos envolvidos na ativação receptor-quimiocina e a sinalização intracelular ativada será um passo importante para o entendimento desse novo tipo de tratamento da asma que em breve pode estar no mercado.

***PROPOSIÇÃO***



## **2. PROPOSIÇÃO**

Doenças pulmonares alérgicas, como a asma, representam um sério problema de saúde pública. A resposta imune associada à asma é caracterizada pela infiltração da mucosa brônquica por neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos e linfócitos que secretam mediadores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, os quais estão relacionados à gravidade da inflamação alérgica. A quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 têm sido relacionados às respostas alérgicas asmáticas, mas pouco se sabe sobre a inter-relação desta quimiocina com elementos estruturais pulmonares e com mediadores pró-inflamatórios envolvidos na doença. Além disso, a expressão de CXCR4 em fibroblastos pulmonares ainda não foi descrita. Estudos recentes revelam que fibroblastos pulmonares ativados apresentam-se como fontes importantes de quimiocinas e outros fatores inflamatórios e que podem auxiliar no recrutamento e ativação de células e de mediadores inflamatórios. Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram:

- 1- Avaliar os efeitos de CXCL12 sobre a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 por fibroblastos pulmonares;
- 2- Investigar a expressão CXCR4 nestas células;
- 3- Investigar os mecanismos envolvidos na produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12;
- 4- Examinar os efeitos de inibidores farmacológicos MK886, Dexametasona e Loratadina sobre a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4, e
- 5- Investigar o envolvimento das vias de sinalização p38, MEK1/2, PI-3K e JNK sobre a produção das proteínas CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12.

# ***MATERIAIS E MÉTODOS***

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais e aspectos éticos**

Os camundongos Balb/c machos pesando aproximadamente 25 gramas com idade de 6 a 7 semanas foram utilizados durante o estudo. Os camundongos foram mantidos em condições padrão de temperatura e alimentação. Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA/Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP/ Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Araçatuba, SP, Brasil, protocolo n.º. FOA-0969-2012.

#### **3.2 Estabelecimento de cultura primária de fibroblastos pulmonares**

Cinco camundongos Balb/c machos foram eutanasiados em câmara saturada de Halotano (Tanohalo, Cristalia, Campinas, Brasil) e seus pulmões foram retirados. Na capela de fluxo laminar, os pulmões foram fragmentados em espécimes de 1 milímetro (mm) de espessura aproximadamente. Após a fragmentação os fragmentos foram centrifugados a 1200 rpm/5min/temperatura ambiente e os fragmentos foram ressuspensos e colocados em frascos para cultura de 25 cm<sup>2</sup> imersos em Meio Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,5 mg/mL de anfotericina B (todos os produtos da Invitrogen, California, EUA). As culturas foram mantidas neste primeiro frasco até os fibroblastos alcançarem confluência com trocas de meio a cada 2 dias. Após confluência de aproximadamente 80%, os fibroblastos foram repicados utilizando 1 mL de solução de Tripsina EDTA 1:250 (Cultilab, Campinas, Brasil) , este procedimento foi repetido conforme a proliferação das

células. A utilização dos fibroblastos para os ensaios ocorreu a partir da 4ª passagem até a 7ª passagem.

### **3.3 Análise e caracterização dos fibroblastos pulmonares obtidos de culturas primárias de pulmão murino**

Os fibroblastos pulmonares foram semeados ( $5 \times 10^4$  células/poço) sobre lamínulas quadrangulares, colocadas em placas de cultura de 6 poços por 24 horas. As lamínulas foram removidas dos poços e pré-fixadas em acetona gelada por 30 segundos e depois de secas, 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 por 5 vezes. Após, as lamínulas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com tampão fosfato salino/soro albumina bovina (PBS/BSA) 1% para o bloqueio de ligações inespecíficas e após este período foram lavadas por 5 vezes com PBS. Os anticorpos monoclonais primários anti-actina de músculo liso murino ( $\alpha$ SMA; 1:100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e; anti-Cytokeratin 10/13 murino (1:200; Covance Inc. Dallas, TX, USA) e o anticorpo policlonal anti-proteína ativadora de fibroblastos- $\alpha$  de cabra (FAP- $\alpha$ ; 1:100; Santa Cruz, SC, CA, USA) foram incubados por 18 h a  $4^\circ\text{C}$ . Após nova lavagem com PBS por 5 vezes, as células foram incubadas com os anticorpos secundários AlexaFluor 488 goat anti-mouse IgG H+L antibody (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e rabbit anti-goat IgG-FITC antibody (1:100; Santa Cruz, SC, CA, USA) por 2 horas em câmara escura. Em seguida foi realizada a lavagem das lamínulas por 10 vezes com PBS. Após, as lamínulas foram 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 foi realizada utilizando câmera acoplada ao microscópio confocal invertido com 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 citológica dos fibroblastos obtidos de culturas primárias de pulmão murino**

Para o experimento, os fibroblastos pulmonares ( $3 \times 10^6$  células/poço) foram semeados em placas com 6 poços até alcançar confluência. Em seguida, as células foram coradas pela técnica de Hematoxilina/Eosina (H&E - Panóptico rápido – Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) e analisadas por microscopia óptica com captura de imagens por Câmera Digital Olympus acoplada ao microscópio.

### **3.5 Estimulação dos fibroblastos pulmonares por CXCL12**

Os fibroblastos foram distribuídos em placas de 24 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  células por poço e deixados aderir por 24 horas em DMEM suplementado com 15% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 mg/mL de anfotericina B. Após esse período, as células foram suplementadas com DMEM a 0,5% de SFB por 24 horas. As células foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura DMEM 0,5% SFB (500 µL) contendo CXCL12 nas concentrações 1; 10; 50 e 100 ng/mL foi adicionado aos poços (76). Ao grupo controle foi adicionado somente meio de cultura. Após 1, 6 e 24 horas os sobrenadantes foram coletados para detecção da produção de CXCL-2, CCL3, LTB4 e LTC4 por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

### **3.6 Detecção da produção de CXCL2 e CCL3 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12 por ELISA**

A detecção das quimiocinas no sobrenadante das células foi feita por meio de ELISA. Placas de 96 poços foram recobertas e incubadas 15-18 horas a 4°C, com anticorpos anti-CXCL2 e anti-CCL3, diluídos em PBS. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS, contendo Tween 20 0,05% e bloqueadas durante 2 horas, em temperatura ambiente, com PBS/BSA 1%. As placas, então foram lavadas com PBS Tween e incubadas com quantidades conhecidas de recombinantes CXCL2 e CCL3 durante 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo biotilado por 2 horas em temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi realizada a incubação com a enzima estreptavidina por 30 minutos na proporção 1:250 em PBS/BSA 1%. As placas foram lavadas novamente e o substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina na proporção 1:1) adicionado. Após 30 minutos, a solução de paralização da reação (ácido sulfúrico 1M) foi adicionada e a leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 450 nm.

### **3.7 Detecção da produção de LTB4 e LTC4 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12 por ELISA**

A detecção de LTB4 e LTC4 foi realizada por meio de ELISA - Imunoensaio utilizando kit comercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.8 Detecção da expressão do receptor CXCR4 por fibroblastos pulmonares estimulados ou não por CXCL12 por RT-PCR**

Após a estimulação dos fibroblastos pulmonares por CXCL12 as células foram coletadas para avaliar a expressão do receptor de CXCL12, CXCR4 por RT-PCR. O RNA total foi obtido dos fibroblastos pulmonares, 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 a 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 ressuscitado 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 realizada utilizando absorvância de 260/280 nm (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 CXCR4. Para a realização da transcriptase reversa, 1µg 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  $\mu$ L de transcriptase reversa (Super Script II, 200 U/ $\mu$ L, Invitrogen). A reação de transcriptase reversa foi realizada de acordo com o seguinte perfil de amplificação: pré-desnaturação a 94°C durante 1minutopor 30 e/ou 35 ciclos, anelamento a 55 °C por 1 minuto; e extensão a 70°C durante 1 minuto. O passo final de extensão foi a 72 ° C durante 10 minutos. Após a termociclagem as amostras foram armazenadas a 4°C para posteriores análises. Para a realização do PCR, 1 $\mu$ L de cDNA foi usado em uma reação contendo 4  $\mu$ L de água de DEPC, 2  $\mu$ L de dNTP (2,5  $\mu$ M, Invitrogen), 2,5  $\mu$ L de 10x PCR Rxn Buffer (-MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen), 1,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 nM, Invitrogen), 1  $\mu$ L de primer 10 nM, 12,8  $\mu$ L de água ultrapura (Invitrogen) e 0,1  $\mu$ L de Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L, Invitrogen). A mistura foi incubada em termociclador utilizando o seguinte perfil de temperatura para  $\beta$ -actina ou CXCR4: passo de desnaturação a 94 ° C durante 4 min por 30 ciclos ou 35 ciclos, anelamento a 55 ° C durante 1 min e extensão a 72 ° C durante 1 min. O passo final de extensão foi de 72 ° C durante 10 min. O conjunto de primers (camundongos) utilizados foram:  $\beta$ -actina (sense: 5' TGG AATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'; antisense: 5' TAA AACGCAGCTCAGTAACAGTCCG -3', 445 bp) e CXCR4 (sense: 5' TGG AGA CTA TGA CTC CAA CA-3'; antisense: 5' CTG GAA TTG AAA CAC CAC CA-3', 570 bp). A detecção de mRNA para  $\beta$ -actina foi usada como controle interno. Para detecção dos produtos amplificados, uma alíquota de 13  $\mu$ L 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 pb, Invitrogen). A foto documentação 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 ScionImage (ScionCorp., Frederick, MD, USA), para obter um valor numérico que permitiu uma comparação semi-quantitativa entre o alvo CXCR4 e o controle constitutivo  $\beta$ -actina.

### **3.9 Pré-tratamento dos fibroblastos pulmonares com anti-CXCL2 e anti-CCL3**

Os fibroblastos foram distribuídos em placas de 24 poços em suspensão de  $1 \times 10^5$  células por poço e deixados para aderir por 24 horas. Após este período, a concentração de SFB no meio foi reduzida a 0,5% por 24 horas. As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as células foram pré-tratadas pelos seguintes anticorpos inibidores: anti-CXCL2 (1:50) e anti-CCL3 (1:200). Após 30 minutos CXCL12 (100 ng/mL) foi adicionado aos poços pré-tratados com os anticorpos. Ao grupo controle foi adicionado somente meio de cultura. Após 24 horas os sobrenadantes foram coletados para avaliação da produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 por ELISA e as células foram coletadas para avaliação da expressão de CXCR4 por RT-PCR.

### **3.10 Pré-tratamento dos fibroblastos pulmonares com os inibidores farmacológicos MK886, dexametasona e/ou loratadina**

Os fibroblastos foram distribuídos em placas de 24 poços em suspensão de  $1 \times 10^5$  células por poço e deixados para aderir por 24 horas. Após este período, a concentração de SFB no meio foi reduzida a 0,5% por 24 horas. As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após, as células foram pré-tratadas pelos seguintes inibidores farmacológicos: MK886 (1 µM), um inibidor da enzima 5-lipoxigenase, dexametasona (10 µM), um glicocorticóide e/ou loratadina (1 µM), antagonista de receptor de histamina H1(77, 78). Após 30 minutos CXCL12 (100 ng/mL) foi adicionado aos poços pré-tratados com os inibidores. Ao grupo controle foi adicionado somente meio de cultura. Após 24 horas os sobrenadantes foram coletados para avaliação da produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 por ELISA.

### **3.11 Pré-tratamento dos fibroblastos pulmonares com os inibidores da sinalização intracelular**

Os fibroblastos foram distribuídos em placas de 24 poços em suspensão de  $1 \times 10^5$  células por poço e deixados para aderir por 24 horas. Após este período, a concentração de SFB do no meio foi reduzida a 0,5% por 24 horas. As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as células foram pré-tratadas pelos seguintes inibidores da sinalização intracelular: SB202190 (10 µM), inibidor da p38 MAP quinase, PD98059 (30 µM), inibidor da MEK 1/2 quinase, LY294002 (10 µM), inibidor da fosfatidilinositol-3-quinase (PI-3K) e SP600125 (3 µM), inibidor da JNK 1/2/3 (79-81). Após 30 minutos CXCL12 (100 ng/mL) foi adicionado aos poços pré-

tratados com os inibidores. Ao grupo controle foi adicionado somente meio de cultura. Após 24 horas os sobrenadantes foram coletados para avaliação da produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 por ELISA.

### **3.12 Western Blot e análise de detecção imunológica de CXCR4, p38, ERK1/2, PI-3K e JNK1/2 em fibroblastos pulmonares**

Os fibroblastos foram distribuídos em placas de 6 poços ( $2 \times 10^6$  células/poço) e deixados para aderir por 24 horas. Após este período, a concentração de SFB no meio foi reduzida a 0,5% por 24 horas e CXCL12 (100 ng/mL) foi adicionado aos poços. Ao grupo controle foi adicionado somente meio de cultura. Após 24 horas as células foram coletadas para quantificação de CXCR4, p38, ERK1/2, PI-3K e JNK1/2 usando a técnica de Western blot. As células cultivadas foram lisadas com tampão de lise Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), Tween 20 1%, deoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, O-Vanadato 1 mM, NaF 1mM e inibidores de protease (aprotinina 1 µg/mL, leupeptina 10µg/mL e PMSF 1 mM), sendo deixados em banho de gelo por 2 horas. Em seguida, o extrato foi classificado 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 o sobrenadante foi adicionado tampão de amostra na proporção de 1:1 [Tris-HCl100mM (pH 6,8), DTT 200 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,1% e glicerol 20%]. As amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida (10-20%) contendo SDS (SDS-PAGE). Após a corrida, realizou-se a transferência para membranas de PVDF. As membranas foram bloqueadas com leite mólico (1%) preparado em tampão Tris contendo tween 20 (0,05%-TBST) e incubadas “overnight” com anticorpos primários diluídos 1:1000 [Anti-CXCR4, anti-ERK1/2, anti-fosfo-

ERK1/2<sup>Thr202/Tyr204</sup>, anti-p38, anti-fosfo-p38<sup>Thr180/Tyr182</sup>, anti-JNK1/2, anti-fosfo-JNK1/2<sup>Thr183/Tyr185</sup> e anti- $\beta$ -actina (Santa Cruz, SC, CA, USA); anti-PI3K p85 alfa, anti- fosfo PI3K p85 alfa<sup>Tyr607</sup> (Abcam, Cambridge, MA, USA) e anti- fosfo-CXCR4<sup>Ser339</sup> (Sigma, St Louis, USA). Após a lavagem com TBS-0.05% Tween 20, as membranas foram incubadas por 1 h em buffer de bloqueio contendo anticorpos secundários conjugados a peroxidase anti-coelho, anti-camundongo ou anti-cabra (Santa Cruz, SC, CA, USA) diluído 1:3.000. Após lavagem das membranas com TBS, as bandas foram detectadas por quimiluminescência (ECL). Para a análise desintométrica das bandas obtidas, foi utilizado o software Scion Image. O nível de expressão foi determinado através da razão da intensidade do sinal da proteína em relação à  $\beta$ -actina.

### **3.13 Análise estatística**

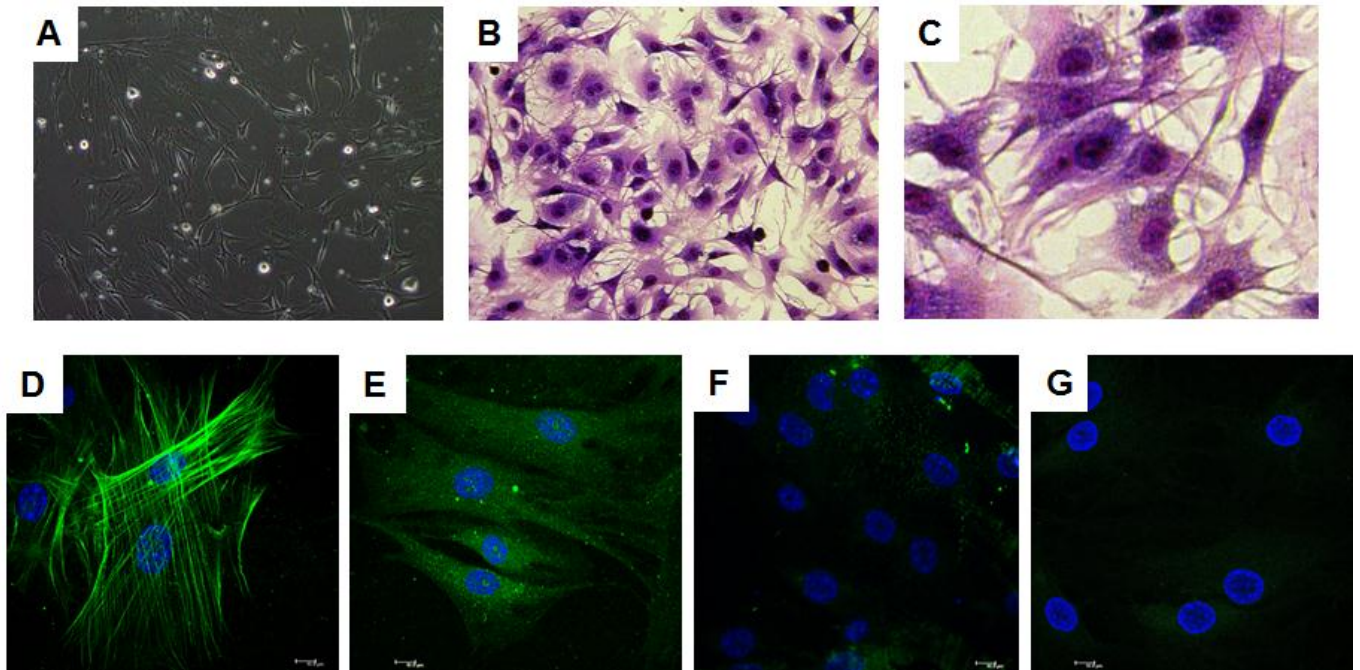
Os dados foram obtidos de pelo menos três séries independentes de experimentos e as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPadPrism (versão 5.0). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e as comparações entre os grupos foram feitas usando One-way ANOVA com correção de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

# ***RESULTADOS***

## 4. Resultados

### 4.1 Caracterizações de fibroblastos pulmonares em cultura

Os fibroblastos isolados a partir dos pulmões de camundongos foram corados com H&E e identificados por microscopia óptica. As características morfológicas dos fibroblastos pulmonares exibiram citologia fibroblastóide com citoplasma ramificado e rodeado por um núcleo elíptico contendo um ou dois nucléolos (Fig. 1A, 1B e 1C). Para confirmar as características fenotípicas dos fibroblastos em cultura primária *in vitro* e excluir possível contaminação com células epiteliais, foram realizadas coloração por imunofluorescência usando FAP- $\alpha$ ,  $\alpha$ -SMA e o marcador para citoqueratina. Fibroblastos apresentaram marcação para FAP- $\alpha$  (Fig. 1D) e  $\alpha$ -SMA (Fig. 1E), mas não apresentaram marcação para citoqueratina (Fig. 1F) e controle negativo (Fig.G). O resultado da reação de imunofluorescência confirmou a homogeneidade destas populações de fibroblastos, indicando pureza da linhagem primária produzida.



**Figura 1. Citologia e fenótipo dos fibroblastos pulmonares. (A)** Cultura celular em contraste de fase a 200X, **(B e C)** cultura de células após coloração com H&E a 200X e 400X, obtidas por microscópio de contraste de fase acoplado a câmera digital Olympus, mostrando morfologia típica fibroblastóide com citoplasma ramificado rodeado por um núcleo elíptico contendo um ou dois nucléolos. Imagens de imunofluorescência revelando marcação positiva para **(D)** FAP- $\alpha$  e **(E)**  $\alpha$ -SMA, **(F)** marcação negativa para citoqueratina e **(G)** controle negativo a 400x.



#### **4.2 CXCL12 induz a produção de CCL3, CXCL2, LTB4, LTC4 em fibroblastos pulmonares**

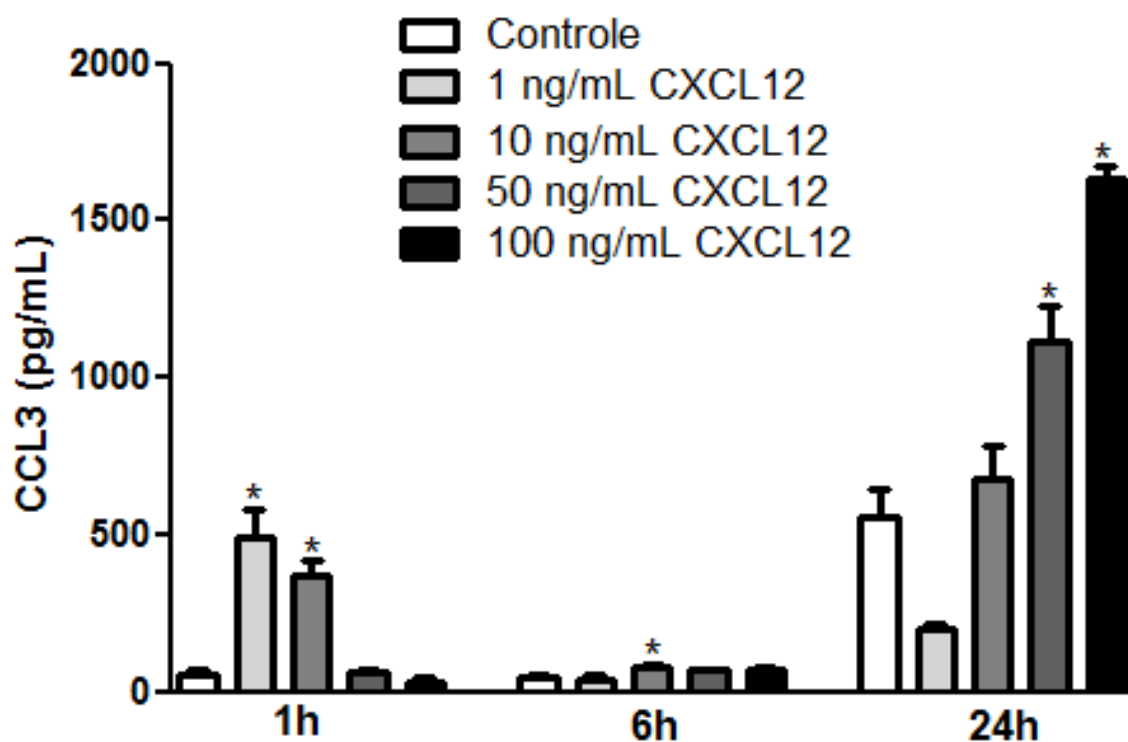
Para examinar os efeitos da estimulação com CXCL12 sobre a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4, os fibroblastos pulmonares foram estimulados por CXCL12 nas concentrações 1, 10, 50 e 100 ng/mL. A produção dos mediadores proteicos e lipídicos foi observada em intervalos de tempo de 1, 6 e 24 horas após a estimulação. Os padrões de produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 foram muito semelhantes, com algumas diferenças entre os cursos de tempo. Uma hora após a estimulação com CXCL12 (1 e 10 ng/mL) houve o aumento da produção de CCL3 (Fig. 2) induzido por CXCL12, já nas concentrações 50 e 100 ng/mL não houve diferença na produção de CCL3 em relação ao grupo controle. Seis horas após a estimulação com CXCL12 (10 ng/mL) esse aumento da produção de CCL3 continuou (Fig. 2). Às 24 horas a produção de CCL3 foi observada em uma forma dose dependente e atingiu um pico com 100 ng/mL de CXCL12 (Fig. 2).

A produção de CXCL2 (Fig. 3) foi observada 1 hora após estimulação com CXCL12 10 ng/mL; no intervalo de 6 horas não houve indução de CXCL2. No entanto, como observado na produção de CCL3, o pico de produção de CXCL2 foi 24 h após o estímulo com 100 ng/mL de CXCL12 (Fig. 3). A estimulação com 50 ng/mL de CXCL12 no mesmo período, também aumentou a produção de CCL3 e CXCL2, mas estes níveis foram menores do que 100 ng/mL (Fig. 2 e 3).

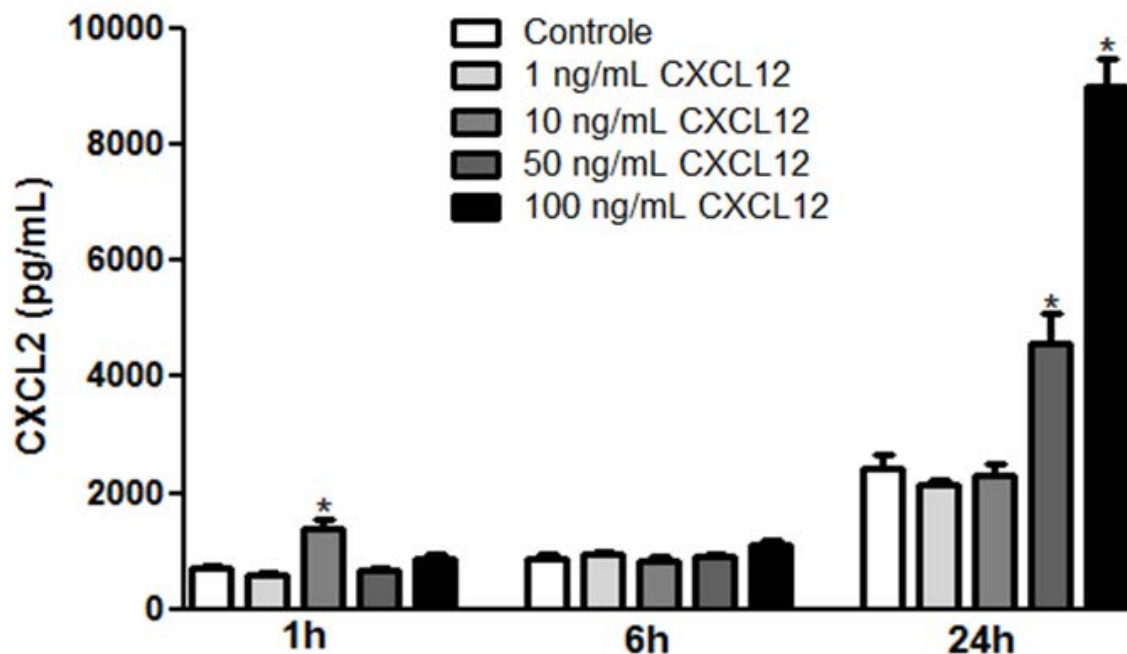
Em relação à produção de LTB4 e LTC4, CXCL12 foi capaz de estimular fibroblastos pulmonares a produzir esses mediadores lipídicos, 24 h após a

estimulação (Fig. 4 e 5). Em 1 e 6 horas a produção LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub> não foi significativamente diferente em comparação ao grupo controle (Fig. 4 e 5).

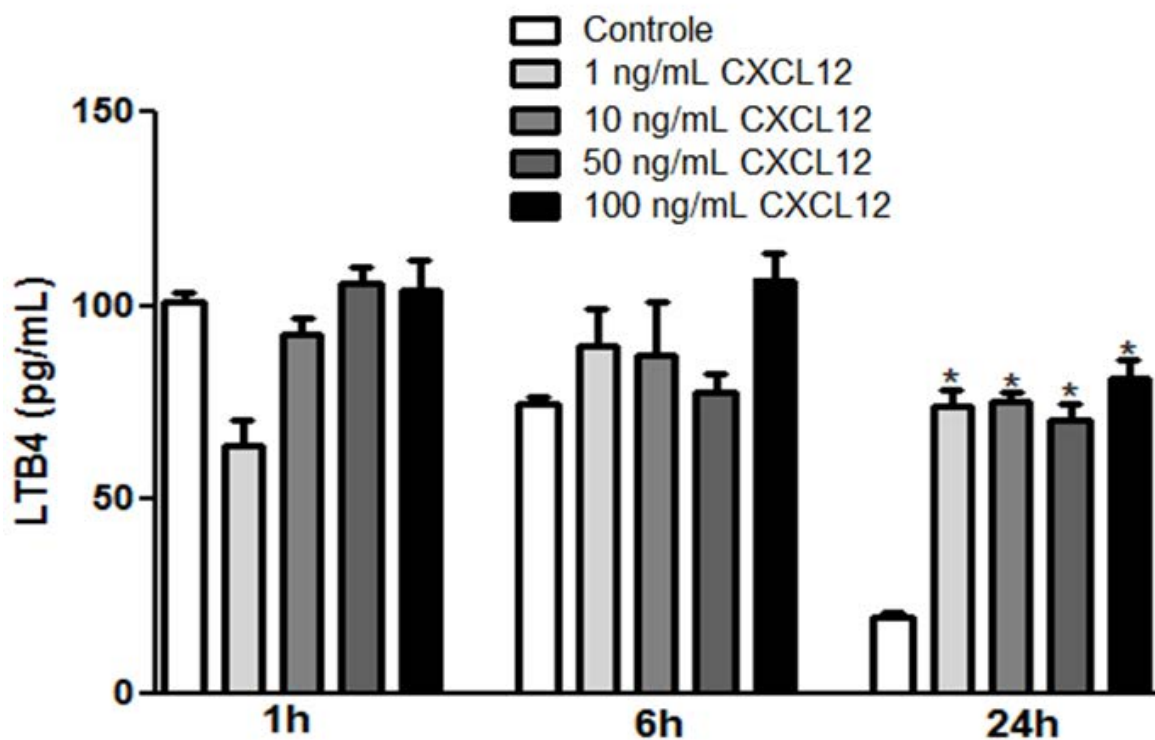
Todos os dados foram avaliados em comparação com grupo de controle.



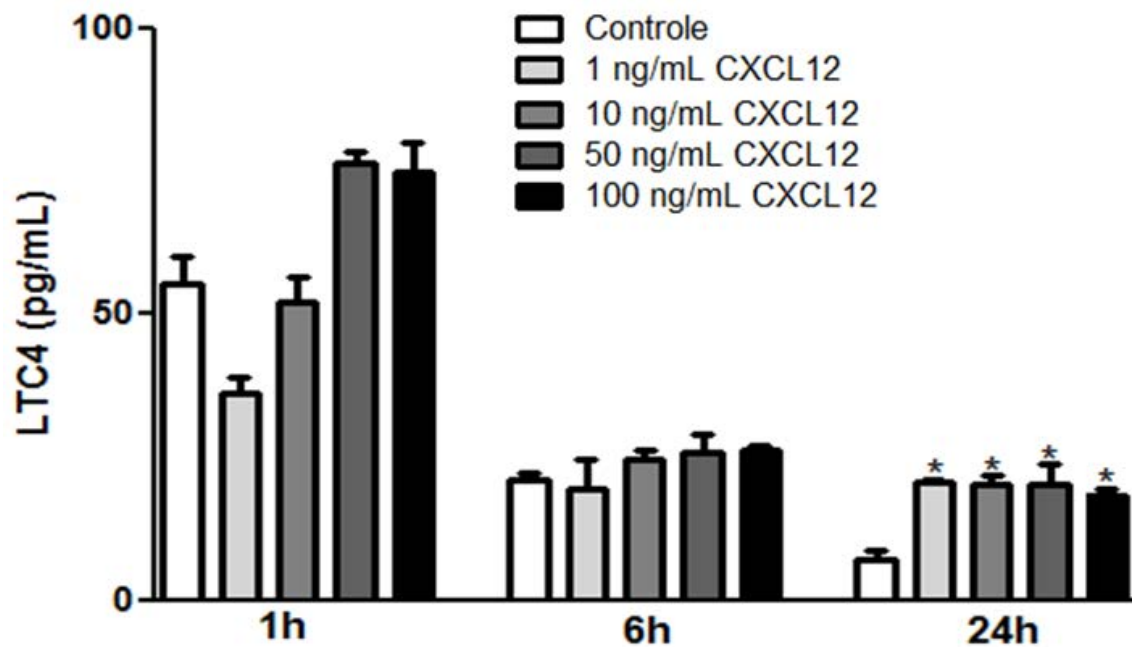
**Fig. 2. CXCL12 induz a produção de CCL3 em fibroblastos pulmonares.** Produção de CCL3 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12 (1, 10, 50 e 100 mg/mL) avaliados 1, 6 e 24 horas após o estímulo. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes, com resultados semelhantes obtidos em cada momento (ANOVA com o teste de múltipla comparação de Bonferroni). \*  $p < 0,05$  comparados com o controle não tratado.



**Fig. 3. CXCL12 induz a produção de CXCL2 em fibroblastos pulmonares.** Produção de CXCL2 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12 (1, 10, 50 e 100 mg/mL) avaliados 1, 6 e 24 horas após o estímulo. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes, com resultados semelhantes obtidos em cada momento (ANOVA com o teste de múltipla comparação de Bonferroni). \*  $p < 0,05$  comparados com o controle não tratado.



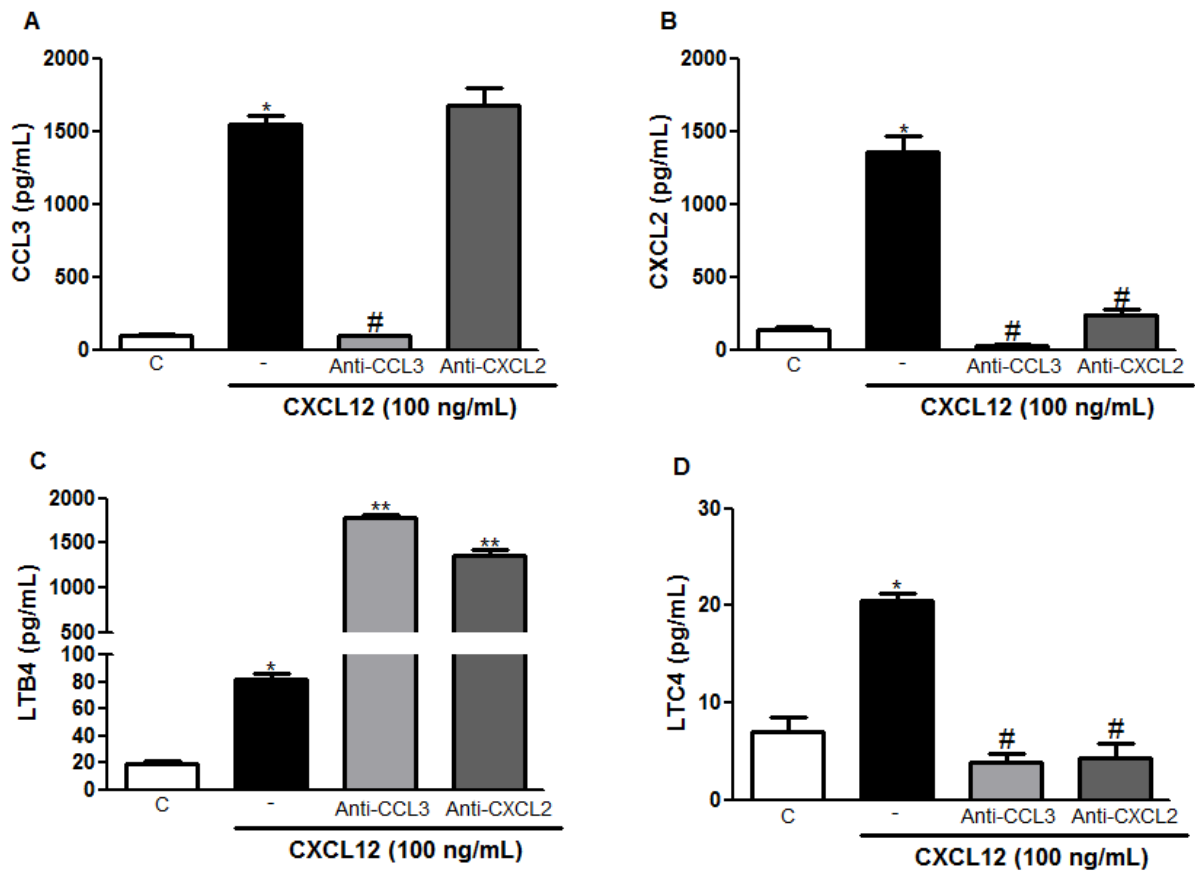
**Fig. 4. CXCL12 induz a produção de LTB4 em fibroblastos pulmonares.** Produção de LTB4 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12 (1, 10, 50 e 100 mg/mL) avaliados 1, 6 e 24 horas após o estímulo. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes, com resultados semelhantes obtidos em cada momento (ANOVA com o teste de múltipla comparação de Bonferroni). \*  $p < 0,05$  comparados com o controle não tratado.



**Fig. 5. CXCL12 induz a produção de LTC4 em fibroblastos pulmonares.** Produção de LTC4 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12 (1, 10, 50 e 100 mg/mL) avaliados 1, 6 e 24 horas após o estímulo. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes, com resultados semelhantes obtidos em cada momento (ANOVA com o teste de múltipla comparação de Bonferroni). \*  $p < 0,05$  comparados com o controle não tratado.

### **4.3 A produção CXCL2 e LTC4 é dependente da produção de CCL3 em fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12**

Os resultados deste estudo demonstraram que a produção de CXCL2 é dependente da produção de CCL3, uma vez que o anticorpo anti-CCL3 diminuiu a produção de CXCL2 após estimulação com CXCL12 (100 ng/mL) durante 24 horas. No entanto, a produção CCL3 não é dependente de CXCL2 já que o anticorpo anti-CXCL2 não foi capaz de inibir a produção de CCL3 após estimulação com CXCL12 (100 ng/mL) durante 24 horas. (Fig. 6). Em relação aos mediadores lipídicos, os anticorpos anti-CCL3 e anti-CXCL2 inibiram a produção de LTC4, no entanto aumentaram produção de LTB4 (Fig. 6), ou seja, a produção de LTC4 é dependente da produção de LTC4 após estimulação com CXCL12 (100 ng/mL) durante 24 horas.

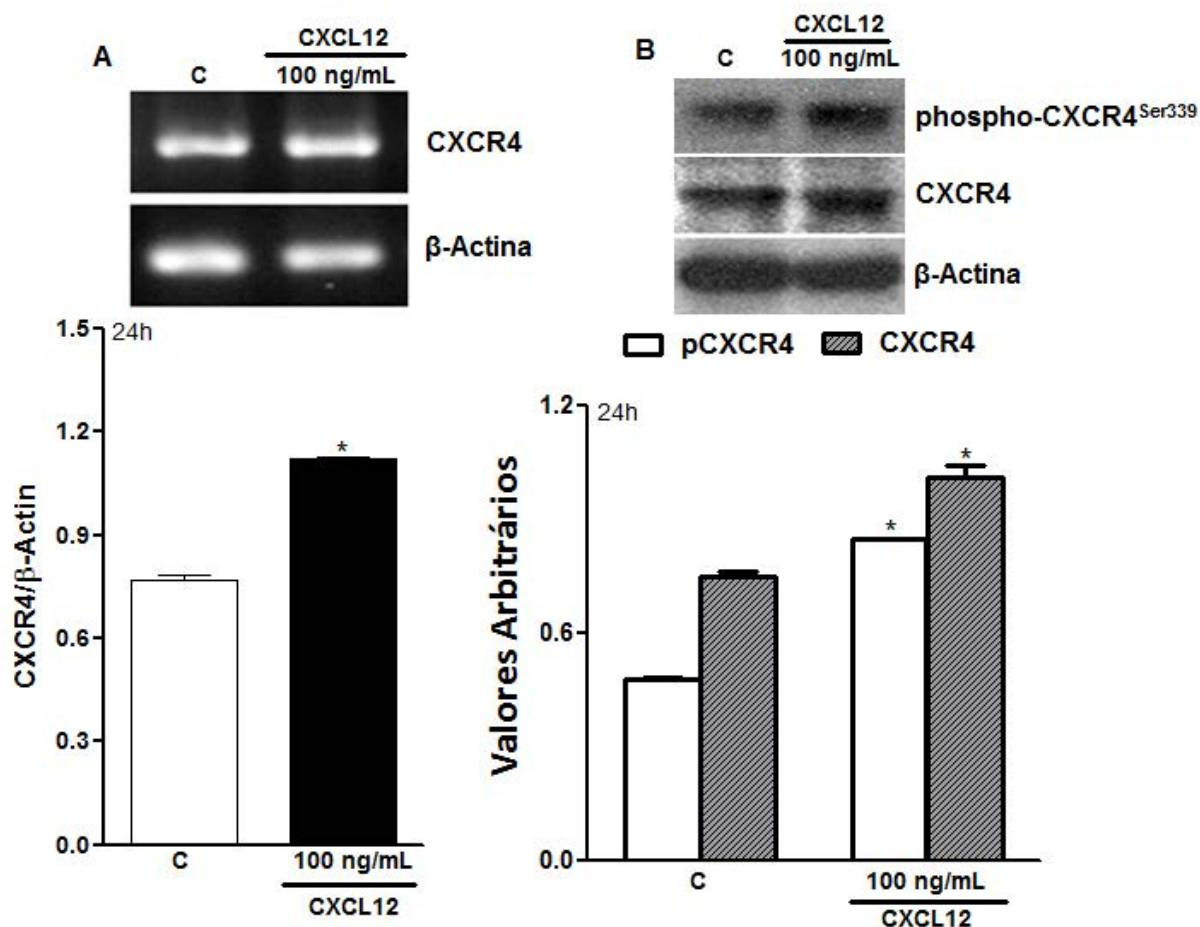


**Fig. 6. Envolvimento de CCL3 e CXCL2, na produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4.** Fibroblastos pulmonares foram pré-tratados com anti-CCL3 (1:200) e anti-CXCL2 (0,9  $\mu$ M) seguido de estimulação por CXCL12 (100 ng/mL) durante 24 horas e a produção de **(A)** CCL3, **(B)** CXCL2, **(C)** LTB4 e **(D)** LTC4 foi mensurada 24 horas após estimulação. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes, com resultados semelhantes obtidos em cada momento do tempo (grupo CXCL12 [-]) (ANOVA, com o teste de múltipla comparação de Bonferroni). \*  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle não tratado, \*\*  $p < 0,05$  e #  $p < 0,05$  comparados com grupo tratado CXCL12.

#### **4.4 Expressão de CXCR4 em fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12**

Fibroblastos pulmonares constitutivamente expressam CXCR4 com diferença significativa entre o grupo estimulado por CXCL12. CXCL12 significativamente induziu a expressão de RNA mensageiro de CXCR4 em fibroblastos pulmonares estimulados com 100 ng/mL de CXCL12 após 24 horas (Fig. 7A). Análises de Western blot também mostraram o aumento da expressão da proteína total e fosforilada de CXCR4 nos fibroblastos após a estimulação por CXCL12 (100 ng/mL) por 24 h (Fig. 7B).

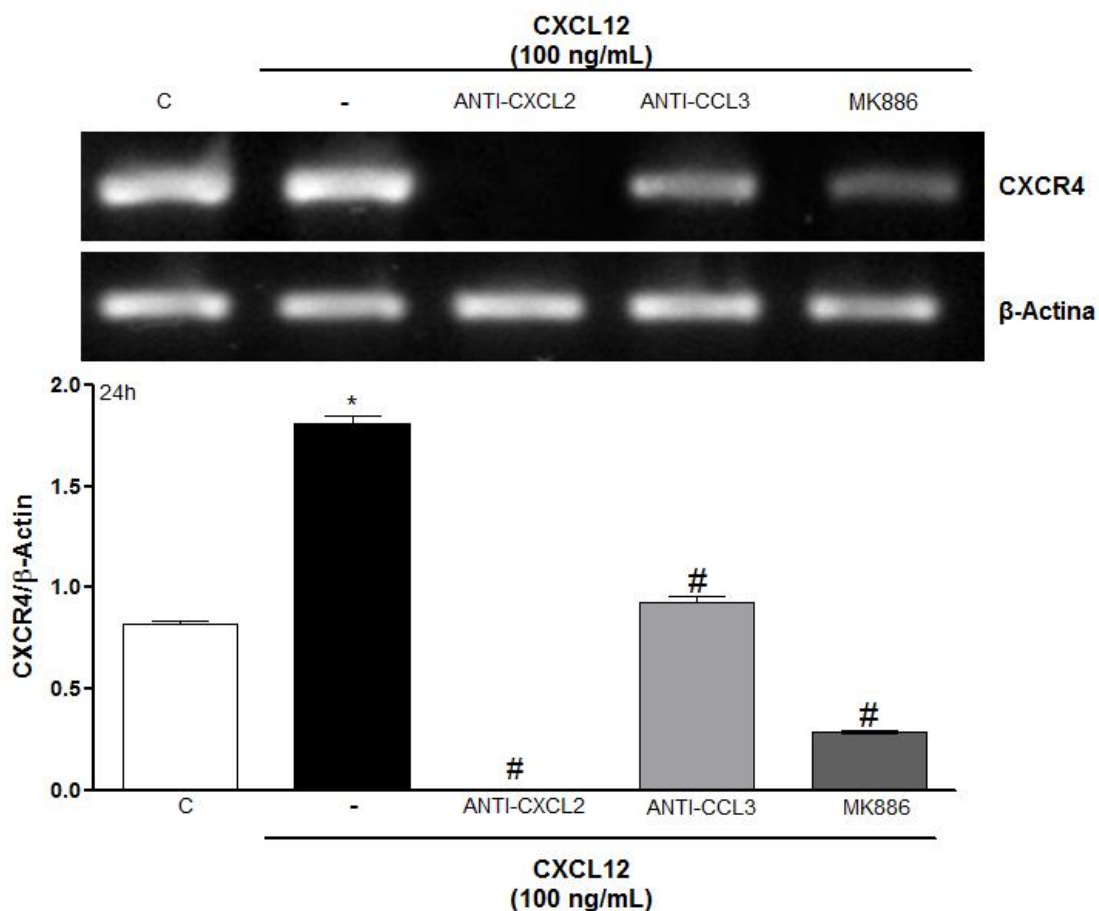




**Fig. 7. Expressão gênica e proteica de CXCR4 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12.** **A)** Expressão do RNA mensageiro de CXCR4, na presença ou ausência de CXCL12 (100 ng/mL), após 24h; CXCR4 (750 pb) e β-actina (350 pb), como controle interno. **(B)** expressão de proteína total e fosforilada de CXCR4 em fibroblastos pulmonares estimulados com ou sem CXCL12 (100 ng/mL) após 24 h. Os resultados representam a média ± EPM em três experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada vez. (ANOVA com o teste de múltipla comparação de Bonferroni). \*  $p < 0,05$  comparado com o controle não tratado.

#### **4.5 Anti-CXCL2, anti-CCL3 e MK886 inibiram a expressão de CXCR4 em fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12**

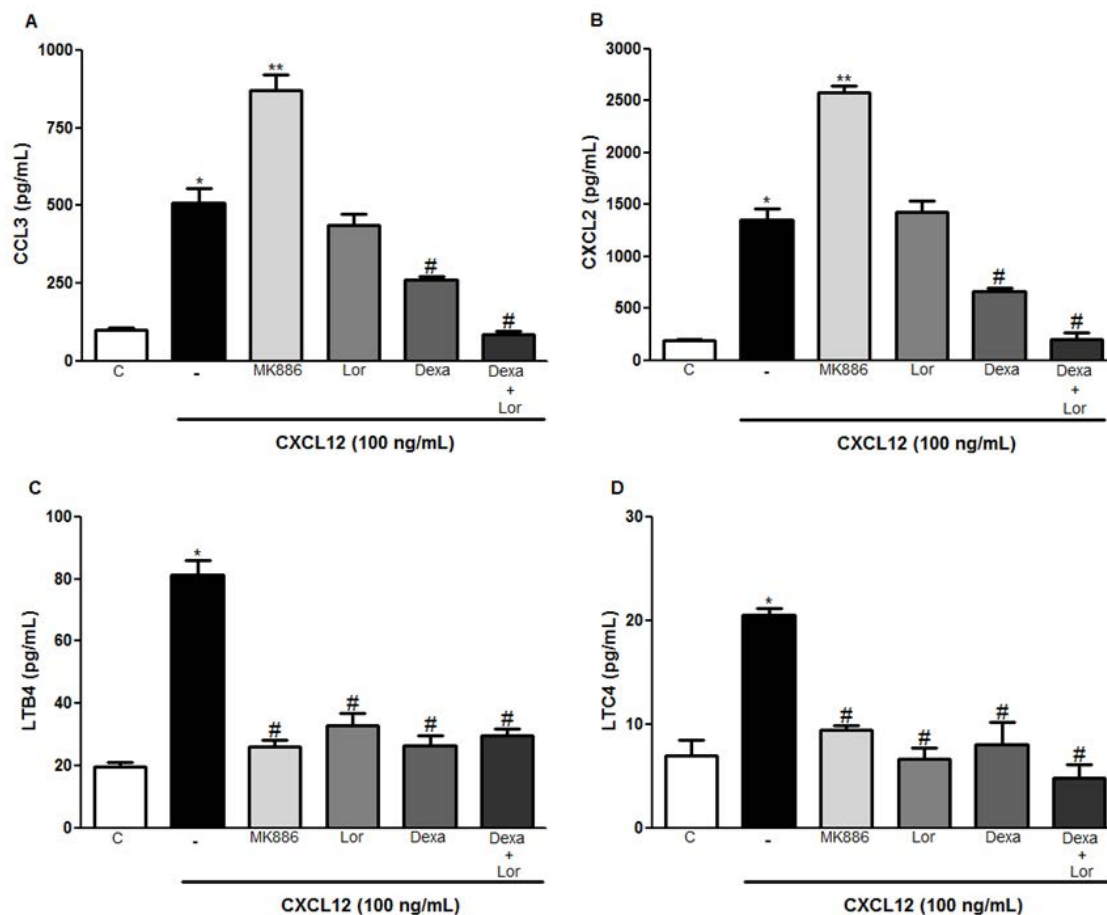
Para determinar se CXCL2, CCL3, LTC4 e LTB4 estão envolvidos na expressão gênica de CXCR4 por fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12, as células foram pré-tratadas com anticorpos anti-CXCL2 e anti-CCL3 e MK886 durante 30 minutos seguido de estimulação com CXCL12 (100 ng/mL) e avaliadas 24 h após. Observou-se que anti-CXCL2 inibiu a expressão constitutiva de CXCR4 em relação ao grupo controle e a expressão gênica induzida por CXCL12 de CXCR4 (Fig.8) e o pré-tratamento com anti-CCL3 e com MK886, foi capaz de reduzir a expressão gênica induzida por CXCL12 de CXCR4 (Fig. 8) em fibroblastos pulmonares após estimulação com CXCL12 (100 ng/mL) durante 24 horas.



**Fig. 8. Efeito do  $\alpha$ -CCL3,  $\alpha$ -CXCL2 e MK886 sobre a expressão gênica de CXCR4 em fibroblastos.** Fibroblastos pulmonares foram pré-tratados com  $\alpha$ -CCL3 (1:200),  $\alpha$ -CXCL2 (0,9  $\mu$ M) e MK886 (1  $\mu$ M) por 30 minutos seguido de estimulação por CXCL12 (100 ng/mL) durante 24 horas. Níveis de RNA mensageiro de CXCR4 foram mensurados por RT-PCR; CXCR4 (750 pb) e  $\beta$ -actina (350bp) como gene interno. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM em três experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada vez. (ANOVA com o teste de múltipla comparação de Bonferroni). \*  $p < 0,05$  comparado com o controle não tratado e #  $p < 0,05$  comparados com grupo tratado CXCL12.

#### **4.6 Efeitos farmacológicos dos inibidores MK886, dexametasona e/ou loratadina sobre a indução da produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 em fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12**

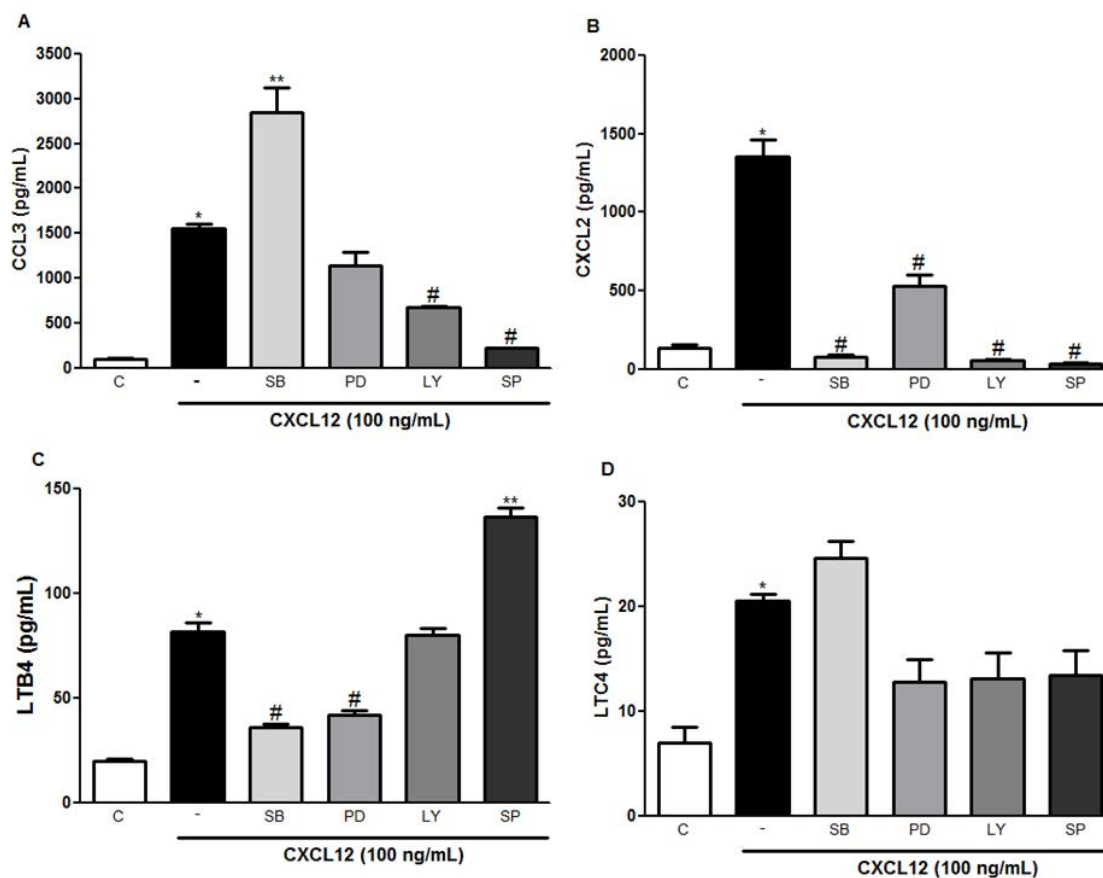
Para examinar o efeito do inibidor da 5-LO, do anti-histamínico antagonista do receptor H1 e do glicocorticóide dexametasona sobre a produção de CCL3, CXCL2, LTC4 e LTB4 por fibroblastos pulmonares estimulados com CXCL12, as células foram pré-tratadas com o MK886 (1  $\mu$ M), dexametasona (10  $\mu$ M) e/ou loratadina (1  $\mu$ M) durante 30 minutos seguido de estimulação com CXCL12 (100 ng/mL) durante 24 h. A produção de CCL3 e CXCL2 (Fig. 9A e B) aumentou após pré-tratamento com MK886. Por outro lado, loratadina não foi capaz de inibir e/ou diminuir essa produção quando comparado com o grupo controle sem tratamento. A associação entre dexametasona e loratadina diminuiu a indução de CCL3 e CXCL2 a níveis basais quando comparadas ao grupo controle e ao grupo estimulado com CXCL12 (Fig. 9A e B). A produção de LTB4 e LTC4 também diminuiu a níveis basais após o pré-tratamento com MK886, dexametasona, loratadina e associação dexametasona e loratadina em fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12 quando comparadas ao grupo controle e ao grupo estimulado com CXCL12 (Fig. 9C e D).



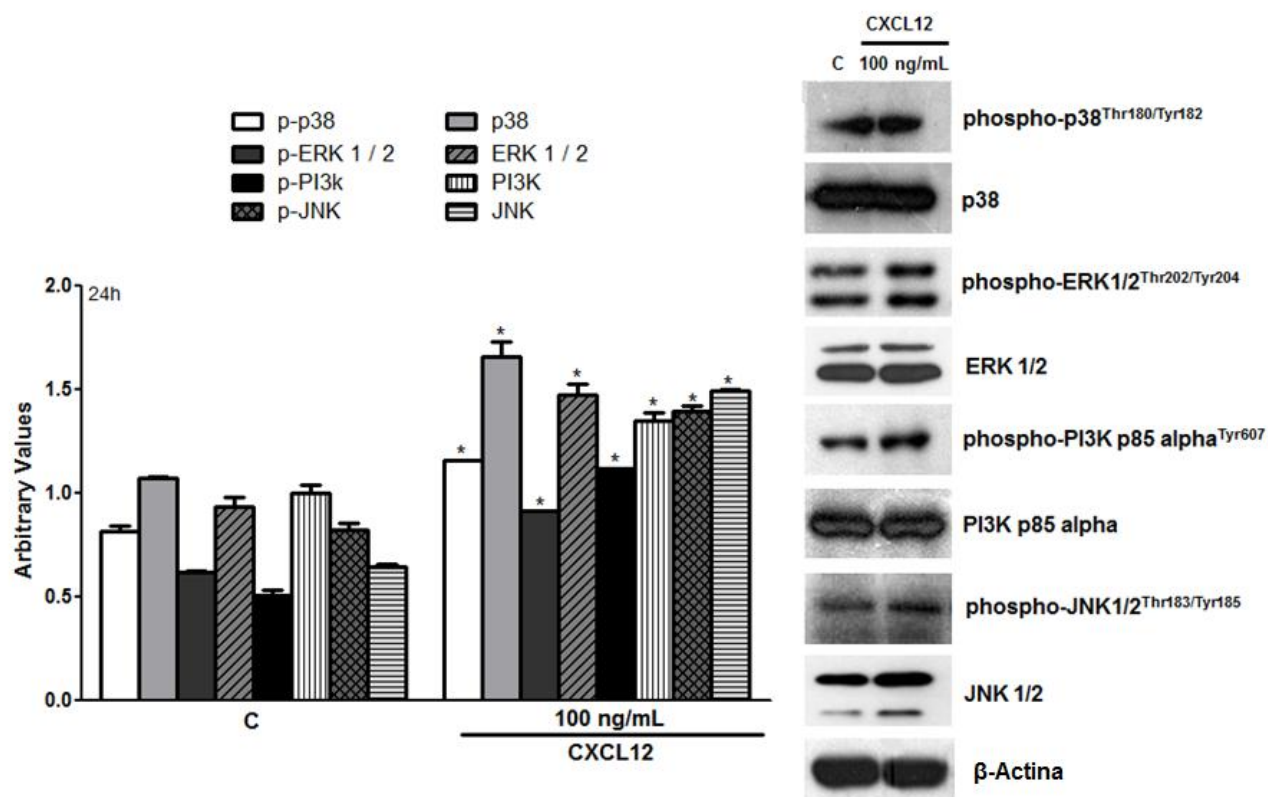
**Fig. 9. Efeito de inibidores farmacológicos sobre a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4.** Os fibroblastos pulmonares foram pré-tratados com MK886 (1uM), Dexametasona (Dexa, 10 uM) e/ou Loratadina (Lor, 1 uM) por 30 minutos seguido de estimulação por CXCL12 (100 ng/mL) durante 24 horas e a produção de **(A)** CCL3, **(B)** CXCL2, **(C)** LTB4 e **(D)** LTC4 foi avaliada por ELISA. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM três experiências independentes, com resultados semelhantes obtidos em cada momento do tempo (grupo CXCL12 [-]) (ANOVA, com o teste de múltipla comparação de Bonferroni). \*  $P < 0,05$  comparado com o grupo controle não tratado, \*\*  $p < 0,05$  e #  $p < 0,05$  comparados com grupo tratado CXCL12.

#### **4.7 Inibidores de vias de sinalização sobre a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4, em fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12.**

Para determinar se as vias p38, MEK1/2, PI-3K e JNK estão envolvidas na produção de CCL3, CXCL2, LTB4, LTC4, os fibroblastos pulmonares foram pré-incubados com o SB 202190 (SB, 10 mM), PD 98059 (DP 30 uM), LY 294002 (LY, 10 uM) e SP 600125 (SP, 3 mM) durante 30 minutos seguido de estimulação por CXCL12 (100 ng/mL) durante 24 horas. Como mostra a Fig. 10A, LY e SP inibiram significativamente a produção proteica de CCL3 induzida por CXCL12, enquanto SB aumentou essa produção. PD não causou efeito sobre a produção de CCL3. A produção proteica induzida por CXCL12 de CXCL2 foi diminuída por SB, PD, LY e SP (Fig. 10B). Na Fig. 10C, tanto SB e PD diminuíram a produção de LTB4 induzida por CXCL12, enquanto SP aumentou a indução e LY não causou efeito sobre a produção de LTB4. A produção de LTC4 induzida por CXCL12 não foi inibida e/ou diminuída por nenhum dos inibidores das vias de sinalização (Fig. 10D). Em seguida, utilizamos as análises de Western blot para confirmar o aumento da regulação do CXCR4 e a ativação de proteínas envolvidas na via de transdução de sinal mediada por este receptor. A estimulação das células com CXCL12 (100 ng/mL) foi acompanhada por uma indução da expressão proteica total e da fosforilação das vias p38, ERK1 / 2, PI-3K e JNK 1/2 (Fig. 11).



**Fig. 10. p38, MEK 1/2, PI-3K e JNK estão envolvidas na indução proteica de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4.** Fibroblastos pulmonares foram pré-incubados com o SB (10 uM), PD (30 uM), LY (10 uM) e SP (3µM) durante 30 minutos seguido da estimulação por CXCL12 (100 ng/mL) e a produção de **(A)** CCL3, **(B)** CXCL2, **(C)** LTB4 e **(D)** LTC4 foi avaliada 24 horas após. Os resultados representam a média ± EPM de três experiências independentes, com resultados semelhantes obtidos em cada momento do tempo (grupo CXCL12 [-]) (ANOVA, com o teste de múltipla comparação de Bonferroni). \* P<0,05 comparado com o grupo controle não tratado, \*\* p<0,05 e # p<0,05 comparados com grupo tratado CXCL12.



**Fig. 11. Efeito de CXCL12 sobre a expressão total e a fosforilação das vias p38, MEK1/ 2, PI-3K e JNK.** Fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12 (100 ng/mL) foram coletados e a expressão total e fosforilação das proteínas foram determinadas por Western blot 24 h após.  $\beta$ -actina foi usada como controle interno. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM em três experimentos independentes, com resultados similares obtidos em cada vez. (ANOVA com o teste de múltipla comparação de Bonferroni). \*  $p < 0,05$  comparado com o controle não tratado.



***DISCUSSÃO***

## 5. Discussão

No presente estudo mostramos que fibroblastos pulmonares expressam CXCR4 e que CXCL12 é capaz de induzir a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4. Identificamos que as vias sinalização intracelular PI-3K e JNK estão envolvidas na produção CCL3; p38, MEK1 / 2, PI-3K e JNK estão envolvidas na produção de CXCL2 e as vias p38 e MEK1/2 estão envolvidas na produção de LTB4 por meio da ativação do eixo CXCL12/CXCR4 em fibroblastos pulmonares

A morfologia dos fibroblastos pulmonares foi observada por análise citológica. Os fibroblastos pulmonares apresentaram-se como células alongadas com citoplasma ramificado e núcleo oval; características similares observadas na descrição convencional fibroblastóide (82, 83). A microscopia por imunofluorescência confirmou as características fenotípicas e a pureza das culturas dos fibroblastos pulmonares; revelando presença de células marcadas para anticorpos anti-FAP- $\alpha$  e anti- $\alpha$ -SMA e ausência de células marcadas para anticorpo anti-citoqueratina, excluindo, assim, a contaminação com células epiteliais (83).

Nos experimentos seguintes examinamos o papel do eixo CXCL12/CXCR4 na ativação de fibroblastos pulmonares *in vitro* e o seu envolvimento na indução de mediadores pró-inflamatórios que participam do processo inflamatório alérgico. Observamos que fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12 induzem a produção proteica de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4.

A quimiocina CCL3 é um importante fator quimiotático e induz o recrutamento celular durante a resposta alérgica das vias aéreas (43, 84). Há

evidências de que CCL3 desempenha um papel importante nas redes de citocinas que regulam as respostas inflamatórias e imunes do pulmão, e pode contribuir para a patogênese da doença pulmonar (41). Estudos com fibroblastos gengivais mostraram que a produção de CCL3 pode ser detectada nestas células após o desafio com lipopolissacarídeo (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* em 1, 6 e 24 horas (85), e que basófilos humanos estimulados por anticorpo anti-IgE produzem CCL3 gradualmente durante 24 horas (86). No presente estudo, a produção de CCL3 já foi observada durante a primeira hora, com 1 e 10 ng/mL de CXCL12. Após 6 horas, a produção de CCL3 diminuiu, embora a concentração de 10 ng/mL de CXCL12 continuou a produzir esta CC quimiocina. Por outro lado, após 24 horas de estímulo, o aumento da produção de CCL3 foi observado de maneira dose-dependente, demonstrando que CXCL12 pode induzir a síntese de novo dessa proteína por meio da liberação de um segundo mediador. A produção de CCL3 nos momentos iniciais pós-estimulação sugere uma possível característica da resposta inflamatória aguda. Após 24 horas a produção de CCL3 pode estar envolvida em um padrão de resposta crônica e pode estar relacionada com um mecanismo de compensação para a produção de outras citocinas e/ou quimiocinas.

A quimiocina CXCL2 é considerada um fator quimiotático potente de neutrófilos e desempenha um papel importante na alergia e na asma, tanto ao nível do recrutamento de células pulmonares bem como no edema pulmonar e na broncoconstrição (41, 47, 87). Estudos recentes relataram que fibroblastos cardíacos humanos e linhagens celulares de fibroblastos humanos expressam e produzem CXCL2 (87, 88). A produção de CXCL2 foi significativamente induzida em células mesangiais pela estimulação com IL-17A/IL-17F de

maneira dose-dependente e esse aumento da produção foi significativo no período de 24 h (89). Em nossos estudos a produção de CXCL2 aumentou de maneira dose-dependente em fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12, e essa produção foi substancialmente maior no período de 24 h após o estímulo. A produção de CXCL2 também foi observada no período de 1 h após o estímulo por CXCL12 10 ng/mL; no entanto em 6 h ocorreu uma diminuição dessa produção. Possivelmente, CXCL12 induz a liberação de CXCL2 armazenado em grânulos e que essa liberação ocorreu primariamente 1h pós-estímulo e após 24 h ocorreu uma nova produção. Sugerimos, então que estas CC e CXC quimiocinas contribuem para a resposta inflamatória pulmonar crônica.

Os LTs formam uma família de mediadores lipídicos inflamatórios de importância central para a patogênese da asma e são capazes de induzir o broncoespasmo, o edema das vias aéreas, a secreção de muco, a infiltração de eosinófilos e a remodelação (90). Estudos anteriores demonstraram que LTB4 e LTC4 são secretados por fibroblastos de pulmões humanos (91, 92) e por fibroblastos da aorta de ratos (93). Neste estudo observamos que a produção de LTB4 e LTC4 ocorreu 24 h após a estimulação por CXCL12, sugerindo assim, que estes mediadores lipídicos podem estar envolvidos na persistência da resposta inflamatória.

Para investigarmos se a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 é funcionalmente dependente da produção de CCL3 e CXCL2, os fibroblastos pulmonares foram pré-tratados com os anticorpos anti-CCL3 e anti-CXCL2. Nossos achados demonstram que a produção de CCL3 não é dependente de CXCL2, pois o anticorpo anti-CXCL2 não foi capaz de inibir sua produção, no

entanto a produção de CCL3 é dependente de sua própria produção. Por outro lado, a produção de CXCL2 é dependente da produção de CCL3 e CXCL2, visto que os anticorpos anti-CCL3 e anti-CXCL2 inibiram sua produção. Estudos anteriores demonstraram que o anticorpo anti-CCL3 foi capaz de inibir a produção de CXCL2, relacionando a ação de CCL3 no recrutamento de polimorfonucleares durante a ceratite induzida pela *Pseudomonas aeruginosa* em ratos (94). Ramos et al. 2006 (95), mostraram que a migração de neutrófilos induzida pela administração de CXCL2 foi inibida por anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , anti-CCL3 ou MK886, sugerindo um mecanismo em cascata representado por CXCL2, CCL3, TNF- $\alpha$  e LTB4 responsável por induzir uma resposta inflamatória imune. Em relação aos mediadores lipídicos, a produção de LTB4 foi aumentada na presença dos anticorpos anti-CCL3 e anti-CXCL2. Pela primeira vez, nossos estudos relataram que a produção de LTB4 pode ser parcialmente regulada pela produção de CXCL2 e CCL3, pois, quando ocorreu o pré-tratamento com os anticorpos direcionados para essas quimiocinas houve um aumento na produção de LTB4. Além disso, sugerimos um mecanismo indireto envolvido na produção de LTB4 induzida por CXCL12 em fibroblastos pulmonares a partir da indução de CCL3 e CXCL2. A produção de LTC4 foi diminuída pelos anticorpos anti-CCL3 e anti-CXCL2; ou seja, a produção de LTC4 é dependente da produção de CCL3 e CXCL2. Oliveira et al. (2002) (96) sugeriram que CCL3 induz significativa liberação de LTC4 em eosinófilos murino. No entanto, este é o primeiro trabalho a demonstrar que CCL3 e CXCL2 estão inter-relacionados com a produção de LTC4 após estimulação dos fibroblastos pulmonares por CXCL12; sugerimos então a

cascata da produção de quimiocinas e mediadores lipídicos, induzida por CXCL12: CCL3, CXCL2 e LTC4.

Nos experimentos seguintes avaliamos a expressão de CXCR4 em fibroblastos pulmonares por RT-PCR e Western blot. Observamos que os fibroblastos pulmonares expressam constitutivamente o RNA mensageiro de CXCR4 e que a estimulação por CXCL12 induz a expressão gênica de CXCR4. O mesmo resultado foi relatado por Chen et al. (2011) (97), em fibroblastos sinoviais humanos. Este é o primeiro estudo que mostra a expressão gênica de CXCR4 em fibroblastos pulmonares. Análises de Western blot mostraram que CXCL12 aumenta a expressão da proteína CXCR4 e a fosforilação induzida pela S339 de CXCR4, após 24 horas de estimulação. Um estudo recente (98) mostrou que CXCL12 induziu a fosforilação de S338/339 em células HEK293. Por conseguinte, este é o primeiro estudo a relatar a expressão da proteína e a fosforilação de CXCR4 em fibroblastos pulmonares estimulados com CXCL12 e a confirmar a participação do eixo CXCL12/CXCR4 na indução de CCL3, CXCL2, LTC4 e LTB4 mediada por CXCL12.

A via CXCL12/CXCR4 desempenha um papel fundamental no recrutamento de leucócitos para os pulmões (32, 35), na angiogênese (99) e na indução da inflamação das vias aéreas e hiper-reatividade (35). Assim, investigamos o possível envolvimento de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 na ativação da via CXCL12/CXCR4 em fibroblastos pulmonares. Para isso os fibroblastos pulmonares estimulados com CXCL12 foram pré-tratados com anticorpos anti-CCL3, anti-CXCL2 ou MK886 e a expressão de RNA mensageiro de CXCR4 foi avaliada. O pré-tratamento com estes inibidores diminuiu a expressão gênica de CXCR4 em fibroblastos pulmonares, o que

indica o envolvimento da produção de CCL3, CXCL2 e mediadores lipídicos na ativação da via CXCL12/CXCR4.

Na seguinte série de experimentos avaliamos os efeitos dos inibidores farmacológicos MK886, dexametasona e/ou loratadina sobre a produção induzida por CXCL12 de CCL3, CXCL2, LTB<sub>4</sub>, e LTC<sub>4</sub> por fibroblastos pulmonares. Os produtos da 5-lipoxigenase estão envolvidos indiretamente na produção de CCL3 e CXCL2, uma vez que o pré-tratamento com o inibidor da 5-LO foi capaz de aumentar a produção de tais quimiocinas após a estimulação dos fibroblastos por CXCL12. Por outro lado, a produção de LTC<sub>4</sub> e LTB<sub>4</sub> foi diminuída por MK886, o qual é um potente inibidor da síntese de leucotrienos. Em um recente estudo, Xu e colaboradores (2010) (100) mostraram que MK886 inibiu a produção de LTB<sub>4</sub> em fibroblastos sinoviais da artrite reumatoide estimulados por LPS, ionomicina e tapsogargin. Em 2001, Oliveira e colaboradores (101) mostraram que o tratamento com MK886 diminuiu significativamente a produção de LTC<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub> do lavado broncoalveolar, indicando que os leucotrienos desempenham um papel fundamental na resposta de hiper-reatividade brônquica das vias aéreas induzida pela citocina Fator de células-tronco (*Stem Cell Factor* - SCF). No entanto, sugerimos que a 5-LO está envolvida na ativação de fibroblastos pulmonares para a produção das proteínas CCL3 e CXCL2 induzida por CXCL12 e por outras citocinas e/ou quimionas, uma vez que a dexametasona também foi capaz de diminuir a produção de CCL3 e CXCL2. A dexametasona é um potente agente anti-inflamatório conhecido em atenuar a infiltração celular induzida por citocinas ou quimiocinas (102, 103). Estudos demonstraram que os glicocorticoides são capazes de suprimir níveis de CCL3 e CXCL2 em vários tipos celulares, tais

como monócitos, macrófagos alveolares, leucócitos e mastócitos (103-107), diminuindo assim, o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para os locais inflamados (104, 107). Em nossos estudos a dexametasona também foi capaz de diminuir a produção de LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub> induzida por CXCL12 em fibroblastos pulmonares. A terapia com corticosteroides pode levar a uma supressão da biossíntese de eicosanoides (108). Em macrófagos alveolares de pacientes com asma grave estimulados com LPS, o uso de dexametasona suprimiu níveis de LTB<sub>4</sub> (108). Em eosinófilos provenientes de pacientes asmáticos o tratamento com prednisona inibiu a liberação de LTC<sub>4</sub> (109). Em resumo, demonstramos que a dexametasona reduziu a produção de mediadores pró-inflamatórios, podendo diminuir o recrutamento celular para o local da inflamação.

Nosso próximo passo foi investigar se a produção de CCL3, CXCL2, LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub> seria mediada pela liberação de histamina. Embora, a histamina seja um importante mediador da resposta alérgica (110), verificamos que a produção de CCL3 e CXCL2 não foi dependente da histamina, uma vez que o pré-tratamento com a loratadina não provocou alterações na produção dessas CC e CXC quimiocinas. Por outro lado, a produção de LTC<sub>4</sub> e LTB<sub>4</sub> foi inibida pela loratadina. Lewis e colaboradores 2004 (111) relataram uma série de compostos à base de loratadina, que exibem atividade antagonista do receptor H<sub>1</sub> da histamina bem como inibidora da 5-LO. Além disso, a loratadina foi capaz de reduzir a reação inflamatória por um efeito direto sobre a produção LTB<sub>4</sub> por neutrófilos (112). Tradicionalmente, os anti-histamínicos H<sub>1</sub> têm sido considerados ineficazes no tratamento da asma, a menos que administrados em doses elevadas (67). Há evidências de que a associação entre anti-



histamínicos e glicocorticóides melhora significativamente a eficácia terapêutica da asma (113), reduz a necessidade de corticosteroides inalados em pacientes com asma brônquica crônica e, conseqüentemente diminui a perda da função pulmonar (114). Portanto, avaliamos a associação de dexametasona e loratadina sobre a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 em fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12. A associação foi capaz de inibir a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 induzida por CXCL12 mais efetivamente do que o uso da loratadina sozinha.

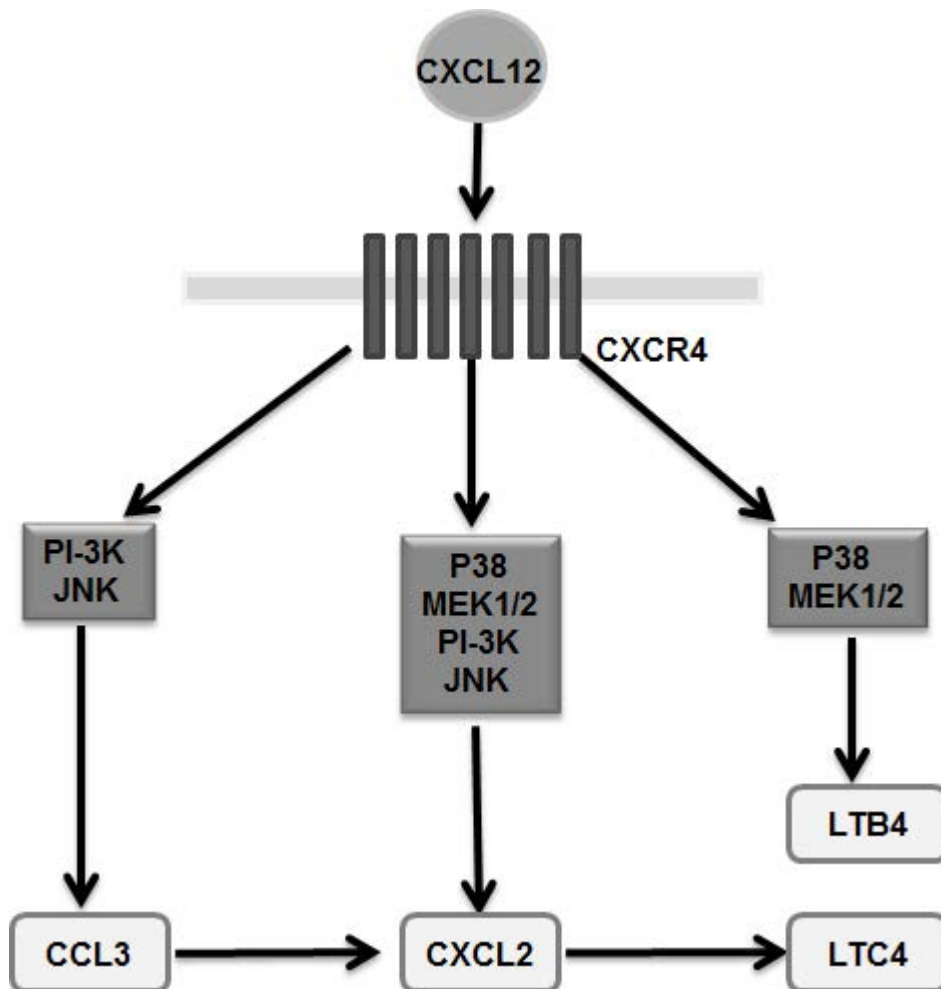
CXCL12 é uma quimiocina pleiotrópica capaz de induzir várias cascatas de transduções de sinais e funções através de interações com CXCR4 ou CXCR7. Recentemente, CXCR7 foi identificado e sugerido como mediador de várias funções já conhecidas semelhantes as do receptor CXCR4. Futuros estudos serão desenvolvidos para saber se a interação entre CXCR7 e CXCR4 está envolvida nos processos de produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 em fibroblastos pulmonares estimulados por CXCL12.

A associação CXCL12/CXCR4 ativa múltiplas vias de sinalização incluindo, JAK 2 e JAK 3 quinase, MEK1/2 e PI-3K (26, 36, 52). Estudos prévios demonstram que CXCL12 aumenta a atividade de p38 na apoptose neuronal induzida (115) e a via JNK é fortemente ativada na adesão celular mediada por CXCR4 (116). Consistente com estes resultados, nós identificamos que as vias de sinalização intracelular p38, MEK1/2, PI-3K e JNK desempenham papel na produção de CCL3, CXCL2 e LTB4 via ativação de CXCL12/CXCR4 em fibroblastos pulmonares.

Nossos resultados indicam que a produção de CCL3 induzida por CXCL12 foi aumentada por SB e inibida por LY e SP, e que na presença de PD

essa produção não sofreu alteração, ou seja, a via p38, mas não as vias PI-3K e JNK, está envolvida diretamente na produção de CCL3 induzida por CXCL12. A via MEK1/2 desempenha um papel crítico nessa produção induzida pela ativação do eixo CXCL12/CXCR4 em fibroblastos pulmonares. A produção de CXCL2 estimulada por CXCL12 foi eficazmente diminuída pelos inibidores das vias p38, MEK1/2, PI-3K e JNK, isso indica que tais vias estão envolvidas diretamente na produção de CXCL2. Em relação aos mediadores lipídicos as vias p38 e MEK1/2, mas não a via PI-3K, estão envolvidas na produção de LTB4 e a via JNK esta indiretamente envolvida em sua produção. A produção de LTC4 a partir da ativação de CXCL12/CXCR4 não é dependente das vias de sinalização p38, MEK, PI-3K e JNK. Além disso, demonstramos diretamente a regulação das atividades de p38, ERK1/2, PI-3K e JNK por CXCL12. Esta quimiocina foi capaz de induzir a fosforilação destas vias de sinalização nos fibroblastos pulmonares, comprovando assim a ativação das vias de sinalização via CXCL12/CXCR4 para a produção das quimiocinas e mediadores lipídicos. Estudos mostraram que CXCL12 ativa PI3K/Akt e as vias MAPK através de CXCR4, regulando assim a sobrevivência celular, a proliferação, a quimiotaxia, a secreção de citocinas e a angiogênese (117, 118). Linhagens de células humanas de câncer da próstata mostraram que a ativação diferencial das vias MEK/ERK e PI3K/Akt pode resultar na secreção diferencial de IL-6, IL-8, TIMP-2 e VEGF (118), enquanto a ativação de PI-3K e de c-Jun induzida pela via CXCL12/CXCR4 tem sido associado com o aumento da produção de IL-6 em fibroblastos sinoviais humanos (97). Portanto, demonstramos, pela primeira vez, que CXCL12/CXCR4 induz a produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4; e que as vias de sinalização intracelular PI-3K e

JNK estão envolvidas na produção CCL3; p38, MEK1 / 2, PI-3K e JNK estão envolvidas na produção de CXCL2 e as vias p38 e MEK1/2 estão envolvidas na produção de LTB4 por meio da ativação do eixo CXCL12/CXCR4 em fibroblastos pulmonares (Fig. 12).



**Figura 12.** Diagrama esquemático das vias de sinalização envolvidas na produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 induzida por CXCL12 em fibroblastos pulmonares. CXCL12 induz a expressão de CXCR4 e promove o aumento da produção de CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 por fibroblastos pulmonares. As vias de sinalização intracelular PI-3K e JNK estão envolvidas na produção CCL3; p38, MEK1 / 2, PI-3K e JNK estão envolvidas na produção de CXCL2 e as vias p38 e MEK1/2 estão envolvidas na produção de LTB4 por meio da ativação do eixo CXCL12/CXCR4 em fibroblastos pulmonares. A produção de LTC4 está relacionada com a produção de CCL3 e CXCL2.

***CONCLUSÕES***

## **6. CONCLUSÕES**

O presente estudo explorou, pela primeira vez, o mecanismo pelo qual CXCL12/CXCR4 estimula fibroblastos pulmonares a produzir CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 por diferentes vias de transdução de sinal dependente do mediador inflamatório produzido.

Estas descobertas podem fornecer uma nova ferramenta farmacológica para o tratamento da asma brônquica.

## ***REFERÊNCIAS***

1. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *The European respiratory journal*. 2008;31(1):143-78. Epub 2008/01/02.
2. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2008;38(6):872-97. Epub 2008/05/24.
3. Manuyakorn W, Howarth PH, Holgate ST. Airway remodelling in asthma and novel therapy. *Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand*. 2013;31(1):3-10. Epub 2013/03/23.
4. Bergeron C, Boulet LP. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest*. 2006;129(4):1068-87. Epub 2006/04/13.
5. Knight D. Epithelium-fibroblast interactions in response to airway inflammation. *Immunology and cell biology*. 2001;79(2):160-4. Epub 2001/03/27.
6. Lewis CC, Chu HW, Westcott JY, Tucker A, Langmack EL, Sutherland ER, et al. Airway fibroblasts exhibit a synthetic phenotype in severe asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(3):534-40. Epub 2005/03/09.
7. Murphy DM, O'Byrne PM. Recent advances in the pathophysiology of asthma. *Chest*. 2010;137(6):1417-26. Epub 2010/06/09.
8. Naik SR, Wala SM. Inflammation, allergy and asthma, complex immune origin diseases: mechanisms and therapeutic agents. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*. 2013;7(1):62-95. Epub 2012/11/13.
9. Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature*. 1999;402(6760 Suppl):B18-23. Epub 1999/12/10.
10. Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature*. 1999;402(6760 Suppl):B24-30. Epub 1999/12/10.
11. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(3):183-92. Epub 2008/02/16.



12. Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological reviews*. 2011;242(1):31-50. Epub 2011/06/21.
13. Smit JJ, Lukacs NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *European journal of pharmacology*. 2006;533(1-3):277-88. Epub 2006/02/09.
14. Kay AB. The role of T lymphocytes in asthma. *Chemical immunology and allergy*. 2006;91:59-75. Epub 2005/12/16.
15. Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacological reviews*. 1998;50(4):515-96. Epub 1998/12/22.
16. Cobanoglu B, Toskala E, Ural A, Cingi C. Role of leukotriene antagonists and antihistamines in the treatment of allergic rhinitis. *Current allergy and asthma reports*. 2013;13(2):203-8. Epub 2013/02/08.
17. Di Gennaro A, Haeggstrom JZ. The leukotrienes: immune-modulating lipid mediators of disease. *Advances in immunology*. 2012;116:51-92. Epub 2012/10/16.
18. Rinaldo-Matthis A, Haeggstrom JZ. Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade. *Biochimie*. 2010;92(6):676-81. Epub 2010/01/26.
19. Via M, Tcheurekdjian H, Gonzalez Burchard E. Role of interactions in pharmacogenetic studies: leukotrienes in asthma. *Pharmacogenomics*. 2013;14(8):923-9. Epub 2013/06/12.
20. Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. 1987;237(4819):1171-6. Epub 1987/09/04.
21. Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *The New England journal of medicine*. 1990;323(10):645-55. Epub 1990/09/06.
22. Busse W, Kraft M. Cysteinyl leukotrienes in allergic inflammation: strategic target for therapy. *Chest*. 2005;127(4):1312-26. Epub 2005/04/12.
23. Lukacs NW, Oliveira SH, Hogaboam CM. Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort? *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(8):995-9. Epub 1999/10/19.

24. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nature immunology*. 2001;2(2):129-34. Epub 2001/03/29.
25. Oliveira SH, Lukacs NW. The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2003;36(11):1455-63. Epub 2003/10/25.
26. Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EG, et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur J Cancer*. 2013;49(1):219-30. Epub 2012/06/12.
27. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996;272(5263):872-7. Epub 1996/05/10.
28. Kruizinga RC, Bestebroer J, Berghuis P, de Haas CJ, Links TP, de Vries EG, et al. Role of chemokines and their receptors in cancer. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(29):3396-416. Epub 2009/10/29.
29. Loetscher P, Moser B, Baggiolini M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Advances in immunology*. 2000;74:127-80. Epub 1999/12/22.
30. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382(6592):635-8. Epub 1996/08/15.
31. Lukacs NW, Berlin A, Schols D, Skerlj RT, Bridger GJ. AMD3100, a CXCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. *The American journal of pathology*. 2002;160(4):1353-60. Epub 2002/04/12.
32. Negrete-Garcia MC, Velazquez JR, Popoca-Coyotl A, Montes-Vizuet AR, Juarez-Carvajal E, Teran LM. Chemokine (C-X-C motif) ligand 12/stromal cell-derived factor-1 is associated with leukocyte recruitment in asthma. *Chest*. 2010;138(1):100-6. Epub 2010/03/20.
33. Hoshino M, Aoike N, Takahashi M, Nakamura Y, Nakagawa T. Increased immunoreactivity of stromal cell-derived factor-1 and angiogenesis in asthma.

The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. 2003;21(5):804-9. Epub 2003/05/27.

34. Daubeuf F, Hachet-Haas M, Gizzi P, Gasparik V, Bonnet D, Utard V, et al. An antedrug of the CXCL12 neutraligand blocks experimental allergic asthma without systemic effect in mice. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(17):11865-76. Epub 2013/03/02.

35. Gonzalo JA, Lloyd CM, Peled A, Delaney T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. *J Immunol*. 2000;165(1):499-508. Epub 2000/06/22.

36. Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *Journal of molecular histology*. 2004;35(3):233-45. Epub 2004/09/02.

37. Ratajczak MZ, Majka M, Kucia M, Drukala J, Pietrzkowski Z, Peiper S, et al. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells*. 2003;21(3):363-71. Epub 2003/05/14.

38. Stumm RK, Rummel J, Junker V, Culmsee C, Pfeiffer M, Kriegstein J, et al. A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(14):5865-78. Epub 2002/07/18.

39. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393(6685):595-9. Epub 1998/06/20.

40. Tillie-Leblond I, Hammad H, Desurmont S, Pugin J, Wallaert B, Tonnel AB, et al. CC chemokines and interleukin-5 in bronchial lavage fluid from patients with status asthmaticus. Potential implication in eosinophil recruitment. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(2 Pt 1):586-92. Epub 2000/08/10.

41. Driscoll KE. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Experimental lung research*. 1994;20(6):473-90. Epub 1994/11/01.
42. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(10):1882-6. Epub 2004/06/19.
43. Lukacs NW, Standiford TJ, Chensue SW, Kunkel RG, Strieter RM, Kunkel SL. C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 1996;60(5):573-8. Epub 1996/11/01.
44. Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of asthma. *Annual review of physiology*. 2009;71:489-507. Epub 2009/07/07.
45. Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW, Kunkel SL. Activation and regulation of chemokines in allergic airway inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 1996;59(1):13-7. Epub 1996/01/01.
46. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine & growth factor reviews*. 2002;13(6):455-81. Epub 2002/10/29.
47. McKinley L, Kim J, Bolgos GL, Siddiqui J, Remick DG. CXC chemokines modulate IgE secretion and pulmonary inflammation in a model of allergic asthma. *Cytokine*. 2005;32(3-4):178-85. Epub 2005/11/18.
48. Nabe T, Hosokawa F, Matsuya K, Morishita T, Ikedo A, Fujii M, et al. Important role of neutrophils in the late asthmatic response in mice. *Life sciences*. 2011;88(25-26):1127-35. Epub 2011/05/14.
49. Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends in immunology*. 2001;22(4):199-204. Epub 2001/03/29.
50. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(5):392-401. Epub 2006/03/31.
51. Laurent GJ, Chambers RC, Hill MR, McAnulty RJ. Regulation of matrix turnover: fibroblasts, forces, factors and fibrosis. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 4):647-51. Epub 2007/07/20.
52. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, et al. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple

signal transduction pathways. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(36):23169-75. Epub 1998/08/29.

53. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature reviews Immunology*. 2001;1(2):108-16. Epub 2002/03/22.

54. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 1989;56(3):335-44. Epub 1989/02/10.

55. Burnstein KL, Cidlowski JA. Regulation of gene expression by glucocorticoids. *Annual review of physiology*. 1989;51:683-99. Epub 1989/01/01.

56. Lee SW, Tsou AP, Chan H, Thomas J, Petrie K, Eugui EM, et al. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(4):1204-8. Epub 1988/02/01.

57. Schleimer RP. Effects of glucocorticosteroids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. *The American review of respiratory disease*. 1990;141(2 Pt 2):S59-69. Epub 1990/02/01.

58. Tanabe J, Watanabe M, Mue S, Ohuchi K. Dexamethasone inhibits the production of macrophage inflammatory protein 2 in the leukocytes in rat allergic inflammation. *European journal of pharmacology*. 1995;284(3):257-63. Epub 1995/09/25.

59. Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids for asthma. *The New England journal of medicine*. 1995;332(13):868-75. Epub 1995/03/30.

60. Boschetto P, Rogers DF, Fabbri LM, Barnes PJ. Corticosteroid inhibition of airway microvascular leakage. *The American review of respiratory disease*. 1991;143(3):605-9. Epub 1991/03/01.

61. Shimura S, Sasaki T, Ikeda K, Yamauchi K, Sasaki H, Takishima T. Direct inhibitory action of glucocorticoid on glycoconjugate secretion from airway submucosal glands. *The American review of respiratory disease*. 1990;141(4 Pt 1):1044-9. Epub 1990/04/01.

62. Bryce PJ, Geha R, Oettgen HC. Desloratadine inhibits allergen-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness and alters T-cell responses in murine models of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;112(1):149-58. Epub 2003/07/09.

63. White MV. The role of histamine in allergic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1990;86(4 Pt 2):599-605. Epub 1990/10/01.
64. Holgate ST. Antihistamines in the treatment of asthma. *Clinical reviews in allergy*. 1994;12(1):65-78. Epub 1994/01/01.
65. Naclerio R. Clinical manifestations of the release of histamine and other inflammatory mediators. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1999;103(3 Pt 2):S382-5. Epub 1999/03/09.
66. Wang Y, Wang J, Lin Y, Si-Ma LF, Wang DH, Chen LG, et al. Synthesis and antihistamine evaluations of novel loratadine analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2011;21(15):4454-6. Epub 2011/07/08.
67. Simons FE. H1-Antihistamines: more relevant than ever in the treatment of allergic disorders. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;112(4 Suppl):S42-52. Epub 2003/10/08.
68. Van Ganse E, Kaufman L, Derde MP, Yernault JC, Delaunois L, Vincken W. Effects of antihistamines in adult asthma: a meta-analysis of clinical trials. *The European respiratory journal*. 1997;10(10):2216-24. Epub 1997/12/05.
69. Li C, Kim M, Choi JS. Effects of prednisolone on the pharmacokinetics of loratadine after oral and intravenous administration of loratadine in rats. *Archives of pharmacal research*. 2010;33(9):1395-400. Epub 2010/10/15.
70. Mastalerz L, Kania A. [Antileukotriene drugs in the treatment of obstructive lung diseases and rhinitis]. *Pneumonologia i alergologia polska*. 2010;78(1):74-8. Epub 2010/02/18. Leki przeciwleukotrienowe w leczeniu obturacyjnych chorób płuc i nieżyty nosa.
71. Barnes NC, Miller CJ. Effect of leukotriene receptor antagonist therapy on the risk of asthma exacerbations in patients with mild to moderate asthma: an integrated analysis of zafirlukast trials. *Thorax*. 2000;55(6):478-83. Epub 2000/05/19.
72. Diczpinigaitis PV, Dobkin JB, Reichel J. Antitussive effect of the leukotriene receptor antagonist zafirlukast in subjects with cough-variant asthma. *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma*. 2002;39(4):291-7. Epub 2002/07/04.
73. Noonan MJ, Chervinsky P, Brandon M, Zhang J, Kundu S, McBurney J, et al. Montelukast, a potent leukotriene receptor antagonist, causes dose-

- related improvements in chronic asthma. Montelukast Asthma Study Group. *The European respiratory journal*. 1998;11(6):1232-9. Epub 1998/07/10.
74. Elsner J, Petering H, Hochstetter R, Kimmig D, Wells TN, Kapp A, et al. The CC chemokine antagonist Met-RANTES inhibits eosinophil effector functions through the chemokine receptors CCR1 and CCR3. *European journal of immunology*. 1997;27(11):2892-8. Epub 1997/12/12.
75. Elsner J, Escher SE, Forssmann U. Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases. *Allergy*. 2004;59(12):1243-58. Epub 2004/10/28.
76. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Murakami K, Miyake Y, et al. CXCL12 and CXCR4 expression by human gingival fibroblasts in periodontal disease. *Clinical and experimental immunology*. 2005;141(3):467-74. Epub 2005/07/28.
77. Oliveira SH, Costa CH, Ferreira SH, Cunha FQ. Sephadex induces eosinophil migration to the rat and mouse peritoneal cavity: involvement of mast cells, LTB<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-8 and PAF. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2002;51(3):144-53. Epub 2002/05/15.
78. Temple DM, McCluskey M. Loratadine, an antihistamine, blocks antigen- and ionophore-induced leukotriene release from human lung in vitro. *Prostaglandins*. 1988;35(4):549-54. Epub 1988/04/01.
79. Cheung PF, Wong CK, Ip WK, Lam CW. IL-25 regulates the expression of adhesion molecules on eosinophils: mechanism of eosinophilia in allergic inflammation. *Allergy*. 2006;61(7):878-85. Epub 2006/06/24.
80. Klein JB, Rane MJ, Scherzer JA, Coxon PY, Kettritz R, Mathiesen JM, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Immunol*. 2000;164(8):4286-91. Epub 2001/02/07.
81. Oliveira SH, Santos VA. Studies on the expression of fibroblast growth factor-2 from odontoblast-like cells. *Journal of endodontics*. 2011;37(11):1520-4. Epub 2011/10/18.
82. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human

fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(20):12877-82. Epub 2002/09/26.

83. Flavell SJ, Hou TZ, Lax S, Filer AD, Salmon M, Buckley CD. Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. *British journal of pharmacology*. 2008;153 Suppl 1:S241-6. Epub 2007/10/30.

84. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England journal of medicine*. 1998;338(7):436-45. Epub 1998/02/12.

85. Morandini AC, Sipert CR, Gasparoto TH, Gregghi SL, Passanezi E, Rezende ML, et al. Differential production of macrophage inflammatory protein-1alpha, stromal-derived factor-1, and IL-6 by human cultured periodontal ligament and gingival fibroblasts challenged with lipopolysaccharide from *P. gingivalis*. *Journal of periodontology*. 2010;81(2):310-7. Epub 2010/02/16.

86. Li H, Sim TC, Grant JA, Alam R. The production of macrophage inflammatory protein-1 alpha by human basophils. *J Immunol*. 1996;157(3):1207-12. Epub 1996/08/01.

87. Lag M, Rodionov D, Ovrevik J, Bakke O, Schwarze PE, Refsnes M. Cadmium-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity: Expression and release of cytokines in fibroblasts, epithelial cells and macrophages. *Toxicology letters*. 2010;193(3):252-60. Epub 2010/01/29.

88. Turner NA, Das A, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2011;43(10):1450-8. Epub 2011/07/02.

89. Iyoda M, Shibata T, Kawaguchi M, Hizawa N, Yamaoka T, Kokubu F, et al. IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF-alpha and IL-1beta. *American journal of physiology Renal physiology*. 2010;298(3):F779-87. Epub 2010/01/01.

90. James AJ, Penrose JF, Cazaly AM, Holgate ST, Sampson AP. Human bronchial fibroblasts express the 5-lipoxygenase pathway. *Respiratory research*. 2006;7:102. Epub 2006/07/29.



91. Takamizawa A, Koyama S, Sato E, Masubuchi T, Kubo K, Sekiguchi M, et al. Bleomycin stimulates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *J Immunol.* 1999;162(10):6200-8. Epub 1999/05/07.
92. Koyama S, Sato E, Numanami H, Kubo K, Nagai S, Izumi T. Bradykinin stimulates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2000;22(1):75-84. Epub 1999/12/30.
93. Dong X, Ye X, Song N, Zhao J, Di B, Peng F, et al. Urotensin II promotes the production of LTC(4) in rat aortic adventitial fibroblasts through NF-kappaB-5-LO pathway by p38 MAPK and ERK activations. *Heart and vessels.* 2012. Epub 2012/10/12.
94. Xue ML, Thakur A, Cole N, Lloyd A, Stapleton F, Wakefield D, et al. A critical role for CCL2 and CCL3 chemokines in the regulation of polymorphonuclear neutrophils recruitment during corneal infection in mice. *Immunology and cell biology.* 2007;85(7):525-31. Epub 2007/06/21.
95. Ramos CD, Fernandes KS, Canetti C, Teixeira MM, Silva JS, Cunha FQ. Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MIP-2 inducing the sequential release of MIP-1alpha, TNF-alpha and LTB(4). *European journal of immunology.* 2006;36(8):2025-34. Epub 2006/07/21.
96. Oliveira SH, Lira S, Martinez AC, Wiekowski M, Sullivan L, Lukacs NW. Increased responsiveness of murine eosinophils to MIP-1beta (CCL4) and TCA-3 (CCL1) is mediated by their specific receptors, CCR5 and CCR8. *Journal of leukocyte biology.* 2002;71(6):1019-25. Epub 2002/06/07.
97. Chen HT, Tsou HK, Hsu CJ, Tsai CH, Kao CH, Fong YC, et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 promotes IL-6 production in human synovial fibroblasts. *Journal of cellular biochemistry.* 2011;112(4):1219-27. Epub 2011/02/12.
98. Mueller W, Schutz D, Nagel F, Schulz S, Stumm R. Hierarchical organization of multi-site phosphorylation at the CXCR4 C terminus. *PloS one.* 2013;8(5):e64975. Epub 2013/06/05.
99. Hoshino M, Morita S, Iwashita H, Sagiya Y, Nagi T, Nakanishi A, et al. Increased expression of the human Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel 1 (CaCC1) gene in the asthmatic airway. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2002;165(8):1132-6. Epub 2002/04/17.

100. Xu S, Lu H, Lin J, Chen Z, Jiang D. Regulation of TNFalpha and IL1beta in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by leukotriene B4. *Rheumatology international*. 2010;30(9):1183-9. Epub 2009/10/08.
101. Oliveira SH, Hogaboam CM, Berlin A, Lukacs NW. SCF-induced airway hyperreactivity is dependent on leukotriene production. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;280(6):L1242-9. Epub 2001/05/15.
102. Goulding NJ, Euzger HS, Butt SK, Perretti M. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 1998;47 Suppl 3:S158-65. Epub 1998/11/27.
103. Schleimer RP. An overview of glucocorticoid anti-inflammatory actions. *European journal of clinical pharmacology*. 1993;45 Suppl 1:S3-7; discussion S43-4. Epub 1993/01/01.
104. Berkman N, Jose PJ, Williams TJ, Schall TJ, Barnes PJ, Chung KF. Corticosteroid inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes and alveolar macrophages. *The American journal of physiology*. 1995;269(4 Pt 1):L443-52. Epub 1995/10/01.
105. John M, Lim S, Seybold J, Jose P, Robichaud A, O'Connor B, et al. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;157(1):256-62. Epub 1998/01/28.
106. Kato A, Chustz RT, Ogasawara T, Kulka M, Saito H, Schleimer RP, et al. Dexamethasone and FK506 inhibit expression of distinct subsets of chemokines in human mast cells. *J Immunol*. 2009;182(11):7233-43. Epub 2009/05/21.
107. Schramm R, Liu Q, Thorlacius H. Expression and function of MIP-2 are reduced by dexamethasone treatment in vivo. *British journal of pharmacology*. 2000;131(2):328-34. Epub 2000/09/19.
108. Bhavsar PK, Levy BD, Hew MJ, Pfeffer MA, Kazani S, Israel E, et al. Corticosteroid suppression of lipoxin A4 and leukotriene B4 from alveolar macrophages in severe asthma. *Respiratory research*. 2010;11:71. Epub 2010/06/10.

109. Shindo K, Hirai Y, Koide K, Sumitomo M, Fukumura M. In vivo effect of prednisolone on release of leukotriene C4 in eosinophils obtained from asthmatic patients. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;214(3):869-74. Epub 1995/09/25.
110. Gelfand EW. Role of histamine in the pathophysiology of asthma: immunomodulatory and anti-inflammatory activities of H1-receptor antagonists. *The American journal of medicine*. 2002;113 Suppl 9A:2S-7S. Epub 2003/01/09.
111. Lewis TA, Young MA, Arrington MP, Bayless L, Cai X, Collart P, et al. Cetirizine and loratadine-based antihistamines with 5-lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2004;14(22):5591-4. Epub 2004/10/16.
112. Amsellem C, Czarlewski W, Lagarde M, Pacheco Y. Inhibitory effect of loratadine on leukotriene B4 production by neutrophils either alone or during interaction with human airway epithelial cells. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 1998;11(4):245-52. Epub 1999/04/02.
113. Ekstrom T, Osterman K, Zetterstrom O. Lack of effect of loratadine on moderate to severe asthma. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 1995;75(3):287-9. Epub 1995/09/01.
114. Busse WW, Middleton E, Storms W, Dockhorn RJ, Chu TJ, Grossman J, et al. Corticosteroid-sparing effect of azelastine in the management of bronchial asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(1):122-7. Epub 1996/01/01.
115. Shepherd AJ, Loo L, Gupte RP, Mickle AD, Mohapatra DP. Distinct modifications in Kv2.1 channel via chemokine receptor CXCR4 regulate neuronal survival-death dynamics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(49):17725-39. Epub 2012/12/12.
116. Jones J, Marian D, Weich E, Engl T, Wedel S, Relja B, et al. CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells. *Experimental cell research*. 2007;313(19):4051-65. Epub 2007/08/21.

117. Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND, Xu L, Fukumura D, Jain RK. CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(8):2074-80. Epub 2011/02/26.
118. Wang J, Sun Y, Song W, Nor JE, Wang CY, Taichman RS. Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis. *Cellular signalling*. 2005;17(12):1578-92. Epub 2005/07/12.

***ANEXOS***

***ANEXO A***  
***(ARTIGO)***

**Pulmonary fibroblasts express CXCR4 and produce CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 after CXCL12-stimulation**

**Taís Marolato Danilucci<sup>1</sup>, Antonio Hernandes Chaves Neto<sup>2</sup>, Ana Paula Campanelli<sup>3</sup>, Sandra Helena Penha Oliveira<sup>1\*</sup>.**

<sup>1</sup>The Multicenter Program Graduate in Physiological Sciences – SBFIS/FOA - School of Dentistry of Araçatuba, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araçatuba, Department of Basic Sciences, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>School of Dentistry of Araçatuba, UNESP - Univ Estadual Paulista, Araçatuba, Department of Basic Sciences, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup>FOB - School of Dentistry of Bauru, USP – Universidade de São Paulo, Campus de Bauru, Department of Biological Sciences, São Paulo, 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](mailto:shpoliv@foa.unesp.br)

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

**Abstract**

C-X-X motif ligand 12 (CXCL12) and its specific receptor Chemokine receptor 4 (CXCR4) play a critical role in airway inflammation. However, the effects of CXCL12/CXCR4 axis on pulmonary fibroblast activation are unknown. In this study, we investigated the effect of CXCL12/CXCR4 axis on chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3), chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), leukotrienes B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) production by pulmonary fibroblasts and the intracellular signaling involved in the process. CXCL12 induced CCL3, CXCL2, LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub> production, and CCL3 production is not dependent on CXCL2; but CXCL2 production is dependent on CCL3 production. LTB<sub>4</sub> production can be partially down-regulated by CXCL2 and CCL3 production and LTC<sub>4</sub> production is dependent on CCL3 and CXCL2 production. Pulmonary fibroblasts constitutively expressed CXCR4, and CXCL12 stimulation up-regulated its expression. Western blot analysis showed that CXCL12 increased protein expression of CXCR4 and induced phosphorylation at S339 of CXCR4. Constitutive CXCR4 expression was decreased by anti-CCL3 antibody or MK 886. Inducible CXCR4 was inhibited by anti-CXCL2 antibody. Indeed pulmonary fibroblasts were pretreated with MK886, dexamethasone (Dexa) and loratadine (Lor). MK886 and loratadine was able to reduce LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub> production but not CCL3 and CXCL2. Dexa decreased CCL3, CXCL2, LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub> production, and when associated with Lor, this decrease was more effective. We found that PI-3K and JNK intracellular signaling play a role in CCL3 production; p38, MEK1/2, PI-3K and JNK are involved in CXCL2 production and p38 and MEK1/2 pathways are involved in LTB<sub>4</sub> production by CXCL12/CXCR4 axis activation in pulmonary fibroblasts. Taken together, our results suggest that



CXCL12 increased CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 production in pulmonary fibroblasts, activating different intracellular mechanisms, and playing an important role in production of pro-inflammatory mediators involved in the regulation of allergic processes.

## **Introduction**

Asthma is an inflammatory disorder of the airways characterized by bronchial hyperresponsiveness, variable airflow obstruction and mucus hypersecretion [1, 2]. These alterations are caused by the release of a great variety of mediators, such as leukotrienes (LTs), cytokines and chemokines [3-7].

Recently, much attention has been given to one particular member of the chemokine family and their specific receptors, CXCL12 and CXCR4, respectively. CXCR4 is functionally expressed in several tissues and cell types [8, 9], but has not been observed in lung fibroblasts. Current investigations have shown that CXCL12/CXCR4 play a role in the development of lung inflammation, airway hyperresponsiveness, peribronchial eosinophilia, angiogenesis and airway remodeling [3, 10-12].

Pulmonary fibroblasts are structural cells and can contribute directly to pulmonary inflammation and ultimately to airway wall remodeling [13]. As structural elements, fibroblasts are key sites of cytokines, chemokines and prostanoids and may contribute to pulmonary inflammation [14-18]. The larger portion of the data available in the literature has demonstrated the release of CXCL12 from activated cells however, CXCL12 acting as stimulators have been observed in a few articles. Furthermore, the role of CXCL12/CXCR4 in inducing

pro-inflammatory mediator production in pulmonary fibroblasts has not yet been described.

CCL3 and CXCL2 are members of a superfamily called chemokines and exhibit inflammatory and immunomodulatory activities and have been shown to have high chemotactic activity for inflammatory and effector cells [9]. LTs are biologically active 5-lipoxygenase (5-LO) lipid mediators of arachidonic acid [19] with immune modulatory and pro-inflammatory properties and play an important role in chemotaxis, activation of leukocytes and chemokine production [20, 21]. The roles of leukotrienes and chemokines have been described in allergy inflammatory response, inducing activation and chemotactic activity in the airway cells [22-25].

The association of CXCL12 with CXCR4 activates multiples signaling pathways. Evidence suggests that after binding to CXCR4, CXCL12 triggers receptor dimerization, thus leading to CXCR4 activation. This process terminates CXCR4 receptor signaling; and activates a number of signaling pathways, including, calcium flux, focal adhesion components, MEK1/2, PI-3K and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) [8, 26, 27].

In this context, we evaluated the role of CXCL12/CXCR4 in the activation of mouse pulmonary fibroblasts. For this purpose we: 1) studied the effects of the CXCL12 on CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 on pulmonary fibroblasts; 2) evaluated the CXCR4 expression in these cells; 3) examined the effects of pharmacological inhibitors on the production of CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 and 4) evaluated the involvement of p38, MEK1/2, PI-3K and JNK signaling pathways on CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 protein and lipid production; respectively in pulmonary fibroblasts. Our study suggests that CXCL12/CXCR4

is able to stimulate pulmonary fibroblasts *in vitro* to produce LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, CCL3 and CXCL2 mediated by different signaling transduction pathways. Furthermore CXCR4 is expressed by pulmonary fibroblasts.

## **Materials and Methods**

### **Animals and Ethical aspects**

Male Balb/c mice (weighing 20 to 25 g and aged 6 to 7 weeks), were used throughout the study. The animals were maintained under standard conditions of temperature and diet. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the School of Dentistry of Araçatuba-UNESP. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Univ. Estadual Paulista-UNESP (Permit Number: 0969-2012).

### **Isolation and primary culture of pulmonary fibroblasts**

Male Balb/c mice were euthanized in a saturated chamber with halothane (Tanohalo, Cristalia, Campinas, Brazil) and their lungs were isolated, fragmented and put into 25 cm<sup>2</sup> culture flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 15% fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 0.5 mg/mL of amphotericin B (all products from Invitrogen, California, USA). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air until confluence was reached. Cells were used in experiments between the 4<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> passage.

### **Immunofluorescence staining analysis of alpha-smooth muscle actin, cytokeratin and fibroblast activation protein-α in pulmonary fibroblasts**

Pulmonary fibroblasts ( $5 \times 10^4$  cells/well) in 4-7 passages were seeded in glass coverslips in 6-well plates for 24 hours. The glass coverslips were removed from the wells and pre-fixed in cold acetone. The immunofluorescence staining was performed as described previously [28]. The antibodies used for immunofluorescence analyses of pulmonary fibroblasts were as follows:  $\alpha$ -Smooth muscle actin mouse monoclonal antibody ( $\alpha$ SMA; 1:200; Sigma, St. Louis, USA); Cytokeratin 10/13 mouse monoclonal antibody (1:100; Covance Inc. Dallas, USA) and fibroblast activation protein- $\alpha$  goat polyclonal antibody (anti-FAP- $\alpha$ ; 1:100; Santa Cruz, USA), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG H+L antibody (1:200; Invitrogen, Carlsbad, USA) and rabbit anti-goat IgG-FITC antibody (1:200; Santa Cruz, USA).

### **Cytological analysis**

For the cytological analysis, pulmonary fibroblasts ( $3 \times 10^6$  cells/well) were seeded in 6-well plates until confluence and were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed by optical microscopy.

### **Pulmonary fibroblast culture stimulation**

Pulmonary fibroblasts in passages 4-7 were put into 24-well plates at  $1 \times 10^5$  cells per well in DMEM complete with 15% FBS and maintained overnight in an incubator at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. After this period, the cells were supplemented with DMEM 0.5% FBS for 24 hours. Then culture medium DMEM 0.5% FBS (500  $\mu$ L) containing recombinant mouse CXCL12/SDF-1 (1, 10, 50 and 100ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, USA) was added to the wells [29]. To the control group, only culture medium was added. After time intervals of 1,

6 and 24 h cell-free supernatant and the cells were collected for evaluation by ELISA.

### **ELISA Assays**

After time intervals of 1, 6, and 24 hours, the cell-free supernatants were collected for CCL3 and CXCL2 quantification using the ELISA technique, in accordance with the manufacturer's instructions. Mouse anti-CCL3 and anti-mouse CXCL2 antibodies were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). The CCL3 and CXCL2 concentration was calculated from a standard curve (from 4 to 4,000 pg/mL). Pulmonary fibroblast supernatants were measured at 450 nm. Results were expressed as pg/mL based on a standard curve. The concentration of LTB4 and LTC4 in CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts cell-free supernatant of were measured by a specific Leukotriene B4 EIA Kit and Leukotriene C4 EIA Kit (Caymann Chemical, Ann Arbor, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. O.D. was determined at 405 nm, and the results were expressed as pg/mL of LTB4 and LTC4, based on standard curves.

### **RT-PCR**

Total RNA was extracted from pulmonary fibroblasts ( $1 \times 10^5$  cells/well) stimulated with CXCL12, or without it (100 ng/mL) using TRIZOL reagent (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY), using the manufacturer's protocol. RT-PCR was conducted as previously described, with some modifications [30]. The primer sequences were as follows:  $\beta$ -actin (sense: 5' TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'; antisense: 5' TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TC CG-3', 445 bp) and CXCR4(5' TGG AGA CTA TGA

CTC CAA CA-3'; antisense: 5' CTG GAA TTG AAA CAC CAC CA-3', 570bp). The PCR products were electrophoresed and visualized under ultraviolet light on 1.8% agarose gel (Invitrogen, NY, USA) containing 10 mg/mL ethidium bromide (Sigma, MO, USA). The agarose gel was scanned and densitometry analysis was evaluated using Scion Image software (Scion Corp, MD, USA) to obtain a numerical value that allowed semi-quantitative comparison between target CXCR4 and the constitutive control  $\beta$ -actin.

### **Western Blot Analyses**

In this set of experiments, after 24 hours, cells were collected for analysis of changes in signaling pathway and CXCR4 activation by CXCL12. Cellular lysates were prepared and Western Blot analysis was performed as previously described [31]. The antibodies used for western blot analyses of pulmonary fibroblasts were as follows: anti-CXCR4, anti-ERK1/2, anti-phospho-ERK1/2<sup>Thr202/Tyr204</sup>, anti-p38, anti-phospho-p38<sup>Thr180/Tyr182</sup>, anti-JNK1/2, anti-phospho-JNK1/2<sup>Thr183/Tyr185</sup> and anti- $\beta$ -actin (Santa Cruz, SC, CA, USA); anti-PI3K p85 alpha, anti-phosphoPI3K p85 alpha<sup>Tyr607</sup> (Abcam, MA, USA) and anti-phospho-CXCR4<sup>Ser339</sup> (Sigma, St Louis, USA)]. Immunoreactive bands were detected with enhanced chemiluminescence. At least three Western blots were performed for each protein and the bands were quantified by densitometric analysis using Scion Image software. The protein levels were expressed relative to  $\beta$ -actin.

### **Pretreatment of CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts with anti-CCL3 and anti-CXCL2 antibodies**

Pulmonary fibroblasts were pretreated with anti-CCL3 (1:200) or anti-CXCL2 antibodies (1:50) (Peprotech, New Jersey, USA) for 30 minutes followed by stimulation with CXCL12 (100 ng/mL) for 24 hours. The cell-free supernatant was stored for measurement by ELISA, and cells were collected to determine the expression using RT-PCR.

### **Pretreatment of CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts with pharmacological inhibitors**

Pulmonary fibroblasts were pretreated with MK886, a 5-LO inhibitor (1  $\mu$ M; Calbiochem, California, USA), dexamethasone (10  $\mu$ M) (Sigma, St Louis, USA) and/or the second-generation H1 antihistamine antagonist loratadine (1  $\mu$ M; Sigma, St Louis, USA) for 30 minutes, followed by stimulation with CXCL12 (100 ng/mL) for 24 hours [32, 33]. The cell-free supernatant was stored for CCL3, CXCL12, LTB4 and LTC4 measurement by ELISA.

### **Pretreatment of CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts with intracellular signaling inhibitors**

Pulmonary fibroblasts were pre-incubated with p38 inhibitor SB 202190 (SB, 10 $\mu$ M), MEK1/2 inhibitor PD 98059 (PD, 30  $\mu$ M), PI-3K inhibitor LY 294002 (LY, 10  $\mu$ M) and selective inhibitor (JNK)-1, -2 and -3 SP 600125 (SP, 3  $\mu$ M) for 30 minutes followed by stimulation with CXCL12 (100 ng/mL) for 24 hours [34-36]. The products used were from Calbiochem, California, USA. The cell-free supernatant was stored for CCL3, CXCL12, LTB4 and LTC4 measurement by ELISA.

## **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  $\pm$  standard error of the mean (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 pulmonary fibroblast cultures**

Fibroblasts isolated from Balb/c mouse lungs were identified by optical microscopy and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The morphological characteristics of the pulmonary fibroblasts exhibited typical cytological appearance with branched cytoplasm, surrounded by an elliptical nucleus containing one or two nucleoli (Fig. 1A, 1B and 1C). The phenotypes of fibroblasts were characterized by immunofluorescence analysis using fibroblast activation protein- $\alpha$  (FAP- $\alpha$ ), alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and cytokeratin markers. Fibroblasts expressed FAP- $\alpha$  (Fig.1D) and  $\alpha$ -SMA (Fig. 1E), but lacked the expression of cytokeratin (Fig. 1F). The figure 1G shows the negative control. The result of immunofluorescence reaction confirmed the homogeneity of these fibroblast populations.



### **CXCL12-induced CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 production in pulmonary fibroblasts**

Pulmonary fibroblasts were stimulated with increasing concentrations of CXCL12 (1, 10, 50 and 100 ng/mL) and their production was observed and evaluated at time intervals of 1, 6 and 24 hours after stimulation. The patterns of CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 production were broadly similar, although there were some differences in the time courses. CXCL12 (1 and 10 ng/mL) induced CCL3 production at 1 hour after stimulation decreasing to control level in the 50 and 100 ng/mL concentrations (Fig. 2A). At 6 hours after stimulation CXCL12 (10 ng/mL) continued this increased production (Fig. 2A). At 24 hours CCL3 production was observed in a dose dependent manner and peaked with 100 ng/mL of CXCL12 (Fig. 2A).

In Figure 2B, CXCL2 production was observed at 1 hour after CXCL12 10 ng/mL, on the other hand, at 6 hours there was no CXCL2 released. Nevertheless, as observed by CCL3, CXCL2 production peaked at 24 h after 100 ng/mL of CXCL12. Stimulation with 50 ng/mL of CXCL12 in the same period, also increased the production of CCL3 and CXCL2, but these production levels were lower than those observed with 100 ng/mL.

With regard to LTB4 and LTC4 production, CXCL12 was able to stimulate pulmonary fibroblasts to produce these lipid mediators at 24 hours after stimulation (Fig. 2C and 2D). At 1 and 6 hours the LTB4 (Fig. 2C) and LTC4 (Fig. 2D) production levels were not significantly distinct, when compared with the control group. All data were evaluated in comparison with the control groups.

### **CCL3 is involved in CXCL2 and LTB4 production in CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts.**

The results of this study demonstrated that CXCL2 production is dependent on CCL3 production, since the anti-CCL3 antibody blocked this production 24 hours after stimulation with CXCL12 (100 ng/mL). However, CCL3 production is not dependent on CXCL2, since the anti-CXCL2 antibody was not able to inhibit its production 24 hours after stimulation with CXCL12 (100 ng/mL) (Fig. 3A and B). As regards lipid mediators, anti-CCL3 and anti-CXCL2 antibodies decreased LTC4 production, but increased LTB4 production after CXCL12-stimulation at 24 hours (Fig. 3C and D).

### **Expression of CXCR4 in CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts**

Pulmonary fibroblasts constitutively expressed CXCR4 mRNA. CXCL12-stimulation (100 ng/mL) was able to up-regulate this expression at 24 hours after (Fig 4A). Western blot analysis also showed increased expression of total protein and phosphorylated CXCR4 in lung fibroblasts, after CXCL12 (100 ng/mL) stimulation at 24 h (Fig. 4B).

### **CXCL2, CCL3 and 5-LO metabolites LTB4 and LTC4 are involved in the CXCR4 expression by CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts**

It was observed that the inhibition of CCL3 and 5-LO metabolites LTC4 and LTB4, significantly reduced constitutive CXCR4 gene expression, and inhibition of CXCL2 significantly reduced the activation of CXCR4 gene expression after CXCL12-stimulation of pulmonary fibroblasts at 24 hours after (Fig. 4C).

### **Pharmacological inhibitors decreased CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 production, in CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts**

We showed that CCL3 and CXCL2 production increased after pretreatment with MK886. On the other hand, loratadine was unable to decrease their production when compared with the pulmonary fibroblast group without treatment. Dexamethasone plus loratadine reduced the production, to the level of the control group. (Fig. 5A and B). LTB4 and LTC4 production decreased to the basal levels after pretreatment with MK886, dexamethasone, loratadine and dexamethasone plus loratadine in CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts at 24 hours after (Fig. 5C and 5D).

### **Signaling intracellular pathways involved in CXCL12-mediated CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 up-regulation**

As shown in Fig. 6A, LY and SP significantly decreased CCL3 protein production, while SB increased CCL3 production. PD did not cause any effect on CCL3 stimulation. Furthermore, CXCL2 protein production was decreased by SB, PD, LY and SP (Fig. 6B). In Fig. 6C, both SB and PD suppressed LTB4 protein production, while SP increased LTB4 production and LY did not cause any effect on LTB4 stimulation. The LTC4 protein production was not inhibited by any signaling inhibitor drugs (Fig. 6D). Next, we used Western blot analysis to confirm the activation of proteins involved in the signal transduction pathway mediated by CXCL12. Stimulation of cells with CXCL12 (100 ng/mL) was accompanied by an increase in the total protein expression and phosphorylation of p38, ERK1/2, PI-3K and JNK1/2 (Fig. 7E).

## Discussion

In our study we identified CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 as target proteins for the CXCL12 signaling pathway that regulates the immune inflammatory response. We showed that the production of CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 proteins by mouse pulmonary fibroblasts is increased in response to CXCL12 and requires activation of the CXCR4 receptor via the signaling pathways p38, MEK1/2, PI-3K and JNK depending on the inflammatory mediator produced.

Cytological analyses showed the pulmonary fibroblast morphology appearing as an elongated cell with branched cytoplasm, a plumper oval nucleus and a greater amount of basophilic cytoplasm, similar to that observed in the conventional description of fibroblasts [37, 38]. Immunofluorescence microscopy was used to confirm the purity and characteristic of fibroblast cultures, where FAP- $\alpha$  and  $\alpha$ -SMA was observed uniformly positive but negative for cytokeratin excluding contamination with epithelial cells [38].

In the next series of experiments we found that pulmonary fibroblasts produce CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 after CXCL12 stimulation.

CCL3 are important in the recruitment factors during allergy airway response [24, 39]. Studies with gingival fibroblasts have shown that CCL3 production can be detected in these cells after they are challenged with lipopolysaccharide(LPS) from *P. gingivalis* at time intervals of 1, 6 and 24 hours [40], and that anti-IgE-stimulated human basophils produced CCL3 gradually over a period of 24 hours [41]. In the present study, CCL3 production could be observed in the first hour with 1 and 10 ng/mL CXCL12. At 6 hours the amount of CCL3 produced decreased, however, the concentration of 10 ng/mL CXCL12

continued to be able to produce the CC chemokine. On the other hand, at 24 hours this production increased in a dose dependent manner, demonstrating that CXCL12 may have induced *de novo* synthesis via the release of a second mediator. The CCL3 production at 1 and 6 hours may possibly be a characteristic of acute inflammatory response. At 24 hours CCL3 production may have been involved in a chronic pattern of response and could be related to a mechanism to compensate for the production of other cytokines and/or chemokines.

CXCL2 is a potent neutrophil chemotactic factor and plays an important role in allergy and asthma both at the level of pulmonary cell recruitment as well as pulmonary edema and bronchoconstriction [25, 42, 43]. Recent studies have reported that human cardiac fibroblasts and human fibroblast cell lines express and produce CXCL2 [43, 44]. Mesangial cell cultures stimulated with IL-17A/IL-17F significantly induced CXCL2 production in a dose-dependent manner, and a significant increase was observed at 24 hours [45]. In agreement with their data, our study revealed the production of CXCL2 increasing in a dose dependent manner at 24 hours in CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts. At 1 hour after CXCL12 10 ng/mL, CXCL2 production was observed, but at 6 hours the production decreased. Possibly, CXCL12 induced the release of CXCL2 from a stored granule, and after that CXCL12 was able to induce a new production that was released 24 hours later. These CC and CXC chemokines may contribute to the chronic lung inflammatory response.

LTs are a family of lipid inflammatory mediators of central importance to the pathogenesis of asthma [46]. Previous studies have shown that amounts of LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub> are released by human lung fibroblasts [47, 48] and rat aortic

adventitial fibroblasts [49]. Therefore, fibroblasts could be a great source of LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub>. In the present study it was observed that LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub> production occurs 24 hours after CXCL12 stimulation suggesting that these lipid mediators may be involved in the persistence of the inflammatory response.

To investigate whether CCL3, CXCL2, LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub> are dependent on CCL3 and CXCL2 production functioning as a cascade 24 hours after stimulation with CXCL12, pulmonary fibroblasts were pretreated with anti-CCL3 and anti-CXCL2 antibodies. We found that CCL3 production is not dependent on CXCL2 because the anti-CXCL2 antibody was not able to inhibit its production, but it does depend on CCL3 production. On the other hand, CXCL2 production is dependent on CCL3 and CXCL2 production, since anti-CCL3 and anti-CXCL2 antibodies blocked this production. An earlier study has shown that anti-CCL3 was able to inhibit CXCL2 production, which demonstrates that CCL3 is critical in polymorphonuclear recruitment during *P. aeruginosa* keratitis in mice [50]. Ramos et al. 2006 [51], suggested that neutrophil migration promoted by CXCL2 administration was inhibited by anti-TNF- $\alpha$ , anti-CCL3 or by MK886 suggesting a mechanism in cascade of CXCL2, CCL3, TNF- $\alpha$  and LTB<sub>4</sub>, inducing an immune system-mediated inflammatory response. With regard to lipid mediators, LTB<sub>4</sub> production was increased in the presence of anti-CCL3 and anti-CXCL2 antibodies 24 hours after stimulation with CXCL12 (100ng/mL). For the first time, our studies have reported that LTB<sub>4</sub> production can be partially down-regulated by CXCL2 and CCL3 production, because when antibodies anti-these chemokines are used, there is an overproduction of LTB<sub>4</sub>. Furthermore, we suggest an indirect mechanism involved in the CXCL12-induced LTB<sub>4</sub> production in pulmonary fibroblasts mediated by some mediator

released by CCL3 and CXCL2 production. LTC<sub>4</sub> production is completely inhibited by anti-CCL3 and anti-CXCL2 antibodies; therefore LTC<sub>4</sub> production is dependent on CCL3 and CXCL2 production. Furthermore, Oliveira et al. (2002) suggested that CCL3 induced significant LTC<sub>4</sub> release in murine eosinophil [52]. For the first time we suggest that CXCL2 mediates LTC<sub>4</sub> production induced by CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts.

In the next series of experiments we evaluated the CXCR4 in pulmonary fibroblasts by RT-PCR and Western blot. It was observed that pulmonary fibroblasts constitutively expressed CXCR4, and that CXCL12 activation up-regulated its expression. The same result was reported by Chen et al. (2011) with human synovial fibroblasts [53]. However, this is the first study showing CXCR4 mRNA expression in pulmonary fibroblasts. Taken together, Western blot analysis showed that CXCL12 increased protein expression of CXCR4 and induced phosphorylation at S339 of CXCR4 after 24 hours of stimulation. A recent study [54] showed that CXCL12 induces phosphorylation at S338/339 in HEK293 cells. Nevertheless, this is the first study to report protein expression and phosphorylation of CXCR4 in pulmonary fibroblasts after CXCL12-stimulation and confirmed the involvement of CXCL12/CXCR4 interaction in the CXCL12-mediating induction of CCL3, CXCL2, LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub>.

Previous studies have shown that the CXCL12/CXCR4 axis plays a critical role in the recruitment of inflammatory leukocytes in the lungs [3, 55], angiogenesis [11] and the subsequent induction of airway inflammation and hyperresponsiveness [3]. Therefore, we investigated the possible involvement of CXCL12/CXCR4 axis-induced CCL3, CXCL2, LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub> production in pulmonary fibroblasts. For this purpose CXCL12-stimulated pulmonary

fibroblasts were pretreated with anti-CCL3 anti-CXCL2 antibodies or MK 886, a 5-LO inhibitor, and CXCR4 mRNA expression was evaluated. The data indicates the involvement of CCL3 and lipid mediator production in the constitutive expression of CXCR4 mRNA, since the pretreatment with these inhibitors decreased the CXCR4 mRNA expression. On the other hand, the anti-CXCL2 antibody was able to inhibit the CXCR4 mRNA expression induced by CXCL12 stimulation. These data suggest that constitutive and inducible CXCR4 mRNA expression depends on different mediators after CXCL12 activation, opening further perspectives to study the activation of lung fibroblasts by CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4.

Nowadays, there are a large number of pharmacological treatments for asthmatic patients, however, a mix of glucocorticosteroids, antihistamines and anti-leukotrienes drugs are being used. In the next series of experiments we determined the effect of these pharmacological inhibitors/antagonists on CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 production induced by CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts. In our studies the lipoxygenase products to be involved in CCL3 and CXCL2 production since the pretreatment with 5-LO inhibitor was able to up-regulate the CCL3 and CXCL2 production after CXCL12-stimulation of pulmonary fibroblasts. On the other hand LTB4 and LTC4 production were decreased. A study showed that MK886 inhibits LTB4 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by LPS, ionomycin and thapsogargin. In 2001, Oliveira et al. [56] found that the treatment with MK886 significantly decreased LTC4 and LTE4 production in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid indicating that leukotrienes play a primary role in the induction of the airway hyperreactivity response induced by Stem Cell Factor. We suggest that 5-LO



are involved in pulmonary fibroblast activation to produce CCL3 and CXCL2 mediated by CXCL12 responses via cytokine and/or chemokine production, since dexamethasone was also able to inhibit these productions. Dexamethasone is a potent anti-inflammatory agent known to attenuate cytokine/chemokine-induced infiltration of inflammatory cells [57, 58]. Previous studies have shown that glucocorticoids suppressed the level of CCL3 and CXCL2 in several cell types such as monocytes, alveolar macrophages, leukocytes and mast cells [59-63] and decreasing the recruitment of neutrophils and eosinophils to the inflammatory sites [59, 62]. Furthermore, we have shown that dexamethasone also decreased LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub> production by CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts. In another study corticosteroid therapy was able to lead to a suppression of eicosanoid biosynthesis [64]. In alveolar macrophages of patients with severe LPS-stimulated asthma, dexamethasone suppressed LTB<sub>4</sub> [64]. In summary, we have shown that dexamethasone reduces the production of pro-inflammatory mediators to the site of inflammation.

Our next step was to find out whether CCL3, CXCL2, LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub> production is decreased by loratadine. Although, histamine is an important chemical mediator of allergic response [65], we found that CCL3 and CXCL2 production were not dependent on histamine, since the production of these CC and CXC chemokines was not changed after loratadine pretreatment. Furthermore LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub> production were dependent on histamine since lipid mediators were inhibited by loratadine. Lewis et al. 2004 [66], reported a series of loratadine-based compounds that exhibited both the H<sub>1</sub> histamine receptor antagonist and 5-LO inhibitory activity. Loratadine was able to reduce

inflammatory reaction by a direct effect on neutrophil LTB<sub>4</sub> production [67]. Previous studies have shown that the association of antihistamines and glucocorticoids significantly improves the therapeutic efficacy of asthma in patients with allergic asthma [68] and can reduce the need for inhaled corticosteroids in patients with chronic bronchial asthma, and consequently not lead to deterioration in pulmonary function [69]. At this rate, we evaluated the association of dexamethasone plus loratadine in CCL<sub>3</sub>, CXCL<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub> production by CXCL<sub>12</sub>-stimulated pulmonary fibroblasts. The association was able to reduce CCL<sub>3</sub>, CXCL<sub>2</sub>, LTB and LTC<sub>4</sub> production more effectively than loratadine alone.

CXCL<sub>12</sub> is a pleiotropic chemokine capable of eliciting multiple signal transduction cascades and functions, via interaction with CXCR<sub>4</sub>. Previous studies have shown that the association of the CXCL<sub>12</sub>/CXCR<sub>4</sub> axis activates multiples signaling pathways such as, JAK 2 and JAK 3 kinases, MEK1/2 and PI-3K [8, 26, 27]. A previous study has demonstrated that CXCL<sub>12</sub> increased p38 activity in induced neuronal apoptosis [70] and JNK via strongly activated in CXCR<sub>4</sub> mediated cell adhesion [71].

We have shown that CXCL<sub>12</sub>-induced production of CCL<sub>3</sub> was up-regulated by SB and reduced by LY and SP, with no changes in the presence of PD, indicating that p38 is indirectly involved in CCL<sub>3</sub> production and that PI-3K and JNK play a critical role in this production induced by CXCL<sub>12</sub>/CXCR<sub>4</sub> axis. The CXCL<sub>12</sub>-direct CXCL<sub>2</sub> production was effectively decreased by p38, MEK1/2, PI-3K and JNK inhibitors, suggesting an important role of these pathways in the production of this chemokine. With regard to lipid mediators, p38 and MEK1/2 are involved in the production of LTB<sub>4</sub>, but PI-3K is not; and

JNK is indirectly involved in its production. The LTC<sub>4</sub> production induced by the CXCL12/CCR4 axis is not independent of p38, MEK, PI-3K and JNK. Additionally, we directly demonstrated the regulation of the activities of p38, ERK1/2, PI-3K and JNK by CXCL12. This chemokine was able to induce phosphorylation of these signaling pathways in the pulmonary fibroblasts. Recent studies have shown that CXCL12 activates PI3K/Akt and MAPK pathways via CXCR4, thus regulating cell survival, proliferation, chemotaxis, cytokine secretion and angiogenesis [72, 73]. It has been shown in human prostate cancer cell lines that the differential activation of the MEK/ERK and PI3K/AKT pathways can result in differential secretion IL-6, IL-8, TIMP-2 and VEGF (Wang et al., 2005), while the activation of PI-3K and c-Jun via CXCR4 induced by CXCL12 has been associated with increased IL-6 production in human synovial fibroblasts [53]. In addition, our results demonstrated for the first time that the CXCL12/CXCR4-mediated up-regulation of CCL3 via PI-3K and JNK, CXCL2 via p38, MEK1/2, PI-3K and JNK, LTB<sub>4</sub> via p38 and MEK1/2 and the cascade production of LTC<sub>4</sub>.

In conclusion, this study has explored, for the first time, the mechanism through which CXCL12/CXCR4-stimulate pulmonary fibroblast production of CCL3, CXCL2, LTB<sub>4</sub> and LTC<sub>4</sub> mediated by different signaling transduction pathways depending on the inflammatory mediator produced (Fig. 8). Taken as a whole, these data suggest that the CXCL12/CXCR4 axis-stimulated pulmonary fibroblasts play a role in airway inflammatory response regulating the allergic process. These findings may provide a better understanding of the asthma pathogenesis mechanisms and treatment.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge with thanks, the collaborative team effort of the Department of Biological Sciences, School of Dentistry of Bauru-USP for assistance with immunofluorescence staining. This work was supported by São Paulo State Research Foundation- FAPESP (Grant# 2011/06405-7 to SHPO) and fellowship from CAPES to TMD.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1. Cytology and phenotype of pulmonary fibroblasts.** Lung from Balb/c mice were explanted and primary fibroblasts were isolated and grown in monolayer cultures in 4-7 passages. **(A)** Cell culture image and **(B, C)** H&E cell culture image at 200x and 400x; showed typical histological appearance of fibroblasts. In Immunofluorescence analysis, pulmonary fibroblasts **(D)** expressed FAP- $\alpha$  and **(E)**  $\alpha$ -SMA, but lacked the expression of **(F)** cytokeratin at 400x and **(G)** negative control.

**Fig. 2. CXCL12 induces CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 production in pulmonary fibroblasts.** CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 protein production by CXCL12- stimulated pulmonary fibroblasts (1, 10, 50 and 100 ng/mL) evaluated at 1, 6, and 24 hours after stimulation. The results represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, with similar results obtained each time (ANOVA with the Bonferroni multiple comparison test). \* $p < 0.05$  compared with untreated control.

**Fig. 3. Involvement of CCL3 and CXCL2, in the CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 production.** Pulmonary fibroblasts pre-immunized with anti-CCL3 and anti-CXCL2 followed by stimulation with CXCL12 (100 ng/mL) for 24 hours and the production of **(A)** CCL3, **(B)** CXCL2, **(C)** LTB4 and **(D)** LTC4 were evaluated. The results represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, with similar results obtained each time (the CXCL12 group [-]) (ANOVA with the Bonferroni multiple comparison test). \* $p < 0.05$  compared with untreated control group and  $^{\#}p < 0.05$  compared with CXCL12 treated group.

**Fig. 4. CXCR4 expression and effect of  $\alpha$ -CCL3,  $\alpha$ -CXCL2 and MK886 on CXCR4 mRNA.** **(A)** CXCR4 mRNA and **(B)** Expression of total protein and phosphorylated CXCR4 in lung fibroblasts stimulated with CXCL12, or without it (100 ng/mL) after 24 h expression in pulmonary fibroblast; **(C)** CXCR4 mRNA expression by pulmonary fibroblasts pretreated with anti-CCL3, anti-CXCL2 and MK886 24 hours after stimulation with CXCL12. The results represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, with similar results obtained each time (ANOVA with the Bonferroni multiple comparison test). \* $p < 0.05$  compared with untreated control and  $^{\#}p < 0.05$  compared with CXCL12 treated group.

**Fig. 5. Pre-treatment of MK886, Dexamethasone and Loratadine in production of CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 induced by CXCL12.** MK886, Dexamethasone and/or Loratadine were added in pulmonary fibroblasts followed by stimulation with CXCL12 (100 ng/mL) for 24 hours and the production of **(A)** CCL3, **(B)** CXCL2, **(C)** LTB4 and **(D)** LTC4 were evaluated. The results represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, with similar results obtained each time (the CXCL12 group [-]) (ANOVA with the Bonferroni multiple comparison test). \* $p < 0.05$

compared with untreated control group, \*\* $p < 0.05$  and # $p < 0.05$  compared with CXCL12 treated group.

**Fig. 6. Signaling intracellular pathways involved in CXCL12-mediated CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 up-regulation.** Pulmonary fibroblasts pre-incubated with SB, PD, LY and SP followed by stimulation with CXCL12 (100 ng/mL) for 24 hours and the production of **(A) CCL3**, **(B) CXCL2**, **(C) LTB4** and **(D) LTC4** were evaluated. The results represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, with similar results obtained each time (the CXCL12 group [-]) (ANOVA with the Bonferroni multiple comparison test). \* $p < 0.05$  compared with untreated control group, \*\* $p < 0.05$  and # $p < 0.05$  compared with CXCL12 treated group.

**Fig. 7. Effect of CXCL12 on the expression and phosphorylation of p38, MEK1/2, PI-3K and JNK pathways.** Expression or phosphorylation of the proteins in CXCL12-stimulated pulmonary fibroblasts was determined by Western blot. Equal loading was confirmed by reprobing them for  $\beta$ -actin. The results represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, with similar results obtained each time (the CXCL12 group [-]) (ANOVA with the Bonferroni multiple comparison test). \* $p < 0.05$  compared with untreated control group.

**Fig.8. Schematic diagram of the signaling pathways involved in CXCL12-induced production of pro-inflammatory mediators in pulmonary fibroblasts.** CXCL12 increases expression of CXCR4 and promotes increase in CCL3, CXCL2, LTB4 and LTC4 production. PI-3K and JNK intracellular signaling play a role in CCL3 production; p38, MEK1/2, PI-3K and JNK are involved in CXCL2 production and p38 and MEK1/2 pathways are involved in

LTB4 production by CXCL12/CXCR4 axis activation in pulmonary fibroblasts.

LTC4 production is related to CCL3 and CXCL2 production.

## References

1. Holgate ST, Arshad HS, Roberts GC, Howarth PH, Thurner P, Davies DE. A new look at the pathogenesis of asthma. *Clin Sci (Lond)*. 2010;118(7):439-50. Epub 2009/12/23.
2. Lotvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjermer L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011;127(2):355-60. Epub 2011/02/02.
3. Gonzalo JA, Lloyd CM, Peled A, Delaney T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. *J Immunol*. 2000;165(1):499-508. Epub 2000/06/22.
4. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2008;38(6):872-97. Epub 2008/05/24.
5. Lukacs NW, Oliveira SH, Hogaboam CM. Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort? *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(8):995-9. Epub 1999/10/19.
6. Murphy DM, O'Byrne PM. Recent advances in the pathophysiology of asthma. *Chest*. 2010;137(6):1417-26. Epub 2010/06/09.
7. Nabe T, Hosokawa F, Matsuya K, Morishita T, Ikedo A, Fujii M, et al. Important role of neutrophils in the late asthmatic response in mice. *Life sciences*. 2011;88(25-26):1127-35. Epub 2011/05/14.
8. Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *Journal of molecular histology*. 2004;35(3):233-45. Epub 2004/09/02.
9. Smit JJ, Lukacs NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *European journal of pharmacology*. 2006;533(1-3):277-88. Epub 2006/02/09.
10. Daubeuf F, Hachet-Haas M, Gizzi P, Gasparik V, Bonnet D, Utard V, et al. An antedrug of the CXCL12 neutraligand blocks experimental allergic asthma without systemic effect in the mouse. *The Journal of biological chemistry*. 2013. Epub 2013/03/02.
11. Hoshino M, Aoike N, Takahashi M, Nakamura Y, Nakagawa T. Increased immunoreactivity of stromal cell-derived factor-1 and angiogenesis in asthma. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2003;21(5):804-9. Epub 2003/05/27.
12. Lukacs NW, Berlin A, Schols D, Skerlj RT, Bridger GJ. AMD3100, a CxCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. *The American journal of pathology*. 2002;160(4):1353-60. Epub 2002/04/12.
13. Nanki T, Lipsky PE. Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4+ T cell activation. *J Immunol*. 2000;164(10):5010-4. Epub 2000/05/09.

14. Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM, Holgate ST. Airway remodeling in asthma: new insights. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;111(2):215-25; quiz 26. Epub 2003/02/18.
15. Knight D. Epithelium-fibroblast interactions in response to airway inflammation. *Immunology and cell biology*. 2001;79(2):160-4. Epub 2001/03/27.
16. Lewis CC, Chu HW, Westcott JY, Tucker A, Langmack EL, Sutherland ER, et al. Airway fibroblasts exhibit a synthetic phenotype in severe asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;115(3):534-40. Epub 2005/03/09.
17. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *The American journal of pathology*. 1997;151(2):317-22. Epub 1997/08/01.
18. Stumm CL, Wettlaufer SH, Jancar S, Peters-Golden M. Airway remodeling in murine asthma correlates with a defect in PGE2 synthesis by lung fibroblasts. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2011;301(5):L636-44. Epub 2011/08/30.
19. Mastalerz L, Kumik J. Antileukotriene drugs in the treatment of asthma. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2010;120(3):103-8. Epub 2010/03/25.
20. Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *The New England journal of medicine*. 1990;323(10):645-55. Epub 1990/09/06.
21. Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. 1987;237(4819):1171-6. Epub 1987/09/04.
22. Cheraim AB, Xavier-Elsas P, de Oliveira SH, Batistella T, Russo M, Gaspar-Elsas MI, et al. Leukotriene B4 is essential for selective eosinophil recruitment following allergen challenge of CD4+ cells in a model of chronic eosinophilic inflammation. *Life sciences*. 2008;83(5-6):214-22. Epub 2008/07/08.
23. Chibana K, Ishii Y, Asakura T, Fukuda T. Up-regulation of cysteinyl leukotriene 1 receptor by IL-13 enables human lung fibroblasts to respond to leukotriene C4 and produce eotaxin. *J Immunol*. 2003;170(8):4290-5. Epub 2003/04/12.
24. Lukacs NW, Standiford TJ, Chensue SW, Kunkel RG, Strieter RM, Kunkel SL. C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 1996;60(5):573-8. Epub 1996/11/01.
25. McKinley L, Kim J, Bolgos GL, Siddiqui J, Remick DG. CXC chemokines modulate IgE secretion and pulmonary inflammation in a model of allergic asthma. *Cytokine*. 2005;32(3-4):178-85. Epub 2005/11/18.
26. Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EG, et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur J Cancer*. 2013;49(1):219-30. Epub 2012/06/12.
27. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, et al. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple



- signal transduction pathways. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(36):23169-75. Epub 1998/08/29.
28. Ramos RN, Oliveira CE, Gasparoto TH, Malaspina TS, Belai EB, Cavassani KA, et al. CD25+ T cell depletion impairs murine squamous cell carcinoma development via modulation of antitumor immune responses. *Carcinogenesis*. 2012;33(4):902-9. Epub 2012/02/22.
29. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Murakami K, Miyake Y, et al. CXCL12 and CXCR4 expression by human gingival fibroblasts in periodontal disease. *Clinical and experimental immunology*. 2005;141(3):467-74. Epub 2005/07/28.
30. Oliveira SH, Lukacs NW. Stem cell factor and igE-stimulated murine mast cells produce chemokines (CCL2, CCL17, CCL22) and express chemokine receptors. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2001;50(3):168-74. Epub 2001/05/08.
31. Chaves Neto AH, Queiroz KC, Milani R, Paredes-Gamero EJ, Justo GZ, Peppelenbosch MP, et al. Profiling the changes in signaling pathways in ascorbic acid/beta-glycerophosphate-induced osteoblastic differentiation. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(1):71-7. Epub 2010/07/14.
32. Oliveira SH, Costa CH, Ferreira SH, Cunha FQ. Sephadex induces eosinophil migration to the rat and mouse peritoneal cavity: involvement of mast cells, LTB4, TNF-alpha, IL-8 and PAF. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2002;51(3):144-53. Epub 2002/05/15.
33. Temple DM, McCluskey M. Loratadine, an antihistamine, blocks antigen- and ionophore-induced leukotriene release from human lung in vitro. *Prostaglandins*. 1988;35(4):549-54. Epub 1988/04/01.
34. Cheung PF, Wong CK, Ip WK, Lam CW. IL-25 regulates the expression of adhesion molecules on eosinophils: mechanism of eosinophilia in allergic inflammation. *Allergy*. 2006;61(7):878-85. Epub 2006/06/24.
35. Klein JB, Rane MJ, Scherzer JA, Coxon PY, Kettritz R, Mathiesen JM, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Immunol*. 2000;164(8):4286-91. Epub 2001/02/07.
36. Oliveira SH, Santos VA. Studies on the expression of fibroblast growth factor-2 from odontoblast-like cells. *Journal of endodontics*. 2011;37(11):1520-4. Epub 2011/10/18.
37. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(20):12877-82. Epub 2002/09/26.
38. Flavell SJ, Hou TZ, Lax S, Filer AD, Salmon M, Buckley CD. Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. *British journal of pharmacology*. 2008;153 Suppl 1:S241-6. Epub 2007/10/30.
39. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England journal of medicine*. 1998;338(7):436-45. Epub 1998/02/12.
40. Morandini AC, Sipert CR, Gasparoto TH, Gregghi SL, Passanezi E, Rezende ML, et al. Differential production of macrophage inflammatory protein-1alpha, stromal-derived factor-1, and IL-6 by human cultured periodontal

ligament and gingival fibroblasts challenged with lipopolysaccharide from *P. gingivalis*. *Journal of periodontology*. 2010;81(2):310-7. Epub 2010/02/16.

41. Li H, Sim TC, Grant JA, Alam R. The production of macrophage inflammatory protein-1 alpha by human basophils. *J Immunol*. 1996;157(3):1207-12. Epub 1996/08/01.

42. Driscoll KE. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Experimental lung research*. 1994;20(6):473-90. Epub 1994/11/01.

43. Lag M, Rodionov D, Ovrevik J, Bakke O, Schwarze PE, Refsnes M. Cadmium-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity: Expression and release of cytokines in fibroblasts, epithelial cells and macrophages. *Toxicology letters*. 2010;193(3):252-60. Epub 2010/01/29.

44. Turner NA, Das A, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Human cardiac fibroblasts express ICAM-1, E-selectin and CXC chemokines in response to proinflammatory cytokine stimulation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2011;43(10):1450-8. Epub 2011/07/02.

45. Iyoda M, Shibata T, Kawaguchi M, Hizawa N, Yamaoka T, Kokubu F, et al. IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF-alpha and IL-1beta. *American journal of physiology Renal physiology*. 2010;298(3):F779-87. Epub 2010/01/01.

46. James AJ, Penrose JF, Cazaly AM, Holgate ST, Sampson AP. Human bronchial fibroblasts express the 5-lipoxygenase pathway. *Respiratory research*. 2006;7:102. Epub 2006/07/29.

47. Koyama S, Sato E, Numanami H, Kubo K, Nagai S, Izumi T. Bradykinin stimulates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2000;22(1):75-84. Epub 1999/12/30.

48. Takamizawa A, Koyama S, Sato E, Masubuchi T, Kubo K, Sekiguchi M, et al. Bleomycin stimulates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *J Immunol*. 1999;162(10):6200-8. Epub 1999/05/07.

49. Dong X, Ye X, Song N, Zhao J, Di B, Peng F, et al. Urotensin II promotes the production of LTC(4) in rat aortic adventitial fibroblasts through NF-kappaB-5-LO pathway by p38 MAPK and ERK activations. *Heart and vessels*. 2012. Epub 2012/10/12.

50. Xue ML, Thakur A, Cole N, Lloyd A, Stapleton F, Wakefield D, et al. A critical role for CCL2 and CCL3 chemokines in the regulation of polymorphonuclear neutrophils recruitment during corneal infection in mice. *Immunology and cell biology*. 2007;85(7):525-31. Epub 2007/06/21.

51. Ramos CD, Fernandes KS, Canetti C, Teixeira MM, Silva JS, Cunha FQ. Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MIP-2 inducing the sequential release of MIP-1alpha, TNF-alpha and LTB(4). *European journal of immunology*. 2006;36(8):2025-34. Epub 2006/07/21.

52. Oliveira SH, Lira S, Martinez AC, Wiekowski M, Sullivan L, Lukacs NW. Increased responsiveness of murine eosinophils to MIP-1beta (CCL4) and TCA-3 (CCL1) is mediated by their specific receptors, CCR5 and CCR8. *Journal of leukocyte biology*. 2002;71(6):1019-25. Epub 2002/06/07.

53. Chen HT, Tsou HK, Hsu CJ, Tsai CH, Kao CH, Fong YC, et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 promotes IL-6 production in human synovial

- fibroblasts. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(4):1219-27. Epub 2011/02/12.
54. Mueller W, Schutz D, Nagel F, Schulz S, Stumm R. Hierarchical organization of multi-site phosphorylation at the CXCR4 C terminus. *PLoS one*. 2013;8(5):e64975. Epub 2013/06/05.
55. Negrete-Garcia MC, Velazquez JR, Popoca-Coyotl A, Montes-Vizuet AR, Juarez-Carvajal E, Teran LM. Chemokine (C-X-C motif) ligand 12/stromal cell-derived factor-1 is associated with leukocyte recruitment in asthma. *Chest*. 2010;138(1):100-6. Epub 2010/03/20.
56. Oliveira SH, Hogaboam CM, Berlin A, Lukacs NW. SCF-induced airway hyperreactivity is dependent on leukotriene production. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;280(6):L1242-9. Epub 2001/05/15.
57. Goulding NJ, Euzger HS, Butt SK, Perretti M. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 1998;47 Suppl 3:S158-65. Epub 1998/11/27.
58. Schleimer RP. An overview of glucocorticoid anti-inflammatory actions. *European journal of clinical pharmacology*. 1993;45 Suppl 1:S3-7; discussion S43-4. Epub 1993/01/01.
59. Berkman N, Jose PJ, Williams TJ, Schall TJ, Barnes PJ, Chung KF. Corticosteroid inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes and alveolar macrophages. *The American journal of physiology*. 1995;269(4 Pt 1):L443-52. Epub 1995/10/01.
60. John M, Lim S, Seybold J, Jose P, Robichaud A, O'Connor B, et al. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;157(1):256-62. Epub 1998/01/28.
61. Kato A, Chustz RT, Ogasawara T, Kulka M, Saito H, Schleimer RP, et al. Dexamethasone and FK506 inhibit expression of distinct subsets of chemokines in human mast cells. *J Immunol*. 2009;182(11):7233-43. Epub 2009/05/21.
62. Schramm R, Liu Q, Thorlacius H. Expression and function of MIP-2 are reduced by dexamethasone treatment in vivo. *British journal of pharmacology*. 2000;131(2):328-34. Epub 2000/09/19.
63. Tanabe J, Watanabe M, Mue S, Ohuchi K. Dexamethasone inhibits the production of macrophage inflammatory protein 2 in the leukocytes in rat allergic inflammation. *European journal of pharmacology*. 1995;284(3):257-63. Epub 1995/09/25.
64. Bhavsar PK, Levy BD, Hew MJ, Pfeffer MA, Kazani S, Israel E, et al. Corticosteroid suppression of lipoxin A4 and leukotriene B4 from alveolar macrophages in severe asthma. *Respiratory research*. 2010;11:71. Epub 2010/06/10.
65. Gelfand EW. Role of histamine in the pathophysiology of asthma: immunomodulatory and anti-inflammatory activities of H1-receptor antagonists. *The American journal of medicine*. 2002;113 Suppl 9A:2S-7S. Epub 2003/01/09.
66. Lewis TA, Young MA, Arrington MP, Bayless L, Cai X, Collart P, et al. Cetirizine and loratadine-based antihistamines with 5-lipoxygenase inhibitory

activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2004;14(22):5591-4. Epub 2004/10/16.

67. Amsellem C, Czarlewski W, Lagarde M, Pacheco Y. Inhibitory effect of loratadine on leukotriene B4 production by neutrophils either alone or during interaction with human airway epithelial cells. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 1998;11(4):245-52. Epub 1999/04/02.

68. Ekstrom T, Osterman K, Zetterstrom O. Lack of effect of loratadine on moderate to severe asthma. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 1995;75(3):287-9. Epub 1995/09/01.

69. Busse WW, Middleton E, Storms W, Dockhorn RJ, Chu TJ, Grossman J, et al. Corticosteroid-sparing effect of azelastine in the management of bronchial asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(1):122-7. Epub 1996/01/01.

70. Shepherd AJ, Loo L, Gupte RP, Mickle AD, Mohapatra DP. Distinct modifications in Kv2.1 channel via chemokine receptor CXCR4 regulate neuronal survival-death dynamics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(49):17725-39. Epub 2012/12/12.

71. Jones J, Marian D, Weich E, Engl T, Wedel S, Relja B, et al. CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells. *Experimental cell research*. 2007;313(19):4051-65. Epub 2007/08/21.

72. Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND, Xu L, Fukumura D, Jain RK. CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(8):2074-80. Epub 2011/02/26.

73. Wang J, Sun Y, Song W, Nor JE, Wang CY, Taichman RS. Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis. *Cellular signalling*. 2005;17(12):1578-92. Epub 2005/07/12.

Fig. 1

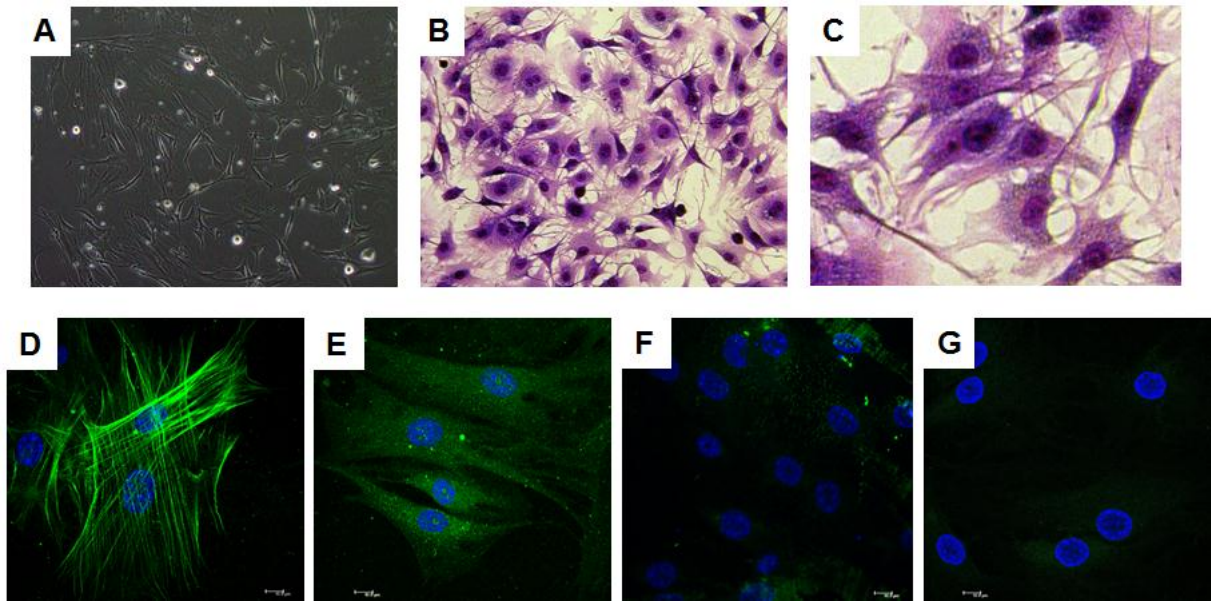


Fig. 2

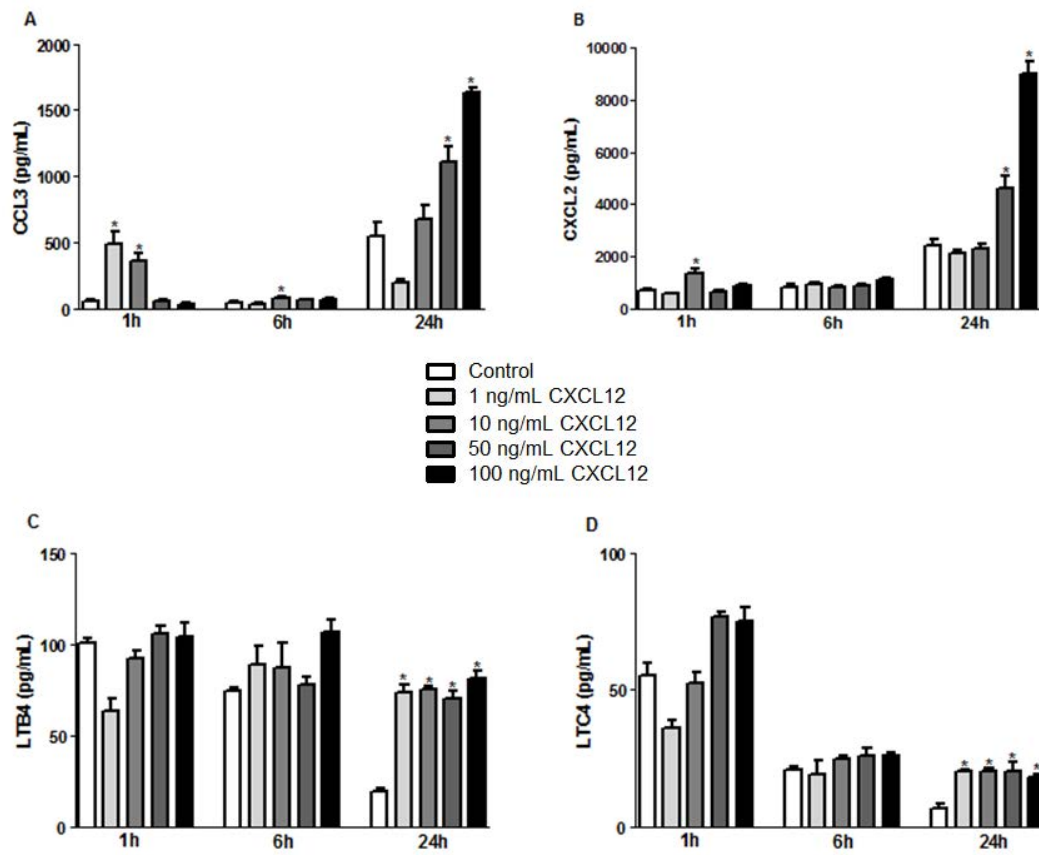


Fig. 3

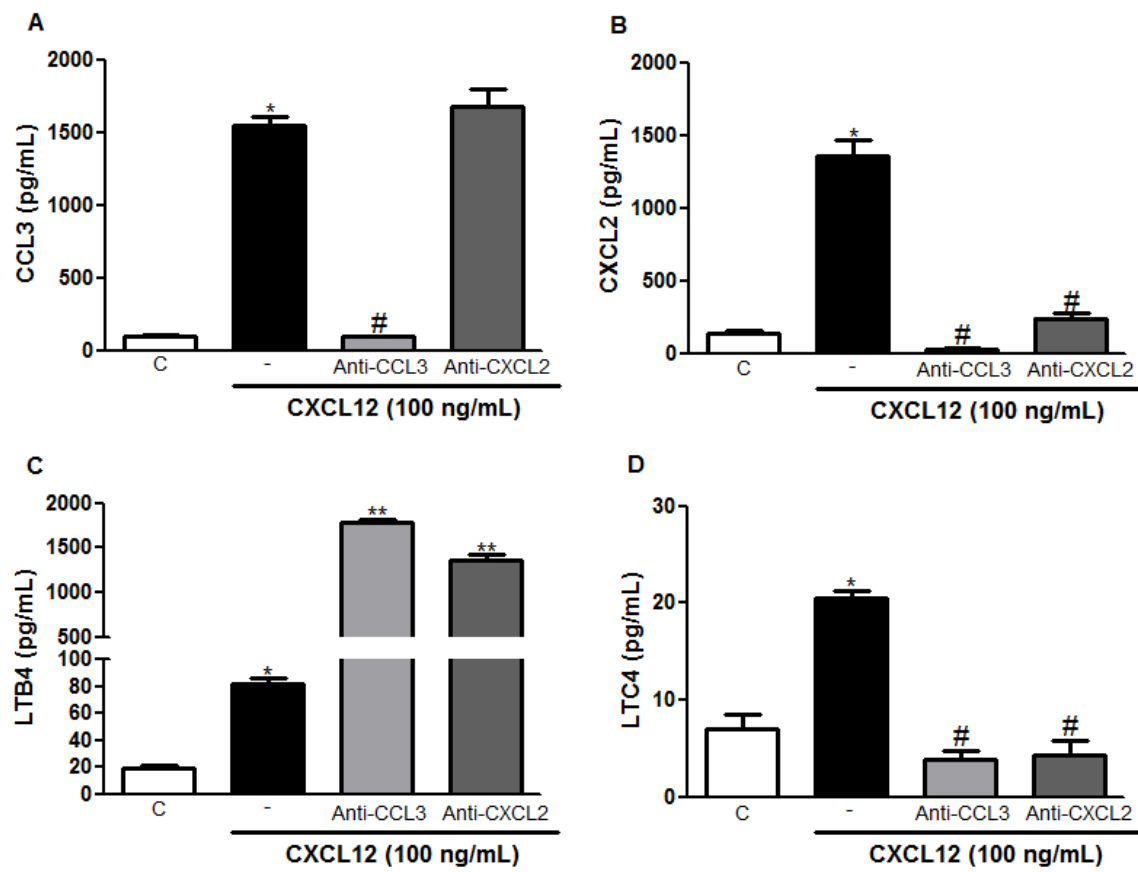


Fig. 4

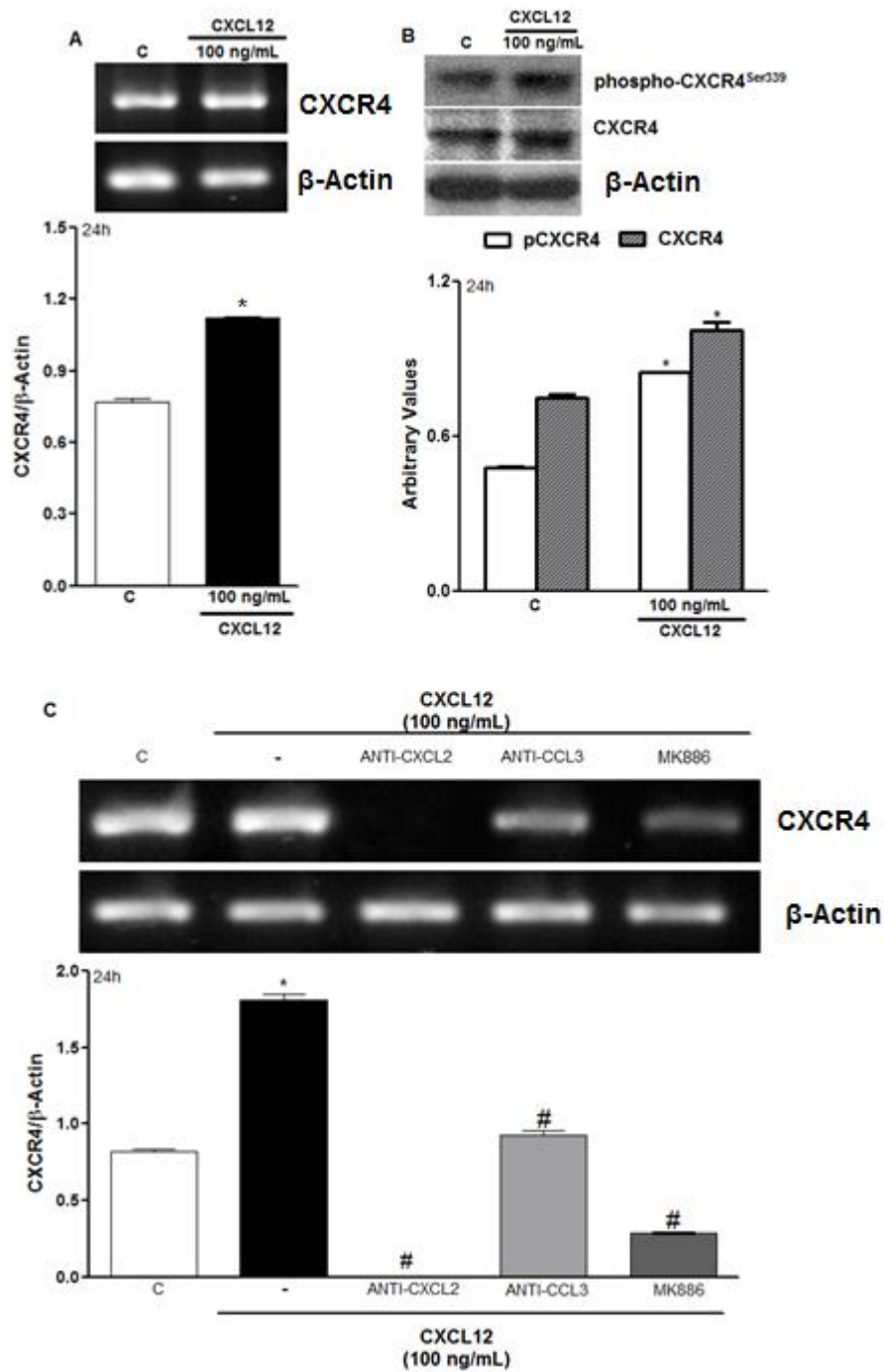


Fig.5

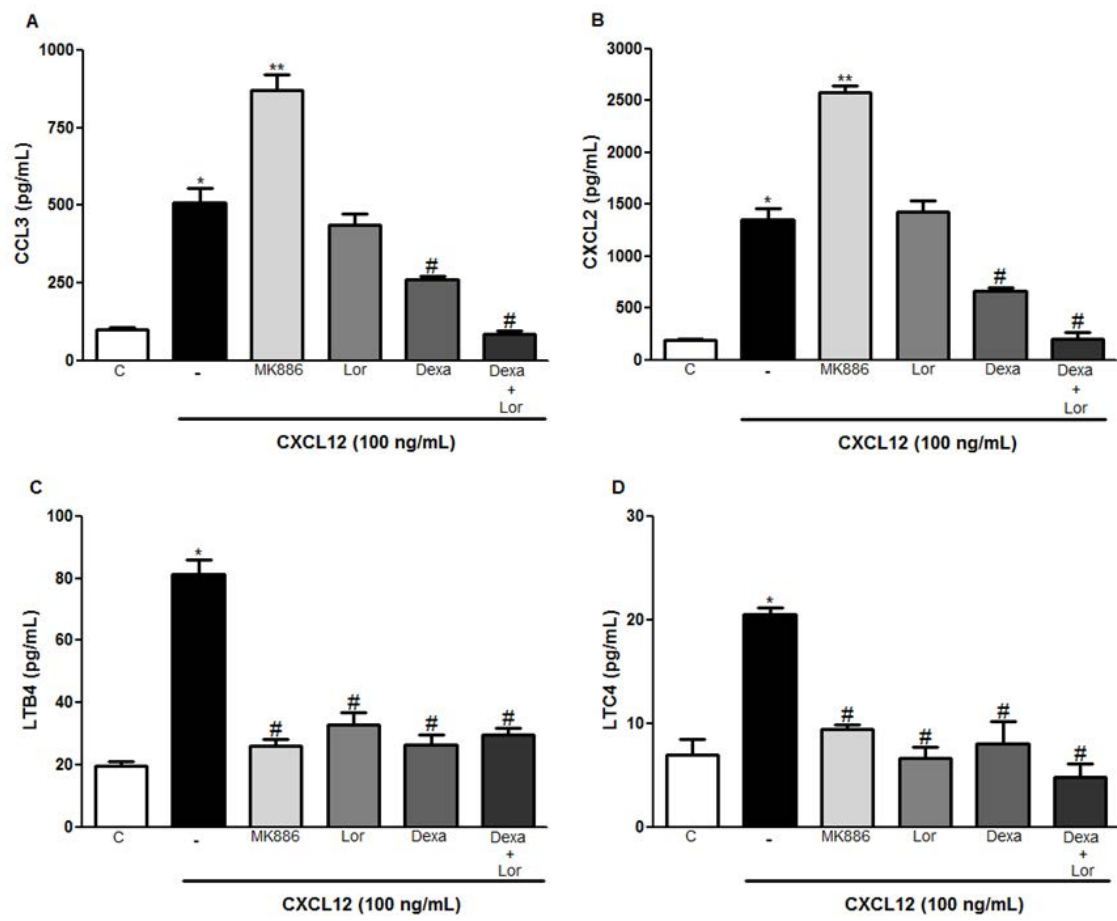




Fig.6

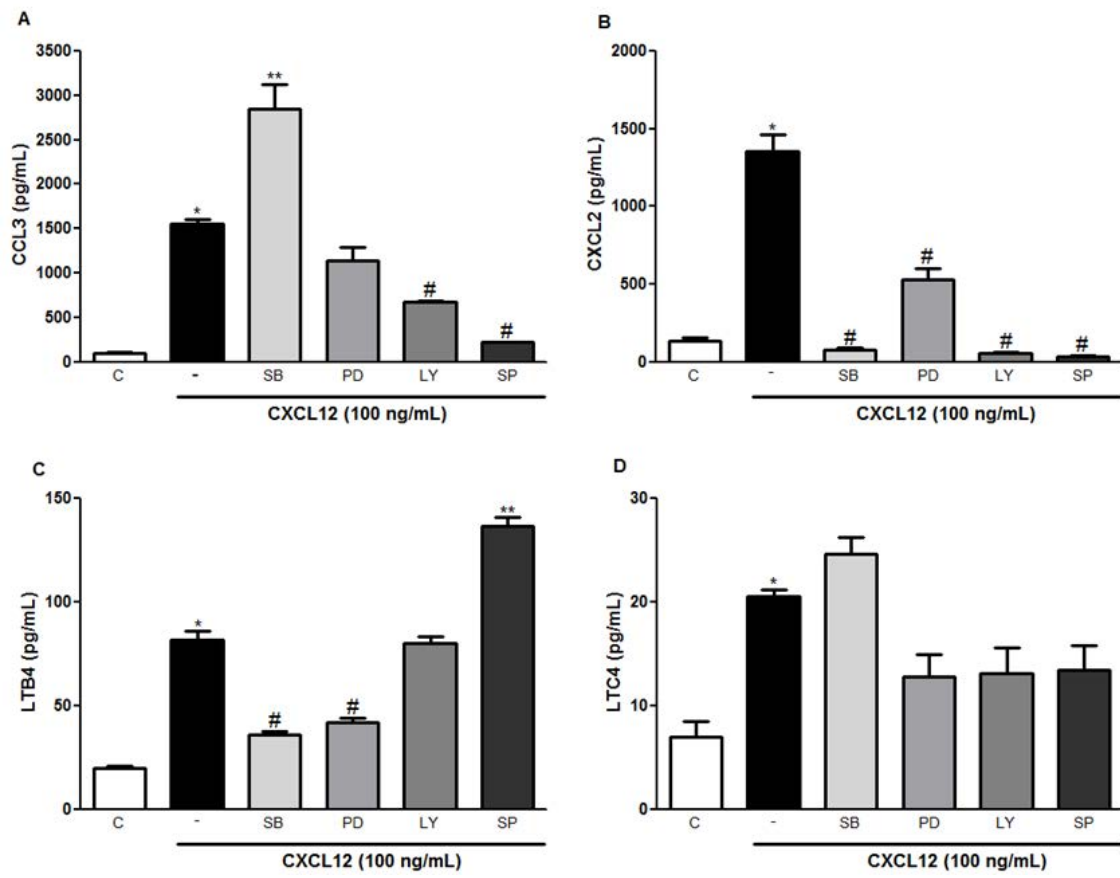


Fig.7

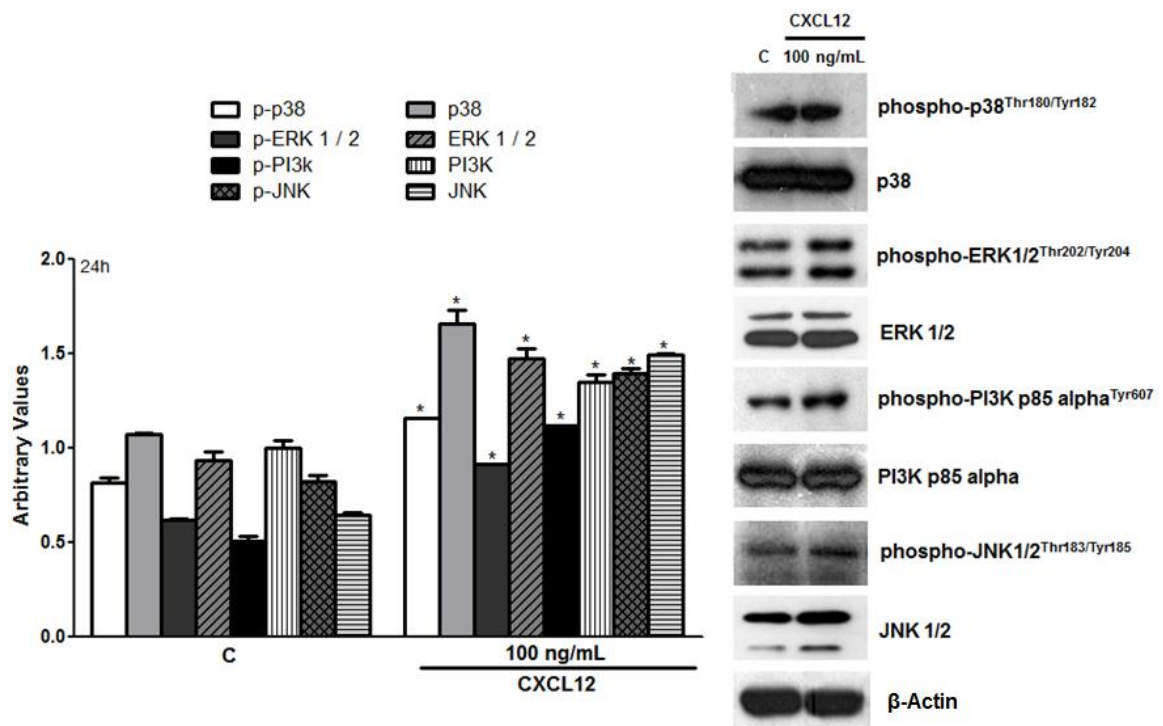
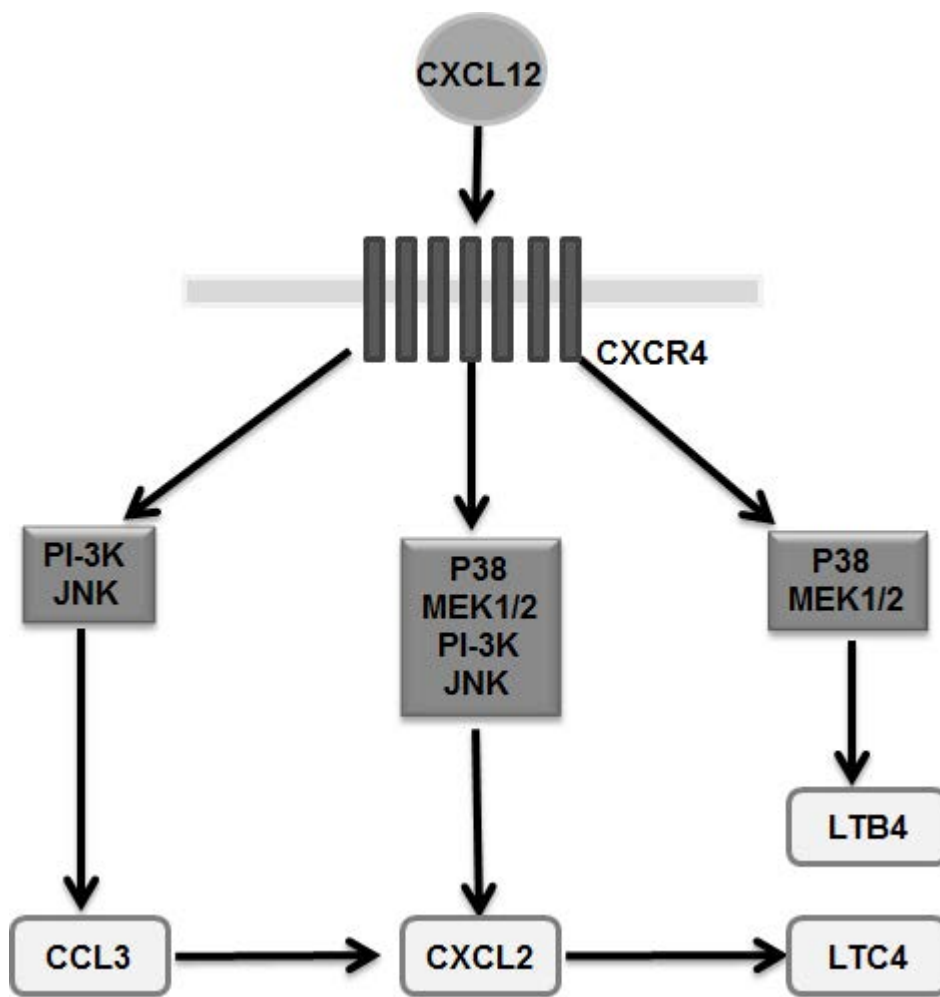


Fig. 8



***ANEXO B***  
***(COMITÊ DE ÉTICA)***



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

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)  
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto "Estudo dos mecanismos envolvidos na ativação de fibroblastos pulmonares de camundongos por CXCL12 (SDF-1)" sob responsabilidade da Pesquisadora **SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA** e colaboração de Taís Marolato Danilucci está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **FOA-0969-2012**.

**CERTIFICATE**

We certify that the research "Study of the mechanisms involved in the activation of mice pulmonary fibroblasts by CXCL12 (SDF-1)", process number **FOA-0969-2012**, under responsibility of **SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA** and with collaboration of Taís Marolato Danilucci agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

**Prof. Dr. EDILSON ERVOLINO**  
Coordenador da CEUA

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária  
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 – Vila Mendonça  
Tel: (18) 3636-3234 Fax (18) 3636-3333 E-mail: eervolino@foa.unesp.br

Catálogo na Publicação (CIP)  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

D186c Danilucci, Tais Marolato.  
CXCL12 estimula fibroblastos pulmonares a produzir  
CCL3, CXCL2, LTB4 e LTC4 via p38, MEK 1/2, PI-3K e  
JNK / Tais Marolato Danilucci. - Araçatuba, 2013  
132 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Quimiocina CXCL12 2. Receptores CXCR4 3. Fibro-  
blastos 4. Quimiocina CCL3 5. Quimiocina CXCL2 6. Leu-  
cotrienos I. T.

CDD 612