CAMILA LEINDECKER STUMM

**PAPEL ANTI-FIBRÓTICO DE PGE₂ E BMP-7
NA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

CAMILA LEINDECKER STUMM

**PAPEL ANTI-FIBRÓTICO DE PGE₂ E BMP-7
NA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Jancar Negro

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Stumm, Camila Leindecker.

Papel anti-fibrótico de PGE₂ e BMP-7 na asma alérgica experimental
/ Camila Leindecker Stumm. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Sonia Jancar Negro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunofarmacologia dos mediadores lipídicos.

Versão do título para o inglês: Anti-fibrotic role of PGE₂ and BMP-7 in experimental allergic asthma.

1. Asma alérgica 2. Vias aéreas 3. Fibrose 4. PGE₂ 5. BMP-7 I. Negro, Profa. Dra. Sonia Jancar II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB075/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Camila Leindecker Stumm.

Título da Tese: Papel anti-fibrótico de PGE₂ e BMP-7 na asma alérgica experimental.

Orientador(a): Profa. Dra. Sonia Jancar Negro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **049** nas fls. **45** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Sonia Jancar** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Estudos sobre os mecanismos que regulam o remodelamento das vias aéreas na inflamação alérgica**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Camila Leindecker Stumm e o pesquisador Richardt Gama Landgraf**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **17.05.2007**.

São Paulo, 18 de maio de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária -Suplente
CEEA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **200** nas fls. **116** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Sonia Jancar**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudos sobre mecanismos que regulam o remodelamento das vias aéreas na inflamação alérgica*" do qual participam o(s) aluno(s) **Camila Leindecker Stumm**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **13.12.2011**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 15 de dezembro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO-SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Sonia Jancar, que me aceitou em seu laboratório após nossa primeira conversa, mesmo sabendo que eu não tinha experiência com o estudo da Imunologia. Você é um grande exemplo de seriedade e dedicação, e agradeço imensamente por ter acreditado em mim.

Aos meus queridos colegas e amigos do Laboratório de Imunofarmacologia: Marina, Fio (Matheus), Mari Morato, Francisco, Jimmy (Luciano), Mari Koga, Marlise e Silvana. Obrigada pelos cafés, pelas brincadeiras, pelas discussões filosóficas-pessoais-existenciais-profissionais. Cada um de vocês é especial para mim. Obrigada pela companhia, pelo excelente ambiente de trabalho e por tornar a pós graduação mais leve.

Ao pessoal do laboratório do Dr. Marc Peters-Golden (Universidade de Michigan), onde fiz meu estágio de doutorado sanduíche. Scott, Anne, Tennille, Henrique, Alexandra, Steve, Katsuhide, Emilie, Teresa, Casey, Dave, Pete e Pryia. Lembro de todos vocês com um enorme carinho. São um exemplo de foco, equilíbrio, seriedade. Obrigada pelos ensinamentos, discussões, labmeetings, brainstorm, inputs e pelo esforço em me fazer companhia para beber meu café concentrado 10X.

Aos componentes da minha banca de qualificação, profs. Vera Capelozzi, Maria Sato e Celso Carvalho, pelas valiosas discussões e contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

À Prof. Mari Sogayar, do Laboratório de Terapia Celular e Molecular (Instituto de Química da USP), por tornar possível o tratamento *in vivo* com BMP-7 na asma. Obrigada também pela contribuição intelectual, discussões de protocolo e agradáveis conversas.

Ao Prof. Niels, que sempre está à disposição para discutir, sugerir e principalmente, para dar um “vortex” no nosso cérebro. Muito obrigada!

Aos demais colegas, ex-colegas e amigos do Departamento de Imunologia: Esther, Lili, Aninha, Lu Mirotti, Lorena, Michele, Bruna, Matheus, Tércio, Enio, Maristella, Richardt, Rosa, Reinaldo, Maíra, Clara, Juliana, Cíntia. Ao Mateus e Edson, novos integrantes do Lab. de Imunofarmacologia, boa sorte. Vocês estão em ótimas mãos.

À FAPESP pelo apoio financeiro do meu projeto.

À CAPES pelo financiamento do meu estágio de doutorado sanduíche na Universidade de Michigan.

À equipe do biotério de experimentação, pelo cuidado com os animais.

Ao Paulo do setor de histologia, pela presteza e paciência com a minha pressa.

À equipe da secretaria, Maria Eni, Jotelma, Amanda e João.

Ao pessoal da portaria, especialmente Milton e Otacílio, sempre tão simpáticos.

A todos os demais professores, funcionários e colegas pós-graduandos do Departamento de Imunologia do ICB/USP, pela agradável convivência.

À minha família: meus pais, Marlene e Luis Thadeu; meus irmãos, Carina e Diogo; meus cunhados, Ike e Carol, meu sobrinho Otávio, minha avó Nena, minha tia Tita. Meu muito obrigada a vocês que sempre estiveram torcendo por mim, comemorando minhas conquistas e me incentivando a seguir em frente. Mesmo sem, muitas vezes, entender o que é mesmo que eu faço. Sou imensamente grata pelo apoio e pela força que vocês sempre me deram.

Ao Luis Fernando, meu companheiro, meu porto seguro, que já me ajudou tanto a respirar fundo nos momentos difíceis. Muito obrigada meu anjo. Sou uma pessoa melhor ao teu lado.

A grandes amigos que, na pesquisa ou fora dela, estiveram sempre presentes ao longo desta trajetória: Renato Mayrinck, Luciane Candeloro, Lindsey Mack, Nahid Dadgar, Franciele Knebel, Bruno Cirne. "Friends are the family we choose for ourselves", and you are definitely part of mine.

À Luciane Capelo, Maria Cristina, tio Manuel e Uchida, que também são minha família.

Mais uma vez, a todos os camundongos que tornaram possível o desenvolvimento deste estudo, o meu profundo respeito.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo, Processo 07/01558-4.

Parte deste trabalho foi desenvolvida no Departamento de Medicina Interna da Universidade de Michigan, Estados Unidos, com bolsa do PDEE – Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior, processo BEX 4381-08-4. Durante este período, o estudo também recebeu suporte do NIH – *National Institutes of Health* – grant HL094311.

RESUMO

Stumm CL. Papel anti-fibrótico de PGE₂ e BMP-7 na asma alérgica experimental. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas e um dos eventos relevantes na sua patologia é a ativação local de fibroblastos pulmonares. A forma ativa, o miofibroblasto, sintetiza ativamente colágeno tipo I, que se deposita ao redor dos bronquíolos, processo denominado fibrose das vias aéreas. Esta ativação é induzida pelo TGF- β e este processo é regulado por moléculas anti-fibróticas que contêm o avanço da fibrose das vias aéreas. O objetivo deste trabalho foi o de elucidar mecanismos envolvidos na fibrose das vias aéreas em modelo de asma alérgica experimental. Para isto, utilizamos duas abordagens: na primeira parte, investigamos se a fibrose das vias aéreas na asma está relacionada com um defeito no eixo síntese/resposta da PGE₂. Estabelecemos um modelo animal de asma alérgica crônica e isolamos os fibroblastos pulmonares destes animais. Os fibroblastos dos animais asmáticos apresentaram uma intacta capacidade de responder à PGE₂ e seu análogo forskolina, no que diz respeito à inibição da síntese de colágeno e proliferação. Além disso, a expressão do receptor EP2 nos fibroblastos dos animais asmáticos é semelhante aos controles. Estas células, porém, apresentam uma perda tempo-dependente na sua capacidade de sintetizar PGE₂ sob estímulo com IL-1 β , e esta perda está relacionada a uma menor produção das enzimas sintéticas COX-2 e mPGEs-1. O tratamento *in vivo* com nimesulide, inibidor seletivo de COX-2, ao longo do protocolo de asma, causou uma piora no quadro de fibrose. Uma vez que a PGE₂ atua como um freio da fibrose no ambiente pulmonar, a perda da capacidade destas células em sintetizá-la pode estar implicada na fibrose das vias aéreas neste modelo. Na segunda parte do trabalho, estudamos a relação TGF- β 1/BMP-7 e sua relação com a fibrose das vias aéreas na asma alérgica experimental. Primeiramente, observamos que existe um predomínio da molécula pró-fibrótica TGF- β 1 sobre a molécula anti-fibrótica BMP-7 nos pulmões dos animais asmáticos. Em fibroblastos isolados dos animais controle e asmáticos, vimos que a BMP-7 é capaz de inibir a síntese de colágeno tipo I induzida pelo TGF- β 1 e as vias de Smad 2, Smad 3 e p38 que também são ativadas neste

contexto. O tratamento dos animais com BMP-7 durante o protocolo de asma causou diminuição significativa da deposição de colágeno ao redor dos bronquíolos destes animais. Estes resultados mostram que a BMP-7 tem ações anti-fibróticas no contexto da asma alérgica e que estas ações estão relacionadas com a regulação da atividade do TGF- β 1. Coletivamente, os resultados obtidos neste trabalho representam um avanço no entendimento dos mecanismos envolvidos no aparecimento da fibrose das vias aéreas, que pode futuramente contribuir para tradução da pesquisa básica até a prática clínica.

Palavras-chave: Asma alérgica. Vias aéreas. Fibrose. PGE₂. BMP-7.

ABSTRACT

Stumm CL. Anti-fibrotic role of PGE₂ and BMP-7 in experimental allergic asthma. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease of the airways and one of the key events in its pathology is the local activation of lung fibroblasts. The active form, the myofibroblast, actively synthesizes type I collagen, which accumulates around bronchi, a process called airway fibrosis. Activation is induced by TGF- β and this process is regulated by anti-fibrotic molecules which impair the fibrotic process in the airways. The main goal of this work was to elucidate mechanisms involved in airway fibrosis in a mouse model of experimental allergic asthma. We used two approaches: in the first part, we investigated if airway fibrosis in asthma correlates with a defect in the PGE₂ synthesis/response axis. We established a mouse model of chronic allergic asthma and isolated lung fibroblasts from these mice. Lung fibroblasts from asthmatic mice showed an intact capacity to respond to PGE₂ and its analog, forskolin, when we analyzed inhibition of collagen-I synthesis and proliferation. Besides, EP2 expression in asthmatic fibroblasts is similar to controls. These cells, however, present a time-dependent loss in their ability to upregulate PGE₂ production under IL-1 β stimulation, and this is accompanied by a reduced expression of the synthetic enzymes COX-2 and mPGEs-1. *In vivo* treatment with nimesulide, a selective COX-2 inhibitor, through the asthma protocol, caused worsening in the fibrotic process. Since PGE₂ acts as a brake on fibrosis in the lung environment, the loss in the ability of these cells to upregulate it could be implicated in fibrosis in this model. In the second part of this work, we studied the ratio TGF- β 1/BMP-7 and its relationship with airway fibrosis in experimental allergic asthma. First, we observed a predominance of the pro-fibrotic molecule TGF- β 1 over the anti-fibrotic molecule BMP-7 in the lungs of asthmatic animals. Using lung fibroblasts isolated from these animals, we saw that BMP-7 is capable of inhibiting TGF- β 1-induced collagen-I synthesis, as well as the Smad 2, Smad 3 and p38 pathways, which are also induced by TGF- β 1 in this context. *In vivo* treatment with BMP-7 through the asthma protocol caused a significant decrease in collagen deposition around small bronchi. These results show that BMP-7 has anti-fibrotic properties in allergic asthma and that these are related with regulation of TGF- β 1 activity.

Collectively, the results generated in this work represent an advance in understanding the mechanisms involved in the development of airway fibrosis, which can contribute, in the future, to the translation of basic research into the clinical practice.

Keywords: Allergic asthma. Airways. Fibrosis. PGE₂. BMP-7.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

WHO	Organização Mundial de Saúde – <i>World Health Organization</i>
AHR	Hiperresponsividade das vias aéreas – <i>airway hyperresponsiveness</i>
IL	Interleucina - <i>interleukin</i>
TGF	Fator de crescimento e transformação ou fator de transformação do crescimento – <i>transforming growth factor</i>
ECM	Matriz extracelular – <i>extracellular matrix</i>
COPD	Doença pulmonar obstrutiva crônica – <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
α-SMA	α -actina de músculo liso – <i>α-smooth muscle actin</i>
MMP	Metaloprotease de matriz – <i>matrix metalloprotease</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas – <i>platelet-derived growth factor</i>
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteases – <i>tissue inhibitors of metalloproteases</i>
AA	Ácido araquidônico – <i>arachidonic acid</i>
cPLA₂	Fosfolipase A ₂ citosólica – <i>cytosolic phospholipase A₂</i>
5-LO	5-lipoxigenase – <i>5-lipoxygenase</i>
PGEs	Sintases de prostaglandina E – <i>prostaglandin E synthases</i>
COX	Ciclooxigenase – <i>cyclooxygenase</i>
PG	Prostaglandina – <i>prostaglandin</i>
PGE₂	Prostaglandina E ₂ – <i>prostaglandin E₂</i>
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G – <i>G-protein coupled receptors</i>
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina – <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
PTEN	Homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10 – <i>phosphatase and tensin homolog on chromosome 10</i>
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinase – <i>phosphatidil inositol 3-kinase</i>
Epac-1	Proteína de troca ativada por cAMP-1 – <i>exchange protein activated by cAMP-1</i>
Rap-1	Proteína relacionada à Ras-1 – <i>Ras-related protein-1</i>

PKA	Proteína quinase A – <i>protein kinase A</i>
PKCδ	Proteína quinase C δ – <i>protein kinase C δ</i>
IPF	Fibrose pulmonar idiopática – <i>idiopathic pulmonary fibrosis</i>
MLFs	Fibroblastos pulmonares de camundongo – <i>mouse lung fibroblasts</i>
CysLT	Cisteinil leucotrienos – <i>Cysteinil leukotrienes</i>
BMP	Proteína morfogenética óssea – <i>bone morphogenetic protein</i>
LAP	Peptídeo associado de latência – <i>latency-associated peptide</i>
LTBP	Proteína de ligação ao TGF-β latente – <i>latent TGF-β binding protein</i>
ALK	Quinase do tipo receptor de activina – <i>activin receptor-like kinase</i>
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos – <i>mitogen-activated protein kinases</i>
OP-1	Proteína osteogênica-1 – <i>osteogenic protein-1</i>
Id	Inibidor de diferenciação – <i>Inhibitor of differentiation</i>
EMT	Transição epitélio-mesenquimal – <i>epithelial-mesenchymal transition</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Da inflamação ao remodelamento.....	25
Figura 2 -	Protocolo de asma alérgica 1.....	46
Figura 3 -	Células no BAL.....	47
Figura 4 -	Infiltrado peribronquiolar.....	48
Figura 5 -	Deposição de colágeno.....	49
Figura 6 -	Expressão de Colágeno I, EP2 e produção de PGE ₂ por fibroblastos pulmonares.....	50
Figura 7 -	Efeito da PGE ₂ e forskolina na produção de colágeno I e proliferação...	51
Figura 8 -	Síntese induzível de PGE ₂ e expressão de enzimas biossintéticas nos fibroblastos pulmonares do grupo C.....	52
Figura 9 -	Efeito do nimesulide sobre a deposição de colágeno nas vias aéreas....	53
Figura 10 -	Efeito do nimesulide sobre a deposição de colágeno tipo I nas vias aéreas.....	54
Figura 11 -	Protocolo de asma alérgica 2.....	55
Figura 12 -	Contagem total e diferencial das células recuperadas do lavado broncoalveolar.....	56
Figura 13 -	Muco nos bronquíolos dos grupos 2D e 6D.....	57
Figura 14 -	Expressão de α -SMA ao redor dos bronquíolos dos grupos 2D e 6D.....	57
Figura 15 -	Deposição de colágeno ao redor dos bronquíolos dos grupos 2D e 6D....	58
Figura 16 -	Imunomarcagem para colágeno tipo I ao redor dos bronquíolos dos grupos 2D e 6D.....	59
Figura 17 -	Expressão gênica de BMP-7 e TGF- β 1 no pulmão dos grupos 2D e 6D.....	60
Figura 18 -	TGF- β 1 no BAL de camundongos dos grupos 2D e 6D.....	61
Figura 19 -	Efeito inibitório da BMP-7 sobre a síntese de colágeno I induzida pelo TGF- β 1 em fibroblastos.....	62
Figura 20 -	Efeito inibitório da BMP-7 sobre as vias de sinalização de Smads em fibroblastos.....	64
Figura 21 -	Efeito inibitório da BMP-7 sobre vias de sinalização de MAPK em fibroblastos.....	65

Figura 22 - Efeito do tratamento com BMP-7 sobre o infiltrado celular no BAL.....	66
Figura 23 - Efeito do tratamento com BMP-7 sobre a deposição de colágeno nas vias aéreas.....	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 A inflamação das vias aéreas na asma	21
1.2 O remodelamento tecidual na asma.....	23
1.3 A fibrose das vias aéreas na asma	25
1.4 O eixo síntese/resposta da PGE₂ na fibrose	27
1.5 As moléculas TGF-β1 e BMP-7 na fibrose	29
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Reagentes.....	35
3.2 Animais.....	36
3.3 Indução da inflamação alérgica pulmonar	36
3.4 Sacrifício e coleta do lavado broncoalveolar	37
3.5 Contagem total e diferencial das células inflamatórias	37
3.6 Histologia	38
3.7 Histoquímica e imunohistoquímica	38
3.7.1 Histoquímica.....	38
3.7.2 Imunohistoquímica	39
3.8 Cultura primária dos fibroblastos pulmonares	39
3.9 Expressão protéica nos lisados celulares	40
3.10 Ensaio de MTT	41
3.11 Quantificação de PGE₂ e TGF-β1.....	41
3.12 Ensaio de proliferação	42
3.13 Real-time PCR semiquantitativo – lisados celulares	42
3.14 Real-time PCR semiquantitativo – homogenatos de pulmão.....	43
3.15 Tratamento <i>in vivo</i> com nimesulide	43
3.16 Tratamento <i>in vivo</i> com BMP-7	44
4 RESULTADOS	46
4.1 Papel anti-fibrótico da prostaglandina E₂ em modelo de asma experimental	46
4.1.1 Análise temporal do infiltrado celular e deposição de colágeno nos pulmões.....	46
4.1.2 Caracterização do eixo síntese/resposta da PGE₂ em fibroblastospulmonares	48
4.1.3 Efeito da inibição da síntese de prostaglandinas na deposição de colágeno <i>in vivo</i>	53
4.2 Papel anti-fibrótico da BMP-7 em modelo de asma experimental	54

4.2.1 Caracterização da inflamação pulmonar e expressão de marcadores de fibrose.....	55
4.2.2 A BMP-7 inibe a produção de colágeno I em fibroblastos pulmonares	61
4.2.3 A BMP-7 inibe vias de sinalização ativadas pelo TGF-β1 em fibroblastos pulmonares ..	63
4.2.4 Tratamento de animais asmáticos com BMP-7 recombinante inibe a fibrose das vias aéreas na asma	66
5 DISCUSSÃO	69
CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXO A – Artigo de periódico publicado	97

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma das doenças respiratórias crônicas mais comuns, afetando tanto crianças quanto adultos. É uma doença inflamatória das vias aéreas, caracterizada por broncoconstrição espontânea, difusa e variável em intensidade, e também por obstrução do fluxo aéreo em resposta a uma ampla variedade de estímulos endógenos e ambientais (1, 2). As manifestações clínicas da asma são ocasionais e podem incluir chiado ao respirar, tosse, dispnéia e sensação de aperto no peito. A asma vem sendo reconhecida como uma doença que contém múltiplos subfenótipos que diferem entre si quanto à severidade clínica, patologia, resposta à terapia e resultados a longo prazo (3, 4).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO – *World Health Organization*), dados de 2011 (5), quase 300 milhões de pessoas sofrem de asma ao redor do mundo, sendo que os países ocidentais apresentam a maior prevalência. A asma é, também, a doença crônica mais comum entre crianças. Nas últimas décadas, a incidência de asma aumentou dramaticamente, e a tendência é de que os números continuem a aumentar, com a estimativa do aumento de 100 milhões de pessoas asmáticas até o ano de 2025, com a urbanização e ocidentalização das populações (3, 6, 7).

Um fator importante que contribui para a alta incidência de asma é a natureza heterogênea de sua etiologia (1, 8). Um amplo espectro de estímulos ambientais e endógenos podem desencadear esta doença, incluindo estímulos alérgicos (*e.g.* pólen, resíduos de ácaro, pelos ou resíduos da pele de gatos, certas drogas ou químicos ocupacionais (1, 2, 9) e também estímulos não alérgicos (*e.g.* exercício ou frio) (2, 10). Grande parte dos quadros de asma são associados à alergia. Nesta revisão, vamos examinar os mecanismos envolvidos na inflamação e remodelamento na asma alérgica, que podem levar à fibrose das vias aéreas.

1.1 A inflamação das vias aéreas na asma

A inflamação crônica das vias aéreas resulta em alterações estruturais decorrentes da resposta de reparo tecidual e é um fenômeno biológico bem documentado. Na asma alérgica há um infiltrado inflamatório rico em linfócitos, eosinófilos, mastócitos, neutrófilos e macrófagos (11) que caracteriza o quadro inflamatório da via aérea asmática.

Em indivíduos predispostos, a exposição inicial das células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) ao alérgeno leva à ativação preferencial de células Th2 antígeno específicas e síntese de IgE, o que é conhecido como sensibilização alérgica. Exposições subseqüentes ao alérgeno causam o recrutamento e ativação de células inflamatórias e liberação de mediadores que são responsáveis pela resposta alérgica precoce (aguda) e respostas tardias. Na resposta aguda, os mastócitos sensibilizados por IgE desgranulam, liberando tanto mediadores pré-formados quanto recém sintetizados. Estes incluem histamina, mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos e PAF) e citocinas, que promovem aumento da permeabilidade vascular, contração do músculo liso e produção de muco. Citocinas e quimiocinas produzidas por vários tipos celulares dirigem o recrutamento de células inflamatórias que contribuem para a resposta alérgica tardia, que é caracterizada pelo influxo de eosinófilos e células Th2. Os eosinófilos liberam uma grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios, incluindo cisteinil leucotrienos e proteínas presentes em seus grânulos (peroxidase eosinofílica, ribonucleases, desoxirribonucleases, proteínas básicas), além de citocinas como IL-3, IL-5 e IL-13. Os linfócitos Th2 produzem IL-4 (interleucina-4), IL-5 e IL-13 (12). A superexpressão de interleucinas do tipo Th2 em modelos animais pode levar à fibrose das vias aéreas na asma. A superexpressão de IL-13 resultou em fibrose subepitelial, metaplasia das células caliciformes e um infiltrado celular rico em eosinófilos e macrófagos (13). A superexpressão de IL-5 levou a uma grande eosinofilia das vias aéreas, bem como elevada produção de muco e fibrose subepitelial (14). Já em animais que superexpressavam IL-4, a fibrose subepitelial não se mostrou tão acentuada e até mesmo ausente, apesar de haver eosinofilia e superprodução de muco (15, 16). O impacto de mastócitos e eosinófilos no remodelamento se baseia em seus efeitos na função de barreira, proliferação e descamação epitelial, e na formação de células caliciformes (17). Isso indica que o remodelamento anormal das vias aéreas na asma deve-se, ao menos em parte, à inflamação crônica do tipo Th2. Este remodelamento anormal leva a alterações estruturais na parede das vias aéreas que pode progredir para fibrose com declínio da função pulmonar.

Há, ainda, evidências de que os linfócitos Th1 podem também contribuir para algumas características patogênicas nos pacientes que sofrem de formas crônicas de atopia, tais como apoptose epitelial e ativação das células musculares lisas. Os linfócitos T reguladores podem suprimir algumas respostas Th2, enquanto os linfócitos Th17 parecem

estar especificamente associados com os eventos dependentes de neutrófilos na inflamação alérgica.

1.2 O remodelamento tecidual na asma

O termo “remodelamento das vias aéreas” pode se referir às alterações estruturais normais que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário dos pulmões ou às alterações decorrentes de lesão nas vias aéreas que visam o reparo tecidual. Na asma, a inflamação crônica das vias aéreas pode levar a transformações anormais na composição da parede da via aérea. As alterações estruturais características do remodelamento das vias aéreas na asma incluem metaplasia das células caliciformes (que determina aumento na produção de muco), hiperplasia e hipertrofia da camada de músculo liso, fibrose subepitelial e angiogênese aumentada (ver Figura 1) (18-20). Como consequência, a função pulmonar em pacientes asmáticos diminui (21). Até o momento, os mecanismos que levam à fibrose são pouco conhecidos, mas há um consenso de que ela se estabelece por desregulação dos mecanismos fisiológicos de reparo tecidual. Os linfócitos Th2, conhecidos pelo seu papel na indução alérgica, também contribuem para o remodelamento das vias aéreas induzindo a hipertrofia/hiperplasia das células musculares lisas e a metaplasia das células epiteliais (22, 23). O infiltrado eosinofílico visto na inflamação alérgica resulta em níveis elevados de TGF- β (TGF – fator de crescimento e transformação) derivado destas células (22), uma potente citocina pró-inflamatória conhecida por estimular a diferenciação de fibroblastos e aumentar a síntese de colágeno, levando à fibrose subepitelial e consequente endurecimento das paredes broncoalveolares (24). Também os mastócitos podem contribuir para o remodelamento das vias aéreas através da liberação de mediadores inflamatórios como triptase, histamina e outras citocinas (25).

Uma das características mais marcantes da patologia da asma é a deposição de componentes da ECM (matriz extracelular) localizada na camada subepitelial dos bronquíolos, processo chamado de fibrose das vias aéreas ou fibrose da camada basal reticular (ou ainda, lâmina reticular). O espessamento desta camada é característico da asma e ocorre precocemente no processo patológico da doença, não sendo visto em outras doenças pulmonares como COPD (doença pulmonar obstrutiva crônica) ou bronquite crônica (26). Os componentes da matriz extracelular depositados na região consistem em colágeno

tipo I, III e V, fibronectina, tenascina, lumican e proteoglicanos (27-30). Esta deposição contribui para o espessamento da parede, subsequente redução na distensibilidade das vias aéreas e limitação do fluxo de ar (31).

As principais células efetoras da excessiva deposição de moléculas da ECM são os fibroblastos, o principal tipo de célula mesenquimal pulmonar (32). Biópsias de vias aéreas de indivíduos asmáticos mostram números elevados de fibroblastos quando comparados com sujeitos normais (33), e isto foi correlacionado com maior fibrose da camada subepitelial. Sob a influência de dano epitelial e citocinas como o TGF- β 1, os fibroblastos podem se diferenciar em sua forma bioativa, o miofibroblasto, o qual tem função secretora e contrátil e expressa α -SMA (α -actina de músculo liso), reconhecido atualmente como um dos marcadores de ativação deste tipo celular. Além da secreção de colágeno, os miofibroblastos também produzem mais TGF- β 1, assim prolongando ainda mais o processo fibrótico. O aparecimento de miofibroblastos hiperplásicos na região subepitelial em indivíduos asmáticos e em modelos animais de asma têm sido amplamente descritos (34-36). Porém, a origem e o destino destas células não são completamente entendidos. Células com este fenótipo aparecem cedo após o desafio antigênico, possivelmente implicando uma célula precursora que adquire o fenótipo de miofibroblasto sem se dividir (35). Os miofibroblastos são os principais produtores de moléculas da matriz colágena e não colágena. Eles possivelmente desempenham um papel similar na asma, uma vez que o número de miofibroblastos presentes na camada submucosa se correlaciona com a deposição de colágeno subepitelial (36).

Figura 1 - Da inflamação ao remodelamento

A asma envolve uma progressão de eventos agudos (a) como a ativação de mastócitos induzida pelo alérgeno, causando a liberação de citocinas e mediadores pró-inflamatórios que levam a broncoconstrição aguda e obstrução das vias aéreas para a inflamação crônica (b), caracterizada pela ativação de células Th2 e macrófagos, e o recrutamento e desgranulação de eosinófilos. As alterações nas vias aéreas causam não somente obstrução do fluxo de ar mas também aumento na responsividade brônquica. Finalmente, em alguns indivíduos, há uma progressão das alterações inflamatórias em direção ao remodelamento das vias aéreas (c), o que pode causar alterações permanentes na arquitetura da via aérea de forma que os eventos que causam obstrução são irreversíveis.

Fonte: Modificado de (37)

1.3 A fibrose das vias aéreas na asma

As respostas inflamatórias agudas quebram a integridade do endotélio/epitélio pulmonar, levando ao edema e recrutamento de leucócitos. O processo de resolução da inflamação pela fagocitose de células alteradas e restos celulares causa mínima destruição e restabelece a arquitetura normal do tecido. Entretanto, muitas condições de fibrose pulmonar tem em comum a persistência do estímulo, como é o caso do alérgeno na asma. Portanto, a fibrose seria causada por uma desregulação no processo de reparo, ocorrendo caracteristicamente quando a síntese de colágeno pelos miofibroblastos excede a taxa na qual ele é degradado, de forma que o montante de colágeno aumente ao longo do tempo.

A fibrose, portanto, é um fenômeno decorrente de inflamação crônica – definida como uma resposta persistente na qual a inflamação e o remodelamento tecidual

acontecem simultaneamente. As doenças fibróticas normalmente têm em comum um agente irritante persistente que sustenta a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas fibrogênicas, os quais estimulam a deposição de elementos do tecido conjuntivo que modificam progressivamente a arquitetura normal do tecido (38-40). Durante o processo de remodelamento, os macrófagos têm papel central na remoção das células alteradas e de restos celulares. Os linfócitos Th2 que migraram para o tecido secretam citocinas pró-fibróticas como o TGF- β , que ativa fibroblastos (41, 42). Os fibroblastos ativados se transformam em miofibroblastos que expressam α -SMA. Após a ativação, os fibroblastos promovem a contração da ferida e, finalmente, as células epiteliais se dividem e migram sobre as camadas basais para regenerar o tecido danificado, completando então o processo de reparação. No entanto, a inflamação e o reparo crônicos podem desencadear um acúmulo excessivo de componentes da ECM, o qual leva à formação de uma cicatriz fibrótica permanente. A degradação de colágeno e o remodelamento da ECM são regulados por várias MMPs (metaloproteases de matriz) e seus inibidores, incluindo os inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs). Variações entre síntese e catabolismo da ECM regulam o aumento ou diminuição do colágeno total na área danificada (43).

Dados provenientes de estudos funcionais suportam a idéia de que as alterações estruturais contribuem para a hiperresponsividade das vias aéreas, amplificando a obstrução do fluxo de ar (44, 45). Além disso, o papel das vias aéreas pequenas em produzir obstrução do fluxo de ar parece ser maior que o das vias grandes (46, 47). Estudos utilizando tecido pulmonar dissecado (48-50), espécimens de autópsias (51-53) e biópsias transbrônquicas (54, 55) indicam que ocorrem alterações estruturais similares, porém mais severas, nas vias aéreas menores (52, 56) e no parênquima pulmonar (54) de pessoas asmáticas. Esta descoberta foi de extrema importância, uma vez que o volume total e a superfície combinada da área das vias aéreas pequenas é muito maior que a superfície da área das vias aéreas maiores (57), resultando em um esforço em desenvolver melhores tecnologias de inalação de maneira a melhorar a distribuição dos agentes anti-inflamatórios na terapia pulmonar.

1.4 O eixo síntese/resposta da PGE₂ na fibrose

Os eicosanóides (*eicosa* – do grego, vinte) são um grupo de mediadores lipídicos derivados do metabolismo de um ácido graxo de 20 carbonos chamado ácido araquidônico (AA). Após sua liberação dos fosfolipídeos de membrana pela ação da enzima fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂), o ácido araquidônico é também metabolizado pelas enzimas 5-lipoxigenase (5-LO), dando origem aos leucotrienos, ou pela via das ciclooxygenases (COX), originando os prostanóides (58). As ciclooxygenases, também conhecidas como sintases de prostaglandina H, são enzimas que catalisam duas reações sequenciais: 1) a bis-oxigenação do AA levando à produção de PGG₂ e 2) a redução do 15-hidroperóxido da PGG₂, levando à formação de PGH₂ (59). Duas isoformas de COX, COX-1 e COX-2, são encontradas em mamíferos. De maneira geral, considera-se que a COX-1 é expressa constitutivamente em vários tipos celulares, enquanto a COX-2 é induzível por estímulo e tem sido implicada em processos patológicos, como inflamação, dor, febre e câncer (60). As PGEs (sintases de prostaglandina E) foram descritas pela primeira vez em 1999 (61) e são enzimas que têm a habilidade de catalisar a conversão de PGH₂ em PGE₂ (prostaglandina E₂). A mPGEs-1 é induzida em resposta a vários estímulos e age após a COX-2 na geração de PGE₂ (61-64). Quando COX-2 e mPGEs-1 são transfectadas em células HEK293, grandes quantidades de PGE₂ são sintetizadas a partir de AA endógeno e exógeno, em comparação com cada enzima transfectada separadamente (65). Comparativamente, o acoplamento entre COX-1 e mPGEs-1 é observado somente quando quantidades muito altas de AA estão presentes. Este estudo sugere que a geração de PGE₂ pela mPGEs-1 ocorre predominantemente pela via dependente de COX-2. A COX-2 e a mPGEs-1 se colocalizam na membrana perinuclear (65). A colocalização das duas enzimas biossintéticas no mesmo compartimento subcelular pode permitir a transferência eficiente da PGH₂, que é um substrato instável, da COX-2 para a mPGEs-1.

A PGE₂ é o principal eicosanóide produzido pelos fibroblastos (66-68) e exerce uma gama de ações que contribuem tanto para a homeostase quanto para a doença. Apesar de sua reputação como mediador pró-inflamatório em vários contextos, as ações da PGE₂, especificamente no ambiente pulmonar, se opõem à inflamação e à fibrogênese (69). A PGE₂ exerce ações inibitórias sobre fibroblastos pulmonares, inibindo a proliferação destas células (70, 71), e causa redução nos níveis de colágeno tanto pela redução da síntese (72-74)

quanto pelo aumento de sua degradação (75), diminuindo também a produção da enzima lisil-oxidase, o que leva a uma diminuição na organização extracelular das moléculas de colágeno (76). A PGE_2 também inibe a migração (77, 78) e sobrevivência (79) de fibroblastos, bem como sua ativação em miofibroblastos (80). Ela age de forma parácrina ou autócrina, ligando-se a 4 tipos diferentes de GPCRs (receptores transmembrana acoplados à proteína G) - EP1 a EP4 (81), os quais ativam diferentes vias de sinalização intracelular. A ligação da PGE_2 aos receptores EP2 e EP4 (acoplados à proteína G_s) aumenta os níveis intracelulares de cAMP (monofosfato cíclico de adenosina) (82, 83). A sinalização via EP1 (acoplado a G_q) aumenta os níveis intracelulares de Ca^{++} (84). O receptor EP3 (acoplado a G_i) causa diminuição nos níveis intracelulares de cAMP (85). Quase todos os efeitos inibitórios da PGE_2 sobre fibroblastos pulmonares são mediados pela sua ligação ao receptor EP2 (78, 80, 86) e subsequente habilidade de elevar os níveis intracelulares de cAMP. A partir daí, dependendo de qual efector de cAMP será ativado posteriormente, determina-se uma ou outra função celular de PGE_2 . Em fibroblastos pulmonares, em humanos ou em modelo animal de fibrose, algumas das vias de PGE_2 que geram inibição da fibrose foram dissecadas. A migração de fibroblastos, por exemplo, é inibida através do aumento da atividade de PTEN (homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10), que por sua vez se opõe à ação de PI3K (fosfatidil inositol-3-kinase) (78). Em fibroblastos fetais humanos, foi demonstrado que a PGE_2 tem função inibitória sobre a proliferação devido exclusivamente à ativação de Epac-1 (proteína de troca ativada por cAMP), que aumenta a atividade da GTPase Rap-1 (proteína relacionada à Ras-1) (87). Já a inibição da síntese de colágeno pela PGE_2 acontece através de outro efector do cAMP, PKA (proteína quinase A), que inibe a ação de PKC- δ (proteína quinase C delta) (87), conhecida por promover a síntese de colágeno em fibroblastos (88).

No entanto, já foi demonstrado que os fibroblastos pulmonares isolados de alguns pacientes com fibrose pulmonar idiopática (IPF) sintetizam uma menor quantidade de PGE_2 e da enzima responsável pela sua biossíntese, COX-2, sob estímulo, quando comparadas a fibroblastos de indivíduos normais (89). Estas células também manifestam resistência às ações supressoras da PGE_2 (86), devida em parte a uma diminuída expressão do receptor EP2 (86). O mesmo defeito foi observado em fibroblastos pulmonares de camundongo (MLFs) com fibrose pulmonar induzida por bleomicina (90). Entretanto, o efeito da PGE_2 em fibroblastos pulmonares de asma alérgica não é conhecido.

1.5 As moléculas TGF- β 1 e BMP-7 na fibrose

A superfamília do TGF- β compreende um grande grupo de moléculas estruturalmente relacionadas que participam da regulação de uma variedade de processos celulares, incluindo progressão do ciclo celular, diferenciação celular, função reprodutiva, desenvolvimento tecidual, adesão, crescimento neuronal, morfogênese óssea, cicatrização e respostas imunes (91-94). A importância evolutiva desta família é destacada pela conservação destas moléculas através das espécies. Em mamíferos, a superfamília do TGF- β pode ser dividida em três subfamílias: 1) TGF- β ; 2) activinas/inibinas e 3) BMPs (proteínas morfogênicas ósseas) (95, 96). O TGF- β é sintetizado como parte de uma grande molécula, o pró-TGF- β , que contém os peptídeos associados de latência (LAP). Estes são clivados do TGF- β no complexo de Golgi, mas permanecem não covalentemente associados a ele. As proteínas de ligação ao TGF- β latente 1/2 (LTBP 1/2) conectam este complexo à matriz extracelular (97). A liberação do TGF- β do complexo pró-TGF- β ocorre pela atividade proteolítica da plasmina (98) de metaloproteases de matriz como MMP-2 e MMP-9 (99), através de integrinas (100-102), tratamento com ácidos leves (103) ou pela ação da trombospondina (104), fatores que causam a ruptura das ligações não-covalentes entre o LAP e o TGF- β 1. A sinalização do TGF- β ocorre via ligação aos receptores tipo I (também conhecido como ALK-5 – quinase do tipo receptor de activina) (105-107) e tipo II (T β RII) (108), e desencadeia uma cascata de sinalização que pode ser dependente ou independente de Smads (109). Classicamente, a ligação do TGF- β ao seu receptor desencadeia a fosforilação de Smad 2 e Smad 3, mas existem outras vias, menos estudadas, que são também ativadas por esta ligação, como as vias de MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos). O TGF- β pode induzir a fosforilação de Erk, JNK e p38 MAPK, mas tanto os mecanismos de ativação quanto as consequências biológicas ainda são pouco caracterizados. Existem, no entanto, descrições do envolvimento destas vias de sinalização em quadros de fibrose e em modelos animais de doenças fibróticas (110-114), assim como no remodelamento das vias aéreas na asma (115, 116).

Desde a primeira identificação da BMP-7 (antes conhecida como OP-1 ou proteína osteogênica-1) como um fator envolvido na formação óssea em 1990 (117), este membro da superfamília do TGF- β tem atraído muita atenção da comunidade científica. A BMP-7 age, fisiologicamente, como um fator de morfogênese e sobrevivência no desenvolvimento dos

rins, ossos e olhos. Camundongos deficientes do gene para BMP-7 (*knockouts*) exibem um desenvolvimento retardado dos rins, e morrem cedo após o nascimento (118, 119). A função fisiológica precisa desta proteína nos rins e outros órgãos não foi completamente caracterizada, mas estudos indicam que a BMP-7 seja um regulador endógeno da homeostase e regeneração dos órgãos (120, 121). Além disso, com a descoberta de que a BMP-7 recombinante (rBMP-7) reduz a severidade da injúria decorrente da falência renal aguda e crônica (122) por contrapor as ações pró-fibróticas do TGF- β 1, esta molécula se tornou um alvo atraente como modulador das ações do TGF- β 1 em doenças agudas e crônicas. Atualmente é aceito que, no tecido normal, existe um balanço entre o TGF- β 1 biologicamente ativo e a BMP-7, que se desloca na direção do TGF- β 1 durante a inflamação e a fibrogênese em doenças renais e hepáticas (123, 124).

Além da importância da BMP-7 na fisiologia e patologia renais, tem sido demonstrado que a regeneração do fígado também é afetada por esta citocina multifuncional. A administração sistêmica de anticorpos que neutralizam a BMP-7 endógena após a hepatectomia em camundongos resultou em uma regeneração hepática debilitada. Já a administração de rBMP-7 levou a uma melhor regeneração (96).

Experimentos *in vitro* revelam que a BMP-7 inibe fenômenos decorrentes da sinalização de TGF- β 1 através da indução de Id2 (inibidor de diferenciação), Id3 e Smad 6 (125-127). Estes estudos demonstraram que a BMP-7 aumenta a expressão de Smad 6 e proteínas Id em diversos sistemas celulares, os quais levam diretamente ao bloqueio da expressão de colágeno. A função da BMP-7 como molécula anti-fibrótica que inibe a síntese de colágeno em fibroblastos pulmonares de camundongo já foi relacionada com aumento da expressão e atividade de Id2 (127). Da mesma forma, a inibição da atividade de BMP-7 pelo seu antagonista Gremlin causa piora no quadro de fibrose pulmonar induzida por asbestos em modelo animal (128), e ela regula a ativação dos fibroblastos pulmonares humanos (129). Foi demonstrado também que em outros processos relacionados à fibrose, como a EMT (transição epitélio-mesenquimal), a BMP-7 exerce uma função antagonista ao TGF- β 1 diretamente através da inibição da via de Smad 3 (130). Também já foi demonstrado seu papel na contenção da EMT no epitélio do cristalino, envolvendo inibição da translocação nuclear de Smad 2 e Smad 3 (131). Foi observado que pacientes com fibrose hepática apresentam níveis elevados de BMP-7 e TGF- β 1 no plasma e portanto a determinação dos níveis de BMP-7 no plasma, por si só, não pode ser usada como parâmetro indicativo de

fibrogênese hepática (132-134). Porém, outros estudos sugerem que a relação TGF- β 1/BMP-7 pode ser potencialmente promissora para estimar a progressão da fibrose hepática (135, 136). Estes dados mostram que a análise da relação TGF- β 1/BMP-7 pode ter valor preditivo na avaliação da progressão da fibrose hepática. Uma diminuição nesta relação pode indicar pacientes com lenta progressão, e um aumento pode indicar uma progressão mais rápida (124, 137). Seria relevante avaliar esta relação em outros modelos de fibrose.

2 OBJETIVOS

O remodelamento das vias aéreas que ocorre na asma alérgica é caracterizado por alterações estruturais no tecido pulmonar, entre elas a deposição de colágeno ao redor dos bronquíolos, caracterizando um processo de fibrose das vias aéreas. Ele é causa de complicações, uma vez que leva ao espessamento da parede bronquiolar, subsequente redução na distensibilidade das vias aéreas e limitação do fluxo de ar. Portanto, uma melhor compreensão do desbalanço molecular durante o remodelamento das vias aéreas na asma é relevante e pode levar ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. O desbalanço molecular durante o processo de remodelamento das vias aéreas envolve moléculas pró- e anti-fibróticas. Nos últimos anos, as ações pró-fibróticas do TGF- β 1 têm sido bastante estudadas, mas menos atenção tem sido dada ao estudo das moléculas anti-fibróticas, que são igualmente importantes. Neste sentido, alguns estudos mostram que a PGE₂ age como molécula anti-fibrótica no ambiente pulmonar. Esta ação da PGE₂ se deve a seus efeitos inibitórios sobre fibroblastos pulmonares e, especificamente, sobre a proliferação, migração, diferenciação/ativação e a síntese de colágeno por estas células. Na fibrose idiopática, os fibroblastos isolados do pulmão de pacientes apresentam resistência à ação anti-fibrótica da PGE₂. O mesmo foi observado em modelos experimentais desta doença, por inoculação de bleomicina no pulmão. Porém, na asma alérgica, isto nunca foi estudado. Outra molécula antifibrótica, a BMP-7, exerce funções anti-fibróticas e tem sido implicada na manutenção da homeostase renal e hepática. Alguns estudos mais recentes envolvem esta molécula na inibição das funções de fibroblastos pulmonares, porém as descrições desta molécula ou seu receptor na asma serem bastante escassas. **Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de estudar a modulação da fibrose das vias aéreas na asma experimental por PGE₂ e BMP-7.**

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

A Ovalbumina grau V (OVA) e albumina sérica bovina (BSA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). O hidróxido de alumínio (ImJect Alum Adjuvant) foi adquirido da Thermo Scientific (Waltham, MA, Estados Unidos) e o Rehydragel HPA foi adquirido da Reheis INC. (Berkeley Heights, NJ, Estados Unidos). O meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) e o composto penicilina/streptomicina foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos). O soro bovino fetal foi obtido da Hyclone (Logan, UT, Estados Unidos) e da Gibco (Grand Island, NY, Estados Unidos). PGE₂ e forskolina foram obtidos da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, Estados Unidos). A [³H]-timidina foi obtida da GE Healthcare (Piscataway, NJ, Estados Unidos). Os kits de ELISA para PGE₂ foram obtidos da Cayman Chemical e da Assay Designs (Ann Arbor, MI, Estados Unidos). IL-1β foi obtida da Thermo Scientific, TGF-β1 da R&D Systems (Minneapolis, MN, Estados Unidos) e da Abcam (Cambridge, MA, Estados Unidos) e o kit de ELISA para TGF-β1 da eBioscience (San Diego, CA, Estados Unidos). A BMP-7 recombinante utilizada nas culturas celulares foi obtida da Invitrogen, enquanto a BMP-7 administrada nos experimentos *in vivo* (138) foi uma generosa doação do grupo chefiado pela Dra. Mari Sogayar do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. [³H]timidina foi obtida da GE Healthcare (Piscataway, NJ, Estados Unidos), e o reagente quimioluminescente (ECL) foi obtido da GE Healthcare e da Thermo Scientific. Os anticorpos usados para imunohistoquímica e suas fontes são os seguintes: anticorpo anti-Colágeno I e anti-α-SMA (AbCam); anti-fibronectina (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, Estados Unidos). Os anticorpos usados para immunoblotting e suas fontes são os seguintes: anti-colágeno I, Cedarlane Laboratories (Burlington, ON, Canada) e Abcam; COX-2 e mPGEs-1, Cayman Chemical; α-tubulina e β-actina, Sigma-Aldrich; GAPDH, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, Estados Unidos); anti-fosfo-p38 MAPK e p38 MAPK; anti-fosfo-Smad 2, fosfo-Smad 3 e Smad 2/3 e anti-fosfo-Erk 1/2 e Erk 1/2, Cell Signaling Technology (Beverly, MA, Estados Unidos). O nimesulide foi adquirido da Sigma-Aldrich. Os anticorpos secundários para revelação foram obtidos da Sigma-Aldrich e da Cell Signaling Technology.

3.2 Animais

Na primeira parte do trabalho, camundongos Balb/c fêmeas entre 5 e 7 semanas de idade (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, Estados Unidos) foram mantidos em condições SPF (*specific pathogen free*) em caixas com filtros na tampa. Antes e após a manipulação dos animais, estes foram mantidos no biotério, acondicionados em caixas coletivas, contendo no máximo cinco animais por caixa, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22 °C, com comida e água *ad libitum*. O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Michigan aprovou estes experimentos. Na segunda parte dos experimentos, o manuseio dos animais foi conforme a lei federal 6638 de 1979 que regulamenta o emprego de animais em experimentação científica, após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo. Foram usados camundongos BALB/c machos, com idade entre 6 e 8 semanas, pesando de 20 a 28g que foram fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos da Universidade de São Paulo. Antes e após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos no biotério, acondicionados em caixas coletivas, contendo no máximo cinco animais por caixa, com ciclo artificial claro/escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente constante de 22 °C e com suprimentos de água e alimento autoclavados disponíveis todo o tempo.

3.3 Indução da inflamação alérgica pulmonar

Na primeira parte do trabalho, os animais foram imunizados com uma injeção intraperitoneal de ovalbumina (OVA – 20 µg) e Hidróxido de Alumínio (Al(OH)₃ – 2 mg) diluídos em PBS estéril. Após 12 dias, os animais receberam o reforço da imunização. Do dia 18 ao dia 23, diariamente, os animais receberam o antígeno (desafio) por nebulização de uma solução de OVA a 5% em aparelho ultrassônico (ICEL US-800, São Paulo, BR), que emite partículas de 0,5 a 10µm de diâmetro a aproximadamente 0,75 cm³/min, durante por 20 minutos. Os desafios antigênicos posteriores foram realizados nos dias 25, 27, 29, 31, 33 e 35. Os animais do grupo controle foram imunizados e aerosolizados com PBS estéril. Os animais foram sacrificados no dia 36, conforme representação esquemática (Figura 2).

Na segunda parte do trabalho, os animais foram imunizados com uma injeção intraperitoneal de ovalbumina (OVA – 50 µg) e Hidróxido de Alumínio (Al(OH)₃ – 1 mg,

Rehydragel HPA, Reheis INC., Berkeley Heights, NJ, Estados Unidos) diluídos em salina estéril. Após 7 dias, os animais receberam o reforço da imunização. Do dia 14 ao dia 30, a cada 84 horas (3 ½ dias), os animais receberam o antígeno (desafio) por nebulização de uma solução de OVA a 2,5% através do mesmo aparelho nebulizador durante por 20 minutos, conforme a representação esquemática na Figura 11.

3.4 Sacrifício e coleta do lavado broncoalveolar

Os camundongos foram sacrificados por asfixia por CO₂, a traquéia foi canulada com tubo de polietileno anexado a uma agulha de 25-gauge em uma seringa e os pulmões foram lavados 3 vezes com 0,5 ml de PBS gelado, para um volume total de 1,5ml. O fluido foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi removido e congelado em freezer -80 °C.

3.5 Contagem total e diferencial das células inflamatórias

As células do BAL foram ressuspensas em 1ml de PBS e o número total de células foi determinado com o auxílio de uma Câmara de Neubauer. Após a contagem total, as células foram aderidas em lâmina de vidro com o auxílio de uma centrífuga histológica e coradas com uma coloração Wright-Giemsa (WG) modificada. As lâminas foram fixadas/coradas por 2 minutos em uma coloração WG com base em metanol (Harleco, EM Diagnostics, Gibbstown, NJ, Estados Unidos) seguida de coloração Diff-Quick para sangue total (Diff-Quick, Baxter Scientific, Miami, FL, Estados Unidos) ou apenas com coloração Hematoxilina/Eosina (Hema 3 Stain Set, Fisher Scientific, Kalamazoo, MI, USA, Estados Unidos). A contagem diferencial das células inflamatórias foi realizada por porcentagem dos tipos celulares em campos aleatórios em alta resolução, para derivar o número de monócitos/macrófagos, neutrófilos e eosinófilos por amostra.

3.6 Histologia

Os pulmões foram lavados em PBS gelado, fixados em formalina e processados rotineiramente para inclusão em parafina. Cortes de 5 μm foram feitos, aderidos em lâminas e corados conforme descrito nas seções de histoquímica e imunohistoquímica. O material foi analisado em um microscópio Nikon Eclipse E600 e as imagens foram capturadas utilizando-se uma câmera digital Nikon DXM1200C. As fotografias foram analisadas e a análise morfométrica foi realizada com o uso do software NIS Elements AR 2.30 Imaging Software. Especificamente, nós quantificamos a área marcada no número máximo de vias aéreas pequenas (aproximadamente 0.4-0.7 mm em diâmetro) em cada lâmina (uma lâmina por animal). Foi feita a média das áreas de marcação positiva de cada animal e este número foi considerado representativo daquele animal individualmente. Os resultados são apresentados como a média de área marcada em μm^2 . Posteriormente, como forma de prover uma informação mais exata, nós normalizamos o valor obtido com a área de marcação pela média de 3 medidas do diâmetro do respectivo bronquíolo, como forma de eliminar erros provenientes de diferenças no diâmetro do bronquíolo e sua influência na quantidade de colágeno depositado ao redor dele.

3.7 Histoquímica e imunohistoquímica

3.7.1 Histoquímica

Cortes histológicos de pulmão com 5 μm de espessura foram desparafinizados em dois banhos subsequentes de xilol, durante 30 minutos. Logo após, foram hidratados em escala decrescente de etanol (100%, 95%, 70%) e depois em água destilada. Posteriormente foram submetidos à coloração por ácido periódico de Schiff (PAS) para evidenciar o muco, e Picrosirius ou Tricrômico de Masson, para evidenciar o colágeno. O material foi posteriormente desidratado em escala crescente de etanol (95%, 100%) diafanizado em xilol e as lâminas foram montadas em meio VectaMount (VectorLabs, Burlingame, CA, Estados Unidos).

3.7.2 Imunohistoquímica

Cortes histológicos de pulmão com 5 µm de espessura foram desparafinizados em dois banhos subsequentes de xilol, durante 30 minutos. Logo após, foram hidratados em escala decrescente de etanol (100%, 95%, 70%) e depois em água destilada. O material foi submetido a um passo de recuperação antigênica que visa desfazer as ligações cruzadas estabelecidas pelo fixador, na superfície do corte, desta forma facilitando o acesso do anticorpo aos epítomos. Isso se faz com a incubação do material em tampão citrato de sódio 10 mM a 90 °C durante 20 minutos. A recuperação antigênica foi necessária apenas para a marcação para colágeno I e fibronectina, sendo que este passo não se fez necessário na reação para α-SMA. Após a recuperação antigênica foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena incubando-se o material em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em PBS, durante 30 minutos, sob agitação leve. Posteriormente o material foi incubado com solução de BSA a 10% em PBS durante 30 minutos, para bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos. Após o bloqueio, o material foi incubado com anticorpo primário anti-colágeno I, anti α-SMA ou anti- fibronectina em PBS com 0,3% Tween 20, *overnight* a 4 °C em câmara úmida. Na seqüência, o material foi incubado com anticorpo secundário anti-coelho feito em cabra diluído 1:2000 em PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem em PBS as lâminas foram incubadas com streptoavidina peroxidase (VectorLabs), durante 1 hora a temperatura ambiente. Logo após o material é incubado com uma solução de DAB (3,3-diaminobenzidina, Sigma-Aldrich) 11% em PBS, com 0,08% H₂O₂, para revelação da reação. O tempo máximo de exposição foi de 5 minutos. Após a revelação, foi realizada a contracoloração com Hematoxilina de Mayer durante 5 segundos, lavagem em água corrente e desidratação em escala crescente de alcoóis. O material foi posteriormente diafanizado em xilol e as lâminas foram montadas em meio VectaMount (VectorLabs).

3.8 Cultura primária dos fibroblastos pulmonares

Os pulmões dos animais foram perfundidos pelo ventrículo direito com 5ml de PBS gelado e removidos sob condições assépticas. O pulmão esquerdo de cada animal foi triturado com tesoura em DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino, 100 U/ml penicilina/streptomicina e 250 µg fungizona. O material obtido de cada animal foi colocado

separadamente em placa de Petri plástica de 100 cm². Os fibroblastos cresceram a partir das partículas de pulmão e quando atingiram 70% de confluência na placa, foram repicadas pela primeira vez utilizando-se tripsina 0,05% em 0,53mM EDTA e passadas para garrafas de 75 ml. As células foram repicadas a cada 3 dias e utilizadas nas passagens 2 ou 3 em todos os experimentos.

3.9 Expressão protéica nos lisados celulares

Na primeira parte do trabalho, os fibroblastos foram plaqueados em placas de 6 poços a uma densidade de 5×10^5 células/poço e aderiram durante 8 horas. Então o meio foi substituído por meio sem soro *overnight*. No dia seguinte as células foram tratadas ou não com IL-1 β (2,5 ng/ml) (Thermo Scientific), TGF- β 1 (5ng/ml) (R&D Systems) sozinho ou em combinação com forskolina (Cayman Chemical) 200 μ m, um ativador direto da enzima adenil ciclase; ou PGE₂ (Cayman Chemical) 1 μ M. Na segunda parte do trabalho, os fibroblastos foram plaqueados a uma densidade de 4×10^5 células/poço em placas de 6 poços e aderiram durante 8 horas. Então o meio foi substituído por meio sem soro *overnight*. No dia seguinte as células foram tratadas ou não com BMP-7 (human recombinant BMP-7, Invitrogen), 30, 100 e 300 ng/ml – sozinha ou em combinação com TGF- β 1 (human recombinant TGF- β 1, Abcam) 5 ng/ml, durante 18 horas para análise da expressão protéica de colágeno I e por 15 minutos para análise da fosforilação das vias de sinalização. Os lisados celulares totais foram obtidos pela raspagem das células em tampão de lise (PBS contendo 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato de sódio, 0.1% SDS, 2 mM ortovanadato de sódio, e coquetel inibidor de protease – Roche Scientific, Indianapolis, IN, Estados Unidos). Quantidades iguais de proteína foram separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran B83, GE HealthCare). As membranas foram bloqueadas em leite 7% em tampão Tris com 0,1% Tween (TBST) (no caso do anti-colágeno I da Cedarlane) e em leite a 5% em TBST para os demais anticorpos. Foram então incubadas *overnight* com os seguintes anticorpos: anti-colágeno I (Cedarlane) 1:500 em leite 7% em TBST; anti-colágeno I (Abcam) 1:10000 em 2% BSA/TBST; anti-COX-2 murina 1:2000 em 2% BSA/TBST; anti-mPGEs-1 (Cayman Chemicals) 1:2000 em TBST; anti- β -actina (Sigma-Aldrich) 1:10000 em 2% BSA/TBST; anti- α -tubulina (Sigma-Aldrich); anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) 1:1000 em 1% BSA/TBST; anticorpo anti-fosfo-p38 MAPK e p38 MAPK (Cell

Signaling), 1:1000 em 2% BSA/TBST; anti-phospho-Smad 2, phospho-Smad 3 e Smad 2/3 (Cell Signaling), 1:1000 em 2% BSA/TBST; anti-phospho-Erk 1/2 e Erk 1/2 (Cell Signaling), 1:1000 em 2% BSA/TBST.

Posteriormente, as membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpo secundário apropriado (anti-rabbit Sigma A9169 ou anti-mouse Sigma A9044) conjugado com peroxidase e reagente quimioluminescente (GE Healthcare, Piscataway, NJ< Estados Unidos ou Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific). A quantificação do sinal quimioluminescente foi realizada por análise densitométrica em todas as bandas utilizando o software Scion Image (NIH), ou DigiDoc1000 (AlphaEase FC software, version 3.2 Beta, AlphaInnotech). A densitometria das bandas foi normalizada para α -tubulina, GAPDH ou β -actina e expressa como a porcentagem do controle não tratado.

3.10 Ensaio de MTT

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) e tratadas com as mesmas condições de TGF- β 1 e BMP-7 utilizadas nos experimentos *in vitro*. O sobrenadante foi retirado e adicionado 180 μ l de meio DMEM incompleto mais 20 μ l de solução de MTT a 5 mg/ml em PBS em cada poço, seguindo-se uma incubação de 4 horas. O sobrenadante foi então retirado e adicionados 200 μ l de uma solução solubilizadora (50% v/v álcool isopropílico, 5% v/v Triton X, 0,4% v/v HCl 37% em água MilliQ) em cada poço. As placas foram novamente incubadas por 4 horas no escuro e lidas em espectrofotômetro em λ 570 nm.

3.11 Quantificação de PGE₂ e TGF- β 1

Os sobrenadantes das culturas foram diluídos 1:10 em DMEM livre de soro e a PGE₂ foi quantificada através de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante. O BAL dos animais foi utilizado sem diluição para detecção de TGF- β 1 através de ELISA, seguindo as instruções do fabricante.

3.12 Ensaio de proliferação

As células foram plaqueadas a uma concentração de 5×10^3 por poço em uma placa de 96 poços com DMEM suplementado com 10% SFB e aderiram durante 8 horas a 37 °C em 5% CO₂. O meio foi então removido e substituído por DMEM sem soro *overnight*. Posteriormente as células receberam os tratamentos, que consistiram de soro suplementado com 3% SFB sozinho ou em combinação com forskolina 200 µm ou PGE₂ 1 µM. Foi feita também a adição de 0.1 mCi/ml de [³H]timidina em cada poço. As células foram então incubadas a 37 °C durante 16-18 horas. As células foram então coletadas e a [³H]timidina incorporada foi medida utilizando-se um contador de cintilação beta.

3.13 Real-time PCR semiquantitativo – lisados celulares

As células foram plaqueadas a uma concentração de 7×10^5 por poço e aderiram durante 8 horas. A seguir o meio foi substituído por meio sem soro *overnight*. O RNA foi então solubilizado em 1ml TRIzol (Invitrogen) e extraído de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 260 nm e o RNA de interesse foi amplificado por Real time RT-PCR semi-quantitativo no termociclador ABI Prism 7000 Thermocycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Os primers e sondas foram desenhados utilizando-se o Primer Express software (PerkinElmer, Applied Biosystems) e são os seguintes: EP2 (sense) 5'-TGC GCT CAG TCC TCT GTT GT-3', (antisense) 5'-TGG CAC TGG ACT GGG TAG AAC-3', EP2 probe, 5' 6FAM-CAC TGA GAA CAC AAG AAG CTC AGC AAA CAT-TAMRA-3'. β-actina murina foi usada como controle para avaliar as mudanças na expressão relativa, e as sequências são as seguintes: β-actina (sense) 5'- CTG CCT GAC GGC CAA GTC-3', (antisense) 5'-CAA GAA GGA AGG CTG GAA AAG AG-3', β-actina probe: 5'-6FAM-AAC GAG AGG TTC CGA TGC CCT G-TAMRA-3'. As reações continham 250 ng de RNA em 12,5ml de 2x Universal PCR Master Mix, 0,625ml de 40x MultiScribe and RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems and Roche), 250 nM de sonda, e primers *forward* e *reverse* a 300 nM para um volume final de 25 µl. Cada amostra foi corrida em triplicata, e a expressão gênica foi determinada pelo método de $\Delta\Delta C_T$, que estuda a diferença na expressão gênica entre o gene de interesse e um gene interno padrão em cada

amostra, gerando a fórmula $\Delta\Delta C_T$. A expressão gênica foi determinada em relação à β -actina, na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

3.14 Real-time PCR semiquantitativo – homogenatos de pulmão

Os pulmões foram coletados, lavados em PBS estéril a 4 °C e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Posteriormente foram conservados em freezer a -80 °C. O RNA total foi isolado dos tecidos pulmonares usando o método de TRIzol e a concentração do RNA foi determinada pela leitura na absorbância de 260 nm por espectrofotômetro. O cDNA foi sintetizado pela transcriptase reversa MML-V (Promega, Madison, WI, Estados Unidos). O Real-time PCR foi realizado usando o ensaio do PCR quantitativo SYBR Green (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Os primers são os seguintes: BMP-7 (sense) 5'-AGA ATT CTT CCA CCC TCG ATA CC-3', (antisense) 5'-TCC TTA TAG ATC CTG AAT TCG GCT-3'; TGF- β (sense) 5'-AAC TAT TGC TTC AGC TCC ACA GAG A-3', (antisense) 5'-AGT TGG ATG GTA GCC GTT G-3' e HPRT (sense) 5'-CTC ATG GAC TGA TTA TGG ACA GGA C-3'; (antisense) 5'-GCA GGT CAG CAA AGA ACT TAT AGC C-3'. As condições de termociclamento foram determinadas para cada primer. A análise dos resultados foi feita pelo programa Sequence Detection Software 1.9. A expressão do mRNA foi normalizada pela abundância do HPRT. Todos os resultados foram expressos em relação à expressão dos respectivos animais controles.

3.15 Tratamento *in vivo* com nimesulide

Os camundongos receberam uma dose i.p. do inibidor seletivo de COX-2 nimesulide (5 mg/kg em um volume de 200 μ l por animal) em salina estéril diariamente dos dias 27 a 35 do protocolo (Figura 2), para analisar o papel dos prostanóides derivados de COX-2 durante a fase fibrótica da asma crônica. Todos os demais animais destes grupos experimentais receberam o mesmo volume de veículo i.p. nos mesmos dias.

3.16 Tratamento *in vivo* com BMP-7

Os camundongos receberam uma dose i.n. de BMP-7 recombinante (150 ou 300 µg/kg em um volume total de 30 µl) em tampão isotônico PBSA (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ e 1,5mM KH₂PO₄), a cada dois dias entre os dias 17 a 30 do protocolo (Figura 11), para analisar o papel desta proteína durante a fase fibrótica da asma crônica. Todos os demais animais destes grupos experimentais receberam o mesmo volume de veículo i.n. nos mesmos dias.

4 RESULTADOS

4.1 Papel anti-fibrótico da prostaglandina E₂ em modelo de asma experimental

Os camundongos BALB/c sensibilizados com OVA foram desafiados por 3x (grupo A), 7x (grupo B) ou 12x (grupo C), e 24 após o último desafio antigênico em cada grupo, os animais foram sacrificados e os pulmões processados, conforme detalhado na Figura 2. O objetivo foi avaliar, inicialmente, a progressão da inflamação e do remodelamento das vias aéreas neste modelo de asma. Para tanto, os parâmetros analisados foram o infiltrado celular no lavado broncoalveolar e no parênquima pulmonar (como indicativo da inflamação alérgica nos pulmões) e a deposição peribronquiolar de colágeno. A seguir foram isolados fibroblastos pulmonares destes animais e avaliados: a) responsividade à PGE₂; b) capacidade sintética de PGE₂ por estas células; c) importância da PGE₂ na contenção da fibrose das vias aéreas na asma.

Figura 2 - Protocolo de asma alérgica 1

Os animais foram sensibilizados i.p. 2x com OVA e Alum e submetidos a desafios antigênicos nas vias aéreas (indicados pelas setas). Os grupos receberam 3, 7 e 12 desafios (respectivamente, grupos A, B e C). Um dia após o último desafio antigênico os animais foram sacrificados e os pulmões processados para análises posteriores.

FONTE: (139)

4.1.1 Análise temporal do infiltrado celular e deposição de colágeno nos pulmões

Conforme demonstrado na Figura 3, os animais de todos os grupos experimentais (A, B e C) desenvolveram inflamação alérgica, dado o número aumentado de células e a alta porcentagem de eosinófilos que foi recuperada do espaço aéreo dos mesmos. Conforme a

severidade da asma dos animais foi ficando maior (grupo C), o número de neutrófilos aumenta e o de eosinófilos diminui.

Figura 3 - Células no BAL

As células recuperadas do BAL foram centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de PBS (volume total). Os números totais foram contados em câmara de Neubauer (A). Células foram também aderidas a lâminas de vidro com auxílio de uma citocentrífuga e coradas com corante Wright-Giemsa modificado para as contagens diferenciais de células mononucleares (B), eosinófilos (C) e neutrófilos (D). Os números são expressos como 10⁴ células/ml e representam a média $\pm$ SEM. Os números de cada tipo celular foram comparados entre os grupos experimentais. * $p < 0,05$ em comparação às demais colunas; ** $p < 0,05$ em comparação às colunas indicadas; # $p < 0,05$ em relação às demais colunas.

FONTE: (139)

A análise histopatológica do parênquima pulmonar mostrou que os pulmões dos camundongos dos 3 grupos exibiram infiltrados de células inflamatórias ao redor dos bronquíolos e vasos sanguíneos, enquanto não houve infiltração de células inflamatórias nos pulmões dos animais controles (Figura 4 A - D). Foi observado que uma quantidade moderada de colágeno estava depositada ao redor das vias aéreas pequenas nos pulmões dos animais do grupo B (em relação ao grupo A) e esta se mostrou-se mais intensa nos animais do grupo C (Figura 5 A - D). Estes resultados mostram que a deposição de colágeno nos pulmões aumenta com o número de desafios antigênicos.

Figura 4 - Infiltrado peribronquiolar

A análise morfológica foi feita por coloração com H&E nos pulmões dos animais controle e grupos A, B e C. Barras = 50 μ m.

FONTE: (139)

4.1.2 Caracterização do eixo síntese/resposta da PGE_2 em fibroblastos pulmonares

A seguir, realizamos experimentos *in vitro* com fibroblastos pulmonares isolados dos camundongos após 3 (grupo A), 7 (grupo B) ou 12 (grupo C) desafios antigênicos com OVA ou PBS. As propriedades funcionais estudadas foram a expressão basal de colágeno I, expressão basal de EP2 e produção basal e estimulada (por IL-1 β) de PGE_2 . Em condições basais, os fibroblastos controles dos grupos A, B e C expressaram quantidades similares de colágeno tipo I. No grupo A, a expressão de colágeno I nas células de animais asmáticos não diferiu em relação a seus controles, mas no grupo B as células dos animais asmáticos apresentaram uma tendência a maior expressão de colágeno I em relação aos seus controles. Esta diferença tornou-se significativa quando comparamos células de animais asmáticos e controles do grupo C (Figura 6 A). A expressão gênica de EP2 foi similar entre os grupos experimentais, e não foi alterada pela severidade da inflamação das vias aéreas ou fibrose (Figura 6 B).

Figura 5 - Deposição de colágeno

A análise morfológica foi feita por coloração com Picrosirius-hematoxilina nos pulmões dos animais controle e grupos A, B e C. Barras = 50 μ m. Setas indicam positividade para Picrosirius.

FONTE: (139)

Conforme mostrado na Figura 6 C, os fibroblastos de animais controles em todos os grupos foram capazes de regular positivamente a síntese de PGE_2 em resposta ao tratamento com $IL-1\beta$. Fibroblastos de animais asmáticos do grupo A exibiram a capacidade de regular positivamente a síntese de PGE_2 em um grau ainda maior do que as células controles deste grupo. No entanto, esta capacidade foi sendo perdida progressivamente com o aumento dos desafios antigênicos, e no grupo C este aumento foi claramente inibido. De fato, as células dos animais asmáticos do grupo C exibiram apenas um terço da capacidade sintética de PGE_2 comparando com os fibroblastos de animais asmáticos do grupo A. Estes resultados mostram que a expressão de colágeno por fibroblastos é inversamente proporcional à capacidade destas células produzirem PGE_2 quando estimuladas. Como a fibrose das vias aéreas e as alterações na função dos fibroblastos foram máximas no grupo C, nós focamos neste grupo para avaliar mais detalhadamente o eixo da PGE_2 em uma série de experimentos subsequentes.

Figura 6 - Expressão de Colágeno I, EP2 e produção de PGE₂ por fibroblastos pulmonares

A) Expressão basal de colágeno tipo I nos fibroblastos pulmonares de camundongos controles e asmáticos determinada por western blot. Dados expressos como porcentagem do grupo controle. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo controle do grupo C. B) Expressão gênica de EP2 determinada por real time RT-PCR em fibroblastos pulmonares não estimulados dos animais controles e asmáticos utilizando o método comparativo de Ct, com dados relativos à β -actina. C) Aumento da síntese de PGE₂, medida por ELISA, nas culturas de fibroblastos estimulados com IL-1 β . Dados expressos como pg/ μ g de proteína total no lisado celular da amostra. A linha horizontal indica o valor das células não tratadas com IL-1 β . * $p < 0.05$ comparando o grupo asmático C com seu respectivo controle.

FONTE: (139)

A seguir, nós investigamos o efeito da PGE₂ na produção de colágeno I induzida por TGF- β 1. A Figura 6 A mostra que os fibroblastos isolados dos animais do grupo C expressaram níveis mais elevados de colágeno em condições basais do que as células dos animais controle. Como demonstrado na figura 7 A, o TGF- β 1 potencializou significativamente o acúmulo de colágeno tipo I nos fibroblastos pulmonares de animais controles e asmáticos, e a PGE₂ reverteu este efeito. A forskolina, um ativador direto da enzima adenil ciclase que também aumenta os níveis intracelulares de cAMP, teve efeito semelhante ao da PGE₂. A proliferação foi induzida por adição de soro bovino fetal a 3% (v/v) e foi igualmente inibida pela PGE₂ e forskolina (Figura 7 B).

Figura 7 - Efeito da PGE₂ e forskolina na produção de colágeno I e proliferação

A) Efeito da PGE₂ e forskolina (FSK) na expressão de colágeno tipo I nos fibroblastos pulmonares de camundongo do grupo C. B) Efeito da PGE₂ e forskolina na proliferação, medida como a incorporação de [³H]-timidina, nos fibroblastos de camundongos controles e asmáticos do grupo C. Resultados estão expressos como porcentagem do grupo controle sem estímulo. Dados representam média ± SEM de 5 animais por grupo em 4 experimentos independentes. FSK - forskolina. *p<0.05 em comparação aos grupos indicados; **p<0.05 em comparação aos grupos indicados; ***p<0.05 em comparação aos grupos não tratados.

FONTE: (139)

Posteriormente, examinamos a capacidade dos fibroblastos pulmonares em sintetizar PGE₂ sob estímulo. As células foram plaqueadas e incubadas *overnight* com meio livre de soro ou tratadas com IL-1β. Uma vez que a IL-1β induz a expressão de COX-2 e a síntese de PGE₂ em fibroblastos pulmonares (89), ela foi empregada como uma ferramenta para avaliar a habilidade dos fibroblastos pulmonares de animais asmáticos em regular a biossíntese deste prostanóide. Resultados obtidos nos experimentos anteriores mostraram que os fibroblastos provenientes de pulmões asmáticos perdem a capacidade de produzir PGE₂ quando estimulados. No grupo crônico esta característica é mais marcante, conforme mostra a figura 8 A onde vemos que, enquanto no grupo C controle a produção de PGE₂ estimulada com IL-1β aumenta 4,8x, no grupo C asmático a produção aumenta apenas 2,2x. A síntese de PGE₂ depende das ações sequenciais das enzimas COX e PGEs. Portanto, nós comparamos a regulação positiva induzida por IL-1β das enzimas sintéticas induzíveis, COX-2 e mPGEs-1, em fibroblastos pulmonares de animais controles e asmáticos do grupo C. Quando comparados às células controle, os fibroblastos pulmonares dos animais asmáticos exibiram uma capacidade diminuída de regular positivamente a síntese de COX-2 (Figura 8 B) e, em menor grau, a mPGEs-1 (Figura 8 C), em resposta à IL-1β. Estes resultados mostram uma relação inversa entre a produção de PGE₂ e colágeno I pelos fibroblastos pulmonares de animais com asma crônica. A menor produção de PGE₂ se deve à menor expressão das

enzimas COX-2 e mPGEs-1. A PGE₂ inibe a produção de colágeno através do aumento do cAMP intracelular, portanto a diminuída síntese de PGE₂ pode explicar o aumento na síntese de colágeno I pelos fibroblastos pulmonares.

Figura 8 - Síntese induzível de PGE₂ e expressão de enzimas biossintéticas nos fibroblastos pulmonares do grupo C

A) Fibroblastos pulmonares de animais controles e asmáticos do grupo C foram incubados com ou sem IL-1β por 18 horas e os níveis de PGE₂ no sobrenadante da cultura foi quantificado por ELISA. Os dados são expressos como o aumento induzido pela IL-1β sobre as condições não estimuladas (que são indicadas pela linha horizontal), e representam a média ± SEM de 5 animais por grupo em 4 experimentos independentes. Expressão de COX-2 (B) e mPGEs-1 (C), determinadas por western blot, nos fibroblastos dos animais do grupo C. Os dados são expressos como o aumento com IL-1β sobre os níveis sem estímulo, representados pela linha horizontal, e representam a média ± SEM de 5 animais por grupo em 4 experimentos independentes.

FONTE: (139)

4.1.3 Efeito da inibição da síntese de prostaglandinas na deposição de colágeno *in vivo*

Para determinar se os prostanóides derivados da COX-2 endógena gerados durante o remodelamento das vias aéreas influenciam o grau de fibrose, nós tratamos os animais com uma dose i.p. diária (5 mg/kg) de nimesulide, um inibidor seletivo de COX-2, nos dias 27 a 35 do protocolo do grupo C. Os cortes de pulmão foram corados com picrossirius-hematoxilina para visualizar o colágeno total e também imunomarcados para colágeno tipo I e submetidos a análise morfométrica conforme descrito em métodos. Os animais tratados com nimesulide exibiram um maior grau de fibrose do que os animais asmáticos, no que se refere ao colágeno total (Figura 9 A-C), que foi acompanhado pelo colágeno tipo I (Figura 10 A-C). Chegamos a esta conclusão através da quantificação da média da área total (μm^2) da deposição de colágeno, conforme descrito em métodos, e os resultados na análise morfométrica estão apresentados nas figuras 9 D e 10 D.

Figura 9 - Efeito do nimesulide sobre a deposição de colágeno nas vias aéreas

O inibidor de COX-2 nimesulide foi administrado i.p. aos animais do grupo C diariamente do dia 27 ao 35, e os bronquíolos pequenos foram analisados para colágeno por coloração com picrossirius-hematoxilina. A) Controle, B) Asma e C) Asma + nimesulide. Barras = 50 μm . D) Análise morfométrica da área marcada em μm^2 . Os dados representam a média $\pm$ SEM de 5 animais por grupo em 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo controle e ** $p < 0.05$ em comparação ao grupo asmático. As setas indicam as áreas de marcação positiva para picrossirius.

FONTE: (139)

Figura 10 - Efeito do nimesulide sobre a deposição de colágeno tipo I nas vias aéreas

O inibidor de COX-2 nimesulide foi administrado i.p. aos animais do grupo C diariamente do dia 27 ao 35, e os bronquíolos pequenos foram analisados por imunohistoquímica para colágeno tipo I. A) Controle, B) Asma e C) Asma + nimesulide. Barras = 50 μm . D) Análise morfológica da área marcada em μm^2 . Os dados representam a média $\pm$ SEM de 5 animais por grupo em 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ em comparação ao grupo controle e ** $p < 0.05$ em comparação ao grupo asmático. As setas indicam as áreas de marcação positiva para colágeno I.

FONTE: (139)

4.2 Papel anti-fibrótico da BMP-7 em modelo de asma experimental

Os animais BALB/c sensibilizados com OVA foram desafiados por 2 (grupo 2D) ou 6 (grupo 6D) exposições ao aerossol de OVA, com intervalos de 3 $\frac{1}{2}$ dias (conforme esquematizado na figura 11), e 24 horas após a última exposição os animais foram sacrificados e os pulmões processados para avaliação de: a) inflamação pulmonar; b) expressão de marcadores de fibrose (colágeno e α -SMA); c) expressão gênica das moléculas pró- e anti-fibróticas (TGF- β 1 e BMP-7); d) cultivo de fibroblastos pulmonares e avaliação da ação inibitória de BMP-7 sobre TGF- β 1.

Figura 11 - Protocolo de asma alérgica 2

Os animais foram sensibilizados i.p. 2x com OVA e Alum e então sujeitos a diferentes números de desafios antigênicos às vias aéreas por aerossol, com OVA a 2,5% w/v em PBS ou somente PBS (indicados pelas setas). Os grupos receberam 2 ou 6 desafios (respectivamente, grupos agudo e crônico). Um dia após o último desafio antigênico em cada um dos grupos, os pulmões e o BAL foram coletados para análise posterior.

FONTE: Stumm (2012)

4.2.1 Caracterização da inflamação pulmonar e expressão de marcadores de fibrose

Em ambos os modelos de asma houve um aumento no número total de células recuperadas do BAL 24 horas após o último desafio antigênico. Este aumento foi devido, principalmente, à infiltração de eosinófilos e neutrófilos (Figura 12 A-D).

Além da infiltração eosinofílica, a produção de muco também pode ser considerada um marcador da severidade da inflamação pulmonar. Nós quantificamos o muco em cortes histológicos de pulmão corados com PAS (ácido periódico de Schiff). Conforme mostrado na figura 13 A-C, a produção de muco está aumentada em ambos os modelos experimentais quando comparados ao grupo controle. A análise morfométrica (Figura 13 D) mostra uma produção mais elevada de muco no grupo 6D.

Figura 12 - Contagem total e diferencial das células recuperadas do lavado broncoalveolar

O lavado foi centrifugado e as células ressuspensas em 1ml PBS para a contagem total. As lâminas foram preparadas em citospin para coloração e contagem dos diferentes tipos celulares. * $p<0.05$ em relação aos grupos indicados.

FONTE: Stumm (2012)

A expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) tem sido extensivamente usada como marcador da diferenciação do fibroblasto em seu estado ativado, o miofibroblasto. A expressão de α -SMA, seguida do espessamento da camada muscular do bronquíolo, estava aumentada ao redor dos bronquíolos dos animais do grupo 6D, comparado ao grupo 2D. Os dois grupos mostraram aumentada expressão de α -SMA quando comparados ao grupo controle (Figura 14 A-C). Estes resultados foram confirmados pela análise morfométrica, cujos resultados estão apresentados na Figura 14 D.

Figura 13 - Muco nos bronquíolos dos grupos 2D e 6D

Pulmões corados com PAS. (A) Controle; (B) 2D (2 desafios); (C) 6D (6 desafios); (D) Análise morfométrica da marcação de PAS. Barras = 50 μm .

FONTE: Stumm (2012)

Figura 14 - Expressão de α -SMA ao redor dos bronquíolos dos grupos 2D e 6D

(A) Controle; (B) 2D (2 desafios); (C) 6D (6 desafios); (D) Análise morfométrica da área de marcação para α -SMA. Barras = 50 μm .

FONTE: Stumm (2012)

Os miofibroblastos sintetizam ativamente componentes da matriz extracelular, que são depositados ao redor dos bronquíolos e são características marcantes do remodelamento das vias aéreas. Inicialmente, nós medimos o colágeno peribronquiolar em secções de pulmão coradas com picrosírius/hematoxilina, técnica histoquímica que não diferencia entre diferentes tipos de colágeno. Nós encontramos uma aumentada deposição de colágeno ao redor dos bronquíolos em ambos os grupos experimentais, sendo mais intensa no grupo 6D quando comparado ao 2D (Figura 15 A-C). A análise morfométrica (Figura 15 D) confirmou a significância destas observações.

Figura 15 - Deposição de colágeno ao redor dos bronquíolos dos grupos 2D e 6D

Pulmões corados com Picrosírius/Hematoxilina. (A) Controle; (B) 2D (2 desafios); (C) 6D (6 desafios); (D) Análise morfométrica da área marcada com Picrosírius. Barras = 50µm.

FONTE: Stumm (2012)

O colágeno tipo I é a principal isoforma que os fibroblastos depositam nos tecidos em muitos processos de fibrose. Em nosso estudo, a deposição de colágeno tipo I (Figura 16) foi observada na região subepitelial dos bronquíolos em ambos os modelos de asma. A quantidade de colágeno tipo I (Figura 16 A-C) foi mais elevada em ambos os grupos experimentais quando comparados ao controle. A análise morfométrica mostra que a

deposição de colágeno I é mais alta no grupo 6D quando comparado ao grupo 2D (Figura 16 D).

O TGF- β 1 é a citocina pró-fibrótica típica e a sua sinalização é inibida por BMP-7, a qual também é um membro da superfamília do TGF- β . Nós vimos que a expressão gênica de TGF- β 1 é similar nos dois grupos experimentais em relação ao controle (Figura 17 A). De forma contrária, a expressão gênica de BMP-7 estava aumentada no grupo 2D em comparação ao grupo 6D (Figura 17 B). Quando analisamos a razão TGF- β 1/BMP-7 (Figura 17 C), BMP-7 predominou sobre TGF- β 1 no grupo 2D, enquanto no grupo 6D a expressão de TGF- β 1 foi prevalente.

Figura 16 - Imunomarcação para colágeno tipo I ao redor dos bronquíolos dos grupos 2D e 6D

(A) Controle; (B) 2D (2 desafios); (C) 6D (6 desafios); (D) Análise morfométrica da área de marcação para colágeno tipo I. Barras = 50µm.

FONTE: Stumm (2012)

Figura 17 - Expressão gênica de BMP-7 e TGF- β 1 no pulmão dos grupos 2D e 6D

Expressão relativa à expressão de HPRT. A) Expressão gênica de TGF- β 1; B) Expressão gênica de BMP-7; C) Relação entre a expressão das duas moléculas. * $p < 0.05$ em relação aos grupos indicados; ** $p < 0.05$ em relação aos grupos indicados.

FONTE: Stumm (2012)

O resultado da expressão gênica de TGF- β 1 foi confirmado pela quantificação desta citocina no BAL, por ELISA, conforme a figura 18.

Figura 18 - TGF- β 1 no BAL de camundongos dos grupos 2D e 6D

O TGF- β 1 foi quantificado no lavado broncoalveolar dos animais através de ELISA, conforme as instruções do fabricante. * $p < 0.05$ em relação aos grupos controle e agudo; ** $p < 0.05$ em relação ao grupo controle, conforme indicado.

FONTE: Stumm (2012)

4.2.2 A BMP-7 inibe a produção de colágeno I em fibroblastos pulmonares

A BMP-7 é uma citocina da família do TGF- β que exerce papel inibitório sobre as ações do TGF- β 1 em modelos animais de doença, desempenhando muitas vezes função anti-fibrótica. Inicialmente, fibroblastos isolados de pulmões de camundongos normais foram incubados com TGF- β 1 (5ng/ml) sozinho ou em combinação com BMP-7 (30, 100 e 300 ng/ml). O TGF- β 1 induziu um aumento na expressão de colágeno tipo I pelos fibroblastos pulmonares (Figura 19 A). Fizemos uma análise ampliada, com células de animais diferentes, com foco na dose de 300 ng/ml de BMP-7, confirmando que esta dose de BMP-7 é realmente eficaz na inibição da indução da síntese de colágeno I pelo TGF- β 1 nos fibroblastos de animais controles (Figura 19 B) e asmáticos (isolados dos animais do grupo 6D – Figura 19 C), a qual foi inibida pela BMP-7 igualmente em ambos os grupos. A dose de 300 ng/ml, portanto, foi utilizada em todos os experimentos subsequentes.

Figura 19 - Efeito inibitório da BMP-7 sobre a síntese de colágeno I induzida pelo TGF- β 1 em fibroblastos

(A) Dose resposta. Fibroblastos pulmonares de animais controles foram plaqueados e tratados durante 18 horas com TGF- β 1 sozinho ou em combinação com BMP-7 (30, 100 ou 300 ng/ml). O Colágeno tipo I foi analisado por western blot e normalizado pela expressão de β -actina. Resultados apresentados como porcentagem do controle, representado pela linha. (B) Fibroblastos de animais controles tratados com TGF- β 1 (5 ng/ml) sozinho ou em combinação com BMP-7 (300 ng/ml). (C) Fibroblastos de animais asmáticos tratados com TGF- β 1 (5 ng/ml) sozinho ou em combinação com BMP-7 (300 ng/ml). * $p < 0.05$ em relação aos fibroblastos não tratados; ** $p < 0.05$ em relação aos demais grupos conforme indicado.

FONTE: Stumm (2012)

4.2.3 A BMP-7 inibe vias de sinalização ativadas pelo TGF- β 1 em fibroblastos pulmonares

Após comprovarmos que o colágeno I induzido por TGF- β 1 é inibido pela BMP-7, resolvemos analisar quais vias de sinalização ativadas por TGF- β são inibidas pela BMP-7. Optamos pelas vias clássicas dependentes de Smads (Smads 2 e 3) e também por vias independentes de Smads – vias de MAPK – como p38 e Erk 1/2, porque estas são vias de sinalização que já foram implicadas em modelos animais de fibrose e em patologias humanas envolvendo processos fibróticos. Em fibroblastos isolados de animais controles, o TGF- β 1 induziu a fosforilação de Smad 2 e Smad 3, e BMP-7 inibiu a fosforilação destas duas vias tanto em fibroblastos isolados de animais controle (Figura 20 A) quanto de animais asmáticos (Figura 20 B).

O TGF- β 1 também causou aumento na fosforilação de p38, via que foi igualmente inibida em fibroblastos de animais controle (Figura 21 A) e asmáticos (Figura 21 B). Utilizando esta dose de TGF- β 1, não observamos efeito marcante sobre a indução da fosforilação de Erk 1/2, e portanto BMP-7 não exerceu ação inibitória sobre a via de Erk 1/2 (Figura 21 B e D).

Para os ensaios de viabilidade, os fibroblastos pulmonares foram incubados nas mesmas condições de tratamento descritas para os experimentos *in vitro*. O ensaio de MTT foi realizado para verificar se os resultados obtidos estavam sendo influenciados por alterações na viabilidade celular. Os tratamentos *in vitro* de 15 minutos para verificação das proteínas fosforiladas quanto o tratamento de 18 horas para verificação de colágeno não alteraram a viabilidade das células. Os resultados das incubações foram semelhantes e de aproximadamente 103% do controle (incubação com SFB a 10% v/v). O controle negativo utilizado foi feito incubando-se as células com DMSO.

Figura 20 - Efeito inibitório da BMP-7 sobre as vias de sinalização de Smads em fibroblastos

Os fibroblastos pulmonares de animais controles e asmáticos do grupo de 6 desafios (6D) foram plaqueados e tratados durante 10 minutos com BMP-7 (300 ng/ml), após foi adicionado o TGF- β 1 (5 ng/ml) por mais 15 minutos. (A) Smad 2 e 3 em fibroblastos de animais controle; (B) Smad 2 e 3 em fibroblastos de animais asmáticos. As proteínas foram analisadas por western blot e normalizadas pelas respectivas proteínas totais. * $p < 0.05$ em relação às células não tratadas; ** $p < 0.05$ em relação às células tratadas com BMP-7 conforme indicado.

FONTE: Stumm (2012)

Figura 21 - Efeito inibitório da BMP-7 sobre vias de sinalização de MAPK em fibroblastos

Os fibroblastos pulmonares de animais controles e asmáticos do grupo de 6 desafios (6D) foram plaqueados e tratados durante 10 minutos com BMP-7 (300 ng/ml), após foi adicionado o TGF- β 1 (5 ng/ml) e incubado por mais 15 minutos. (A) p-p38 em fibroblastos de animais controle; (B) p-p38 em fibroblastos de animais asmáticos; (C) p-Erk 1/2 em fibroblastos de animais controle e (D) p-Erk 1/2 em fibroblastos de animais asmáticos. As proteínas foram analisadas por western blot e normalizadas pelas respectivas proteínas totais. * $p < 0.05$ em relação às células não tratadas; ** $p < 0.05$ em relação às células tratadas com BMP-7 conforme indicado.

FONTE: Stumm (2012)

4.2.4 Tratamento de animais asmáticos com BMP-7 recombinante inibe a fibrose das vias aéreas na asma

O tratamento com BMP-7 (em ambas as doses – 150 e 300 g/kg) durante a fase de remodelamento das vias aéreas levou a uma diminuição no infiltrado de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar em relação aos animais asmáticos não tratados, conforme mostra a Figura 22 A-D.

Figura 22 - Efeito do tratamento com BMP-7 sobre o infiltrado celular no BAL

O lavado foi centrifugado e as células ressuspensas em 1ml PBS para a contagem total. As lâminas foram preparadas em citospin para coloração e contagem dos diferentes tipos celulares. *p<0.05 em relação ao grupo controle. **P<0.05 em relação aos grupos indicados.

FONTE: Stumm (2012)

Os animais tratados com BMP-7 (na dose de 300 µg/kg) durante a fase fibrogênica da asma alérgica apresentaram uma diminuição na deposição de colágeno ao redor dos bronquíolos. O tratamento com a dose de 150 µg/kg, no entanto, não causou diminuição

nesta deposição. Estes resultados podem ser apreciados na figura 23 A-D. Os resultados relativos à análise morfométrica deste material estão na figura 23 E.

Figura 23 - Efeito do tratamento com BMP-7 sobre a deposição de colágeno nas vias aéreas

Os cortes de pulmão foram corados com Tricrômico de Masson (em azul) e a análise morfométrica foi realizada conforme descrito em métodos. (A) Controle; (B) Grupo 6D (6 desafios); (C) Grupo 6D tratado com BMP-7 em dose de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$; (D) Análise morfométrica da área marcada com Tricrômico de Masson (azul). Barras = 50 μm . *p<0.05 em relação ao grupo controle; **p<0.05 em relação ao grupos asmático tratado com BMP-7 (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

FONTE: Stumm (2012)

5 DISCUSSÃO

A inflamação persistente induzida por um alérgeno é seguida de diversas alterações estruturais, incluindo infiltrados de células inflamatórias, aumento do tamanho e atividade das células caliciformes, espessamento das camadas de células musculares lisas ao redor dos bronquíolos e deposição de proteínas da matriz extracelular (ECM) ao redor dos mesmos, levando finalmente à fibrose subepitelial.

A fibrose é caracterizada por extensiva deposição de proteínas relacionadas à ECM, que substituem o parênquima normal por tecido cicatricial (principalmente colágeno tipo I), assim determinando, em casos severos, perda de função (39). Este processo é o resultado de uma resposta inflamatória crônica, na qual a síntese de fatores angiogênicos, a liberação de enzimas proteolíticas e a secreção de citocinas estimulam a deposição destas proteínas da ECM que progressivamente destroem e redefinem a arquitetura normal do tecido (140). Uma vez que os pacientes com asma são expostos cronicamente ao alérgeno, o remodelamento tecidual é um evento marcante nesta doença. Acredita-se que estas alterações estruturais das vias aéreas, que caracterizam o “remodelamento”, contribuem para a hiperresponsividade e obstrução das vias aéreas na asma crônica (1, 12). A fibrose é a consequência patológica do remodelamento. Comumente, os elementos que levam à fibrose tanto das vias aéreas quanto do parênquima pulmonar, incluem uma resposta Th2 dominada por citocinas como IL-5 e IL-13, injúria epitelial, e produção de fatores de crescimento como o TGF- β . Estes eventos resultam no acúmulo e ativação de células mesenquimais, incluindo fibroblastos, os quais sintetizam e secretam proteínas da matriz extracelular, entre elas o colágeno, principal componente dos tecidos cicatriciais. Especificamente na asma, a fibrose das vias aéreas tem sido associada com a limitação fisiológica do fluxo de ar e a perda da distensibilidade das vias aéreas (31). Atualmente, não existem opções terapêuticas efetivas disponíveis, ressaltando desta a forma a necessidade de um melhor entendimento da fibrogênese na asma, que possa levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Dados obtidos em estudos com pacientes (141) e em modelos animais (142, 143) sugerem que os corticosteróides, bem conhecidos por exercerem efeitos anti-inflamatórios na asma, não são capazes de atenuar o remodelamento das vias aéreas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de estudar mecanismos envolvidos no remodelamento das vias aéreas na asma. Em vista disso, o trabalho foi focado em dois mecanismos diferentes. Na primeira parte do trabalho, nós estudamos o eixo

síntese/resposta da Prostaglandina E_2 e na segunda parte, a relação TGF- β 1/BMP-7 na fibrose das vias aéreas na asma.

Conforme mencionado da introdução, existe uma quantidade robusta de informações na literatura a respeito do eixo da prostaglandina E_2 e sua função como um freio endógeno da fibrogênese, que é desregulado na fibrose do parênquima pulmonar. A PGE $_2$ pode ser sintetizada por, potencialmente, todos os tipos celulares presentes no pulmão, mas as células epiteliais, células mesenquimais e macrófagos são provavelmente as suas fontes predominantes. Este prostanóide apresenta propriedades ideais de uma molécula anti-fibrótica, uma vez que ela inibe virtualmente todas as funções pró-fibróticas dos fibroblastos ativados enquanto, ao mesmo tempo, promove a sobrevivência, proliferação e migração das células epiteliais (144). Suas ações supressoras sobre os fibroblastos são mediadas pela sua ligação ao receptor EP2, e de maneira menos importante, do receptor EP4 – receptores cuja ligação desencadeia o aumento dos níveis de cAMP intracelular. Os mecanismos posteriores que foram identificados para estas ações da PGE $_2$ e cAMP incluem a ativação da PKA, Epac e PTEN, com inibição subsequente da PKC, PI3K e a proteína anti-apoptótica survivina (78, 79, 87). Uma vez que já foram descritos defeitos tanto na síntese (89, 145-147) quanto na responsividade (90, 148) de fibroblastos isolados de pulmões de pacientes e modelos animais de fibrose do parênquima pulmonar, nós decidimos avaliar o eixo da PGE $_2$ em fibroblastos em um modelo animal de asma alérgica, uma vez que isto não foi previamente descrito. Nós utilizamos inicialmente um modelo consistindo de 2 sensibilizações com OVA/Alum seguidas de 3 (grupo A), 7 (grupo B) ou 12 (grupo C) desafios antigênicos com aerossol de uma solução de OVA (Figura 3). O número de eosinófilos recuperados do fluido do lavado broncoalveolar nos possibilitou verificar que a inflamação alérgica ocorreu em todos os três grupos (Figura 4 A-D), vista também no tecido pulmonar (Figura 5 A-D). No entanto, a análise histológica revelou que a fibrose das vias aéreas foi modesta nos animais do grupo B, mas extensa nos animais do grupo C (Figura 6 A-H). Quando isolamos fibroblastos pulmonares destes animais, observamos que, na ausência de estímulo *in vitro*, a expressão de colágeno tipo I pelos fibroblastos dos animais asmáticos do grupo A não foi diferente quando comparada à das células dos animais controle de nenhum dos grupos estudados. Porém, verificamos que a expressão basal de colágeno tipo I aumenta conforme o número de desafios antigênicos aumenta, tornando-se estatisticamente significativa no grupo C (Figura 7 A). Esta descoberta é consistente com um relato anterior que identificou a regulação positiva de uma variedade de propriedades pró-

fibróticas nos fibroblastos pulmonares isolados de camundongos asmáticos quando comparados com células de animais controle, embora a síntese de colágeno propriamente dita não tenha sido examinada neste trabalho (149). Em função dos resultados obtidos nesta comparação dos grupos A, B e C, nós focamos a nossa investigação do eixo da PGE_2 e todos os experimentos subsequentes nas células obtidas dos animais do grupo C. As células destes animais apresentaram uma expressão mais robusta de colágeno I em condições basais (Figura 7 A) e uma capacidade diminuída de produzir PGE_2 (Figura 7 B). Isto está de acordo com o remodelamento observado nas vias aéreas por análise histopatológica (Figura 5).

Tem sido observado que os fibroblastos de pacientes com IPF podem exibir resistência às ações inibitórias da PGE_2 a despeito da expressão intacta do seu receptor EP2 (148), e por isso demos seguimento aos estudos de responsividade. Nos experimentos referentes à análise da responsividade dos fibroblastos pulmonares dos camundongos controles e asmáticos do grupo C à PGE_2 , tanto a síntese de colágeno I elicitada pelo tratamento com TGF- β 1 quanto a proliferação celular estimulada por soro bovino fetal a 3% (v/v) foram inibidas pela PGE_2 nos fibroblastos dos animais controles (Figura 8). Esta inibição permaneceu intacta nos fibroblastos dos animais asmáticos. Já em modelo experimental de IPF induzida por bleomicina, foi observado o contrário (90) e o mesmo foi visto em fibroblastos isolados de alguns pacientes (porém não todos) com IPF (148). Em nosso estudo, as respostas à forskolina foram semelhantes às respostas à PGE_2 , enfatizando a dependência do cAMP para a supressão dos fibroblastos. Da mesma forma, ao mesmo tempo em que a responsividade à PGE_2 encontrava-se preservada, não é de surpreender que a expressão gênica do receptor EP2, que medeia a maioria das ações inibitórias da PGE_2 nos fibroblastos pulmonares, estivesse também intacta nos fibroblastos obtidos dos pulmões dos animais asmáticos (Figura 6 B). A regulação negativa do EP2 e a resistência à PGE_2 correspondente, nos fibroblastos pulmonares de camundongos e pacientes com fibrose do parênquima pulmonar têm sido atribuídas ao silenciamento do promotor do gene de EP2 por metilação (150). Não sabemos explicar a razão pela qual este efeito não foi observado nos fibroblastos do grupo C em nosso modelo de fibrose das vias aéreas.

Em contraste à intacta responsividade à PGE_2 , nós percebemos uma perda da capacidade de sintetizar PGE_2 em resposta à IL-1 β pelos fibroblastos isolados dos camundongos do grupo C (Figura 9 A). A IL-1 β é um componente importante do meio inflamatório ao qual os fibroblastos são expostos *in vivo*, já que foi reportado que a IL-1 β está elevada no BAL de pacientes com asma (151) e que ela desempenha um papel no

desenvolvimento da AHR (152). Esta perda foi acompanhada por uma capacidade diminuída dos fibroblastos do grupo C em regular positivamente tanto a COX-2, enzima biossintética que converte o ácido araquidônico em PGH₂ (Figura 9 B), e a mPGEs-1, enzima induzível que converte a PGH₂ no seu produto final bioativo, a PGE₂ (Figura 9 C). É importante ressaltar que a indução diminuída da síntese de COX-2 e PGE₂ já foi previamente descrita em fibroblastos isolados dos brônquios de indivíduos com asma sensível à aspirina (153). No entanto, no nosso entendimento esta é a primeira demonstração de uma quebra na síntese induzível de PGE₂ em células mesenquimais associada especificamente com a fibrose das vias aéreas em contexto alérgico, e não com a fibrose do parênquima pulmonar. Ainda que os mecanismos que levam a uma expressão debilitada das enzimas biossintéticas de PGE₂ no nosso modelo necessitem ser determinados, algumas possibilidades são a inibição pela IL-13 ou outras citocinas Th2 (154) e o silenciamento epigenético do gene de COX-2 por desacetilação de histonas (155). Os níveis de PGE₂ no fluido do BAL não foram diferentes entre os animais controle e asmático. No entanto, não é de se esperar que a amostragem da superfície das vias aéreas via lavado broncoalveolar reflita adequadamente as concentrações na região subepitelial da via aérea. Além disso, uma vez que a inflamação alérgica e a infiltração de células inflamatórias foi extensa nos pulmões dos animais asmáticos, nós especulamos que a contribuição das células inflamatórias *in vivo* poderia ser compensada pela diminuída produção de PGE₂ pelos fibroblastos pulmonares. No entanto, uma deficiência na produção de PGE₂ no compartimento subepitelial poderia permitir uma ativação não contida dos fibroblastos pulmonares e promover a fibrose das vias aéreas.

Vários estudos têm demonstrado que a inibição farmacológica (156) ou genética (157) de COX, assim como a deficiência de mPGEs-1 (158) podem causar uma piora da inflamação alérgica em modelos animais de asma alérgica (159). Além disso, um estudo demonstrou que o desafio antigênico em animais deficientes em mPGEs-1 levou a um aumento no remodelamento da vasculatura pulmonar (158). Foi previamente mostrado que camundongos COX-2 KO desenvolvem maior inflamação alérgica pulmonar (159) e pior fibrose pulmonar (147) que os camundongos do tipo selvagem. Porém, o fenótipo dos camundongos com deleção constitutiva de COX-2, PGE sintases ou do receptor EP2 pode ser imprevisível. Já foi demonstrado que, em alguns contextos, estes genótipos exibem diminuída inflamação aguda, e isto poderia compensar pela fibrose exagerada que resulta da perda do freio exercido pela PGE₂. Para determinar um possível papel dos prostanoídes derivados da COX-2, incluindo a PGE₂, na limitação da fibrose das vias aéreas *in vivo*, nós

administramos nimesulide, um inibidor de COX-2 seletivo (160, 161) após o início do remodelamento, ou seja, no dia 27 (que corresponde ao grupo B), e coletamos os pulmões no dia 35 (correspondente ao grupo C). Nós escolhemos esta janela de tempo para a administração de nimesulide para evitar a inibição da síntese de PGE₂ durante o pico da fase inflamatória da resposta mas, ao invés disso, interferir com a função enzimática durante a fase fibrogênica máxima. A análise histopatológica e morfométrica indica que os animais tratados com nimesulide apresentaram uma maior fibrose das vias aéreas quando comparado aos animais do grupo C tratados com veículo, conforme pode ser apreciado nas figuras 10 e 11. Este fenômeno também pode ser decorrente do fato de os fibroblastos do grupo C apresentarem uma responsividade intacta à PGE₂. Este resultado é similar a uma descoberta prévia de que a fibrose do parênquima pulmonar induzida por bleomicina é piorada pelo tratamento com indometacina (inibidor de COX-1/COX-2) administrada exclusivamente durante a fase pós-inflamatória e fibrótica da resposta (162). Estes dados *in vivo* trazem uma base para a hipótese de que a inibição da função da COX-2 e da síntese de PGE₂ *ex vivo* características dos fibroblastos durante a evolução da fibrose das vias aéreas pode, da mesma forma, promover a fibrogênese. Nossos dados também abrem espaço para a especulação de que a bem conhecida habilidade dos corticosteróides em inibir a indução de COX-2 (163) pode ajudar a explicar a inabilidade destas drogas em melhorar ou prevenir a fibrose das vias aéreas na asma, e também sugere que os corticosteróides possam ainda estimular o processo de fibrose.

Em resumo, os resultados obtidos durante a primeira parte desta tese mostram que em um modelo animal de inflamação alérgica crônica, o desenvolvimento de fibrose das vias aéreas está associado com um defeito na habilidade dos fibroblastos pulmonares em regular positivamente a geração de PGE₂ em resposta a estímulo. Uma vez que a PGE₂ age como um freio da fibrogênese, nossos resultados sugerem a possibilidade de este efeito possa contribuir para a evolução da fibrose das vias aéreas. Este trabalho foi publicado no *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology* (139).

A segunda parte do trabalho foi baseada no estudo da BMP-7 como molécula anti-fibrótica e na investigação de seu possível envolvimento na contenção do remodelamento das vias aéreas na asma. Para tanto, nós inicialmente comparamos dois modelos animais para estudar a inflamação alérgica pulmonar, um grupo imunizado que recebeu dois desafios antigênicos no pulmão (grupo 2D) e um grupo imunizado que recebeu 6 desafios (grupo 6D) (Figura 11). Esta comparação foi feita com a finalidade de investigar se na asma a

relação TGF- β 1/BMP-7 pode também ser usada como critério de fibrose, à semelhança do que já foi descrito para rim e fígado (123, 124). Inicialmente, fizemos o estudo do remodelamento das vias aéreas nestes dois modelos de asma. Nosso grupo e outros investigadores reportaram previamente um aumento na produção de muco (164, 165) e deposição de colágeno (166, 167) nos pulmões em modelos agudos de asma. Nós estabelecemos um protocolo mais longo (grupo 6D) de asma alérgica na tentativa de avaliar outros marcadores importantes de remodelamento, como a expressão de α -SMA que indica não apenas o espessamento da camada muscular ao redor dos bronquíolos quanto a ativação local de fibroblastos, ambos eventos chave no remodelamento e fibrose das vias aéreas. A exposição crônica ao alérgeno leva ao remodelamento do tecido pulmonar, como é observado em pacientes asmáticos. A extensão deste processo é proporcional à cronicidade da doença, e o resultado final pode ser uma estrutura alterada que é definida como remodelamento das vias aéreas (168). Na asma crônica, os processos de migração, diferenciação e maturação celular, assim como a deposição de tecido conjuntivo pode ser seguida da restituição alterada da estrutura e função das vias aéreas, freqüentemente vista como uma fibrose localizada ao redor dos bronquíolos (169). Classicamente, os miofibroblastos que expressam α -SMA são as células efetoras do processo fibrótico. Estas células podem se originar de células mesenquimais ou mesmo epiteliais, em um processo chamado transição epitélio-mesenquimal (170, 171). Nos pulmões, os fibroblastos ativados se diferenciam em células α -SMA positivas que sintetizam e secretam ativamente componentes da ECM, principalmente colágeno tipo I. Para caracterizar melhor o remodelamento tecidual, nós fizemos a análise *in situ* de muco, colágeno (por coloração com picrossirius), colágeno tipo I e α -SMA. Nós observamos uma aumentada expressão de colágeno tipo I e α -SMA ao redor dos bronquíolos, indicando a ativação local de miofibroblastos e fibrose das vias aéreas, que foi maior no grupo com 6 desafios (6D).

Para avaliar o balanço entre TGF- β 1 e BMP-7 durante a evolução da fibrose das vias aéreas, nós passamos primeiramente à análise da expressão gênica destas moléculas em preparados totais de pulmão dos animais dos grupos controle, 2D e 6D. O TGF- β 1 é uma molécula efetora do processo fibrótico, mas pode ser regulado por moléculas endógenas que têm sua expressão aumentada em situações de injúria tecidual, e uma destas moléculas reguladoras é a BMP-7 conforme descrito em estudos prévios (135, 172). Neste sentido, nós nos interessamos em investigar o balanço entre estas duas moléculas, uma vez que outros estudos o utilizam como indicativo da severidade da doença em modelos de patologias

associadas à fibrose (124, 136). O TGF- β 1 e a BMP-7 pertencem à mesma superfamília de citocinas, embora cada uma apresente uma via de sinalização única, das quais participam diferentes Smads, determinando portanto efeitos opostos. A BMP-7 tem sido extensivamente estudada no desenvolvimento dos rins e também na fisiologia do órgão adulto (173-175). Recentemente, alguns autores descreveram o papel protetor da BMP-7 no tecido pulmonar durante a inflamação (176) e também o aumento da fibrose quando a sinalização desta molécula é bloqueada (177). Também já foi descrito que existe uma influência de BMP-7 na sinalização de TGF- β 1, em modelos animais de fibrose renal crônica, majoritariamente no sentido de inibir as ações do último (178). Nós vimos que a expressão gênica de BMP-7 está aumentada nos pulmões dos animais do grupo de dois desafios (2D), enquanto no grupo de 6 desafios (6D) esta expressão é semelhante à do grupo controle. Já a expressão de TGF- β 1 aumenta nos grupos asmáticos em relação ao grupo controle, e a expressão de TGF- β 1 é ainda mais marcante na análise protéica de TGF- β 1 no lavado broncoalveolar dos animais, onde percebemos um claro aumento progressivo de TGF- β 1 no BAL conforme o número de desafios antigênicos aumenta. Nossa hipótese é que o aumento inicial da expressão de BMP-7 teria um papel protetor, em uma tentativa de controlar o dano inflamatório em progressão. Posteriormente, com o predomínio do TGF- β 1, a situação evoluiria para fibrose. Como pode ser apreciado pela relação entre a expressão destas moléculas, há uma predominância de BMP-7 no grupo 2D, enquanto os animais do grupo 6D apresentaram uma resposta fibrótica mais bem definida, com predominância de TGF- β 1, provavelmente resultante de uma perda no controle da regulação do reparo tecidual.

Posteriormente aos estudos *in situ* e de preparados totais de pulmão, nós partimos para o estudo *in vitro* da ação de BMP-7 sobre TGF- β 1. Para isso, os fibroblastos pulmonares de animais controles foram cultivados e submetidos a diferentes tratamentos. O tratamento com BMP-7 foi efetivo na inibição da síntese de colágeno induzida pelo TGF- β 1 nestas células (Figura 19) embora a administração de BMP-7 sozinha não tenha tido efeito sobre a síntese de colágeno quando comparada ao controle não tratado (dados não mostrados). Na sequência, resolvemos analisar a influência da BMP-7 sobre a ativação de vias de sinalização do TGF- β 1.

Em nosso estudo, a BMP-7 demonstrou ter ação inibitória sobre a fosforilação de Smad 2 e Smad 3 induzida por TGF- β 1, além de inibir a fosforilação de p38. Não houve influência de BMP-7 sobre a fosforilação de Erk 1/2 em nosso modelo. Uma vez que já foi descrito que as vias de p38, Smad 2 e Smad 3 desempenham um papel importante em

modelos animais de fibrose (110, 115, 116, 179-181), é importante notar que as ações de BMP-7 podem acontecer (embora talvez não se limitem a isso) via inibição destas vias de sinalização que são desencadeadas pelo TGF- β 1. Embora a importância da BMP-7 como agente anti-fibrótico em modelos de injúria renal já tenha sido descrita (178, 182-184), e haja também precedentes a respeito de sua ação no pulmão (127, 129, 176), os mecanismos de inibição exercidos pela BMP-7 sobre vias específicas da sinalização do TGF- β 1 não haviam sido descritos anteriormente em fibroblastos pulmonares.

Nós passamos, então, para uma abordagem funcional no sentido de analisar uma possível participação da BMP-7 na contenção da fibrose das vias aéreas em nosso modelo animal de asma alérgica. Para isso, os animais foram tratados com BMP-7 em dose de 150 e 300 μ g/kg entre os dias 17 a 30 do protocolo de asma do grupo 6D (figura 12). Este período de tratamento foi escolhido por corresponder, em nosso modelo, ao período de início do remodelamento pulmonar e, portanto, caracterizar uma abordagem terapêutica de tratamento. A administração de BMP-7 foi realizada por via intranasal para melhor avaliar os efeitos locais desta proteína sobre as vias aéreas dos animais. Ambas as doses de BMP-7 foram capazes de causar uma diminuição no infiltrado inflamatório nas vias aéreas, conforme mostrado nos gráficos de contagens celulares. O efeito anti-inflamatório de BMP-7 tem sido observado nos rins. Em modelo de isquemia renal, a infusão endovenosa de BMP-7 reduz a severidade da injúria renal e suprime a inflamação por inibir moléculas adesivas intercelulares, prevenindo o acúmulo e ativação de neutrófilos (122). Em estudos *in vitro* com células do túbulo proximal dos rins, a BMP-7 inibe o estímulo de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8, IL-1 β e MCP-1 induzidas por TNF- α (185). Porém, o papel anti-inflamatório da BMP-7 nos pulmões de indivíduos asmáticos ou em modelos experimentais não está descrito.

O tratamento com BMP-7 em nosso modelo foi capaz de diminuir, na dosagem mais elevada (300 μ g/kg), a deposição de colágeno ao redor dos bronquíolos dos animais, ou seja, diminuiu a fibrose das vias aéreas no nosso modelo. A dose mais baixa, de 150 μ g/kg, porém, não teve o mesmo efeito e não foi capaz de reduzir a fibrose das vias aéreas de maneira significativa, ao contrário do que aconteceu com o infiltrado de células inflamatórias recuperadas do lavado broncoalveolar. Há descrições do papel da BMP-7 como agente anti-fibrótico em diversos modelos animais. Em culturas primárias de células estreladas hepáticas, o tratamento com BMP-7 diminui a expressão do mRNA de colágeno e α -SMA via fosforilação de Smads 1, 5 e 8. A BMP-7 administrada por via endovenosa diminui

o conteúdo de hidroxiprolina e a área marcada com Sirius red (que marca colágeno) nos cortes de tecido pulmonar dos animais (125). De maneira semelhante, em modelo animal de IPF induzida por asbestos, o tratamento com BMP-7 i.p. faz decair os níveis de hidroxiprolina, contrapondo assim as ações do seu antagonista Gremlin, cujos níveis estão elevados nos pulmões fibróticos (128). Foi demonstrado também que a BMP-7 reverte a transição epitélio-mesenquimal induzida pelo TGF- β por indução de E-caderina, uma molécula fundamental na adesão de células epiteliais de dos túbulos renais e ductos mamários. Esta inibição é dependente da fosforilação de Smads. O tratamento com BMP-7 leva ao reparo de células epiteliais tubulares extensamente danificadas, revertendo a injúria renal crônica (178). Apesar de o tratamento com BMP-7 ter sido descrito como efetivo no tratamento da fibrose em modelos experimentais de doença, esta é a primeira descrição do papel anti-fibrótico desta proteína em um modelo de fibrose em doença alérgica, como é o caso da asma.

Por ter uma etiologia diversa, englobando uma combinação de fatores genéticos e ambientais, o tratamento da asma, até hoje, permanece restrito à tentativa de atenuar os sintomas, mais do que tratar a doença em si. Muitas vezes o tratamento dos sintomas da asma também é decidido de acordo com os efeitos de cada medicamento em determinado paciente, uma vez que a resposta ao medicamento está vinculada à causa da doença em cada paciente, o que é de difícil determinação. Com os medicamentos disponíveis para tratamento dos sintomas, o remodelamento das vias aéreas que decorre da asma crônica, incluindo a fibrose das vias aéreas, na maioria dos casos não representa ameaça à vida do paciente. Diferente do tipo de fibrose desenvolvido na fibrose pulmonar idiopática, por exemplo, na qual formam-se placas fibróticas que substituem o parênquima normal do tecido pulmonar e determinam aumento da mortalidade, a fibrose das vias aéreas na asma é localizada e restrita aos arredores dos bronquíolos, enquanto grande parte do tecido alveolar permanece intacto. Porém, já foi determinado que mesmo esta fibrose sendo menos volumosa e mais localizada, ela determina perda de distensibilidade do órgão como um todo, bem como aumento da hiperreatividade brônquica, fatores que afetam a qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

Além da asma alérgica, outras doenças fibróticas pulmonares têm alta incidência e freqüentemente são fatais, como no caso da IPF. Outras são fibrose por radiação ou quimioterapia, doença granulomatosa pulmonar, sarcoidose e COPD. Portanto, entender os mecanismos que levam a esta resposta de reparo desregulada é de fundamental

importância para abrir novas possibilidades de intervenção terapêutica. Por esta razão, é importante que os mecanismos implicados na patogênese da asma, assim como os envolvidos especificamente na fibrose das vias aéreas, continuem sendo estudados. Sabe-se pouco a respeito dos mecanismos moleculares ou o desbalanço nos processos de remodelamento que determinam as patologias fibróticas. Neste trabalho, contribuimos para elucidar ou pelo menos implicar novos mecanismos na progressão da patogênese da asma, na esperança de que isso possa contribuir, futuramente, para a tradução da pesquisa básica até a prática clínica.

CONCLUSÕES

1. Caracterizamos um modelo crônico de asma alérgica em camundongos BALB/c com evidente deposição de colágeno ao redor dos bronquíolos, caracterizando um quadro de fibrose das vias aéreas. Neste modelo, estudamos o envolvimento de PGE₂ e BMP-7 no processo de fibrose das vias aéreas;
2. Fibroblastos isolados do pulmão de animais asmáticos produzem PGE₂ sob estímulo de IL-1 β . Esta produção diminui com o tempo, acompanhada por diminuição da expressão de COX-2 e mPGEs-1;
3. A adição de PGE₂ aos fibroblastos de pulmões de camundongos asmáticos e sadios inibiu a síntese de colágeno e a proliferação de fibroblastos;
4. O tratamento com nimesulide (inibidor de COX-2) a partir do início do processo de fibrose causou piora neste quadro;
5. Pulmões de animais asmáticos expressam TGF- β 1 e BMP-7, com predomínio de TGF- β 1 sobre BMP-7;
6. Em fibroblastos pulmonares isolados de animais asmáticos e controles, a BMP-7 inibiu a síntese de colágeno tipo I induzida pelo TGF- β 1;
7. A BMP-7 inibiu a fosforilação de moléculas de sinalização induzida pelo TGF- β 1, como Smad 2, Smad 3 e p38 em fibroblastos;
8. O tratamento dos animais asmáticos com rBMP-7, administrada por via intranasal a partir do segundo desafio antigênico diminuiu o infiltrado de células inflamatórias e a fibrose das vias aéreas, medida como a deposição de colágeno ao redor dos bronquíolos.
9. Estes estudos mostram que PGE₂ e BMP-7 têm efeito anti-fibrótico na asma experimental e que é possível regular o processo que leva à fibrose das vias aéreas pelo tratamento com rBMP-7.

REFERÊNCIAS

1. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008 Jun;38(6):872-97.
2. Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int*. 2008 Mar;57(1):1-10.
3. Royce SG, Cheng V, Samuel CS, Tang ML. The regulation of fibrosis in airway remodeling in asthma. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Apr 4;351(2):167-75.
4. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*. 2008 Sep 20;372(9643):1107-19.
5. Organization WH. Asthma. 2011; Available from: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>> [2012 Mar 10]
6. Subbarao P, Mandhane PJ, Sears MR. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ*. 2009 Oct 27;181(9):E181-90.
7. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy*. 2004 May;59(5):469-78.
8. Borish L, Culp JA. Asthma: a syndrome composed of heterogeneous diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008 Jul;101(1):1-8; quiz -11, 50.
9. Passalacqua G, Ciprandi G. Allergy and the lung. *Clin Exp Immunol*. 2008 Sep;153 Suppl 1:12-6.
10. McKenzie DC, Boulet LP. Asthma, outdoor air quality and the Olympic Games. *CMAJ*. 2008 Sep 9;179(6):543-8.
11. Homer RJ, Elias JA. Airway remodeling in asthma: therapeutic implications of mechanisms. *Physiology (Bethesda)*. 2005 Feb;20:28-35.
12. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:789-815.
13. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest*. 1999 Mar;103(6):779-88.
14. Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, Carrigan PE, et al. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med*. 1997 Jun 16;185(12):2143-56.

15. Jain-Vora S, Wert SE, Temann UA, Rankin JA, Whitsett JA. Interleukin-4 alters epithelial cell differentiation and surfactant homeostasis in the postnatal mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997 Nov;17(5):541-51.
16. Rankin JA, Picarella DE, Geba GP, Temann UA, Prasad B, DiCosmo B, et al. Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 23;93(15):7821-5.
17. Balzar S, Fajt ML, Comhair SA, Erzurum SC, Bleecker E, Busse WW, et al. Mast cell phenotype, location, and activation in severe asthma. Data from the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Feb 1;183(3):299-309.
18. Mauad T, Bel EH, Sterk PJ. Asthma therapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Nov;120(5):997-1009; quiz 10-1.
19. Boulet LP, Sterk PJ. Airway remodelling: the future. *Eur Respir J*. 2007 Nov;30(5):831-4.
20. Pascual RM, Peters SP. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Sep;116(3):477-86; quiz 87.
21. Lange P, Scharling H, Ulrik CS, Vestbo J. Inhaled corticosteroids and decline of lung function in community residents with asthma. *Thorax*. 2006 Feb;61(2):100-4.
22. Broide DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Mar;121(3):560-70; quiz 71-2.
23. Camoretti-Mercado B, Solway J. Transforming growth factor-beta1 and disorders of the lung. *Cell Biochem Biophys*. 2005;43(1):131-48.
24. Moore B, Murphy RF, Agrawal DK. Interaction of tgf-beta with immune cells in airway disease. *Curr Mol Med*. 2008 Aug;8(5):427-36.
25. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 2008 Nov;118(11):3546-56.
26. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 2):S28-38.
27. Huang J, Olivenstein R, Taha R, Hamid Q, Ludwig M. Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Aug;160(2):725-9.
28. Postma DS, Timens W. Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2006 Jul;3(5):434-9.

29. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989 Mar 11;1(8637):520-4.
30. Laitinen A, Altraja A, Kampe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen LA. Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Sep;156(3 Pt 1):951-8.
31. Ward C, Johns DP, Bish R, Pais M, Reid DW, Ingram C, et al. Reduced airway distensibility, fixed airflow limitation, and airway wall remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Nov 1;164(9):1718-21.
32. Boxall C, Holgate ST, Davies DE. The contribution of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma. *Eur Respir J*. 2006 Jan;27(1):208-29.
33. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 May 15;167(10):1360-8.
34. Tang W, Geba GP, Zheng T, Ray P, Homer RJ, Kuhn C, 3rd, et al. Targeted expression of IL-11 in the murine airway causes lymphocytic inflammation, bronchial remodeling, and airways obstruction. *J Clin Invest*. 1996 Dec 15;98(12):2845-53.
35. Gizycki MJ, Adelroth E, Rogers AV, O'Byrne PM, Jeffery PK. Myofibroblast involvement in the allergen-induced late response in mild atopic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997 Jun;16(6):664-73.
36. Brewster CE, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990 Nov;3(5):507-11.
37. Gern JE, Busse WW. Relationship of viral infections to wheezing illnesses and asthma. *Nat Rev Immunol*. 2002 Feb;2(2):132-8.
38. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):524-9.
39. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 May;3(5):349-63.
40. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2004 Dec;1(2):98-105.
41. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99-146.
42. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:425-56.

43. Pardo A, Selman M. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc*. 2006 Jun;3(4):383-8.
44. Bai TR, Knight DA. Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. *Clin Sci (Lond)*. 2005 Jun;108(6):463-77.
45. Siddiqui S, Martin JG. Structural aspects of airway remodeling in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2008 Nov;8(6):540-7.
46. Lambert RK, Wiggs BR, Kuwano K, Hogg JC, Pare PD. Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD. *J Appl Physiol*. 1993 Jun;74(6):2771-81.
47. Yanai M, Sekizawa K, Ohnishi T, Sasaki H, Takishima T. Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. *J Appl Physiol*. 1992 Mar;72(3):1016-23.
48. Taha RA, Minshall EM, Miotto D, Shimbara A, Luster A, Hogg JC, et al. Eotaxin and monocyte chemoattractant protein-4 mRNA expression in small airways of asthmatic and nonasthmatic individuals. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Mar;103(3 Pt 1):476-83.
49. Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, et al. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Jul;100(1):44-51.
50. Minshall EM, Hogg JC, Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Mar;101(3):386-90.
51. Carroll N, Cooke C, James A. The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. *Eur Respir J*. 1997 Feb;10(2):292-300.
52. Faul JL, Tormey VJ, Leonard C, Burke CM, Farmer J, Horne SJ, et al. Lung immunopathology in cases of sudden asthma death. *Eur Respir J*. 1997 Feb;10(2):301-7.
53. Christodoulou P, Leung DY, Elliott MW, Hogg JC, Muro S, Toda M, et al. Increased number of glucocorticoid receptor-beta-expressing cells in the airways in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Sep;106(3):479-84.
54. Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Nov;154(5):1505-10.
55. Kraft M, Martin RJ, Wilson S, Djukanovic R, Holgate ST. Lymphocyte and eosinophil influx into alveolar tissue in nocturnal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Jan;159(1):228-34.
56. Carroll N, Carello S, Cooke C, James A. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. *Eur Respir J*. 1996 Apr;9(4):709-15.

57. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest.* 1963 Feb;12:131-55.
58. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001 Nov 30;294(5548):1871-5.
59. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:145-82.
60. Murakami M, Kudo I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res.* 2004 Jan;43(1):3-35.
61. Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jun 22;96(13):7220-5.
62. Satoh K, Nagano Y, Shimomura C, Suzuki N, Saeki Y, Yokota H. Expression of prostaglandin E synthase mRNA is induced in beta-amyloid treated rat astrocytes. *Neurosci Lett.* 2000 Apr 14;283(3):221-3.
63. Mancini JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, Chan CC, et al. Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem.* 2001 Feb 9;276(6):4469-75.
64. Fillion F, Bouchard N, Goff AK, Lussier JG, Sirois J. Molecular cloning and induction of bovine prostaglandin E synthase by gonadotropins in ovarian follicles prior to ovulation in vivo. *J Biol Chem.* 2001 Sep 7;276(36):34323-30.
65. Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2000 Oct 20;275(42):32783-92.
66. Korn JH. Fibroblast prostaglandin E2 synthesis. Persistence of an abnormal phenotype after short-term exposure to mononuclear cell products. *J Clin Invest.* 1983 May;71(5):1240-6.
67. Levine L, Alam I. Arachidonic acid metabolism by cells in culture: analyses of culture fluids for cyclooxygenase products by radioimmunoassay before and after separation by high pressure liquid chromatography. *Prostaglandins Med.* 1979 Nov;3(5):295-304.
68. Shindo N, Saito T, Murayama K. Rapid quantification of 11 prostanoids by combined capillary column gas chromatography and negative ion chemical ionization mass spectrometry: application to prostanoids released from normal human embryonic lung fibroblasts WI38 in a culture medium. *Biomed Environ Mass Spectrom.* 1988 Jan 1;15(1):25-32.

69. Vancheri C, Mastruzzo C, Sortino MA, Crimi N. The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE₂. *Trends Immunol.* 2004 Jan;25(1):40-6.
70. Bitterman PB, Wewers MD, Rennard SI, Adelberg S, Crystal RG. Modulation of alveolar macrophage-driven fibroblast proliferation by alternative macrophage mediators. *J Clin Invest.* 1986 Mar;77(3):700-8.
71. Elias JA. Tumor necrosis factor interacts with interleukin-1 and interferons to inhibit fibroblast proliferation via fibroblast prostaglandin-dependent and -independent mechanisms. *Am Rev Respir Dis.* 1988 Sep;138(3):652-8.
72. Goldstein RH, Polgar P. The effect and interaction of bradykinin and prostaglandins on protein and collagen production by lung fibroblasts. *J Biol Chem.* 1982 Aug 10;257(15):8630-3.
73. Korn JH, Halushka PV, LeRoy EC. Mononuclear cell modulation of connective tissue function: suppression of fibroblast growth by stimulation of endogenous prostaglandin production. *J Clin Invest.* 1980 Feb;65(2):543-54.
74. Fine A, Poliks CF, Donahue LP, Smith BD, Goldstein RH. The differential effect of prostaglandin E₂ on transforming growth factor-beta and insulin-induced collagen formation in lung fibroblasts. *J Biol Chem.* 1989 Oct 15;264(29):16988-91.
75. Baum BJ, Moss J, Breul SD, Berg RA, Crystal RG. Effect of cyclic AMP on the intracellular degradation of newly synthesized collagen. *J Biol Chem.* 1980 Apr 10;255(7):2843-7.
76. Choung J, Taylor L, Thomas K, Zhou X, Kagan H, Yang X, et al. Role of EP₂ receptors and cAMP in prostaglandin E₂ regulated expression of type I collagen alpha₁, lysyl oxidase, and cyclooxygenase-1 genes in human embryo lung fibroblasts. *J Cell Biochem.* 1998 Nov 1;71(2):254-63.
77. Kohyama T, Ertl RF, Valenti V, Spurzem J, Kawamoto M, Nakamura Y, et al. Prostaglandin E₂ inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Nov;281(5):L1257-63.
78. White ES, Atrasz RG, Dickie EG, Aronoff DM, Stambolic V, Mak TW, et al. Prostaglandin E₂ inhibits fibroblast migration by E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in PTEN activity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005 Feb;32(2):135-41.
79. Huang SK, White ES, Wettlaufer SH, Grifka H, Hogaboam CM, Thannickal VJ, et al. Prostaglandin E₂ induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathways. *FASEB J.* 2009 Dec;23(12):4317-26.
80. Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ, Moore BB. Prostaglandin E₂ inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Nov;29(5):537-44.

81. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999 Oct;79(4):1193-226.
82. Honda A, Sugimoto Y, Namba T, Watabe A, Irie A, Negishi M, et al. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype. *J Biol Chem.* 1993 Apr 15;268(11):7759-62.
83. Katsuyama M, Ikegami R, Karahashi H, Amano F, Sugimoto Y, Ichikawa A. Characterization of the LPS-stimulated expression of EP2 and EP4 prostaglandin E receptors in mouse macrophage-like cell line, J774.1. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Oct 29;251(3):727-31.
84. Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T, Negishi M, et al. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem.* 1993 Sep 25;268(27):20175-8.
85. Sugimoto Y, Namba T, Honda A, Hayashi Y, Negishi M, Ichikawa A, et al. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J Biol Chem.* 1992 Apr 5;267(10):6463-6.
86. Huang S, Wettlaufer SH, Hogaboam C, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E(2) inhibits collagen expression and proliferation in patient-derived normal lung fibroblasts via E prostanoid 2 receptor and cAMP signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007 Feb;292(2):L405-13.
87. Huang SK, Wettlaufer SH, Chung J, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits specific lung fibroblast functions via selective actions of PKA and Epac-1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 Oct;39(4):482-9.
88. Zhang L, Keane MP, Zhu LX, Sharma S, Rozengurt E, Strieter RM, et al. Interleukin-7 and transforming growth factor-beta play counter-regulatory roles in protein kinase C-delta-dependent control of fibroblast collagen synthesis in pulmonary fibrosis. *J Biol Chem.* 2004 Jul 2;279(27):28315-9.
89. Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM, Peters-Golden M. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest.* 1995 Apr;95(4):1861-8.
90. Moore BB, Ballinger MN, White ES, Green ME, Herrygers AB, Wilke CA, et al. Bleomycin-induced E prostanoid receptor changes alter fibroblast responses to prostaglandin E2. *J Immunol.* 2005 May 1;174(9):5644-9.
91. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 1994 Jan;8(2):133-46.
92. Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Dec;1(3):169-78.

93. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1646-7.
94. Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev*. 2002 Dec;23(6):787-823.
95. Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol*. 2002 May;71(5):731-40.
96. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003 Jun 13;113(6):685-700.
97. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*. 2003 Jan 15;116(Pt 2):217-24.
98. Sato Y, Rifkin DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol*. 1989 Jul;109(1):309-15.
99. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev*. 2000 Jan 15;14(2):163-76.
100. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*. 1999 Feb 5;96(3):319-28.
101. Mu D, Cambier S, Fjellbirkeland L, Baron JL, Munger JS, Kawakatsu H, et al. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J Cell Biol*. 2002 Apr 29;157(3):493-507.
102. Wipff PJ, Hinz B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. *Eur J Cell Biol*. 2008 Sep;87(8-9):601-15.
103. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol*. 1988 May;106(5):1659-65.
104. Poczatek MH, Hugo C, Darley-Usmar V, Murphy-Ullrich JE. Glucose stimulation of transforming growth factor-beta bioactivity in mesangial cells is mediated by thrombospondin-1. *Am J Pathol*. 2000 Oct;157(4):1353-63.
105. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997 Dec 4;390(6659):465-71.
106. Wrana JL. Regulation of Smad activity. *Cell*. 2000 Jan 21;100(2):189-92.
107. Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*. 1998 Dec 11;95(6):737-40.

108. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem*. 2000 Dec;267(24):6954-67.
109. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003 Oct 9;425(6958):577-84.
110. Nishida M, Okumura Y, Sato H, Hamaoka K. Delayed inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase ameliorates renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Aug;23(8):2520-4.
111. Pat B, Yang T, Kong C, Watters D, Johnson DW, Gobe G. Activation of ERK in renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction: modulation by antioxidants. *Kidney Int*. 2005 Mar;67(3):931-43.
112. Stambe C, Atkins RC, Tesch GH, Masaki T, Schreiner GF, Nikolic-Paterson DJ. The role of p38alpha mitogen-activated protein kinase activation in renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Feb;15(2):370-9.
113. Stratton R, Rajkumar V, Ponticos M, Nichols B, Shiwen X, Black CM, et al. Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF-beta by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. *FASEB J*. 2002 Dec;16(14):1949-51.
114. Kluwe J, Pradere JP, Gwak GY, Mencin A, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition. *Gastroenterology*. 2010 Jan;138(1):347-59.
115. Anthoni M, Wang G, Leino MS, Lauerma AI, Alenius HT, Wolff HJ. Smad3 -signalling and Th2 cytokines in normal mouse airways and in a mouse model of asthma. *Int J Biol Sci*. 2007;3(7):477-85.
116. Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T, et al. Activation of TGF-beta/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Aug;110(2):249-54.
117. Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK, et al. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *EMBO J*. 1990 Jul;9(7):2085-93.
118. Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev*. 1995 Nov 15;9(22):2795-807.
119. Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev*. 1995 Nov 15;9(22):2808-20.

120. Zeisberg M, Muller GA, Kalluri R. Are there endogenous molecules that protect kidneys from injury? The case for bone morphogenetic protein-7 (BMP-7). *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Apr;19(4):759-61.
121. Sugimoto H, Yang C, LeBleu VS, Soubasakos MA, Giraldo M, Zeisberg M, et al. BMP-7 functions as a novel hormone to facilitate liver regeneration. *FASEB J*. 2007 Jan;21(1):256-64.
122. Vukicevic S, Basic V, Rogic D, Basic N, Shih MS, Shepard A, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest*. 1998 Jul 1;102(1):202-14.
123. Damiao MJ, Bertocchi AP, Monteiro RM, Goncalves GM, Cenedeze MA, Feitoza CQ, et al. The effects of rapamycin in the progression of renal fibrosis. *Transplant Proc*. 2007 Mar;39(2):457-9.
124. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol*. 2007;6:7.
125. Kinoshita K, Iimuro Y, Otagawa K, Saika S, Inagaki Y, Nakajima Y, et al. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. *Gut*. 2007 May;56(5):706-14.
126. Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, Flanders KC, Ohnishi Y, Nakajima Y, et al. Adenoviral gene transfer of BMP-7, Id2, or Id3 suppresses injury-induced epithelial-to-mesenchymal transition of lens epithelium in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006 Jan;290(1):C282-9.
127. Izumi N, Mizuguchi S, Inagaki Y, Saika S, Kawada N, Nakajima Y, et al. BMP-7 opposes TGF-beta1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Jan;290(1):L120-6.
128. Myllarniemi M, Lindholm P, Ryyanen MJ, Kliment CR, Salmenkivi K, Keski-Oja J, et al. Gremlin-mediated decrease in bone morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Feb 1;177(3):321-9.
129. Pegorier S, Campbell GA, Kay AB, Lloyd CM. Bone morphogenetic protein (BMP)-4 and BMP-7 regulate differentially transforming growth factor (TGF)-beta1 in normal human lung fibroblasts (NHLF). *Respir Res*. 2010 Jun 23;11:85.
130. Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol*. 2004 Apr;85(2):47-64.
131. Saika S, Ikeda K, Yamanaka O, Sato M, Muragaki Y, Ohnishi Y, et al. Transient adenoviral gene transfer of Smad7 prevents injury-induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium in mice. *Lab Invest*. 2004 Oct;84(10):1259-70.
132. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci*. 2002 Apr 1;7:d793-807.

133. Murawaki Y, Nishimura Y, Ikuta Y, Idobe Y, Kitamura Y, Kawasaki H. Plasma transforming growth factor-beta 1 concentrations in patients with chronic viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998 Jul;13(7):680-4.
134. Tacke F, Gabele E, Bataille F, Schwabe RF, Hellerbrand C, Klebl F, et al. Bone morphogenetic protein 7 is elevated in patients with chronic liver disease and exerts fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. *Dig Dis Sci*. 2007 Dec;52(12):3404-15.
135. Li G, Xie Q, Shi Y, Li D, Zhang M, Jiang S, et al. Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats. *J Gene Med*. 2006 Jul;8(7):889-900.
136. George J, Tsutsumi M. siRNA-mediated knockdown of connective tissue growth factor prevents N-nitrosodimethylamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Gene Ther*. 2007 May;14(10):790-803.
137. Gressner OA, Rizk MS, Kovalenko E, Weiskirchen R, Gressner AM. Changing the pathogenetic roadmap of liver fibrosis? Where did it start; where will it go? *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Jul;23(7 Pt 1):1024-35.
138. Bustos-Valenzuela JC, Halcsik E, Bassi EJ, Demasi MA, Granjeiro JM, Sogayar MC. Expression, purification, bioactivity, and partial characterization of a recombinant human bone morphogenetic protein-7 produced in human 293T cells. *Mol Biotechnol*. 2010 Oct;46(2):118-26.
139. Stumm CL, Wettlaufer SH, Jancar S, Peters-Golden M. Airway remodeling in murine asthma correlates with a defect in PGE2 synthesis by lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011 Nov;301(5):L636-44.
140. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):199-210.
141. Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. The Childhood Asthma Management Program Research Group. *N Engl J Med*. 2000 Oct 12;343(15):1054-63.
142. Henderson WR, Jr., Tang LO, Chu SJ, Tsao SM, Chiang GK, Jones F, et al. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jan 1;165(1):108-16.
143. Henderson WR, Jr., Chiang GK, Tien YT, Chi EY. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT1 receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Apr 1;173(7):718-28.
144. Horowitz JC, Peters-Golden M. Prostaglandin E2's new trick: "decider" of differential alveolar cell life and death. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Jul 1;182(1):2-3.

145. Pierzchalska M, Szabo Z, Sanak M, Soja J, Szczeklik A. Deficient prostaglandin E2 production by bronchial fibroblasts of asthmatic patients, with special reference to aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 May;111(5):1041-8.
146. Keerthisingam CB, Jenkins RG, Harrison NK, Hernandez-Rodriguez NA, Booth H, Laurent GJ, et al. Cyclooxygenase-2 deficiency results in a loss of the anti-proliferative response to transforming growth factor-beta in human fibrotic lung fibroblasts and promotes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol*. 2001 Apr;158(4):1411-22.
147. Hodges RJ, Jenkins RG, Wheeler-Jones CP, Copeman DM, Bottoms SE, Bellingan GJ, et al. Severity of lung injury in cyclooxygenase-2-deficient mice is dependent on reduced prostaglandin E(2) production. *Am J Pathol*. 2004 Nov;165(5):1663-76.
148. Huang SK, Wettlaufer SH, Hogaboam CM, Flaherty KR, Martinez FJ, Myers JL, et al. Variable prostaglandin E2 resistance in fibroblasts from patients with usual interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Jan 1;177(1):66-74.
149. Sugiura H, Liu X, Duan F, Kawasaki S, Togo S, Kamio K, et al. Cultured lung fibroblasts from ovalbumin-challenged "asthmatic" mice differ functionally from normal. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007 Oct;37(4):424-30.
150. Huang SK, Fisher AS, Scruggs AM, White ES, Hogaboam CM, Richardson BC, et al. Hypermethylation of PTGER2 confers prostaglandin E2 resistance in fibrotic fibroblasts from humans and mice. *Am J Pathol*. 2010 Nov;177(5):2245-55.
151. Mahajan B, Vijayan VK, Agarwal MK, Bansal SK. Serum interleukin-1beta as a marker for differentiation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers*. 2008 Nov;13(7):713-27.
152. Nakae S, Komiyama Y, Yokoyama H, Nambu A, Umeda M, Iwase M, et al. IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int Immunol*. 2003 Apr;15(4):483-90.
153. Chambers LS, Black JL, Ge Q, Carlin SM, Au WW, Poniris M, et al. PAR-2 activation, PGE2, and COX-2 in human asthmatic and nonasthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Sep;285(3):L619-27.
154. Trudeau J, Hu H, Chibana K, Chu HW, Westcott JY, Wenzel SE. Selective downregulation of prostaglandin E2-related pathways by the Th2 cytokine IL-13. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jun;117(6):1446-54.
155. Coward WR, Watts K, Feghali-Bostwick CA, Knox A, Pang L. Defective histone acetylation is responsible for the diminished expression of cyclooxygenase 2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol Cell Biol*. 2009 Aug;29(15):4325-39.
156. Hashimoto K, Sheller JR, Morrow JD, Collins RD, Goleniewska K, O'Neal J, et al. Cyclooxygenase inhibition augments allergic inflammation through CD4-dependent, STAT6-independent mechanisms. *J Immunol*. 2005 Jan 1;174(1):525-32.

157. Card JW, Carey MA, Bradbury JA, Graves JP, Lih FB, Moorman MP, et al. Cyclooxygenase-1 overexpression decreases Basal airway responsiveness but not allergic inflammation. *J Immunol*. 2006 Oct 1;177(7):4785-93.
158. Lundequist A, Nallamshetty SN, Xing W, Feng C, Laidlaw TM, Uematsu S, et al. Prostaglandin E(2) exerts homeostatic regulation of pulmonary vascular remodeling in allergic airway inflammation. *J Immunol*. 2010 Jan 1;184(1):433-41.
159. Gavett SH, Madison SL, Chulada PC, Scarborough PE, Qu W, Boyle JE, et al. Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase-deficient mice. *J Clin Invest*. 1999 Sep;104(6):721-32.
160. Fukutake M, Nakatsugi S, Isoi T, Takahashi M, Ohta T, Mamiya S, et al. Suppressive effects of nimesulide, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*. 1998 Nov;19(11):1939-42.
161. Bennett A, Villa G. Nimesulide: an NSAID that preferentially inhibits COX-2, and has various unique pharmacological activities. *Expert Opin Pharmacother*. 2000 Jan;1(2):277-86.
162. Moore BB, Coffey MJ, Christensen P, Sitterding S, Ngan R, Wilke CA, et al. GM-CSF regulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via a prostaglandin-dependent mechanism. *J Immunol*. 2000 Oct 1;165(7):4032-9.
163. Gilroy DW, Tomlinson A, Willoughby DA. Differential effects of inhibition of isoforms of cyclooxygenase (COX-1, COX-2) in chronic inflammation. *Inflamm Res*. 1998 Feb;47(2):79-85.
164. Gama Landgraf R, Sirois P, Jancar S. Differential modulation of murine lung inflammation by bradykinin B1 and B2 selective receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*. 2003 Jan 26;460(1):75-83.
165. Reader JR, Tepper JS, Schelegle ES, Aldrich MC, Putney LF, Pfeiffer JW, et al. Pathogenesis of mucous cell metaplasia in a murine asthma model. *Am J Pathol*. 2003 Jun;162(6):2069-78.
166. Vasquez-Pinto LM, Landgraf RG, Bozza PT, Jancar S. High vascular endothelial growth factor levels in NZW mice do not correlate with collagen deposition in allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;142(1):19-27.
167. Kenyon NJ, Ward RW, Last JA. Airway fibrosis in a mouse model of airway inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003 Jan 15;186(2):90-100.
168. Rennard SI. Repair mechanisms in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Dec;98(6 Pt 2):S278-86.

169. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 May;161(5):1720-45.
170. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1776-84.
171. Neilson EG, Plieth D, Venkov C. Epithelial-mesenchymal transitions and the intersecting cell fate of fibroblasts and metastatic cancer cells. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2003;114:87-100; discussion 100-1.
172. Loureiro J, Schilte M, Aguilera A, Albar-Vizcaino P, Ramirez-Huesca M, Perez-Lozano ML, et al. BMP-7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Apr;25(4):1098-108.
173. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res*. 2009 Jan;19(1):71-88.
174. Archdeacon P, Detwiler RK. Bone morphogenetic protein 7 (BMP7): a critical role in kidney development and a putative modulator of kidney injury. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2008 Jul;15(3):314-20.
175. Kazama I, Mahoney Z, Miner JH, Graf D, Economides AN, Kreidberg JA. Podocyte-derived BMP7 is critical for nephron development. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;19(11):2181-91.
176. Kariyawasam HH, Xanthou G, Barkans J, Aizen M, Kay AB, Robinson DS. Basal expression of bone morphogenetic protein receptor is reduced in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 May 15;177(10):1074-81.
177. Myllarniemi M, Vuorinen K, Pulkkinen V, Kankaanranta H, Aine T, Salmenkivi K, et al. Gremlin localization and expression levels partially differentiate idiopathic interstitial pneumonia severity and subtype. *J Pathol*. 2008 Mar;214(4):456-63.
178. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, et al. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med*. 2003 Jul;9(7):964-8.
179. Stambe C, Nikolic-Paterson DJ, Hill PA, Dowling J, Atkins RC. p38 Mitogen-activated protein kinase activation and cell localization in human glomerulonephritis: correlation with renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Feb;15(2):326-36.
180. Li JH, Zhu HJ, Huang XR, Lai KN, Johnson RJ, Lan HY. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Jun;13(6):1464-72.

181. Qin W, Chung AC, Huang XR, Meng XM, Hui DS, Yu CM, et al. TGF-beta/Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Aug;22(8):1462-74.
182. Zeisberg M, Kalluri R. Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights into novel therapeutic strategies for chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2008 Sep;23(9):1395-8.
183. Patel SR, Dressler GR. BMP7 signaling in renal development and disease. *Trends Mol Med*. 2005 Nov;11(11):512-8.
184. Piscione TD, Phan T, Rosenblum ND. BMP7 controls collecting tubule cell proliferation and apoptosis via Smad1-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Jan;280(1):F19-33.
185. Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H. BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int*. 2002 Jan;61(1):51-60.

ANEXO A – Artigo de periódico publicado

Stumm CL, Wettlaufer SH, Jancar S, Peters-Golden M. Airway remodeling in murine asthma correlates with a defect in PGE₂ synthesis by lung fibroblasts. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011 Nov;301(5):L636-44.

Airway remodeling in murine asthma correlates with a defect in PGE₂ synthesis by lung fibroblasts

Camila Leindecker Stumm, Scott H. Wetzlauffer, Sonia Jancar and Marc Peters-Golden

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 301:L636-L644, 2011. First published 26 August 2011;
doi:10.1152/ajplung.00158.2011

You might find this additional info useful...

This article cites 49 articles, 25 of which can be accessed free at:

<http://ajplung.physiology.org/content/301/5/L636.full.html#ref-list-1>

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:

<http://ajplung.physiology.org/content/301/5/L636.full.html>

Additional material and information about *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajplung>

This information is current as of November 2, 2011.

Airway remodeling in murine asthma correlates with a defect in PGE₂ synthesis by lung fibroblasts

Camila Leindecker Stumm,¹ Scott H. Wettlaufer,² Sonia Jancar,¹ and Marc Peters-Golden²

¹Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; and ²Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan

Submitted 27 May 2011; accepted in final form 18 August 2011

Stumm CL, Wettlaufer SH, Jancar S, Peters-Golden M. Airway remodeling in murine asthma correlates with a defect in PGE₂ synthesis by lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301: L636–L644, 2011. First published August 26, 2011; doi:10.1152/ajplung.00158.2011.—Asthma is a chronic lung disease characterized by local inflammation that can result in structural alterations termed airway remodeling. One component of airway remodeling involves fibroblast accumulation and activation, resulting in deposition of collagen I around small bronchi. Prostaglandin E₂ (PGE₂) is the main eicosanoid lipid mediator produced by lung fibroblasts, and it exerts diverse anti-fibrotic actions. Dysregulation of the PGE₂ synthesis/response axis has been identified in human pulmonary fibrotic diseases and implicated in the pathogenesis of animal models of lung parenchymal fibrosis. Here we investigated the relationship between the fibroblast PGE₂ axis and airway fibrosis in an animal model of chronic allergic asthma. Airway fibrosis increased progressively as the number of airway challenges with antigen increased from 3 to 7 to 12. Compared with cells from control lungs, fibroblasts grown from the lungs of asthmatic animals, regardless of challenge number, exhibited no defect in the ability of PGE₂ or its analogs to inhibit cellular proliferation and collagen I expression. This correlated with intact expression of the EP₂ receptor, which is pivotal for PGE₂ responsiveness. However, cytokine-induced upregulation of PGE₂ biosynthesis as well as expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and microsomal PGE synthase-1 declined with increasing numbers of antigen challenges. In addition, treatment with the COX-2-selective inhibitor nimesulide potentiated the degree of airway fibrosis following repeated allergen challenge. Because endogenous COX-2-derived PGE₂ acts as a brake on airway fibrosis, the inability of fibroblasts to upregulate PGE₂ generation in the inflammatory milieu presented by repeated allergen exposure could contribute to the airway remodeling and fibrosis observed in chronic asthma.

prostaglandin E₂; airway; prostanoid; inflammation

ASTHMA IS A CHRONIC INFLAMMATORY disease of the airways that in 2005 was estimated to affect over 300 million people around the world. Allergens play an important role in driving asthma, and animal models of allergic asthma have contributed greatly to the understanding of its pathogenesis. The inflammatory process in allergic asthma is typically characterized by increased numbers of Th2 lymphocytes, eosinophils, and activated mast cells. A variety of structural changes in and around the airways, collectively termed airway remodeling, are also observed (4, 7, 10, 39, 43). These include mucus metaplasia of goblet cells, hyperplasia and hypertrophy of airway smooth muscle cells, excessive angiogenesis, and airway fibrosis (2). Airway fibrosis reflects the accumulation, activation, and dif-

ferentiation of fibroblasts which elaborate type I collagen and other extracellular matrix proteins in the subepithelial region of the small airways (4, 5, 43).

The fibrogenic functions of parenchymal lung fibroblasts have long been studied in the context of pulmonary fibrosis. Indeed, a number of functional differences in cells from fibrotic lung tissue that would be expected to contribute to fibrosis have been identified (45); moreover, many of these differences have been found to persist through numerous passages, implying a stable phenotypic alteration. The apparent stability of some of these phenotypic alterations can now be explained on the basis of epigenetic mechanisms (11, 26). Many of these same stable differences in fibroblast phenotype have likewise been observed in both human (30) and mouse models (47) of asthma. Although activation by mediators such as transforming growth factor- β (TGF- β) and interleukin (IL)-13 of both parenchymal and airway fibroblasts has been studied extensively, the importance of endogenous anti-fibrotic mediators has received far less attention. Prostaglandin E₂ (PGE₂) is the major arachidonic acid metabolite of lung fibroblasts (34, 36, 46), and it has been shown to inhibit virtually all fibroblast functions, including migration (32, 50), proliferation (3, 12), survival (29), myofibroblast differentiation (33), and collagen accumulation (13, 17, 35).

However, fibroblasts isolated from the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) exhibit diminished synthesis of PGE₂ and diminished expression of the inducible enzyme responsible for its biosynthesis, cyclooxygenase-2 (COX-2), in response to various stimuli (51). PGE₂ can ligate four different G protein-coupled receptors (EP₁ through EP₄), which are coupled to different G proteins and thereby mediate distinct signaling responses. Virtually all of the inhibitory effects of PGE₂ on lung fibroblasts are mediated predominantly by its ligation of EP₂ (25, 33, 50) and subsequent ability to increase intracellular levels of cAMP. Furthermore, however, we have shown that fibroblasts from some patients with IPF also manifest resistance to the suppressive actions of PGE₂ (28), in part because of downregulation of EP₂ (28), and this defect was recapitulated in lung fibroblasts from mice following bleomycin fibrosis (40).

Although they affect different compartments of the lung, both asthma and IPF are characterized by the deposition of scar tissue that alters normal architecture and physiological function. In addition, both IPF (23) and allergic asthma are characterized by Th2 skewing of immune responses. Because parenchymal lung fibrosis is characterized by defects in fibroblast synthesis of and responsiveness to PGE₂, and because airway fibrosis is an important component of airway remodeling in asthma, in this study we utilized a model of repeated

Address for reprint requests and other correspondence: M. Peters-Golden, 6301 MSRB III, 1150 W Medical Center Dr, Ann Arbor, MI 48109-5642 (e-mail: petersm@med.umich.edu).

allergen challenge to the airways to determine if airway fibrosis is accompanied by similar defects in the fibroblast PGE₂ axis.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Grade V ovalbumin (OVA) and BSA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Aluminum hydroxide (ImJect Alum Adjuvant) was obtained from Thermo Scientific (Waltham, MA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and penicillin/streptomycin were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). FBS was purchased from HyClone (Logan, UT). PGE₂ and PGE₂ enzyme immunoassay (EIA) kits were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Mouse IL-1 β was obtained from Thermo Scientific, TGF- β was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN), and forskolin was from Cayman Chemical. [³H]thymidine and enhanced chemiluminescence (ECL) reagent were obtained from GE Healthcare (Piscataway, NJ). Antibodies used for immunoblotting and their sources were as follows: mouse collagen I, Cedarlane Laboratories (Burlington, ON, Canada); COX-2 and microsomal PGE synthase-1 (mPGEs1), Cayman Chemical; α -tubulin, Sigma-Aldrich; and GAPDH, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The collagen-I antibody used for immunohistochemistry was purchased from Abcam (Cambridge, UK). Nimesulide was obtained from Sigma-Aldrich.

Mice. Female BALB/c mice 7–8 wk old were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and kept under specific pathogen-free conditions at the University of Michigan. All experiments were approved by The University of Michigan Committee on the Use and Care of Animals.

Induction of allergic asthma. Mice were sensitized on days 0 and 12 by an intraperitoneal injection of a mixture containing 20 μ g of OVA and 2 mg of Al(OH)₃ in PBS (a total volume of 0.1 ml). Sensitized mice were then challenged by multiple exposures to an aerosol of OVA at 5% in PBS generated by an ultrasonic nebulizer (ICEL US-800), delivering particles of 0.5–10 μ m diameter at ~0.75 ml/min for 20 min. An initial dose-finding experiment compared three different numbers of cumulative airway challenges to determine the most appropriate protocol for inducing histologic airway remodeling as well as the kinetics of this response. The experimental groups were as follows: *group A* received the sensitizations and 3 challenges (days 18, 19, and 20); *group B* received the sensitizations and 7 challenges (days 18–23 and 25); and *group C* received the sensitizations and 12 challenges (days 18–23, 25, 27, 29, 31, 33, and 35), as depicted in Fig. 1. Animals were killed for evaluation following the last allergen challenge on the days indicated in Fig. 1. The control groups consisted of animals sensitized with OVA as described above but challenged the same number of times with PBS solution. Because no differences were detected among the three control groups, we used the control of the *group C* (2 sensitizations and 12 challenges with PBS) mice as

standard controls for all experiments. Four independent experiments were performed, with five animals per group in each of them. For the dose-finding experiment, we examined five animals per group.

BAL. Mice were killed via CO₂ asphyxiation, the trachea was cannulated with polyethylene tubing (PE-50, Intramedic; Clay Adams, Parsippany, NJ) attached to a 25-gauge needle on a tuberculin syringe, and the lungs were lavaged two times with 0.75 ml cold PBS for a total lavage volume of 1.5 ml. In >95% of the mice, the recovery volume was 1.3–1.4 ml. The bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was centrifuged at 1,500 rpm, and the supernatant was removed. The pelleted cells were collected and enumerated by counting on a hemocytometer in the presence of trypan blue. Cytospins were prepared from suspended BAL cells.

Differential staining. Cytospins of the BAL were made by centrifuging 50,000–100,000 cells on microscope slides using a Shandon Cytospin 3 (Shandon, Astmoore, UK). The slides were allowed to air-dry and were then stained using a modified Wright-Giemsa (WG) stain. For WG staining, the slides were fixed/prestained for 2 min using a one-step methanol-based WG stain (Harleco; EM Diagnostics, Gibbstown, NJ) followed by steps 2 and 3 of the Diff-Quick whole blood stain (Diff-Quick; Baxter Scientific, Miami, FL). A total of 300 cells were counted from randomly chosen high-power microscope fields for each sample. The differential percentage was multiplied by the total leukocyte number to derive the number of monocyte/macrophages, neutrophils, and eosinophils per sample.

Light microscopy processing. Lung samples were fixed for 24 h in 10% neutral buffered formalin, dehydrated in ethanol, and embedded in Paraplast (Sigma-Aldrich) at 60°C. Five-micrometer sections were adhered on glass slides precoated with 0.1% poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) and then dried at 37°C.

Histology. Animals were killed and perfused via the left ventricle with 3 ml normal saline. Lungs were inflated with 1 ml 10% neutral buffered formalin before being dehydrated in 70% ethanol. Lungs were then processed using standard procedures and embedded in paraffin. Sections of 5 μ m were cut, mounted on slides, and stained with hematoxylin and eosin, picrosirius-hematoxylin, and antibody against type I collagen. The material was analyzed under a Nikon Eclipse E600 microscope, and images were captured using a Nikon DXM1200C digital camera. Photographs were analyzed, and morphometric analysis was performed using the NIS Elements AR 2.30 Imaging Software. Specifically, we quantified the stained area in the maximum number of small airways (0.4–0.7 mm in diameter) in each slide (one slide/animal). The areas of staining of each animal were averaged, and this number was considered representative of that individual animal. Results are presented as the mean of the stained area in square micrometers.

Immunohistochemistry. Lung sections were deparaffinized and hydrated, and antigenic retrieval was performed by incubating the slides in 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0 with 0.05% vol/vol Tween 20, at 90°C for 20 min. Each of the succeeding steps was followed by a thorough rinse in PBS. All steps were performed in a humidified chamber. Slides were then treated with 3% H₂O₂ in PBS for 30 min to block endogenous peroxidase activity. Nonspecific staining was blocked by incubating the sections for 30 min in PBS containing 10% BSA. Rabbit polyclonal anti-collagen I antibody was diluted 1:200 in PBS containing 0.3% Tween 20 and incubated overnight at 4°C. The sections were incubated with biotin-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Vector Laboratories, Burlingame, CA), diluted 1:1,000 in PBS, for 1 h at room temperature. After washes in PBS, sections were incubated in streptavidin-peroxidase ABC complex (Vector Laboratories) for 1 h at room temperature. Peroxidase was visualized using 0.03% 3,3'-diaminobenzidine in PBS with 0.03% H₂O₂. The sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. For each immunohistochemical reaction, controls were obtained by omitting the primary antibody. Microscopy, image capture, morphometric analysis, and data presentation were as described above for histochemical staining.

Fig. 1. Dose-finding experimental protocol. Animals were sensitized ip 2 times with ovalbumin (OVA) and alum and then subjected to varying numbers of aerosol antigen challenges to the airways with 5% OVA (wt/vol) in PBS or PBS alone (indicated by arrows). Groups received 3, 7, and 12 challenges (*groups A, B, and C, respectively*). One day after the last challenge in each of the groups, lungs and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected for further analysis.

Fibroblast purification. A previous report (47) identified phenotypic differences between fibroblasts from asthmatic and control lungs but noted no differences between cells isolated from the trachea and the lung parenchyma. Because our focus was on the process of remodeling of small bronchi, we used parenchymal lung tissue as a source of fibroblasts in these studies. Mouse lungs were perfused via the right ventricle with 5 ml cold PBS and removed under aseptic conditions. The left lung was minced with scissors in DMEM containing 10% FBS and placed in 10 ml of medium in 10-cm-diameter tissue culture plates. Fibroblasts were allowed to grow out of the minced tissue, and, when cells reached 70% confluence, they were passaged following trypsinization. Fibroblasts were grown for 10–15 days (2–3 passages) before being used.

Cell proliferation. Proliferation was measured by [³H]thymidine incorporation in disintegrations per minute measured by β -scintillation counting as described previously (25). Cells were incubated in medium alone or in 3% FBS in the presence or absence of PGE₂ (1 μ M) or the direct adenylyl cyclase activator forskolin (200 μ M) with the simultaneous addition of [³H]thymidine for 18 h. Proliferation in the presence of PGE₂ and other cAMP agonists was expressed as a percentage of that determined in the absence of PGE₂/cAMP agonists. All proliferation experiments were run in six replicates for each treatment, and results are presented as a percentage of untreated nonasthmatic animals.

Determination of PGE₂ synthesis. PGE₂ was measured in both BAL fluid and cell culture supernatants using an EIA kit according to the manufacturer's instructions. Mouse lung fibroblasts were adhered and then cultured for 18 h with or without 2.5 ng/ml IL-1 β . Supernatants were collected and kept at -80°C before immunoassay. BAL results are given as picograms of PGE₂ per milliliter of BAL fluid, whereas PGE₂ in the cell culture supernatant results were normalized to the total amount of protein in the cell lysates.

Immunoblot analysis. For collagen I analysis, the cells were plated, serum-starved overnight, and then treated for 18 h with TGF- β (5 ng/ml) alone or in combination with forskolin (200 μ M) or PGE₂ (1 μ M). Cells were washed in PBS and disrupted in lysis buffer (PBS containing 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM orthovanadate, and Roche protease cocktail inhibitor). Equal amounts of lysate protein were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 7% nonfat milk for collagen I and 5% BSA in Tris-buffered solution with 0.1% Tween for the other proteins of interest. They were then incubated overnight at 4°C with respective primary antibodies against collagen I (1:500 in 7% milk), COX-2 (1:2,000 in 2% PBS/BSA), and mPGEs-1 (1:2,000 in 2% PBS/BSA), followed by peroxidase-conjugated secondary antibodies to rabbit or mouse IgG (1:5,000). Proteins of interest were detected using the ECL method. Densitometry of the bands was calculated using Scion Image software (NIH) and normalized for α -tubulin or GAPDH, which were used as loading controls. Results are expressed as a percentage of the nontreated cells.

Semiquantitative real-time RT-PCR. Semiquantitative real-time RT-PCR was performed on an ABI Prism 7000 Thermocycler (Applied Biosystems) attached to a Dell Latitude laptop computer. Gene-specific primers and probes were designed using Primer Express software (Perkin Elmer/Applied Biosystems). The sequences were as follows: EP₂ forward, 5-TGCGCTCAGTCCTCTGTTGT-3; EP₂ reverse, 5-TGGCACTGGACTGGGTAGAAC-3; EP₂ probe, 5-6FAM-CACT-GAGAACAACAAGAAGCTCAGCAAACAT-TAMRA-3; β -actin (housekeeping gene against which EP₂ expression was normalized) forward, 5-CTGCCTGACGGCCAAGTC-3; β -actin reverse, 5-CAA-GAAGGAAGGCTGGAAAAGAG-3; and β -actin probe, 5-6FAM-AAACGAGAGGTTCCGATGCCCTG-TAMRA-3. Briefly, the reaction mixture contained 250 ng of RNA, 12.5 μ l of TaqMan Universal PCR Master Mix, 0.625 μ l of $\times$ 40 MultiScribe and RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems and Roche), 250 nM probe, and forward and reverse primers at 300 nM in a final volume of 25 μ l. For each time point, samples from each individual mouse (5 animals/group) were run in triplicate. The average cycle threshold (C_t) was determined for each group of animals from a given experiment at each time point. Relative gene expression was calculated using the comparative C_t method, which assesses the difference in gene expression between the gene of interest and β -actin for each sample to generate the $\Delta\Delta C_t$. Relative gene expression was then determined by the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Nimesulide treatment. Mice received an intraperitoneal dose of the selective COX-2 inhibitor nimesulide (5 mg/kg) in sterile saline solution daily from days 27 to 35 of the group C asthma protocol to assess the role of COX-2-derived prostanoids during the fibrotic phase of chronic asthma. All other animals in these experimental groups received the same volume of vehicle alone intraperitoneally on the same days.

Data analysis. Data are presented as mean values $\pm$ SE. Statistical significance was analyzed using GraphPad Prism 5 (version 5.01; GraphPad Software). Significance was assessed by ANOVA and a post hoc Bonferroni test for three or more groups. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Inflammatory cell recruitment to the airways. Total and differential BAL cell counts were determined as a means to evaluate airway inflammation. Control mice exhibited a small number of leukocytes, most of which were mononuclear cells (Table 1). An increase in the cumulative number of allergen challenges resulted in a modest gradual increase in the accumulation of mononuclear cells as well as a modest increase in neutrophils that peaked in group C. Numbers of recovered eosinophils increased substantially in all groups, peaking in group B. This analysis confirmed that the protocol employed

Table 1. Cell counts in bronchoalveolar lavage fluid

	Group	Total	Mononuclear	Eosinophils	Neutrophils
Control	A	5 $\pm$ 0.54	5 $\pm$ 0.54	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	B	10.4 $\pm$ 1.8	9.49 $\pm$ 1.57	0 $\pm$ 0	0.19 $\pm$ 0.13
	C	12 $\pm$ 1.22	11.98 $\pm$ 1.23	0 $\pm$ 0	0.02 $\pm$ 0.02
Asthma	A	52 $\pm$ 10.81	24.75 $\pm$ 3.12	23.64 $\pm$ 7.86	3.72 $\pm$ 1.04
	B	316.8 $\pm$ 78.33*	35.88 $\pm$ 9.02	276.7 $\pm$ 70.51#	4.72 $\pm$ 1.66
	C	198.8 $\pm$ 22.78**	44.64 $\pm$ 8.34***	125.1 $\pm$ 24.83##	28.56 $\pm$ 3.39###

Cell nos. are expressed as 10⁴ cells/ml and represent means $\pm$ SE from 4 independent experiments. Cells were pelleted and resuspended in 1 ml total volume. Total cells were counted on a hemocytometer. Cytospins were prepared and stained with a modified Wright-Giemsa stain for the differential cell counts. Nos. of each cell type were compared among the experimental groups. * $P < 0.05$ compared with total cells from controls and asthma from groups A and B. ** $P < 0.05$ compared with total cells from controls and asthma from groups A and C. *** $P < 0.05$ compared with mononuclear cell counts of controls and asthma from groups A and B. # $P < 0.05$ compared with eosinophils of controls and asthma from groups A and C. ## $P < 0.05$ compared with eosinophils of controls and asthma from groups A and B. ### $P < 0.05$ compared with neutrophil counts of controls and asthma from groups A and B.

resulted in robust eosinophil-predominant allergic inflammation.

Allergen-induced histopathologic alterations in lung structure. Control lungs exhibited no inflammation or structural abnormalities (Fig. 2A) and, regardless of the cumulative number of PBS challenges, were identical to untreated controls in their lack of inflammation (data not shown). Lungs from *group A* mice exhibited inflammatory cell infiltrates around small bronchi and blood vessels but almost no collagen deposition (Fig. 2F). A modest amount of collagen deposition around small airways was observed in the *group B* animals, and this was more extensive in those from *group C* (Fig. 2, E–H).

In vitro properties of fibroblasts during the evolution of airway fibrosis. Having defined the kinetics for the evolution of airway fibrosis as described above, we next performed parallel in vitro experiments with lung fibroblasts isolated from mice following 3 (*group A*), 7 (*group B*), or 12 (*group C*) challenges with OVA or PBS. Functional properties assessed included baseline collagen I expression, baseline EP₂ expression, and PGE₂ production in the presence and absence of IL-1 β stimulation. At baseline, control fibroblasts from *groups A, B,* and *C* expressed similar amounts of type I collagen. While baseline collagen I expression in asthmatic cells did not differ from that of control cells from *group A* mice, asthmatic cells from *group B* mice showed a trend toward greater baseline collagen I than observed in controls, and this difference reached significance in those from *group C* (Fig. 3A). Because immunodetection of EP proteins by available commercial antibodies is of limited success in mice, real-time RT-PCR was used to determine receptor expression. EP₂ expression was similar among the experimental groups and not altered by the severity of airway inflammation or fibrosis (Fig. 3B). As shown in Fig. 3C, control cells from all three groups were able to upregulate PGE₂ synthesis approximately five- to sevenfold in response to IL-1 β . Asthmatic fibroblasts from *group A* mice exhibited a capacity to upregulate the synthesis of PGE₂ to an even greater extent than corresponding control cells. However, this capacity was progressively lost with increased numbers of allergen

challenges, and in *group C* this upregulation was clearly impaired; in fact, asthmatic cells from *group C* mice exhibited only one-third the capacity for upregulated PGE₂ synthesis as did asthmatic cells from *group A* mice. These results identify functional alterations in fibroblasts that accompany and parallel the development of airway fibrosis by histopathologic assessment. Because airway fibrosis and alterations in fibroblast function were both maximal in *group C*, we focused on this group to carefully evaluate the PGE₂ axis in a subsequent series of four independent experiments.

Fibroblast responsiveness to PGE₂. To more thoroughly assess if the histopathologic alterations of chronic asthma reflected by *group C* animals are accompanied by a defect in the responsiveness of lung fibroblasts to PGE₂, we first analyzed the gene expression of EP₂, the G protein-coupled receptor through which PGE₂ exerts most of its inhibitory effects on these cells. Real-time RT-PCR results showed no difference in EP₂ expression in lung fibroblasts from *group C* control vs. asthmatic mice (data not shown), consistent with the results (Fig. 3B) of initial dose-finding studies. In addition to the phenomenon of PGE₂ resistance attributable to EP₂ down-regulation, we have also observed that fibroblasts from some IPF patients can exhibit resistance to the inhibitory actions of PGE₂ despite intact EP₂ expression (28). Because of this possibility of a postreceptor defect in cell signaling, we investigated asthmatic cell responses to PGE₂ or its analogs even though EP₂ expression was preserved. As endpoints for these experiments, we examined type I collagen expression and proliferation. As suggested in the dose-finding experiment, fibroblasts isolated from *group C* mice expressed higher amounts of collagen I at baseline than did their control counterparts (Fig. 4A). To determine their responsiveness to a profibrotic stimulus, fibroblasts from *group C* (control and asthmatic) mice were incubated with TGF- β (5 ng/ml) either alone or together with PGE₂ (1 μ M) or the direct adenylyl cyclase activator forskolin (200 μ M), both of which increase intracellular levels of cAMP. As also shown in Fig. 4A, TGF- β significantly potentiated collagen I accumulation in lung fibroblasts from both control and asthmatic animals, and TGF- β -

Fig. 2. Morphologic analysis of airways with increasing allergen challenges. A–D: hematoxylin and eosin (H&E) staining of small bronchi from control and *group A, B,* and *C* animals, respectively. E–H: picrosirius-hematoxylin staining of lungs from control and *group A, B,* and *C* mice. Bars = 50 μ m. Arrows indicate areas of Periodic acid-Schiff (PAS) staining.

Fig. 3. Properties of mouse lung fibroblasts as a function of numbers of allergen challenges. A: baseline type I collagen expression in mouse lung fibroblasts from control and asthmatic animals as determined by Western blot. * $P < 0.05$ compared with group A and control from groups B and C. B: EP₂ expression as determined by real-time RT-PCR in nonstimulated mouse lung fibroblasts from control and asthmatic animals using the comparative cycle threshold method, with data expressed relative to β -actin. C: prostaglandin E₂ (PGE₂) synthesis as measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and expressed as pg/ μ g of total protein in the cell lysate sample; the horizontal line indicates the no-IL-1 β value. * $P < 0.05$ compared with groups A, B, and C. Data represent means $\pm$ SE from 5 animals in each group.

stimulated collagen I accumulation was abrogated by PGE₂ and forskolin to the same extent in control and asthmatic cells. In contrast to collagen I levels, baseline proliferation was comparable between control and asthmatic group C cells (Fig. 4B). Proliferation was stimulated by 3% (vol/vol) serum in both control and asthmatic cells, although stimulation was slightly less in asthmatic cells. Serum-stimulated proliferation was likewise diminished by PGE₂ and forskolin to a com-

parable degree in lung fibroblasts from both control and asthmatic animals.

PGE₂ synthesis by lung fibroblasts. Next we examined the capacity of lung fibroblasts for stimulated PGE₂ synthesis. Cells were plated and incubated overnight with serum-free medium or treated with IL-1 β (2.5 ng/ml). Because IL-1 β is well-known to induce COX-2 expression and PGE₂ synthesis in lung fibroblasts (51), it was employed as a tool to evaluate the ability of lung fibroblasts from asthmatic mice to upregulate the biosynthesis of this prostanoid. However, it is also a relevant constituent of the inflammatory milieu to which lung fibroblasts are exposed in vivo, as IL-1 β has been reported to be elevated in the BAL of asthma patients (38) and to play a role in the development of airway hyperresponsiveness (42). Results from the initial dose-finding experiment were corroborated here, since we saw an impaired ability to upregulate PGE₂ synthesis by asthmatic fibroblasts in group C (Fig. 5A). PGE₂ synthesis from arachidonic acid depends on the sequential actions of COX and PGE enzymes. We therefore compared the IL-1 β -induced upregulation of the inducible synthetic enzymes, COX-2 and mPGEs-1, in control and asthmatic fibroblasts from group C animals. Compared with control cells,

Fig. 4. Responsiveness to PGE₂ and forskolin in group C fibroblasts. A: effect of PGE₂ and forskolin (FSK) on collagen I expression in mouse lung fibroblasts from control and asthmatic group C animals. B: effect of PGE₂ and forskolin on proliferation, measured as [³H]thymidine incorporation, in mouse lung fibroblasts from control and asthmatic group C animals. Data represent means $\pm$ SE from 5 animals in each of 4 independent experiments. SFM, serum-free medium; TGF, transforming growth factor. * $P < 0.05$ compared with forskolin-treated asthma group. ** $P < 0.05$ compared with control cells treated with forskolin and PGE₂. *** $P < 0.05$ compared with untreated controls.

Fig. 5. Inducible PGE₂ synthesis and biosynthetic enzyme expression in *group C* mouse lung fibroblasts. **A**: fibroblasts from control and asthmatic mouse lungs of *group C* were incubated without or with interleukin (IL)-1β for 18 h, and PGE₂ levels in medium were quantitated by immunoassay. Data are expressed as the fold increase with IL-1β above unstimulated conditions (which are indicated by the horizontal line) and represent the means ± SE from 5 animals in each of 4 independent experiments. **B** and **C**: cyclooxygenase (COX)-2 (**B**) and microsomal PGE synthase-1 (mPGEs1, **C**) expression, determined by Western blot, in fibroblasts from *group C* animals. Data are expressed as the fold increase with IL-1β above the unstimulated level, depicted as a horizontal line, and represent the means ± SE from 5 animals in each of 4 independent experiments. **A** and **B**: **P* < 0.05 compared with baseline. ***P* < 0.05 compared with baseline and IL-1β-treated asthma group. **C**: **P* < 0.05 compared with baseline and IL-1β-treated asthma group.

lung fibroblasts from asthmatic animals exhibited a diminished capacity to upregulate COX-2 (Fig. 5B) and, to a lesser extent, mPGEs-1 (Fig. 5C), in response to IL-1β.

PGE₂ in BAL fluid. PGE₂ was measured in the BAL fluid of *group C* asthmatic and control animals. PGE₂ was not different between the experimental groups. In BAL from control animals, PGE₂ levels were 185.1 ± 22.82 pg/ml, whereas levels in the asthmatic animals were 232.8 ± 15.41 pg/ml.

Effect of nimesulide treatment on histopathology. To determine if endogenous COX-2-derived prostanoids generated during the fibrotic phase of airway remodeling influence the eventual extent of fibrosis, we treated animals with a daily intraperitoneal dose (5 mg/kg) of nimesulide, a highly selective COX-2 inhibitor (1, 14), from *days 27 to 35* of the *group C* protocol. Lung sections were stained with picrosirius-hematoxylin to visualize total collagen and also immunostained for type I collagen and submitted to morphometric analysis as described in MATERIALS AND METHODS. By both methods, animals treated with nimesulide exhibited a greater degree of airway fibrosis than their vehicle-treated asthmatic counterparts (Fig. 6, A–C and E–G). This conclusion was supported by morphometric quantitation of the mean total area (μm²) of collagen deposi-

tion around all small bronchi (0.4–0.7 mm in diameter) (Fig. 6, D and H).

DISCUSSION

A variety of structural changes in the airways, collectively termed “airway remodeling,” are thought to contribute to airway hyperresponsiveness and obstruction in chronic asthma (10, 22). Fibrosis is one component of this remodeling response. Common pathogenic elements driving fibrogenesis of both pulmonary airways and parenchyma include a Th2 immune response dominated by cytokines such as IL-5 and IL-13, epithelial injury, and elaboration of growth factors such as TGF-β. These events ultimately result in the accumulation and activation of mesenchymal cells, including fibroblasts, which synthesize and secrete matrix proteins such as collagen that comprise scars. Fibrosis in asthma has been associated with physiologic airflow limitation and loss of airway distensibility (49). No effective therapeutic options for fibrotic processes are currently available, underscoring the need to gain a better understanding of fibrogenesis that might lead to novel therapeutic strategies. Importantly, existing data in both humans (9a) and in animal models (19, 20) suggest that corticosteroids,

Fig. 6. Effect of nimesulide on airway remodeling in asthma. The COX-2 inhibitor nimesulide was administered ip to animals in the group C asthma protocol daily from days 27 to 35, and small bronchi were analyzed for staining by picrosirius-hematoxylin (top) and collagen I antibody (bottom). A: control. B: asthma. C: asthma + nimesulide. Bars = 50 μm. D: morphometric analysis of the stained area in μm². Data represent means ± SE from 5 mice in each of 3 independent experiments. **P* < 0.05 compared with the control group. ***P* < 0.05 compared with the asthma group. Arrows indicate areas of positive staining to PAS and collagen I.

well known to exert anti-inflammatory effects in asthma, fail to ameliorate airway remodeling.

As noted in the Introduction, a substantial body of literature now supports the conclusion that the PGE₂ axis is an important endogenous brake on fibrogenesis that is dysregulated in parenchymal lung fibrosis. PGE₂ can be synthesized by virtually all cell types in the lung, but epithelial cells, mesenchymal cells, and macrophages are likely its predominant sources. This prostanoid possesses ideal properties of an anti-fibrotic molecule, since it inhibits virtually all profibrotic functions of activated fibroblasts while at the same time promoting the survival, proliferation, and migration of epithelial cells (24). Its suppressive actions in fibroblasts are mediated by ligation of EP₂ and to a lesser extent, EP₄, receptors that signal via increases in intracellular cAMP. Downstream mechanisms that have been identified for these actions of PGE₂ and cAMP include activation of protein kinase A, guanine nucleotide exchange protein activated by cAMP, and phosphatase and tensin homolog activated on chromosome 10, with subsequent inhibition of protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and the anti-apoptotic protein survivin (27, 29, 50).

Given that defects in both PGE₂ synthesis (21, 31, 44, 51) and responsiveness (28, 40) have been reported in fibroblasts isolated from lungs of patients and mouse models exhibiting parenchymal fibrosis, we wished to evaluate the fibroblast PGE₂ axis in an experimental model of airway fibrosis, since this has not previously been examined. We initially utilized a model consisting of two sensitizations with OVA/alum followed by either 3 (group A), 7 (group B), or 12 (group C) aerosol OVA challenges. Eosinophil numbers in BAL fluid verified allergic inflammation in all three groups. However, preliminary histologic analyses revealed that airway fibrosis was modest in group B animals but extensive in group C animals. In the absence of *in vitro* stimulation, expression of collagen I in fibroblasts from group A asthmatic animals was no different from that in cells from control animals. However, baseline collagen I expression was noted to increase with

additional allergen challenges, reaching statistical significance in group C. This finding is consistent with a previous report that identified upregulation of a variety of profibrotic properties in lung fibroblasts isolated from asthmatic mice compared with cells from control animals, although collagen expression was not examined therein (47). This initial dose-finding study led us to focus our investigation of the PGE₂ axis on cells from group C, in which more robust collagen I expression at baseline and an impaired ability to upregulate PGE₂ synthesis paralleled the robust degree of airway remodeling seen histopathologically.

We first compared the response arm of the PGE₂ axis between fibroblasts isolated from group C and control animals. As expected, both TGF-β1-driven synthesis of collagen I and 3% serum-stimulated cellular proliferation were inhibited by PGE₂ in fibroblasts from control animals. Inhibition by PGE₂ remained intact in asthmatic fibroblasts, in contrast to what has been observed in fibroblasts from mice with bleomycin-induced parenchymal fibrosis (40) and from some, but not all, patients with IPF (28). As expected, responses to forskolin mirrored those to PGE₂, emphasizing the cAMP dependence of fibroblast suppression. Likewise, because PGE₂ responsiveness was preserved, it was not surprising that gene expression of the EP₂ receptor, which mediates most of the inhibitory effects of PGE₂ in lung fibroblasts, was also intact in the asthmatic fibroblasts. EP₂ downregulation and corresponding PGE₂ resistance in lung fibroblasts from mice and humans with parenchymal pulmonary fibrosis have been attributed to silencing of the EP₂ gene promoter by methylation (26). It remains to be determined why this defect was not observed in fibroblasts from our group C model of airway fibrosis.

In contrast to their intact PGE₂ responsiveness, a loss of PGE₂ synthesis in response to IL-1β stimulation was noted in asthmatic fibroblasts isolated from mice subject to increasing numbers of allergen challenges. This was accompanied by diminished capacity of the fibroblasts from group C asthmatic animals to upregulate both COX-2, the biosynthetic enzyme

that converts arachidonic acid into PGH₂, and mPGES-1, the inducible enzyme that converts PGH₂ to the bioactive terminal product PGE₂. Of note, impaired COX-2 induction and inducible PGE₂ synthesis have previously been reported for bronchial fibroblasts from aspirin-sensitive asthmatics (44) and for airway smooth muscle cells from asthmatics (9). However, to our knowledge, this is the first demonstration of an impairment in inducible PGE₂ synthesis in mesenchymal cells that is specifically associated with fibrosis of the airways, as opposed to the parenchyma of the lung. Although the mechanism(s) accounting for impaired expression of PGE₂ biosynthetic enzymes in our model remain to be determined, possibilities include inhibition by IL-13 or other Th2 cytokines (48) and epigenetic silencing of COX-2 by histone deacetylation (11). PGE₂ levels in the BAL fluid were not different between control and asthmatic animals. However, sampling of the airway surface via lavage would not be expected to adequately reflect concentrations in the subepithelial region of the airway. Moreover, since allergic inflammation and the infiltration of inflammatory cells was extensive in the lungs of asthmatic animals, we speculate that the contribution of inflammatory cells *in vivo* could compensate for the diminished production of PGE₂ by lung fibroblasts. Nevertheless, a deficiency of PGE₂ production in the subepithelial compartment could allow unchecked activation of lung fibroblasts and promote airway fibrosis.

A number of studies have demonstrated that pharmacologic (18) or genetic (8) COX inhibition as well as mPGES-1 deficiency (37) can worsen the allergic inflammation in mouse models of allergic asthma (15). Moreover, one report has demonstrated that allergen challenge of mPGES-1-deficient mice led to enhanced remodeling of the pulmonary vasculature (37). It has previously been shown that COX-2 knockout mice develop worse allergic lung inflammation (15) and worse pulmonary fibrosis (21) than their wild-type counterparts. However, the phenotype of mice with a constitutive deletion of COX-2, PGE synthase, or EP₂ receptor might in fact be somewhat unpredictable. This is because, in some contexts, these genotypes have been shown to exhibit diminished acute inflammation, and this could counterbalance the exaggerated fibrosis resulting from loss of the PGE₂ brake. To assess the possible role of endogenous COX-2-derived prostanoids, including PGE₂, in limiting airway fibrosis *in vivo*, we administered nimesulide, a highly selective COX-2 inhibitor, beginning at day 27 (corresponding to group B) after airway remodeling had already begun and harvested mice at the group C endpoint, day 35. The time window for nimesulide administration was selected so that it would interfere with prostanoid synthesis exclusively during the peak fibrogenic phase rather than during the peak inflammatory phase of the response. The histopathology and morphometric analyses indicated that nimesulide treatment of asthmatic animals worsened airway fibrosis compared with vehicle-treated group C asthmatic animals. Its ability to do so may in part reflect the fact that fibroblast responsiveness to PGE₂ remained intact in group C asthmatic mice. This result is similar to our previous finding that bleomycin-induced parenchymal fibrosis was worsened by treatment with the COX-1/COX-2 inhibitor indomethacin administered exclusively during the postinflammatory fibrotic phase of this response (41). These *in vivo* data provide a basis for envisioning that the impaired *ex vivo* COX-2 function and

PGE₂ synthesis that characterizes fibroblasts during the evolution of airway fibrosis may likewise promote fibrogenesis. Our data also prompt the speculation that the well-established ability of corticosteroids to inhibit COX-2 induction (16) may help to explain their inability to ameliorate or prevent airway fibrosis in asthma and provide a basis for the possibility that corticosteroids may even promote fibrosis.

In summary, we have shown that, in a mouse model of chronic allergic inflammation, the development of airway fibrosis with an increasing number of allergen challenges is associated with an acquired defect in the ability of lung fibroblasts to upregulate PGE₂ generation in response to a cytokine stimulus. Given that endogenous PGE₂ acts as a brake on fibrogenesis, our results suggest the possibility that this defect may contribute to the evolution of airway fibrosis (27).

ACKNOWLEDGMENTS

The technical assistance of Teresa Murphy and Casey Lewis is acknowledged. We thank Drs. Steven Huang, Carlos Henrique Serezani, and David M. Aronoff for insightful discussions.

GRANTS

This work was supported by National Institutes of Health Grant HL-094311 and the Brazilian agencies Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

DISCLOSURES

No conflicts of interest are declared by the authors.

REFERENCES

- Bennett A, Villa G. Nimesulide: an NSAID that preferentially inhibits COX-2, and has various unique pharmacological activities. *Expert Opin Pharmacother* 1: 277–286, 2000.
- Bentley JK, Hershenson MB. Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration. *Proc Am Thorac Soc* 5: 89–96, 2008.
- Bitterman PB, Wewers MD, Rennard SI, Adelberg S, Crystal RG. Modulation of alveolar macrophage-driven fibroblast proliferation by alternative macrophage mediators. *J Clin Invest* 77: 700–708, 1986.
- Boulet LP, Sterk PJ. Airway remodelling: the future. *Eur Respir J* 30: 831–834, 2007.
- Broide DH. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 121: 560–570, 2008.
- Busse W, Elias J, Sheppard D, Banks-Schlegel S. Airway remodeling and repair. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1035–1042, 1999.
- Card JW, Carey MA, Bradbury JA, Graves JP, Lih FB, Moorman MP, Morgan DL, DeGraff LM, Zhao Y, Foley JF, Zeldin DC. Cyclooxygenase-1 overexpression decreases Basal airway responsiveness but not allergic inflammation. *J Immunol* 177: 4785–4793, 2006.
- Chambers LS, Black JL, Ge Q, Carlin SM, Au WW, Poniris M, Thompson J, Johnson PR, Burgess JK. PAR-2 activation, PGE₂, and COX-2 in human asthmatic and nonasthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L619–L627, 2003.
- Childhood Asthma Management Program Research Group. Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. The Childhood Asthma Management Program Research Group. *N Engl J Med* 343: 1054–1063, 2000.
- Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 22: 789–815, 2004.
- Coward WR, Watts K, Feghali-Bostwick CA, Knox A, Pang L. Defective histone acetylation is responsible for the diminished expression of cyclooxygenase 2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Mol Cell Biol* 29: 4325–4339, 2009.
- Elias JA, Rossman MD, Zurier RB, Daniele RP. Human alveolar macrophage inhibition of lung fibroblast growth. A prostaglandin-dependent process. *Am Rev Respir Dis* 131: 94–99, 1985.

13. Fine A, Poliks CF, Donahue LP, Smith BD, Goldstein RH. The differential effect of prostaglandin E₂ on transforming growth factor-beta and insulin-induced collagen formation in lung fibroblasts. *J Biol Chem* 264: 16988–16991, 1989.
14. Fukutake M, Nakatsugi S, Isoi T, Takahashi M, Ohta T, Mamiya S, Taniguchi Y, Sato H, Fukuda K, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppressive effects of nimesulide, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 19: 1939–1942, 1998.
15. Gavett SH, Madison SL, Chulada PC, Scarborough PE, Qu W, Boyle JE, Tian HF, Lee CA, Langenbach R, Roggli VL, Zeldin DC. Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase-deficient mice. *J Clin Invest* 104: 721–732, 1999.
16. Gilroy DW, Tomlinson A, Willoughby DA. Differential effects of inhibition of isoforms of cyclooxygenase (COX-1, COX-2) in chronic inflammation. *Inflamm Res* 47: 79–85, 1998.
17. Goldstein RH, Polgar P. The effect and interaction of bradykinin and prostaglandins on protein and collagen production by lung fibroblasts. *J Biol Chem* 257: 8630–8633, 1982.
18. Hashimoto K, Sheller JR, Morrow JD, Collins RD, Goleniewska K, O'Neal J, Zhou W, Ji S, Mitchell DB, Graham BS, Peebles RS Jr. Cyclooxygenase inhibition augments allergic inflammation through CD4-dependent, STAT6-independent mechanisms. *J Immunol* 174: 525–532, 2005.
19. Henderson WR Jr, Chiang GK, Tien YT, Chi EY. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT₁ receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 718–728, 2006.
20. Henderson WR Jr, Tang LO, Chu SJ, Tsao SM, Chiang GK, Jones F, Jonas M, Pae C, Wang H, Chi EY. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 108–116, 2002.
21. Hodges RJ, Jenkins RG, Wheeler-Jones CP, Copeman DM, Bottoms SE, Bellingan GJ, Nanthakumar CB, Laurent GJ, Hart SL, Foster ML, McAnulty RJ. Severity of lung injury in cyclooxygenase-2-deficient mice is dependent on reduced prostaglandin E₂ production. *Am J Pathol* 165: 1663–1676, 2004.
22. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 38: 872–897, 2008.
23. Honda T, Imaizumi K, Yokoi T, Hashimoto N, Hashimoto I, Kawabe T, Matsuo M, Iwano S, Shimokata K, Hasegawa Y. Differential Th1/Th2 chemokine expression in interstitial pneumonia. *Am J Med Sci* 339: 41–48, 2000.
24. Horowitz JC, Peters-Golden M. Prostaglandin E₂'s new trick: "decider" of differential alveolar cell life and death. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 2–3.
25. Huang S, Wettlaufer SH, Hogaboam C, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E₂ inhibits collagen expression and proliferation in patient-derived normal lung fibroblasts via E prostanoic 2 receptor and cAMP signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L405–L413, 2007.
26. Huang SK, Fisher AS, Scruggs AM, White ES, Hogaboam CM, Richardson BC, Peters-Golden M. Hypermethylation of PTGER2 confers prostaglandin E₂ resistance in fibrotic fibroblasts from humans and mice. *Am J Pathol* 177: 2245–2255, 2000.
27. Huang SK, Wettlaufer SH, Chung J, Peters-Golden M. Prostaglandin E₂ inhibits specific lung fibroblast functions via selective actions of PKA and Epac-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39: 482–489, 2008.
28. Huang SK, Wettlaufer SH, Hogaboam CM, Flaherty KR, Martinez FJ, Myers JL, Colby TV, Travis WD, Toews GB, Peters-Golden M. Variable prostaglandin E₂ resistance in fibroblasts from patients with usual interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 66–74, 2008.
29. Huang SK, White ES, Wettlaufer SH, Grifka H, Hogaboam CM, Thannickal VJ, Horowitz JC, Peters-Golden M. Prostaglandin E₂ induces fibroblast apoptosis by modulating multiple survival pathways. *FASEB J* 23: 4317–4326, 2009.
30. Ingram JL, Huggins MJ, Church TD, Li Y, Francisco DC, Degan S, Firszt R, Beaver DM, Lugogo NL, Wang Y, Sunday ME, Noble PW, Kraft M. Airway fibroblasts in asthma manifest an invasive phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 183: 1625–1632, 2000.
31. Keerthisingam CB, Jenkins RG, Harrison NK, Hernandez-Rodriguez NA, Booth H, Laurent GJ, Hart SL, Foster ML, McAnulty RJ. Cyclooxygenase-2 deficiency results in a loss of the anti-proliferative response to transforming growth factor-beta in human fibrotic lung fibroblasts and promotes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol* 158: 1411–1422, 2001.
32. Kohyama T, Ertl RF, Valenti V, Spurzem J, Kawamoto M, Nakamura Y, Veys T, Allegra L, Romberger D, Rennard SI. Prostaglandin E₂ inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L1257–L1263, 2001.
33. Kolodnick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ, Moore BB. Prostaglandin E₂ inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E prostanoic 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 537–544, 2003.
34. Korn JH. Fibroblast prostaglandin E₂ synthesis. Persistence of an abnormal phenotype after short-term exposure to mononuclear cell products. *J Clin Invest* 71: 1240–1246, 1983.
35. Korn JH, Halushka PV, LeRoy EC. Mononuclear cell modulation of connective tissue function: suppression of fibroblast growth by stimulation of endogenous prostaglandin production. *J Clin Invest* 65: 543–554, 1980.
36. Levine L, Alam I. Arachidonic acid metabolism by cells in culture: analyses of culture fluids for cyclooxygenase products by radioimmunoassay before and after separation by high pressure liquid chromatography. *Prostaglandins Med* 3: 295–304, 1979.
37. Lundquist A, Nallamshetty SN, Xing W, Feng C, Laidlaw TM, Uematsu S, Akira S, Boyce JA. Prostaglandin E₂ exerts homeostatic regulation of pulmonary vascular remodeling in allergic airway inflammation. *J Immunol* 184: 433–441.
38. Mahajan B, Vijayan VK, Agarwal MK, Bansal SK. Serum interleukin-1beta as a marker for differentiation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers* 13: 713–727, 2008.
39. Mauad T, Bel EH, Sterk PJ. Asthma therapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 120: 997–1009, 2007.
40. Moore BB, Ballinger MN, White ES, Green ME, Herrygers AB, Wilke CA, Toews GB, Peters-Golden M. Bleomycin-induced E prostanoic 2 receptor changes alter fibroblast responses to prostaglandin E₂. *J Immunol* 174: 5644–5649, 2005.
41. Moore BB, Coffey MJ, Christensen P, Sitterding S, Ngan R, Wilke CA, McDonald R, Phare SM, Peters-Golden M, Paine R, 3rd, Toews GB. GM-CSF regulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via a prostaglandin-dependent mechanism. *J Immunol* 165: 4032–4039, 2000.
42. Nakae S, Komiyama Y, Yokoyama H, Nambu A, Umeda M, Iwase M, Homma I, Sudo K, Horai R, Asano M, Iwakura Y. IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int Immunol* 15: 483–490, 2003.
43. Pascual RM, Peters SP. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol* 116: 477–487, 2005.
44. Pierzchalska M, Szabo Z, Sanak M, Soja J, Szczeklik A. Deficient prostaglandin E₂ production by bronchial fibroblasts of asthmatic patients, with special reference to aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111: 1041–1048, 2003.
45. Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* 132: 1311–1321, 2007.
46. Shindo N, Saito T, Murayama K. Rapid quantification of 11 prostanoics by combined capillary column gas chromatography and negative ion chemical ionization mass spectrometry: application to prostanoics released from normal human embryonic lung fibroblasts WI38 in a culture medium. *Biomed Environ Mass Spectrom* 15: 25–32, 1988.
47. Sugiura H, Liu X, Duan F, Kawasaki S, Togo S, Kamio K, Wang XQ, Mao L, Ahn Y, Ertl RF, Bargar TW, Berro A, Casale TB, Rennard SI. Cultured lung fibroblasts from ovalbumin-challenged "asthmatic" mice differ functionally from normal. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37: 424–430, 2007.
48. Trudeau J, Hu H, Chibana K, Chu HW, Westcott JY, Wenzel SE. Selective downregulation of prostaglandin E₂-related pathways by the Th2 cytokine IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 117: 1446–1454, 2006.
49. Ward C, Johns DP, Bish R, Pais M, Reid DW, Ingram C, Feltis B, Walters EH. Reduced airway distensibility, fixed airflow limitation, and airway wall remodeling in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1718–1721, 2001.
50. White ES, Atrasz RG, Dickie EG, Aronoff DM, Stambolic V, Mak TW, Moore BB, Peters-Golden M. Prostaglandin E₂ inhibits fibroblast migration by E-prostanoic 2 receptor-mediated increase in PTEN activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 135–141, 2005.
51. Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM, Peters-Golden M. Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E₂ and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 95: 1861–1868, 1995.