Vanessa Martins da Silva

**Relevância do fibroblasto no remodelamento parenquimatoso pulmonar em
modelos experimentais de fibrose induzida por bleomicina e 3-5-di-*tert*-4-
hidroxitolueno**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento de Patologia

Orientadora: Prof. Dra. Vera Luiza
Capelozzi

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Vanessa Martins da

Relevância do fibroblasto no remodelamento parenquimatoso pulmonar em modelos experimentais de fibrose induzida por bleomicina e 3-5-di-*tert*-4- hidroxitolueno / Vanessa Martins da Silva. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.Fibrose pulmonar 2.Fibroblastos 3.Células epiteliais
4.Remodelação das vias aéreas 5.Matriz extracelular 6.Bleomicina 7.Hidroxitolueno
butilado 8.Camundongos 9.Fator de crescimento transformador beta 10.Reação em
cadeia da polimerase em tempo real

USP/FM/DBD-347/15

Este trabalho foi desenvolvido com a colaboração interdisciplinar do Laboratório de Investigação Médica em Reumatologia e Matriz Extracelular (LIM17) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e do Departamento de Patologia da Universidade de Michigan (UMICH), Michigan-USA.

Os recursos financeiros foram obtidos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos número: 2011/09181-2, 2012/03543-2 e 2013/01496-0 – São Paulo, Brasil.

Aos meus amados pais, Malioni e Wilson (in memorian), pelo amor infinito, apoio imensurável, sacrifício e dedicação incondicional. Por me ensinarem a lutar por um mundo melhor, a manter o caráter íntegro frente as adversidades e a sobreviver no mundo real. Uma pequena retribuição a base sólida e à educação que me proporcionaram

À minha irmã Monique, por sempre estar ao meu lado e ter dado o que ninguém mais conseguiu em momentos adversos. Risadas infinitas e doses surreais de felicidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela coragem, sabedoria e discernimento para seguir em frente mesmo quando os caminhos não eram os melhores. Aos irmãos de luz por sempre seguirem ao meu lado iluminando os caminhos percorridos e conquistados.

Aos meus pais, por todo amor e carinho, por nunca duvidarem de minhas escolhas e ter sempre uma palavra de conforto e incentivo em todos os momentos. A vocês que se doaram inteiros e renunciaram a seus sonhos, para que muitas vezes pudesse realizar os meus; que me ajudaram a crescer e a ter o propósito de não parar e não passar em vão pela vida, não bastaria um simples obrigada.

A minha irmã, por todo apoio, colo, incentivo, conversas positivas, abraços e beijos amoroso. Me ajudou a olhar o mundo de forma diferente. Obrigada por ser minha irmã.

A prof^a. Dra. Vera Luiza Capelozzi, por ter aberto as portas de seu laboratório e acreditado em mim, mesmo sendo uma carioca desconhecida. Agradeço a orientação, a amizade, os conhecimentos trocados, as conversas inspiradoras, o voto de confiança e a grande paciência em todas as etapas da minha formação. Sem palavras para agradecer o quão importante foi nesse processo. Muito obrigada!

Ao prof^o. Dr. Sem H. Phan, por ter me recebido em Michigan, pela dedicação e discussões científicas que com certeza ajudaram a me tornar uma pesquisadora melhor. A experiência foi única e enriquecedora, não poderia ter tido co-orientação melhor.

A prof^a. Dra. Tianju Liu, por horas de conversas científicas, pela amizade, por ter ensinado cada detalhe de todas as técnicas utilizadas durante minha vivência em Michigan. Sem palavras para dizer como foi importante.

Ao Dr. Edwin Parra, pela amizade, momentos de descontração e discussões científicas que fizeram aumentar minhas perspectivas e conhecimentos.

A prof^a. Dra. Walcy Rosolia Teodoro, por permitir a utilização de seu laboratório, bem como pelas longas conversas à cerca de minha pesquisa. Agradeço os conhecimentos doados.

A amiga prof^a Dra. Manuela Lanzetti, pela grande amizade ao longo desses anos, por ter revisado cada vírgula dessa Tese. Pelas colocações e ideias importantes. Agradeço ainda a enorme paciência, carinho e dedicação a nossa amizade. Obrigada Manu!

A todos os professores que direta e indiretamente contribuíram para o desenvolvimento dessa Tese bem como para o meu amadurecimento científico e formação.

As técnicas da Imunohistoquímica, Esmeralda e Sandra, pela paciência em responder a todas as perguntas, por me permitirem acompanhar todas as imunomarcações, por todos os cafezinhos e, também, pela imensa amizade!

Aos amigos de laboratório: Mariestela, Natália, Marcelo, Deborah, Vanessa, Tabatha, Priscila e todos aqueles que não foram citados, mas, que contribuíram e proporcionaram momentos especiais.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica, Marcelo e Deborah, pela oportunidade de orientá-los, compartilhar meus conhecimentos e experiências, bem como a chance de poder fazer a diferença na formação acadêmica de vocês.

Ao amigo Felipe Vale, por sempre estar presente em todos os momentos sejam eles bons ou ruins. Obrigada pela compreensão, carinho, conselhos e dedicação a esta amizade. Muito, muito obrigada Fê!

A todos os amigos, que não foram aqui citados, pelos momentos compartilhados, sejam de tristeza ou alegria, pelo apoio independentemente da situação e, principalmente, pela amizade concedida.

A Lúdia pelo companheirismo, respeito, carinho, cumplicidade e incentivo em todos os momentos vividos. Por compartilhar comigo este e tantos outros projetos ao longo de tantos anos. A ti, que sempre se fez presente, não tenho palavras para descrever o quão importante se tornou. Simplesmente, muito obrigada!

Minha energia é o desafio, minha motivação é o impossível, e é por isso que eu preciso ser, à força e a esmo, inabalável.

Augusto Branco

Por vezes, são as pessoas de que ninguém imagina nada que fazem as coisas que ninguém consegue sequer imaginar.

Alan Turing

Normalização adotada

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Fibrose Pulomnar	20
1.2. Epidemiologia	20
1.3. Fisiopatologia: participação da matriz extracelular (MEC)	21
1.4. Modelos Experimentais	24
1.4.1. Bleomicina (BLM)	25
1.4.2. Hidroxitolueno butilado (3-5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene: BHT)	26
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	28
3. OBJETIVOS	29
4. METODOLOGIA	30
4.1. Animais utilizados	30
4.2. Modelo experimental de Fibrose Pulmonar	30
4.3. Análise histológica	32
4.4. Imunohistoquímica	33
4.5. Morfometria	34
4.6. Imunofluorescência para os colágenos I, III e V	34
4.7. Quantificação da imunofluorescência	35

4.8. Dosagem de colágeno mediante a técnica de hidroxilação	37
4.9. Técnica empregada para microscopia eletrônica.....	38
4.10. Análise da expressão gênica por RT-PCR	39
4.11. Análise estatística	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Análise histopatológica do tecido pulmonar nos modelos de BLM e BHT	46
5.2. Envolvimento e comprometimento do endotélio e epitélio pulmonar	48
5.3. Desorganização da membrana basal e superexpressão do colágeno V	51
5.4. Aumento do depósito de colágeno I e III no interstício pulmonar	53
5.5. Participação de proteínas reguladoras do fibroblasto e endotélio pulmonar	57
5.6. Mudanças submicroscópicas causadas pelo estresse celular	62
5.7. Sinalização molecular na Fibrose Pulmonar induzida por BLM e BHT	64
6. DISCUSSÃO	67
7. ANEXOS.....	74
8. REFERÊNCIAS.....	79
Apêndice	90

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA	<i>alfa smooth muscle actin</i>
AEC I	<i>alveolar epithelial type I cells</i>
AEC II	<i>alveolar epithelial type II cells</i>
AQP-5	Aquaporina 5
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BHT	3-5-di- <i>tert</i> -butil-4-hidroxitolueno
BLM	Bleomicina
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C/EBP β	<i>CCAAT/enhancer binding protein beta</i>
Col I	Colágeno do tipo I
Col III	Colágeno do tipo III
Col V	Colágeno do tipo V
DPF	Doenças pulmonares fibrosantes
ET-1	Endotelina-1
ES	Esclerose sistêmica
FPI	Fibrose pulmonar idiopática
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IgG	Imunoglobulina G
LAP	<i>Liver-enriched activator protein</i>
LIP	<i>Liver-enriched inhibitor protein</i>
LOX	Lisil-oxidase
MB	Membrana basal

MEC	Matriz extracelular
PAF	<i>Platelet-activating factor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
RE	Retículo endoplasmático
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
Smad3	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i>
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
SP-A	<i>Surfactant protein A</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Regeneração tecidual ou fibrose	22
Figura 2 – Desenho experimental utilizando BLM para indução da fibrose pulmonar em camundongo	30
Figura 3 – Desenho experimental utilizando BHT para indução da fibrose pulmonar em camundongo	31
Figura 4 – Esquema de coleta das amostras biológicas.....	33
Figura 5 - Exemplo de tecido imunomarcado (colágeno I)	36
Figura 6 – Exemplo de interstício imunomarcado (colágeno I)	36
Figura 7 – Exemplo do total de área sólida (colágeno I)	37
Figura 8- Protocolo utilizado no <i>RT² Profiler PCR Array</i>	40
Figura 9 – Extração de RNA utilizando <i>Rnase Microarray</i>	42
Figura 10 – Fibrose induzida por BLM e BHT	47
Figura 11 – Aumento na produção de componentes de MEC.....	48
Figura 12 – Aumento de colágeno no pulmão induzido por BLM e BHT.....	48
Figura 13 – Comprometimento das AEC II induzido por BLM e BHT.....	49
Figura 14 – Comprometimento das AEC I induzido por BLM e BHT	50
Figura 15 – BLM e BHT induzem ativação endotelial	51

Figura 16 – BLM e BHT induzem a expressão gênica de ET-1	52
Figura 17 – Fibras de Col V ao longo da MB epitélio/endotelial	53
Figura 18 – Aumento de Col I após BLM e BHT	55
Figura 19 – Depósito de Col III após BLM and BHT	56
Figura 20 – Aumento da expressão gênica de <i>COL1α2</i> e <i>COL3α1</i>	57
Figura 21 – Expressão de Telomerase na fibrose pulmonar	58
Figura. 22 – BLM e BHT induzem sinais pró-fibróticos	59
Figura 23 – Aumento de VEGF na microvasculatura pulmonar	60
Figura. 24 – Aumento de TGF- β no parênquima pulmonar	61
Figura. 25 – Expressão gênica de TGF- β 1 e VEGF na fibrose pulmonar	62
Figura 26 – Alterações ultraestruturais no septo alveolar após instilação de BLM	63
Figura 27 – Alterações ultraestruturais no septo alveolar após instilação de BHT	64
Figura 28 – Expressão gênica de α -SMA e IL-1 β na fibrose pulmonar	65
Figura 29 – Expressão gênica de Smad3 e Lox na fibrose pulmonar	65
Figura 30 – Expressão gênica de C/EBP β e Sp1 na fibrose pulmonar	66

RESUMO

Martins, V. *Relevância do fibroblasto no remodelamento parenquimatoso pulmonar em modelos experimentais de fibrose induzida por bleomicina e 3-5-di-tert-4-hidroxitolueno* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A remodelação do epitélio e do mesênquima subjacente tem um papel crucial na patogênese da fibrose pulmonar experimental. A iniciação, gravidade e distribuição de fibrose varia entre os diferentes agentes químicos. Estudos recentes indicaram que o envolvimento epitelial, a expressão de proteínas reguladoras do epitélio, ativação endotelial, estresse do retículo endoplasmático, a ativação de fibroblastos e acumulação de diferentes tipos de colágeno, pode ser específica em lesão causadas por diferentes agentes químicos. Neste estudo, comparou-se a fibrose pulmonar induzida por bleomicina (BLM) e hidroxitolueno butilado (BHT). Envolvimento epitelial, proteínas reguladoras, ativação endotelial e de fibroblastos foram quantitativamente avaliados pela densidade de células alveolares, expressão de telomerase, endotelina-1 (ET-1), fator de crescimento vascular (VEGF), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e do fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF). Estresse celular em células epiteliais alveolares do tipo 2 (AEC II) e fibroblastos, eventualmente, responsáveis pela gênese da fibrose pulmonar, foram investigados por microscopia eletrônica. Os colágenos do tipo I (Col I), III (Col III) e V (Col V) foram caracterizados e quantificados por imunofluorescência. A quantidade de colágeno pulmonar e alterações histológicas fibróticas foram significativamente aumentadas nos grupos BLM e BHT em relação aos controles, com diferença significativa entre a resposta fibrótica precoce e tardia. A

densidade AEC II, a expressão da telomerase, ET-1, VEGF, TGF- β e bFGF foram significativamente maiores nos grupos BLM e BHT do que em pulmões dos grupos controles, com diferença significativa entre a fase precoce e tardia da resposta fibrótica. Mitocôndrias anormais e estresse do retículo endoplasmático em AEC II e fibroblastos foram encontrados em ambos os grupos fibróticos. Aumento no acúmulo de fibras de Col I, III e V, foram encontradas no interstício pulmonar após instilação de BLM e BHT. A expressão gênica de TGF- β 1 e alfa actina de músculo liso (α -SMA) foi significativamente maior em ambos modelos de fibrose pulmonar. Ativação de Smad3 (Mothers against decapentaplegic homolog 3) associada à expressão de IL- β 1 (Interleucina-1 beta), Lox (lisil-oxidase) e o fator de transcrição Sp1 (Specificity protein 1) foi associada com a ativação do gene α -SMA. Em conclusão, os nossos resultados tornam-se relevantes pois demonstram que, independentemente do insulto inicial, há uma convergência no perfil de sinalização, onde fica evidente que a lesão epitélio/endotelial está envolvida num amplo e contínuo processo de reparação com consequente final fibrótico. Um elemento chave no reparo e remodelamento tecidual ou fibrose é a resposta mesenquimal que fornece componentes essenciais de MEC necessários para a infraestrutura da cura e por outro lado para a fibrose progressiva crônica.

Descritores: fibrose pulmonar, fibroblastos, células epiteliais, remodelação das vias aéreas, matriz extracelular, bleomicina, hidroxitolueno butilado, camundongos, fator de crescimento transformador beta, reação em cadeia da polimerase em tempo real

ABSTRACT

Martins, V. *Relevance of fibroblasts in lung parenchymal remodeling in experimental models of bleomycin and 3-5-di-tert-4-hydroxytoluene-induced fibrosis* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Epithelial and underlying mesenchyme remodeling have a critical role in the pathogenesis of experimental pulmonary fibrosis. The initiation, distribution and severity of fibrosis varies among different chemical agents. Recent studies have indicated that epithelial involvement, expression of epithelial regulatory proteins, endothelium activation, endoplasmic reticulum stress, fibroblast activation and accumulation of different types of collagen may be specific in various chemical agents of injury. In this study, bleomycin (BLM) and Butylated hydroxytoluene (BHT)-induced pulmonary fibrosis in mice were compared. Epithelial involvement, regulatory proteins, endothelium and fibroblast activation were quantitatively evaluated by alveolar cells density, telomerase, endothelin-1 (ET-1), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Transforming growth factor beta (TGF- β) and basic fibroblast growth factor (bFGF) expression. Cellular stress in type 2 alveolar epithelial cells (AEC II) and fibroblasts, eventually responsible by generating lung fibrosis, were investigated by electron microscopy. We characterized and quantified collagen type I (Col I), III (Col III) and V (Col V) by immunofluorescence. Lung collagen content and fibrotic histological changes were significantly increased in BLM and BHT models compared to control with significant difference between early and late fibrotic response. AEC II density, telomerase expression, ET-1, VEGF, TGF- β and bFGF were significantly higher than control lungs with significant difference between early and late BLM and BHT fibrotic response.

Abnormal mitochondria and endoplasmic reticulum in AEC II and fibroblasts was found in both groups of chemical agents. Increased of Col I, Col III and V fibers accumulation was found in the lung interstitium after BLM and BHT instillation. The expression of TGF- β 1 and alfa smooth muscle actin (α -SMA) gene was significantly increased in both model of pulmonary fibrosis. Activated Smad3 (Mothers against decapentaplegic homolog 3) associated to the IL- β 1 (Interleukin-1 beta), Lox (Lysyl oxidase) and the transcription factor Sp1 (Specificity protein 1) was associated to the activation of α -SMA gene. In conclusion, our results become relevant because they demonstrate that, regardless of the initial insult, there is a convergence in the signaling profile, where it is clear that the epithelial/endothelial injury is involved in a broad and continuous repair process with consequent fibrotic end. A key component in tissue repair and remodeling, or fibrosis is the mesenchymal response which provides essential components of extracellular matrix infrastructure needed to cure and secondly for chronic progressive fibrosis.

Descriptors: lung fibrosis, fibroblasts, epithelial cells, airway remodeling, extracellular matrix, bleomycin, butylated hydroxytoluene, mice, transforming growth factor beta, real-time polymerase chain reaction.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Fibrose pulmonar*

A fibrose pulmonar representa a via comum final de uma variedade de lesões pulmonares, sendo caracterizada, independentemente da etiologia, pela transição de uma lesão aguda nas células epiteliais/endoteliais para uma fase proliferativa com expansão da população de fibroblastos/miofibroblastos e pelo acúmulo anormal de matriz extracelular (MEC), que substitui o parênquima funcional normal (1).

Embora as múltiplas causas de fibrose pulmonar resultem numa patologia uniforme na fase tardia, as evidências indicam que a fisiopatologia da fibrose precoce pode ser diferente de acordo com o tipo de insulto primário (2, 3). Duas formas diferentes de insulto primário são descritas: bronquiocêntrica, com efeitos diretos sobre as células epiteliais do pulmão, e periférica, refletindo envolvimento pulmonar secundária a uma resposta inflamatória sistêmica, sendo o principal alvo às células endoteliais pulmonares (2, 3).

1.2. *Epidemiologia*

Em 2000, critérios para o diagnóstico e controle da fibrose pulmonar foram estipulados pela sociedade torácica americana (ATS – *American Thoracic Society*) e pela sociedade respiratória europeia (ERS – *European Respiratory Society*) (4), o qual foi posteriormente revisado em 2011 (5).

Nos estudos revisados, a prevalência variou de acordo com a definição de caso usada. Nos EUA, a estimativa de prevalência ficou entre 14 e 27,9 casos por 100.000 na população geral, e na Europa entre 1,25 a 23,4 por 100.000 habitantes. A incidência anual de fibrose pulmonar idiopática (FPI) nos EUA foi estimada em 6,8-8,8 por 100.000 habitantes, enquanto que na Europa a incidência anual variou de 0,22-7,4 por 100.000 habitantes. No entanto, a verdadeira incidência e prevalência da FPI não está bem estabelecida, devido à falta de definição uniforme em estudos mais antigos, critérios de diagnóstico e diferenças nos estudos epidemiológicos e nos desenhos experimentais de tais estudos. Estima-se que comprometa mais de 5 milhões de pessoas em todo mundo, sem distinção de etnia, raça e classe social (6).

A FPI continua sendo uma doença rara e desafiadora, com causa desconhecida, curso clínico imprevisível e alta mortalidade. Em geral, não há até o presente, terapia farmacológica eficaz, sendo o transplante o único tratamento disponível atualmente (7, 8).

1.3. Fisiopatologia: participação da matriz extracelular (MEC)

Apesar de apresentarem características semelhantes, as diferentes doenças pulmonares fibrosantes (DPF) têm aspectos individuais, fazendo com que cada uma delas seja estudada separadamente. No entanto, o papel dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes a patogenia da fibrose pulmonar progressiva, permanecem por serem elucidados, o que tem motivado pesquisas nesse âmbito.

A maioria das DPF possuem em comum um insulto persistente que sustenta a produção de fatores de crescimento e angiogênicos, enzimas proteolíticas e citocinas fibrogênicas, os quais estimulam a deposição de elementos de MEC que

progressivamente remodela e destrói a arquitetura tecidual normal (Figura 1) (9-11). As alterações estruturais dessas patologias consistem no acometimento fibro-inflamatório das pequenas vias aéreas caracterizadas pelo espessamento do interstício septal, deposição acentuada de MEC, infiltrado inflamatório, remodelamento bronquiolar com alteração das células epiteliais, endoteliais, dos septos alveolares e da rede vascular pulmonar (11-13).

Figura 1 – Regeneração tecidual ou fibrose. Após a lesão, se a membrana basal (MB) estiver intacta e o estímulo para a lesão original for removido, a MEC é remodelada/reabsorvida e ocorre a restauração do epitélio e endotélio da barreira alvéolo-capilar. O processo de reparação normal é completo quando o epitélio e endotélio restabelecem a sua orientação espacial normal na MB. Em contraste, a patogênese da fibrose está associada com os seguintes eventos: (1) perda de células epiteliais alveolares do tipo I e células endoteliais; (2) perda da integridade da MB da barreira alvéolo-capilar com colapso das estruturas alveolares; (3) a proliferação de células epiteliais alveolares de tipo II e células endoteliais sobre uma MEC inadequada, sem restabelecimento de estruturas alveolares normais; e (4) recrutamento e a proliferação de fibroblastos/miofibroblastos, com aumento do depósito de MEC, que conduz à fase final da fibrose alveolar. *Adaptado de Strieter, RM., Chest. 2009 Nov; 136(5): 1364–1370.*

Quando a lesão tecidual ocorre, há um aumento da apoptose em células epiteliais alveolares do tipo 1 (AEC I - *alveolar epithelial type I cells*) e células endoteliais o que culmina em desnudação da membrana basal (MB) (14, 15). As anormalidades hiperplásicas das células alveolares do tipo 2 (AEC II - *alveolar epithelial type II cells*)

relacionadas com o estresse celular e a diminuição da proteína do surfactante A (SF-A - *Surfactant protein A*), contribuem para a falha na regeneração da AEC I perdida durante a lesão (16). Além disso, a redução da replicação de AEC II normais e a falha das mesmas em cobrir a MB desnuda após a lesão, contribui para aumentar o encurtamento dos telômeros e para a expressão anormal de telomerase nessas células. O encurtamento dos telômeros resulta em apoptose ou parada permanente do ciclo celular devido aos danos ao DNA (17).

É sabido que o fator de transformação do crescimento beta ($\text{TGF-}\beta$ - *transforming growth factor beta*), um dos maiores reguladores do processo de cicatrização fisiológico e um dos maiores mediadores do processo fibrótico, é superexpresso em todos os tecidos fibróticos e induz a produção de colágeno em culturas de fibroblastos, independentemente de sua origem (18-20). Além disso, o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF - *basic fibroblast growth factor*) foi identificado como o sinal responsável pela indução da atividade da telomerase em fibroblastos, ao passo que o $\text{TGF-}\beta$, está associado com a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (21).

Estudos anteriores demonstraram que a expressão de telomerase e endotelina-1 (ET-1) está significativamente associada com áreas vasculares e normais em pulmões de pacientes com FPI (13, 22). A expressão anormal da telomerase por células endoteliais ativa também a ET-1, que é um dos indutores da deposição de colágeno, com os seus efeitos fibrogênicos sendo central na cicatrização e reparação de tecido (22). Células epiteliais e/ou endoteliais danificadas, liberam mediadores inflamatórios e citocinas tais como, interleucina 1 beta ($\text{IL-1}\beta$) e $\text{TGF-}\beta 1$ (23, 24). Além disso, os fibroblastos se transformam em miofibroblastos à medida que migram para o foco da lesão (11, 25, 26).

As anormalidades celulares endoteliais causadas pela lesão, sugerem que a MB desnuda contribua para a exposição de epítomos do colágeno do tipo V (Col V), o que aumenta a síntese destas células, fibroblastos e miofibroblastos. O Col V, minoria no tecido pulmonar, é sequestrado juntamente com as fibrilas de colágeno do tipo I (Col I), o principal colágeno pulmonar, e, por conseguinte, escondido do sistema imune. O processo de remodelamento conduz à exposição e a superexpressão do Col V, que por sua vez está associado com o desenvolvimento da imunidade anti-Col V (27). Essa resposta imune resulta na desregulação do processo de cicatrização, acelerando o depósito de MEC e consequentemente a fibrose (11), com diferenciação de miofibroblastos e aumento na produção de citocinas como, TGF- β (28).

1.4. Modelos experimentais

É sabido que a fibrose bronquiocêntrica e periférica não são idênticas, e as diferenças podem ser detectadas por radiografia, funcionalmente e terapêuticamente (3). No entanto, existem contradições entre os diferentes estudos que abordam estas questões, porque 1) a distinção entre fibrose bronquiocêntrica e periférica nem sempre é clara e simples, 2) é possível que insultos diretos e indiretos coexistam na mesma lesão, o que torna difícil avaliar estas duas formas separadamente, e 3) os pacientes apresentam diferentes graus de lesão pulmonar.

A reprodutibilidade e a possibilidade do estudo controlado têm resultado numa maior compreensão da patogenia do processo. Sabendo-se que lesão tecidual pode ser provocada através de diferentes compostos químicos, superexpressão de fatores de crescimento, irradiação, exposição a partículas orgânicas, dentre outros (29, 30), e com o intuito de melhor compreender os mecanismos da fibrose pulmonar, a utilização de

modelos experimentais permite obter informações significativas quanto às alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas da doença. Portanto, visando tais mecanismos, foi utilizado nesta tese, dois modelos experimentais para indução da fibrose pulmonar.

1.4.1. *Bleomicina (BLM)*

Está entre os modelos experimentais mais clássicos para estudo dos mecanismos de fibrose pulmonar. Trata-se de um agente antimicrobiano com propriedades quimioterápicas, isolado de culturas de uma cepa de *Streptomyces verticillus* (31). É utilizado no tratamento inicial de linfomas, tumores testiculares e carcinoma de células escamosas. Dependendo da dose, ao longo do tempo, seu uso pode produzir inflamação e fibrose pulmonar com consequente redução da capacidade e volume pulmonares (32). Os primeiros trabalhos descrevendo a BLM, sua farmacologia e seus efeitos foram realizados em ratos (31, 33). Atualmente os roedores são os espécimes de eleição para os estudos de fibrose pulmonar, devido à facilidade de formação de colônias, manuseio e sensibilidade pulmonar (34). Os efeitos terapêuticos e citotóxicos da BLM são resultados de sua capacidade de fragmentar o DNA das células alvo, com consequente redução na síntese de RNA e proteínas. É possível que os danos pulmonares causados pela BLM estejam diretamente relacionados à formação de radicais livres de oxigênio por um mecanismo dependente de ferro (35). Ademais, a produção de radicais livres pode aumentar a lesão pulmonar por inativação de antiproteínases, rompimento de membranas e exposição da barreira alvéolo-capilar (36). Estes radicais agem como iniciadores, mantenedores e amplificadores da reação inflamatória (37). A quebra da fita de DNA seria, portanto, definida por três mecanismos associados e sinérgicos: a ligação simultânea da BLM com o DNA e o Fe^{+2} ; a fácil oxidação do Fe^{+2} pelo oxigênio

molecular; e a geração de radicais livres em íntima proximidade com o DNA (38, 39). A BLM aparentemente tem ação direta ou indireta na ativação dos macrófagos alveolares, provavelmente com participação do fator de ativação plaquetária (PAF) e de outros metabólitos derivados do ácido araquidônico, já que o uso de antagonistas do PAF inibiu a fibrose induzida pela droga (34, 40). O uso da BLM também é relacionado com o aumento seletivo de RNAs mensageiros específicos que codificam a produção de proteínas como o procolágeno-alfa 1, a elastina e a fibronectina dos pulmões, que tem papel determinante na gênese da fibrose, e mediadores inflamatórios que acarretam em uma migração e ativação de neutrófilos e linfócitos semelhante ao estímulo infeccioso (41-44). A migração de polimorfonucleares ativados para o tecido pulmonar e a liberação de proteases lisossômicas destrói o colágeno e outras proteínas estruturais, estimulam a migração de linfócitos e ativação dos fibroblastos. A consequência histológica desta destruição é o espessamento septal por edema e por infiltração de células inflamatórias e deposição de colágeno. A lesão é heterogênea e a região axial é a mais intensamente comprometida com presença de mononucleares e neoformação intensa de colágeno. Nas regiões periféricas, as lesões são observadas ao longo da região subpleural posterior (45). A destruição alveolar pode ser observada pela presença de alterações das células alveolares e presença de material proteináceo nos espaços alveolares, até pelo total desarranjo estrutural com consequente substituição por tecido fibrótico.

1.4.2. Hidroxitolueno butilado (3-5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytolueno: *BHT*)

Trata-se de um antioxidante sintético amplamente utilizado na indústria alimentícia e cosmética durante os anos 50. Porém, na década de 70 seu uso foi proibido

devido a relatos de que em estudos laboratoriais com animais não só esse composto como também seus metabólitos exerciam efeitos tóxicos sobre camundongos e que poderiam também alterar o metabolismo humano podendo causar sérios danos à saúde dos indivíduos (46, 47).

A primeira descrição de lesão pulmonar causada por BHT ocorreu em 1972 quando, Marino e Mitchell observaram que após administração intraperitoneal desse composto os animais apresentavam sinais de falha respiratória devido à hiperplasia difusa, hipertrofia e desorganização geral dos componentes celulares em regiões alveolares além de edema e colapso alveolar (48). Diversos pesquisadores em estudos seguintes demonstraram que o BHT além de causar extensiva e difusa lesão pulmonar, exercia ação também sobre as AEC I e AEC II, causando necrose das AEC I e induzindo a proliferação e diferenciação das AEC II em AEC I na tentativa de reparo do epitélio lesionado. Adjacente a esse evento as células endoteliais e intersticiais também são induzidas a proliferação, ocasionando assim o dano pulmonar (49, 50). Contudo, para que os animais desenvolvessem fibrose pulmonar semelhante aos humanos, a administração do BHT deveria ser seguida da exposição dos animais a diferentes níveis de oxigênio molecular que variavam de 60 a 100% (51). Então, Haschek e colaboradores descreveram que, o quadro fibrótico semelhante ao desenvolvido por humanos ocorria quando os animais recebiam via intraperitoneal 400 mg/Kg de BHT e ficavam expostos a 70% de oxigênio por 6 dias pois, a hiperóxia favorece a proliferação de fibroblastos intersticiais e das células alveolares epiteliais (52, 53).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Estudos histológicos, ultraestruturais, funcionais e do lavado broncoalveolar há décadas são realizados em modelos animais na busca de semelhanças com as encontradas nos pacientes, com o intuito de compreender melhor os mecanismos evolutivos e etiopatogênicos destas doenças. Se por um lado, esses modelos têm permitido conhecer melhor o comportamento de tais doenças, por outro, tem levantado novas questões, muitas das quais sem resposta até o momento.

É bem conhecido que a iniciação, a distribuição e a gravidade da fibrose varia entre as diferentes lesões químicas, no entanto, os mecanismos dessa variação e também de como ocorre a lesão na MB epitelial/endotelial, como também os sinais de ativação fibrótica, são poucos investigados. Devido a isso, no presente estudo, foi avaliado e comparado o perfil de ativação e perpetuação de fibrose pulmonar induzida por BLM e BHT.

3. OBJETIVOS

Analisar as características dos fibroblastos/miofibroblastos no remodelamento parenquimatoso em 2 modelos experimentais de fibrose pulmonar, visando contribuir para a compreensão do processo fisiopatológico

Os objetivos específicos dessa tese foram:

1. Analisar os processos de ativação dos fibroblastos/miofibroblastos mediante o estudo da telomerase;
2. Analisar e quantificar a participação do colágeno dos tipos I, III e V mediante imunofluorescência no tecido parafinado;
4. Quantificar a presença do aminoácido hidroxiprolina tecidual mediante a técnica de hidroxilação;
5. Analisar o estresse celular mediante a técnica de microscopia eletrônica;
6. Analisar e quantificar a participação da aquaporina 5 (AQP-5), SP-A, bFGF, TGF- β , fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), telomerase e ET-1 utilizando a técnica de imunohistoquímica;
7. Analisar a participação gênica durante a instalação e desenvolvimento do processo fibrótico.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais utilizados

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados camundongos C57Bl/6, com 20-25g, machos, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais receberam cuidados conforme o guia preparado pelo Comitê de cuidados e uso dos animais de laboratório do Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos da América (*U.S. Department of Health and Human Care Services*, 1985). O estudo foi aprovado pelo comitê de ética de uso de animais experimentais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo: 372/11).

4.2. Modelo experimental de Fibrose Pulmonar

Para indução da fibrose pulmonar por BLM (n=6-8) (*Blenoxane*, Bristol-Myers Squibb), foi utilizada a dose de 0,1U/animal diluída em salina, administrada via intratraqueal (i.t.) em uma única instilação de 30µL. O grupo controle recebeu o mesmo volume de salina (Figura 2) (54).

Figura 2 – Desenho experimental utilizando BLM para indução da fibrose pulmonar em camundongo. ME: microscopia eletrônica; IMF: Imunofluorescência; IHQ: Imunohistoquímica.

Para a indução da fibrose pulmonar por BHT (n=6-8) (Sigma Chemical Co., USA), foi utilizada a dose de 400mg/Kg diluída em óleo de milho, administrada via intraperitoneal (i.p.) em um volume final de 1mL. O grupo controle recebeu o mesmo volume de óleo de milho. Todos os animais foram mantidos por 6 dias em câmara ventilada de Plexiglas, com uma mistura de oxigênio puro umidificado e ar comprimido à concentração 70% (Figura 3) (55). Após esse período os animais foram acondicionados as mesmas condições dos animais do grupo BLM.

Figura 3 – Desenho experimental utilizando BHT para indução da fibrose pulmonar em camundongo. ME: *microscopia eletrônica*; IMF: *Imunofluorescência*; IHQ: *Imunohistoquímica*.

Os animais foram divididos em seis grupos:

- 1) Animais do grupo controle BLM (n=8);
- 2) Animais do grupo BLM 14 dias (n=6) (BLM 14d), fase aguda;
- 3) Animais do grupo BLM 21 dias (n=6) (BLM 21d), fase crônica;
- 4) Animais do grupo controle BHT (n=8);
- 5) Animais do grupo BHT 14 dias (n=6) (BHT 14d), fase aguda
- 6) Animais do grupo BHT 21 dias (n=6) (BHT 21d), fase crônica;

Após o 14º e 21º dia, os animais foram eutanasiados e os pulmões foram manipulados conforme a análise proposta, isto é, para a realização da análise histológica, imunohistoquímica, imunofluorescência, dosagem de hidroxiprolina, e análise de expressão gênica.

4.3. *Análise histológica*

Para a realização da eutanásia, os animais foram previamente sedados com 0,3mg/Kg da solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino) 5,6-dihidro-4H 1,3-tiazina (Rompum, Bayer do Brasil S. A) e 10mg/kg cloridrato de cetamina (Ketalar, Park-Davis), ambos via i.p. no quadrante lateral inferior direito e finalmente submetidos à dose letal (0,6 mL) do anestésico cloridrato de cetamina (Ketalar, Park-Davis) via i.p.

Após eutanásia, a toracotomia foi realizada por uma incisão na linha medial anterior no animal, sendo o coração exposto e perfundido via ventrículo direito com 10mL de salina e, a traquéia exposta e canulada. Seguiu-se, então, a fixação do pulmão esquerdo por instilação com um volume de 0,5mL de formol 10% em pressão de 18-22 cmH₂O por 1-2 minutos, de acordo com descrição de Valença e seus colaboradores (56). O pulmão foi retirado e imerso em solução de formol 10% durante 48 horas, e processado segundo a técnica histológica para impregnação com emblocamento em parafina. Cortes de 4µm foram corados com hematoxilina e eosina (HE) (57), tricrômico de Masson e resorcina (58, 59) e observados ao microscópio de luz de campo claro. Cortes sem coloração em lâminas silanizadas para ensaio de imunohistoquímica e imunofluorescência também foram confeccionados.

O pulmão direito foi isolado através de um nó com linha estéril e subdividido da seguinte forma: os lobos cranial e médio foram identificados, ressecados e processados para dosagem de hidroxiprolina. O lobo acessório foi removido para microscopia eletrônica, o lobo caudal removido e processado para análise de expressão gênica (Figura 4).

Figura 4 – Esquema de coleta das amostras biológicas. ME: microscopia eletrônica; IF: Imunofluorescência; IHQ: Imunohistoquímica; HE: Hematoxilina e Eosina.

4.4. Imunohistoquímica

Para avaliar o envolvimento epitelial e endotelial durante o processo fibrótico, foi utilizado o ensaio de imunohistoquímica. As lâminas foram desparafinizadas, rehidratadas em álcool e então, incubadas em citrato de sódio 10mM seguido de aquecimento, para recuperação antigênica. A peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio.

Os cortes foram lavados em solução de tampão fosfato (PBS - *Phosphate buffered saline*) com 0,05% de Tween-20 (Sigma, St.Louis, MO), bloqueados com solução de albumina sérica bovina a 1% (BSA - *bovine serum albumin*) (Dako, Carpinteria, CA), e tratadas de acordo com o método de ABC da Vectastain (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Anticorpos para SP-A (Santa Cruz; diluição de 1:250); AQP-5 (Sigma; diluição de 1:200), bFGF (Upstate; diluição de 1:150); VEGF (Santa Cruz; diluição de 1:1000), TGF- β (Santa Cruz; diluição de 1:3000), ET-1 (Santa Cruz; 1:1000 dilution) e Telomerase (Calbiochem; diluição de 1:500) foram utilizados em solução PBS/BSA, *overnight* a 4°C. Em seguida, as lâminas foram coradas com 3,3-diaminobenzidina tetrahydrocloroeto (Vector Laboratories, Inc.), e contracoradas com

hematoxilina, seguida de desidratação e montagem com lamínula. Utilizou-se a imunoglobulina G (IgG) como o controle negativo de anticorpo primário para assegurar que não houvesse ligações inespecíficas.

4.5. Morfometria

A quantificação das lâminas coradas com tricrômico de Masson, resorcina e imunomarcadas com a técnica de imunohistoquímica, foi realizada por 2 observadores, através do método estereológico convencional.

Para determinação dos índices das diferentes marcações, foi usada a técnica do *point-counting* que consiste num retículo contendo 100 pontos e 50 retas, colocado sob 10 diferentes campos pulmonares em aumento de 400X. A porcentagem (P) de pontos marcados no compartimento de referência para cada antígeno estudado foi expressa conforme a fórmula:

$$P = (P_i \times 100) / P_t$$

Onde P_i é o número de pontos que incide sobre a positividade dos marcadores imunohistoquímicos e P_t é o número total de pontos analisados. A porcentagem (P) de cada antígeno foi calculada a partir da soma dos resultados de todos os campos analisados para cada amostra.

4.6. Imunofluorescência para o colágeno dos tipos I, III e V

Para a imunofluorescência, foram utilizadas lâminas com cortes de 4µm de espessura, previamente imersas em parafina, em lâminas com aminosilane (Sigma Chemical Co.). Posteriormente, as lâminas foram imersas em xilol e desidratadas em

concentrações decrescentes de etanol. Para a exposição dos sítios imunogênicos, foi realizado tratamento enzimático com pepsina bovina (10000 UTD) (Sigma Chemical Co.) em tampão ácido (pH=2.2) (2mg/mL) durante 30 minutos a 37°C e, incubação posterior com leite a 5% em tampão fosfato pH=7,0. As lâminas foram incubadas *overnight*, a 4°C, com anticolágeno tipos I e V policlonais obtidos em coelhos, diluídos em PBS, nas concentrações de 1:100 e anticolágeno tipo III monoclonal (Oncogen), na concentração de 1:200. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS-Tween20 a 0,05% três vezes e incubadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo e coelho conjugados com fluoresceína (Sigma Chemical Co.), diluído em azul de Evans (6mg), em solução de PBS por 90 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas por três vezes com PBS-Tween20 a 0,05% e montadas com solução de glicerina tamponada. A reação foi visualizada em microscópio de fluorescência da marca Olympus.

4.7. Quantificação da imunofluorescência

Foram selecionados aleatoriamente 10 campos de cada lâmina dos diferentes grupos. Tais áreas foram fotografadas sob um aumento de 400X e, utilizando um analisador de imagem acoplado ao microscópio de fluorescência, foi iniciada a quantificação. O sistema utilizado consiste de uma câmera Olympus-5 acoplada a um microscópio Olympus, a partir do qual as imagens são visualizadas no monitor. Através de um sistema digital inserido no computador (Pentium4 3000Mhz), as imagens foram processadas pelo *software* Image Pro-Plus-6.0.

O cálculo da área das fibras do colágeno imunomarcadas, em micrômetros quadrados, é dado através do reconhecimento das frequências de luz correspondentes às fibras verdes fluorescentes (Figura 5). O mesmo padrão de frequências foi utilizado para

quantificação de todas as lâminas, e também utilizado para quantificação do grupo restante, evitando assim qualquer tipo de viés.

Figura 5 - Exemplo de tecido imunomarcado (colágeno I).

Para a quantificação foi realizado um padrão de marcação para as fibras imunomarcadas (Figura 6). Esse padrão foi utilizado para a quantificação de todas as lâminas.

Figura 6 – Exemplo de interstício imunomarcado (colágeno I).

Na mesma amostra, para cada campo de interstício imunomarcado, também foi medido o total de área sólida, correspondente ao tecido pulmonar presente, excluindo-se os espaços aéreos (Figura 7).

Figura 7 – Exemplo do total de área sólida (colágeno I)

O resultado da área de fibras de colágeno dividida pela área sólida intersticial total é expresso em porcentagem de área destas fibras.

4.8. Dosagem de colágeno mediante a técnica de hidroxilação

A deposição de colágeno foi estimada pela concentração de hidroxiprolina no tecido pulmonar. Os lobos cranial e médio foram clivados e desidratados em acetona PA por 24 horas em temperatura ambiente. Após a desidratação, adicionou-se uma mistura de clorofórmio-etanol (2:1) por 24 horas em temperatura ambiente e após este processo, as amostras permaneceram secando em estufa a 60°C por 1 hora. As amostras foram pesadas sendo depois hidrolisadas com 1mL de HCl 6N por 18 horas a 110°C, de acordo com o método Woessner's. Após esta etapa adicionou-se 5,7mL de água destilada e 1mL de NaOH 6N, as amostras foram então centrifugadas a 1400g por 15

minutos. As amostras foram ressuspensas em 500 μ L da solução cloramina T 0,05M (1,41g cloramina T; 10mL de H₂O; 10mL n-propanol; 80mL tampão ácido pH 6) por 20 minutos em temperatura ambiente. Logo após este procedimento, adicionou-se 500 μ L da solução aldeído/ácido perclórico (15g p-dimetil-amino-benzaldeído; 60mL de n-propanol; 26mL de ácido perclórico 70%) por 20 minutos no banho a 60°C. Aguardou-se 10 minutos para que as amostras e a curva padrão esfriassem para então ser feita a leitura a 570nm no espectrofotômetro. O resultado foi expresso em ng de hidroxiprolina por mg de pulmão (60).

4.9. Técnica empregada para microscopia eletrônica

Fragmentos de pulmão foram fixados em tampão de glutaraldeído 2% e pós – fixados em 1% de OsO₄. Os espécimes foram lavados durante a noite em solução salina a 0,9% contendo uranila e sacarose e, finalmente, embebidos em Epon. Para cada caso, três ou cinco fragmentos do pulmão foram seccionados a 1 μ m e selecionados por microscopia óptica. Cortes aceitáveis foram aqueles que representam o padrão histológico do pulmão identificado na maioria dos fragmentos. Seus respectivos blocos embebidos em Epon foram então seccionados a 55 a 60nm, corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e finalmente examinados com um microscópio eletrônico JEOL JEM – 1010.

4.10. Análise da expressão gênica por RT-PCR

Para avaliar a expressão gênica utilizou-se a metodologia de RT-PCR para tanto, foi usado o kit de *RT²-PCR Array* da Qiagen que foi elaborado para analisar, simultaneamente, um painel de genes relacionado com uma determinada doença, neste caso, a fibrose.

A placa de 96 poços do *RT²-PCR Array* (PAMM120ZC, Qiagen) contém 84 genes relacionados com a via da fibrose e 5 genes de controle endógeno. Possui 1 poço para controle de DNA genômico, 3 poços para controle da transcriptase reversa e 3 poços de controle positivo.

O protocolo utilizado pelo kit segue a seguinte ordem (Figura 8): extração do RNA, conversão do RNA em cDNA utilizando o kit *RT² First Strand* (cat. no. 330401, Qiagen) e preparo da placa de RT-PCR.

Figura 8 - Protocolo utilizado no RT2 Profiler PCR Array.

Extração de RNA do tecido pulmonar

O RNA foi extraído do tecido pulmonar, do lobo caudal, utilizando o mini kit *Rnase Microarray Tissue* (Qiagen, cat. No. 73304) de acordo com as instruções do fabricante (Figura 9).

Ao tecido pulmonar foi acrescentado 1mL de QIAzol (uma solução monofásica de fenol e isoticianato de guanidina) e o material foi então homogeneizado. O homogenato foi transferido para um tubo de 1,5mL novo, incubado à temperatura ambiente por 5 minutos, e por fim acrescentado 0,2mL de clorofórmio. Esta solução foi homogenizada por inversão e mantida à temperatura ambiente por 3 minutos, sendo submetida à centrifugação a 12.000G por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa resultante da centrifugação foi transferida para um novo tubo contendo 0,6mL de etanol à 70%. Dessa solução, 0,7mL foi transferido para uma coluna de separação (provida com o kit) contendo um tubo coletor. Tal coluna foi centrifugada por 15 minutos a 10.000 rpm à temperatura ambiente. Esse procedimento é realizado novamente com o restante da solução.

À coluna, foi adicionado 0,5mL do tampão RW1 (provido com o kit), centrifugada novamente. Foi adicionado 0,5mL do tampão RPE (provido com o kit) a coluna e então novamente centrifugada. Após tal procedimento é adicionada a coluna 120µL de água *RNAse free* e então centrifugada por 1 minuto a 10.000 rpm. A leitura do material obtido foi feita com uso de espectrofotômetro da marca *Thermo Scientific, NanoDrop 2000c*, acoplado a um *notebook AB – Applied Biosystems*.

Protocolo RNeasy Microarray

Figura 9 – Extração de RNA utilizando Rnase Microarray.

Reação de transcriptase reversa para obtenção do cDNA

A seguir, o RNA obtido foi processado para obtenção do cDNA utilizando o kit *RT² First Strand* (Qiagen, cat. no. 330401), de acordo com o protocolo a seguir. Todos os reagentes utilizados foram fornecidos com o kit

1 - Para eliminação do DNA genômico, utilizou-se 500ng do RNA total. Ao RNA foi adicionado 2µL de Buffer GE e 3µL de água livre de RNase;

2 – A solução do item 1 foi então incubada por 5 minutos a 42°C no termo ciclador da marca Applied Biosystem;

3 – Adicionou-se então, 10µL do mix de transcrição reversa, que consiste em: 4µL de 5x Buffer BC3, 1µL de Control P2, 2µL de RE3 Reverse Transcriptase Mix e 3µL de água livre de RNase;

4 - O homogenado foi alocado no termo ciclador por 15 minutos a 42°C, em seguida a reação foi cessada com a incubação da amostra por 5 minutos a 95°C;

5 - Foi adicionado 91µL de água livre de RNase ao homogenado. Esta solução final foi utilizada para a realização do RT-PCR.

RT-PCR utilizando RT²-PCR ARRAY

Para a realização dessa metodologia foi utilizado a solução de cDNA descrita no item anterior.

1 - Foi utilizado 102µL do cDNA, descrito anteriormente. Ao cDNA foi adicionado 1350µL de 2x *RT² SYBR Green Mastermix* (cat. No. 330523), 1248µL de água livre de *RNase*, sendo o volume final de 2700µL;

2 – O volume de 25µL do Mix descrito no anterior foi adicionado em cada poço da placa *RT² Profiler PCR Array* de 96 poços;

3 - A placa foi centrifugada por 1 minuto a 1000 g em temperatura ambiente, e então colocada no ciclador da *Applied Biosystems*, modelo 7500 (AB 7500);

4 - Para o RT-PCR o equipamento (AB 7500) foi ajustado da seguinte forma: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C. Após os 40 ciclos foi realizado uma curva de dissociação (*melting curve*) seguindo as configurações recomendadas pelo fabricante do aparelho;

5 - Os resultados obtidos foram exportados para uma planilha Excel, e foram analisados utilizando o modelo matemático $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

A tabela 1 (Anexo 1) descreve os genes contidos na placa utilizada neste protocolo. Os genes grifados foram os abordados nesta tese, além dos controles.

Os dados obtidos da reação de qPCR foram analisados utilizando a metodologia de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (61). Os valores de expressão obtidos do tecido pulmonar, foram normalizados utilizando a média dos controles endógenos providos com a placa (*Gapdh*, *B2m*, *Actb*, *Gusb* e *Hsp90ab1*). Para esse estudo, foi utilizada a média dos valores de C_T obtidos para cada grupo, para calcular o valor individual de ΔC_T . A média dos valor de ΔC_T dos controles, foi utilizada para calcular o valor de $\Delta\Delta C_T$ de cada amostra. Os grupos controles foram definidos com valor igual a 1 para todos os experimentos.

4.11. Análise estatística

Todos os gráficos foram gerados utilizando o programa *GraphPad Prism 6.0C* (GraphPad Software, San Diego, CA.). Os valores quantitativos foram representados como média e erro padrão da média (EPM) e testados para testes não-paramétricos por análise de variância (*One way ANOVA*) seguido do teste Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Análise histopatológica do tecido pulmonar nos modelos de BLM e BHT

Para observação da integridade do parênquima alveolar foi utilizada coloração HE, além de coloração específica para visualização de fibras elásticas (resorcina) e depósito de colágeno (tricroômico de Masson).

Foi observado estrutura normal do tecido pulmonar nos grupos controles (Figura 10 A e 10 D) enquanto que, os animais dos grupos BLM (Figura 10 B-C) e BHT (Figura 10 E-F) apresentaram extensiva área fibrótica ao longo do parênquima pulmonar. Os animais da fase aguda apresentaram edema e aumento do infiltrado inflamatório na região centrilobular (BLM) e periférica (BHT) (Figura 10 B e 10 E). Já na fase crônica, em ambos os grupos, notou-se mudanças significativas nas áreas centrilobular e periférica, com proeminente região fibrótica, colapso alveolar e presença de AEC2 hiperplásicas (Figura 10 C e 10 F).

Figura 10 - Fibrose induzida por BLM e BHT. Os pulmões foram removidos dos animais no 14º e 21º dia após, salina, BLM, óleo de milho e BHT. As alterações histológicas foram demonstradas por HE (ampliação de 400x) (controle, salina – A; BLM 14d – B; BLM 21d – C; controle, óleo de milho - D; BHT 14d – E; e BHT 21d - F). Cada grupo experimental possui n = 6-8. As imagens são representativas de cada grupo.

Em todos os grupos fibróticos, houve aumento progressivo do depósito de colágeno evidenciado pela coloração específica, tricrômico de Masson (Figura 11 A), e também pela quantificação de hidroxiprolina presente no tecido (Figura 12). Em contrapartida, houve uma diminuição das fibras elásticas, devido ao processo fibrótico (Figura 11 B).

Figura. 11 - Aumento da produção de componentes de MEC. Os pulmões foram removidos dos animais no 14º e 21º dia após instilação de solução salina, óleo de milho, BLM ou BHT, tal como descrito na seção de métodos. Gráficos representam a porcentagem de fibras de colágeno (A) e fibra elástica (B). * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle # $P < 0,05$ em relação ao grupo Óleo/controle. Cada grupo experimental possui n = 6-8.

Figura 12 - Aumento de colágeno no pulmão induzido por BLM e BHT. Concentração de hidroxiprolina nos pulmões de camundongos instilados 14 e 21 dias com solução salina, óleo de milho, BLM ou BHT. Os resultados são expressos em ng/mg de proteína de pulmão. * $P < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $P < 0,05$ em relação ao grupo óleo/controle; § $P < 0,05$ comparado com o grupo de BLM 14d; δ $P < 0,05$ em comparação com grupo de BHT 14d. Cada grupo experimental possui n = 6-8.

5.2. Envolvimento e comprometimento do epitélio pulmonar

As figuras 13 e 14, evidenciam a presença de SP-A nas AEC II e AQP-5 nas AEC I, respectivamente. Os grupos controles apresentam distribuição uniforme, com uma proporção maior de AEC II (Figura 13 A - a e d) no septo alveolar e menor presença de AEC I nesse espaço (Figura 14 A - a e d). Nos grupos BLM (Figura 13 A -

b-c) e BHT (Figura 13 A - e-f), houve uma presença significativa de hiperplasia de AEC II nas áreas de colapso alveolar, bem como nos focos fibroblásticos. Esse fato é evidenciado na figura 13 B pela quantificação do SP-A no parênquima alveolar, sendo mais significativo nos grupos crônicos, quando comparado aos grupos controle.

Figura 13 – Comprometimento das AEC II induzido por BLM e BHT. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dias após instilação de óleo de milho, solução salina, BLM ou BHT. As lâminas foram imunomarcadas para a SP-A (A) como descrito na seção de métodos. As imagens são representativas de cada grupo. Gráficos representam a percentagem de SP-A (B). * $P < 0,0001$ em relação ao controle; # $P < 0,0001$ em relação ao Óleo/control; § $P < 0,05$ em comparação com o grupo BLM 14d. δ $P < 0,05$ em comparação com o grupo BHT 14d. Cada grupo experimental possui n = 6-8.

Quanto às AEC I, evidenciadas pela imunomarcção de AQP-5, foi possível observar a diminuição deste tipo celular no parênquima de ambos os grupos fibróticos (Figura 14 A (b-c; e-f)) nas diferentes fases. Esse dado vai de encontro com a quantificação de tal marcador, que demonstrou a perda de AEC1 nos grupos BLM e BHT quando comparados aos seus controles (Figura 14 B).

Figura 14 – Comprometimento das AEC I induzido por BLM e BHT. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dias após instilação de óleo de milho, solução salina, BLM ou BHT. As lâminas foram imunocoradas para a AQP-5 (A) como descrito na seção de métodos. As imagens são representativas de cada grupo. Gráficos representam a percentagem de AQP-5 (B). * $P < 0,0001$ em relação ao controle; # $P < 0,0001$ em relação ao Óleo/controle; § $P < 0,05$ em comparação ao grupo BLM 14d. Cada grupo experimental possui $n = 6-8$.

5.3. Desorganização da MB epitélio/endotelial e superexpressão do colágeno V

Após indução da fibrose, houve um aumento significativo da expressão de ET-1 (Figura 15) após o 14^a e 21^o dia, o que resultou em lesão da MB e contribuiu para a exposição de epítotos de Col V. Evidenciou-se também aumento da expressão gênica para ET-1 (Figura 16).

Figura 15 - BLM e BHT induzem ativação endotelial. Os pulmões foram removidos no 14^o e 21^o dia após instilação de salina, óleo de milho, BLM ou BHT. As lâminas foram imunomarcadas para ET-1 (A) como descrito na seção de métodos. As imagens são representativas de cada grupo. O gráfico representa a percentagem de ET-1 no pulmão (B). * $P < 0,05$ comparado com o controle; # $P < 0,05$ comparado com o grupo Óleo/controle; § $P < 0,05$ em comparação com BLM 14d. δ $P < 0,05$ em comparação com o BHT 14d. Cada grupo experimental possui $n = 6-8$.

Figura 16 - BLM e BHT induzem a expressão gênica de ET-1. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dia após instilação de salina, óleo de milho, BLM ou BHT. As amostras foram processadas para obtenção de RNA e o RT-PCR foi realizado, conforme descrito na seção de metodologia. * $P < 0,05$ comparado com o controle; # $P < 0,05$ comparado com o Óleo/controle; $\delta P < 0,05$ em comparação com o grupo BHT 14d; $\phi P < 0,0001$ em relação a BLM 21d. Cada grupo experimental possui $n = 6-8$.

Análise do Col V revelou que, nos grupos controle houve uma distribuição homogênea dessas fibras bem como um arranjo mais frouxo, linear ao longo da MB epitélio/endotelial e ao redor de vasos sanguíneos, consistentes com a arquitetura normal pulmonar (Figura 17 A – a - d). Em contraste, 14 dias após BLM (Figura 17 A – b) e BHT (Figura 17 A – e), as amostras exibiram aumento na espessura das fibras de Col V ao longo da MB epitélio/endotelial e ao redor de pequenos vasos. Após 21 dias, as fibras do Col V continuaram espessas, porém, assumiram uma distribuição irregular e micronodular envolvendo a MB epitélio/endotelial e ao redor de pequenos vasos sanguíneos, em ambos os grupos (Figura 17 A – c - f). Esse perfil de fibras foi encontrado ao longo do tecido fibrótico. A análise quantitativa mostrou que o acúmulo do Col V aumentou progressivamente em ambos os grupos quando comparados aos controles (Figura 17 B).

Figura. 17 - Fibras grossas de Col V ao longo da MB epitélio/endotelial após BLM e BHT. Os pulmões foram removidos 14 e 21 dias após instilação de óleo de milho, salina, BLM ou BHT. A imunofluorescência foi descrita na seção de métodos. O gráfico representa a percentagem de Col V no pulmão (B). * $P < 0,0001$ em relação ao controle; # $P < 0,05$ em relação ao grupo Óleo/controle; § $P < 0,05$, comparado com BLM 14d; δ $P < 0,05$ em comparação com BHT 14d; φ $P < 0,05$ em relação a BLM 21d. Cada grupo experimental possui $n = 6-8$.

5.4. Aumento do depósito de colágeno dos tipos I e III no interstício pulmonar

Já é sabido que o Col I e o colágeno do tipo III (Col III) representam importante componente durante a resposta fibrótica, devido a isso, tais tipos foram avaliados nos grupos BLM e BHT. Em relação a presença de Col I nos pulmões do grupo controle,

estas fibras estavam dispostas frouxamente ao longo da MB epitélio/endotelial (Figura 18 A), assumindo uma distribuição uniforme, preservando a arquitetura alveolar.

Um padrão similar foi observado no estágio agudo dos grupos BLM (Figura 18 A - b) e BHT (Figura 18 A - e), com uma distribuição das fibras ao longo da MB epitélio/endotelial, contudo, houve um aumento ao redor dos alvéolos. Em contraste, durante a fase crônica da doença, em ambos os grupos BLM (Figura 18 A - c) e BHT (Figura 18 A - f), houve um espessamento e compactação dessas fibras ao longo da MB epitélio/endotelial, modificando a histo-arquitetura usual dos alvéolos. A análise quantitativa da densidade de fluorescência revelou um aumento significativo do Col I nos pulmões das fases aguda e crônica de BLM e BHT, quando comparados com os controles (Figura 18 B).

Figura 18 – Aumento de Col I após BLM e BHT. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dia após instilação de óleo de milho, solução salina, BLM ou BHT. A técnica de imunofluorescência foi descrita na seção de métodos, ampliação de 400x. O gráfico representa a percentagem de Col I no pulmão (B). * $P < 0,0001$ em relação ao controle; # $P < 0,05$ em relação ao grupo Óleo/controle; § $P < 0,05$, comparado com BLM 14d; δ $P < 0,05$ em comparação com BHT 14d. Cada grupo experimental possui $n = 6-8$.

Fibras delgadas do Col III foram visualizadas predominantemente em torno de pequenos vasos nos grupos controle (Figura 19 A). Estas fibras não foram observadas na MB epitélio/endotelial. Todavia, o interstício pulmonar na fase aguda dos grupos BLM (Figura 19 A - b), e BHT (Figura 19 A - e) exibiram fibras finas do Col III distribuídas irregularmente ao longo da MB epitélio/endotelial. Estas fibras encontravam-se ao redor de pequenos vasos e apresentavam um espessamento e

distribuição difusa no interstício pulmonar. O mesmo padrão foi observado nos grupos crônicos (Figura 19 A – c; f), porém houve um espessamento dessas fibras. A análise quantitativa da densidade de fluorescência revelou aumento significativo no depósito do Col III em todos os grupos de BLM e BHT, quando comparados aos controles (Figura 19 B).

Figura 19 – Depósito de Col III após BLM e BHT. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dia após instilação de óleo de milho, solução salina, BLM ou BHT. A técnica de imunofluorescência foi descrita na seção de métodos, ampliação de 400x. O gráfico representa a porcentagem de Col III no pulmão (B). * $P < 0,0001$ em relação ao controle; # $P < 0,05$ em relação ao grupo Óleo/controle. Cada grupo experimental possui $n = 6-8$.

Análise da expressão gênica, corroborou com os dados de imunofluorescência revelando aumento da expressão da cadeia alfa 2 do colágeno tipo I (*COL1a2*) e cadeia alfa 1 do colágeno tipo III (*COL3a1*) (Figura 20 A e B, respectivamente).

Figura 20 - Aumento da expressão gênica de COL1α2 e COL3α1. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dia após instilação de salina, óleo de milho, BLM ou BHT. As amostras foram processadas para obtenção de RNA e o RT-PCR foi realizado, conforme descrito na seção de metodologia. * $P < 0,05$ comparado com o controle; # $P < 0,05$ comparado com o Óleo/controle; $\delta P < 0,05$ em comparação com o grupo BHT 14d; $\phi P < 0,001$ em relação a BLM 21d. Cada grupo experimental possui $n = 6-8$.

5.5. Participação de proteínas reguladoras do fibroblasto e endotélio pulmonar

A Figura 19 mostra a imunomarcagem para a expressão da telomerase em AEC II, fibroblastos e células endoteliais nos grupos controle, BLM e BHT.

Observou-se aumento da celularidade no 14º e 21º dia no grupo BLM (Figura 21 A – (b-c)) e BHT (Figura 21 A – (e-f)) quando comparado às áreas não afetadas dos grupos controles (Figura 21 A – (a e d)). A análise quantitativa (Figura 21 B) confirmou o aumento significativo da expressão de telomerase no 14º e 21º dia em ambos os grupos.

Figure 21 – Expressão de Telomerase na fibrose pulmonar. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dia após instilação de salina, óleo de milho, BLM ou BHT. As lâminas foram imunomarcadas para Telomerase (A) como descrito na seção de métodos. As imagens são representativas de cada grupo. O gráfico representa a percentagem de Telomerase no pulmão (B). * $P < 0,05$ comparado com o controle; # $P < 0,05$ comparado com o grupo Óleo/controle; § $P < 0,05$ em comparação com BLM 14d. δ $P < 0,05$ em comparação com o BHT 14d. Cada grupo experimental possui $n = 6-8$.

Além disso, foi possível constatar o aumento significativo da expressão de bFGF pelos fibroblastos no interstício septal nos grupos crônicos (Figura 22 A – (c - f)) quando comparados aos grupos agudos (Figura 22 A – (b - e)) e controles (Figura 22 A – (a - d)). A análise quantitativa (Figura 20, painel B) confirmou o aumento significativo da expressão de bFGF no 14º e 21º dia em ambos os grupos.

Figure. 22 – BLM e BHT induzem sinais pró-fibróticos. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dia após instilação de salina, óleo de milho, BLM ou BHT. As lâminas foram imunomarcadas para bFGF (A) como descrito na seção de métodos. As imagens são representativas de cada grupo. O gráfico representa a percentagem de bFGF no pulmão (B). * $P < 0,05$ comparado com o controle; # $P < 0,05$ comparado com o grupo Óleo/controle; § $P < 0,05$ em comparação com BLM 14d. $\delta P < 0,05$ em comparação com o BHT 14d. Cada grupo experimental possui $n = 6-8$.

A imunomarcção para VEGF na microvasculatura pulmonar pode ser observada na figura 23. O grupo controle apresentou distribuição uniforme de VEGF na microvasculatura e, em locais onde se manteve a arquitetura pulmonar (Figura 23 A – (a-d)). Em contraste, os grupos agudos e crônicos de BLM e BHT apresentaram uma expressão difusa de VEGF (Figura 23 A – (b-c ; e-f)) na microvasculatura, em regiões

com intensa atividade celular e distorção da arquitetura pulmonar observada. Estes dados foram confirmados utilizando quantificação morfométrica para VEGF (Figura 23 B).

Figure 23 – Aumento de VEGF na microvasculatura pulmonar. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dia após instilação de salina, óleo de milho, BLM ou BHT. As lâminas foram imunomarcadas para VEGF (A) como descrito na seção de métodos. As imagens são representativas de cada grupo. O gráfico representa a porcentagem de VEGF no pulmão (B). * $P < 0,05$ comparado com o controle; # $P < 0,05$ comparado com o grupo Óleo/controle; § $P < 0,05$ em comparação com BLM 14d. δ $P < 0,05$ em comparação com o BHT 14d. Cada grupo experimental possui n = 6-8.

Em relação a expressão de TGF- β por fibroblastos no interstício septal, foi notório o aumento nos grupos crônicos de BLM (Figura 24 A – c.) e BHT (Figura 24 A – f.), quando comparados aos grupos agudos (Figura 24 A – (b-e)) e controles (Figura

24 A – (a-d)). Estes dados foram confirmados utilizando quantificação morfométrica (Figura 22, painel B).

Figure. 24 – Aumento de TGF-β no parênquima pulmonar. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dia após instilação de salina, óleo de milho, BLM ou BHT. As lâminas foram imunomarcadas para (A) como descrito na seção de métodos. As imagens são representativas de cada grupo. O gráfico representa a percentagem de TGF-β no pulmão (B). * $P < 0,05$ comparado com o controle; # $P < 0,05$ comparado com o grupo Óleo/controle; § $P < 0,05$ em comparação com BLM 14d. δ $P < 0,05$ em comparação com o BHT 14d. Cada grupo experimental possui $n = 6-8$.

Análise da expressão gênica de TGF-β1 e VEGF, corroborou com os dados de imunofluorescência revelando aumento da expressão dos mesmos nos grupos BLM e BHT, em ambas as fases (Figura 25 A e B, respectivamente).

Figura. 25 – Expressão gênica de TGF-β1 e VEGF na fibrose pulmonar. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dia após instilação de salina, óleo de milho, BLM ou BHT. As amostras foram processadas para obtenção de RNA e o RT-PCR foi realizado conforme descrito na seção de metodologia. * $P < 0,05$ comparado com o controle; # $P < 0,05$ comparado com o Óleo/controle; δ $P < 0,0001$ em comparação com o grupo BHT 14d; φ $P < 0,0001$ comparado ao grupo BLM 21d. Cada grupo experimental possui n = 6-8.

5.6. Mudanças submicroscópicas causadas pelo estresse celular

Imagens representativas de todos os experimentos mostram características ultra-estruturais encontradas nos septos alveolares (Figura 26 e 27).

Observou-se nos controles, a presença de corpos lamelares dispersos de forma homogênea no citoplasma de AEC II (Figura 26 A e Figura 27 J), bem como retículo endoplasmático (RE) com cisternas regulares e mitocôndrias com cristas preservadas no endotélio (Figura 26 B e Figura 27 K) e fibroblastos (Figura 26 C e Figura 27 L).

Contudo, na fase aguda dos grupos BLM (Figura 26 D-F) e BHT (Figura 27 M-O) observou-se cisternas dilatadas do RE, corpos lamelares esparsos e mitocôndrias com cristas anormais nas AEC II (Figura 26 D e Figura 27 M), células endoteliais (Figura 26 E e Figura 27 N) e de fibroblasto (Figura 26 F e Figura 27 O) nos septos alveolares.

Já na fase crônica , foi possível observar que os corpos lamelares na AEC II apresentaram formas anormais (Figura 26 G e Figura 27 P), bem como a dilatação e distribuição irregular de RE e escassas mitocôndrias, que também foram visualizados no endotélio (Figura 26 H e Figura 27 R) e em fibroblastos (Figura 26 I e Figura 27 S).

Figura 26 – Alterações ultraestruturais no septo alveolar após instilação de BLM. Os pulmões foram removidos dos animais no 14º e 21º dia após, salina ou BLM. Os pulmões do grupo controle mostraram corpos lamelares (CL), retículo endoplasmático (RE) com cisternas regulares, mitocôndrias (MI) e de fibroblasto (FI) (A-C). O grupo BLM mostrou cisternas dilatadas de retículo endoplasmático (RE), corpos lamelares esparsos (CL) e mitocôndria nas AEC II, células endoteliais e fibroblastos no septo alveolar (D-I). As imagens são representativas de cada grupo.

Figura 27 – Alterações ultraestruturais no septo alveolar após instilação de BHT. Os pulmões foram removidos dos animais no 14º e 21º dia após, óleo de milho ou BHT. Os pulmões do grupo controle mostraram corpos lamelares (CL), retículo endoplasmático (RE) com cisternas regulares, mitocôndrias (MI) e de fibroblasto (FI) (A-C). O grupo BHT mostrou cisternas dilatadas de retículo endoplasmático (RE), corpos lamelares esparsos (CL) e mitocôndrias (MI) nas AEC II, células endoteliais e fibroblastos no septo alveolar (D-I). As imagens são representativas de cada grupo.

5.7. Sinalização molecular na Fibrose Pulmonar induzida por BLM e BHT

Para melhor compreender os processos envolvidos na fibroproliferação durante a fibrose pulmonar induzida por BLM e BHT, foi realizada uma análise por RT-PCR a fim de se identificar os mecanismos moleculares envolvidos neste processo.

Ao se analisar a via de sinalização intracelular observou-se um aumento da expressão dos genes α -SMA, IL-1 β , LOX, Smad3, Sp1 e C/EBP β nos grupos da fase

aguda e crônica dos animais que receberam BLM e BHT, quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 28, 29 e 30).

Figura. 28 – Expressão gênica de α -SMA e IL-1 β na fibrose pulmonar. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dia após instilação de salina, óleo de milho, BLM ou BHT. As amostras foram processadas para obtenção de RNA e o RT-PCR foi realizado conforme descrito na seção de metodologia. * $P < 0,0001$ comparado com o controle; # $P < 0,0001$ comparado com o Óleo/controle; $\delta P < 0,05$ em comparação com o grupo BHT 14d; $\phi P < 0,05$ comparado ao grupo BLM 21d. Cada grupo experimental possui n = 6-8.

Figura. 29 – Expressão gênica de Smad3 e Lox na fibrose pulmonar. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dia após instilação de salina, óleo de milho, BLM ou BHT. As amostras foram processadas para obtenção de RNA e o RT-PCR foi realizado conforme descrito na seção de metodologia. * $P < 0,05$ comparado com o controle; # $P < 0,05$ comparado com o Óleo/controle; $\delta P < 0,05$ em comparação a BLM14d; $\phi P < 0,0001$ comparado ao grupo BHT 14d; $\phi P < 0,0001$ comparado ao grupo BLM 21d. Cada grupo experimental possui n = 6-8.

Figura. 30 – Expressão gênica de C/EBPβ e Sp1 na fibrose pulmonar. Os pulmões foram removidos no 14º e 21º dia após instilação de salina, óleo de milho, BLM ou BHT. As amostras foram processadas para obtenção de RNA e o RT-PCR foi realizado conforme descrito na seção de metodologia. * $P < 0,05$ comparado com o controle; # $P < 0,05$ comparado com o Óleo/control; δ $P < 0,05$ em comparação com o grupo BHT 14d; φ $P < 0,0001$ comparado ao grupo BLM 21d. Cada grupo experimental possui n = 6-8.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que BHT e BLM apresentam mecanismos semelhantes da resposta fibrótica, porém com distribuição e intensidade diferente no parênquima pulmonar, sendo mais acentuada no grupo BHT. De fato, a resposta fibrótica no grupo BLM foi mais proeminente na região peribronquiolar, enquanto que a lesão desenvolvida pelo grupo BHT foi mais evidente na região periférica, apresentando semelhança com a FPI.

No presente trabalho, comparou-se a especificidade da ativação de fibroblastos e do endotélio, o acúmulo dos diferentes tipos de colágeno no interstício pulmonar, o envolvimento epitelial, a expressão de proteínas reguladoras epiteliais, características ultraestruturais do estresse celular induzido por ambos os agentes químicos, bem como o perfil gênico de sinalização.

Constatou-se que em ambos os modelos experimentais, as alterações morfológicas e a replicação das AEC II anormais, a produção descompassada de SP-A e AQP-5, assim como a produção de telomerase nos focos fibroblásticos, estavam diretamente relacionadas a regiões de intensa cicatrização fibrótica. Esses resultados encontram embasamento na literatura recente que atribui a perda das AEC II como o gatilho na FPI (62). Esses resultados permitem postular que, a incapacidade das AEC II anormais em recobrir a MB desnuda pela perda de AEC I, pode iniciar e perpetuar o desenvolvimento da resposta fibrótica. As anormalidades observadas nos fibroblastos e endotélio, devido a um desarranjo a nível de organelas tais como, corpos lamelares irregulares, as cisternas ampliadas do RE e a perda de cristas nas mitocôndrias,

principalmente em AEC II, são sugestivas de estresse celular e incapacidade em regenerar AEC I após a instilação de drogas.

Devido ao dano no DNA causado por BLM e BHT, investigou-se o quanto da expressão de telomerase pode ser específica para a fibrose induzida por lesões genotóxicas. Alder e colaboradores, demonstraram que o encurtamento dos telômeros em AEC II, reduz a capacidade destas células em recobrir a MB epitélio/entodelial desnuda subsequente a uma lesão, conduzindo assim a geração de sinais profibróticos e consequente perpetuação da fibrose (63). De acordo com os dados aqui apresentados, a expressão de telomerase foi significativamente maior em AEC II e em fibroblastos nos grupos crônicos de BLM e BHT quando comparados com os grupos iniciais e controle. Tais resultados coincidem com dados da literatura ao demonstrarem que a BLM é capaz de induzir a atividade de telomerase em fibroblastos de pulmão de rato, o que resulta em maior número destas células com o aumento da capacidade proliferativa (21, 64). Além disso, mutações na telomerase e nos genes relacionados aos telômeros, tem sido uma das provas mais convincentes para etiologia da FPI (65).

A indução da telomerase também regula a diferenciação de fibroblastos através da ativação de TGF- β e bFGF. Sabe-se que a atividade da telomerase induzida por BLM está localizada, principalmente em células diferentes de miofibroblastos (64), e que a perda de atividade da telomerase está associada com a diferenciação de miofibroblastos (21, 23). Com base nessas evidências, investigou-se a ativação de fibroblastos por TGF- β e bFGF, onde se constatou que ambos os fatores de crescimento estiveram significativamente elevados nos grupos crônicos de BLM e BHT. Esses achados reforçam a ideia de que a produção de TGF- β está correlacionada com a progressão de doenças fibróticas e sua inibição com a redução da fibrose em diferentes modelos experimentais. Além disso são concordantes com dados literários que relatam o papel

essencial do bFGF em induzir a atividade da telomerase em fibroblastos, ao passo que TGF- β , está associado com redução da atividade de telomerase e o consequente aumento na expressão de α -SMA, levando a diferenciação de miofibroblastos (21, 23).

Lesão nas células vasculares seguida de processo de reparação ineficaz, são eventos complementares na patogênese da fibrose pulmonar. No presente estudo, verificou-se que na fase aguda dos grupos BLM e BHT houve uma expressão difusa de ET-1 e VEGF na microcirculação, coincidente com as áreas de lesão e distorção da arquitetura pulmonar. Com o aumento da expressão de ET-1, VEGF e IL-1 β pode-se postular que tais fatores promovem maior migração de infiltrados inflamatórios perivasculares, tais como macrófagos e polimorfonucleares, através do endotélio. O aumento da migração celular causa inflamação crônica, levando a danos maiores nas células endoteliais o que facilita o processo de ruptura capilar (10, 66). Conjuntamente, a desregulação do controle do tônus vascular e a desorganização progressiva da arquitetura vascular podem provocar um excessivo acúmulo de componentes de MEC, o que conduz à formação de uma cicatriz fibrótica permanente (1, 67).

O presente estudo revelou que, a superexpressão de citocinas, genes e proteínas relacionadas a fatores de crescimento, resultaram no aumento do depósito de colágeno nos grupos BLM e BHT. É interessante observar que esse aumento foi semelhante em ambas as fases fibróticas, aguda e crônica. Aumentos de mesma magnitude, na quantidade de colágeno, foram previamente relatados em fibrose pulmonar induzida por BLM (68) em pacientes com síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (69), FPI (70) e no modelo utilizando paraquat (71).

Reconhecidamente, dentre os colágenos fibrilares, os tipos I e III desempenham um importante papel no desenvolvimento de fibrose pulmonar. De fato, identificou-se maior distribuição de fibras de Col I ao longo da MB dos grupos BLM e BHT, em

ambas os estágios, na região alveolar. Em relação as fibras de Col III no interstício pulmonar, encontrou-se distribuição homogênea e linear ao longo da MB e pequenos vasos, nos grupos crônicos de fibrose. Essas alterações vão de acordo com estudos anteriores que demonstraram na fase avançada da fibrose, um aumento notável na proporção do colágeno tipo I/III (72). Contudo, estudos anteriores propõem que a síntese de Col III possa ser um indicador de resposta fibrótica (73). Além disso, o aumento da expressão a partir da fase aguda para a crônica, pode indicar uma mudança do colágeno intersticial dominante, do tipo III para o tipo I e/ou ao aumento do número de ligações cruzadas intermolecular.

Com a progressão da fibrose e aumento do depósito de colágeno, constatou-se redução das fibras elásticas no interstício pulmonar e aumento na expressão gênica de *LOX*. *Lox*, é uma enzima extracelular que catalisa a formação de aldeídos a partir de resíduos de lisina em precursores de colágeno e elastina. Estes aldeídos são altamente reativos, e sofrem reações químicas espontâneas com outros derivados de reações da lisil-oxidase, ou com resíduos de lisina não modificados. Isto resulta numa ligação cruzada entre colágeno e elastina, o que é essencial para a estabilização de fibrilas de colágeno e para a integridade e a elasticidade da elastina madura (74). No presente trabalho, esses achados sugerem uma progressão e piora da fibrose pulmonar nos grupos estudados.

Associou-se as lesões endoteliais causadas por BLM e BHT à denudação MB que ao expor epítomos do Col V, aumenta a sua síntese por estas células bem como pelos fibroblastos e miofibroblastos. Interessantemente, identificou-se Col V distorcido e em maior quantidade nos pulmões dos grupos crônicos de BLM e BHT. Além disso, foi encontrada uma associação direta entre Col V *vs* telomerase e Col V *vs* ET-1 em ambos os grupos no 21º dia. Tais resultados corroboram com trabalhos anteriores do

grupo onde foi descrito aumento no depósito de Col V em pulmões de pacientes com esclerose sistêmica (ES) (75, 76) e em modelo animal de ES (77). Recentemente, Wilkes e colaboradores, demonstraram que a nebulização de Col V, impediu que a BLM induzisse a fibrose pulmonar, a deposição de colágeno e a diferenciação de miofibroblastos (78).

Para melhor entender os mecanismos subjacentes a progressão e perpetuação da resposta fibrótica, comparou-se a via de sinalização gênica após a indução da fibrose pulmonar. A análise dos dados revelou um aumento da expressão de genes relacionados à sinalização profibrótica e reguladores de transcrição como também, reguladores de remodelamento da MEC. De fato, a expressão de múltiplos genes está alterada na diferenciação celular, e a maioria dos estudos focam em um menor conjunto de genes, que são responsáveis pela diferença do genótipo e fenótipo celular.

Existem grandes evidências que indicam que a expressão do gene α -SMA é regulado a nível de transcrição durante a diferenciação dos miofibroblastos (28, 79, 80). Especialmente na diferenciação de miofibroblastos, fatores adicionais e outros elementos, estão envolvidos na modulação da transcrição do gene α -SMA (79, 81), o que acarreta em maior produção de colágeno.

Nesta investigação, conforme esperado, obteve-se aumento significativo na expressão de genes como α -SMA, TGF- β , Smad3 e Sp1. O aumento da expressão do gene TGF- β 1 tem sido amplamente implicado no desenvolvimento e progressão da fibrose pulmonar, e através de uma intrincada cascata de sinalização, promove a transcrição de colágeno do tipo I e fibronectina nos fibroblastos. Referente a isso, o envolvimento das vias de sinalização de TGF- β tem sido estudado, incluindo as vias relevantes de Smads e quinases (82-85). A importância da sinalização via Smad na fibrose pulmonar foi demonstrada em estudos que utilizaram camundongos *Knockout*

para Smad3 (86, 87). O gene Smad3 está envolvido na produção de proteínas que transmitem sinais químicos da superfície celular até o núcleo. Este caminho de sinalização, chamado via de sinalização do TGF- β , permite que o ambiente exterior da célula afete a função celular, incluindo a forma como a célula produz outras proteínas. O processo de sinalização inicia-se quando uma proteína se liga ao receptor do TGF- β , o que ativa a proteína Smad3 e essa se transloca para o núcleo (86). No núcleo, liga-se a zonas específicas de DNA controlando a atividade de alguns genes e regulando a proliferação celular (88). Além do Smad3, fatores adicionais como Sp1, já foram descritos como um regulador de transcrição para este gene via ligação em alvos que estão localizados na via superior da sinalização para α -SMA (89).

Ainda com relação a via de sinalização, obteve-se aumento significativo na expressão do gene CCAAT proteína de ligação beta (C/EBP β). Cabe ressaltar o papel importante que o C/EBP β possui na sinalização de α -SMA (80). Estudos demonstraram que a deficiência desse fator acarreta na supressão da fibrose pulmonar e na diferenciação de miofibroblasto (90). Além disso, alguns autores sugerem que este fator está ativado durante estresse ao RE (91, 92), conforme esta investigação detectou em nível submicroscópico. C/EBP β é um dos fatores básicos de transcrição na região da leucina e tem duas isoformas principais, o ativador de proteína enriquecido do fígado (*liver-enriched activator protein* -LAP) e o inibidor de proteína enriquecido do fígado (*liver-enriched inhibitor protein* - LIP) (93). Ambos LAP e LIP ligam-se ao C/EBP na região promotora do gene α -SMA (94). Conforme já estabelecido, a diferenciação do miofibroblasto é caracterizada pela expressão de α -SMA, como também pelo aumento da expressão de componentes de MEC e citocinas fibrogênicas como, TGF- β (80).

Para finalizar esta discussão, conclui-se que o estudo dos mecanismos vinculados ao aumento de fibras colágenas, das células que intervém na sua produção e

da análise funcional da via de sinalização fibrogênicas, mostra-se como uma chave para o entendimento racional da patogênese das DPF. Em resumo, a perda de integridade da barreira MB epitélio/endotelial é fundamental para determinar o ponto onde não há possibilidade de retorno, o que conduz à promoção de fibrose.

Os resultados aqui apresentados tornam-se relevantes pois demonstram que, independente do insulto inicial, há uma convergência no perfil de sinalização, onde fica evidente que a lesão epitélio/endotelial está envolvida num amplo e contínuo processo de reparação com consequente final fibrótico. Um elemento chave no reparo e remodelamento tecidual ou fibrose é a resposta mesenquimal que fornece componentes essenciais de MEC necessários para a infraestrutura da cura e por outro lado para a fibrose progressiva crônica.

7. ANEXOS

Tabela 1 - Genes presentes na placa do ensaio de RT^2 -PCR array da Qiagen.

Símbolo	Descrição
Acta2	<i>Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>
Agt	<i>Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)</i>
Akt1	<i>Thymoma viral proto-oncogene 1</i>
Bcl2	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>
Bmp7	<i>Bone morphogenetic protein 7</i>
Cav1	<i>Caveolin 1, caveolae protein</i>
Ccl11	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 11</i>
Ccl12	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 12</i>
Ccl3	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i>
Ccr2	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 2</i>
Cebpb	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta</i>
Col1a2	<i>Collagen, type I, alpha 2</i>
Col3a1	<i>Collagen, type III, alpha 1</i>
Ctgf	<i>Connective tissue growth factor</i>
Cxcr4	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
Dcn	<i>Decorin</i>
Edn1	<i>Endothelin 1</i>
Egf	<i>Epidermal growth factor</i>

Eng	<i>Endoglin</i>
Fasl	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>
Grem1	<i>Gremlin 1</i>
Hgf	<i>Hepatocyte growth factor</i>
Ifng	<i>Interferon gamma</i>
Il10	<i>Interleukin 10</i>
Il13	<i>Interleukin 13</i>
Il13ra2	<i>Interleukin 13 receptor, alpha 2</i>
Il1a	<i>Interleukin 1 alpha</i>
Il1b	<i>Interleukin 1 beta</i>
Il4	<i>Interleukin 4</i>
Il5	<i>Interleukin 5</i>
Ilk	<i>Integrin linked kinase</i>
Inhbe	<i>Inhibin beta E</i>
Itga1	<i>Integrin alpha 1</i>
Itga2	<i>Integrin alpha 2</i>
Itga3	<i>Integrin alpha 3</i>
Itgav	<i>Integrin alpha V</i>
Itgb1	<i>Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</i>
Itgb3	<i>Integrin beta 3</i>
Itgb5	<i>Integrin beta 5</i>
Itgb6	<i>Integrin beta 6</i>
Itgb8	<i>Integrin beta 8</i>
Jun	<i>Jun oncogene</i>

Lox	<i>Lysyl oxidase</i>
Ltbp1	<i>Latent transforming growth factor beta binding protein 1</i>
Mmp13	<i>Matrix metalloproteinase 13</i>
Mmp14	<i>Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)</i>
Mmp1a	<i>Matrix metalloproteinase 1a (interstitial collagenase)</i>
Mmp2	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>
Mmp3	<i>Matrix metalloproteinase 3</i>
Mmp8	<i>Matrix metalloproteinase 8</i>
Mmp9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>
Myc	<i>Myelocytomatosis oncogene</i>
Nfkb1	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105</i>
Pdgfa	<i>Platelet derived growth factor, alpha</i>
Pdgfb	<i>Platelet derived growth factor, B polypeptide</i>
Plat	<i>Plasminogen activator, tissue</i>
Plau	<i>Plasminogen activator, urokinase</i>
Plg	<i>Plasminogen</i>
Serpina1a	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1a</i>
Serpine1	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1</i>
Serpinh1	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1</i>
Smad2	<i>MAD homolog 2 (Drosophila)</i>
Smad3	<i>MAD homolog 3 (Drosophila)</i>
Smad4	<i>MAD homolog 4 (Drosophila)</i>
Smad6	<i>MAD homolog 6 (Drosophila)</i>
Smad7	<i>MAD homolog 7 (Drosophila)</i>

Snai1	<i>Snail homolog 1 (Drosophila)</i>
Sp1	<i>Trans-acting transcription factor 1</i>
Stat1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
Stat6	<i>Signal transducer and activator of transcription 6</i>
Tgfb1	<i>Transforming growth factor, beta 1</i>
Tgfb2	<i>Transforming growth factor, beta 2</i>
Tgfb3	<i>Transforming growth factor, beta 3</i>
Tgfb1	<i>Transforming growth factor, beta receptor I</i>
Tgfb2	<i>Transforming growth factor, beta receptor II</i>
Tgif1	<i>TGFB-induced factor homeobox 1</i>
Thbs1	<i>Thrombospondin 1</i>
Thbs2	<i>Thrombospondin 2</i>
Timp1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>
Timp2	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i>
Timp3	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i>
Timp4	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 4</i>
Tnf	<i>Tumor necrosis factor</i>
Vegfa	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
Actb	<i>Actin, beta</i>
B2m	<i>Beta-2 microglobulin</i>
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Gusb	<i>Glucuronidase, beta</i>
Hsp90ab1	<i>Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1</i>
MGDC	<i>Mouse Genomic DNA contamination</i>

RTC	<i>Reverse Transcription Control</i>
RTC	<i>Reverse Transcription Control</i>
RTC	<i>Reverse Transcription Control</i>
PPC	<i>Positive PCR Control</i>
PPC	<i>Positive PCR Control</i>
PPC	<i>Positive PCR Control</i>

8. REFERÊNCIAS

1. Pardo A, Selman M. Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci.* 2002;7:d1743-61.
2. Churg A, Myers J, Suarez T, Gaxiola M, Estrada A, Mejia M, et al. Airway-centered interstitial fibrosis: a distinct form of aggressive diffuse lung disease. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(1):62-8.
3. Song JW, Do KH, Kim MY, Jang SJ, Colby TV, Kim DS. Pathologic and radiologic differences between idiopathic and collagen vascular disease-related usual interstitial pneumonia. *Chest.* 2009;136(1):23-30.
4. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(2 Pt 1):646-64.
5. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(6):788-824.
6. Nalysnyk L, Cid-Ruzafa J, Rotella P, Esser D. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *Eur Respir Rev.* 2012;21(126):355-61.
7. Spagnolo P, Maher TM, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: Recent advances on pharmacological therapy. *Pharmacol Ther.* 2015;152:18-27.

8. Cabrera S, Selman M, Lonzano-Bolanos A, Konishi K, Richards TJ, Kaminski N, et al. Gene expression profiles reveal molecular mechanisms involved in the progression and resolution of bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;304(9):L593-601.
9. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(5):349-63.
10. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. 2007;117(3):524-9.
11. Strieter RM, Mehrad B. New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest*. 2009;136(5):1364-70.
12. Crystal RG, Gadek JE, Ferrans VJ, Fulmer JD, Line BR, Hunninghake GW. Interstitial lung disease: current concepts of pathogenesis, staging and therapy. *Am J Med*. 1981;70(3):542-68.
13. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008;214(2):199-210.
14. Kuwano K, Hagimoto N, Nakanishi Y. The role of apoptosis in pulmonary fibrosis. *Histol Histopathol*. 2004;19(3):867-81.
15. Barbas-Filho JV, Ferreira MA, Sesso A, Kairalla RA, Carvalho CR, Capelozzi VL. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IFP)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J Clin Pathol*. 2001;54(2):132-8.
16. Camelo A, Dunmore R, Sleeman MA, Clarke DL. The epithelium in idiopathic pulmonary fibrosis: breaking the barrier. *Front Pharmacol*. 2014;4:173.

17. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003;426(6963):194-8.
18. Shi W, Xu J, Warburton D. Development, repair and fibrosis: what is common and why it matters. *Respirology*. 2009;14(5):656-65.
19. Caraci F, Gili E, Calafiore M, Failla M, La Rosa C, Crimi N, et al. TGF-beta1 targets the GSK-3beta/beta-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. *Pharmacol Res*. 2008;57(4):274-82.
20. Strieter RM. What differentiates normal lung repair and fibrosis? Inflammation, resolution of repair, and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5(3):305-10.
21. Liu T, Nozaki Y, Phan SH. Regulation of telomerase activity in rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(5):534-40.
22. Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(4):377-82.
23. Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest*. 2002;122(6 Suppl):286S-9S.
24. Selman M, Pardo A. The epithelial/fibroblastic pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(3 Suppl):S93-7.
25. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med*. 1994;1(1):71-81.
26. Gomperts BN, Strieter RM. Fibrocytes in lung disease. *J Leukoc Biol*. 2007;82(3):449-56.
27. Haque MA, Mizobuchi T, Yasufuku K, Fujisawa T, Brutkiewicz RR, Zheng Y, et al. Evidence for immune responses to a self-antigen in lung transplantation: role of

type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection. *J Immunol.* 2002;169(3):1542-9.

28. Phan SH. Genesis of the myofibroblast in lung injury and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 2012;9(3):148-52.

29. Chua F, Gauldie J, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33(1):9-13.

30. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(3):362-82.

31. Umezawa H, Ishizuka M, Maeda K, Takeuchi T. Studies on bleomycin. *Cancer.* 1967;20(5):891-5.

32. Bowden DH. Unraveling pulmonary fibrosis: the bleomycin model. *Lab Invest.* 1984;50(5):487-8.

33. Ishizuka M, Takayama H, Takeuchi T, Umezawa H. Activity and toxicity of bleomycin. *J Antibiot (Tokyo).* 1967;20(1):15-24.

34. Chen J, Ziboh V, Giri SN. Up-regulation of platelet-activating factor receptors in lung and alveolar macrophages in the bleomycin-hamster model of pulmonary fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;280(3):1219-27.

35. Hay J, Shahzeidi S, Laurent G. Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Arch Toxicol.* 1991;65(2):81-94.

36. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;234(1):137-42.

37. Berend N. Protective effect of hypoxia on bleomycin lung toxicity in the rat. *Am Rev Respir Dis.* 1984;130(2):307-8.

38. Sausville EA, Stein RW, Peisach J, Horwitz SB. Properties and products of the degradation of DNA by bleomycin and iron(II). *Biochemistry*. 1978;17(14):2746-54.
39. Burger RM, Peisach J, Blumberg WE, Horwitz SB. Iron-bleomycin interactions with oxygen and oxygen analogues. Effects on spectra and drug activity. *J Biol Chem*. 1979;254(21):10906-12.
40. Chandler DB, Hyde DM, Giri SN. Morphometric estimates of infiltrative cellular changes during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am J Pathol*. 1983;112(2):170-7.
41. Jones AW. Bleomycin lung damage: the pathology and nature of the lesion. *Br J Dis Chest*. 1978;72(4):321-6.
42. Phan SH, Thrall RS. The role of soluble factors in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 1982;106(2):156-64.
43. Catravas JD, Lazo JS, Dobuler KJ, Mills LR, Gillis CN. Pulmonary endothelial dysfunction in the presence or absence of interstitial injury induced by intratracheally injected bleomycin in rabbits. *Am Rev Respir Dis*. 1983;128(4):740-6.
44. Piguet PF, Kaufman S, Barazzzone C, Muller M, Ryffel B, Eugster HP. Resistance of TNF/LT alpha double deficient mice to bleomycin-induced fibrosis. *Int J Exp Pathol*. 1997;78(1):43-8.
45. Luna MA, Bedrossian CW, Lichtiger B, Salem PA. Interstitial pneumonitis associated with bleomycin therapy. *Am J Clin Pathol*. 1972;58(5):501-10.
46. Babich H. Butylated hydroxytoluene (BHT): a review. *Environ Res*. 1982;29(1):1-29.
47. Witschi H, Malkinson AM, Thompson JA. Metabolism and pulmonary toxicity of butylated hydroxytoluene (BHT). *Pharmacol Ther*. 1989;42(1):89-113.

48. Marino AA, Mitchell JT. Lung damage in mice following intraperitoneal injection of butylated hydroxytoluene. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1972;140(1):122-5.
49. Adamson IY, Bowden DH, Cote MG, Witschi H. Lung injury induced by butylated hydroxytoluene: cytodynamic and biochemical studies in mice. *Lab Invest*. 1977;36(1):26-32.
50. Hirai KI, Witschi H, Cote MG. Electron microscopy of butylated hydroxytoluene-induced lung damage in mice. *Exp Mol Pathol*. 1977;27(3):295-308.
51. Witschi H, Cote MG. Inhibition of butylated hydroxytoluene-induced mouse lung cell division by oxygen: time-effect and dose-effect relationships. *Chem Biol Interact*. 1977;19(3):279-89.
52. Haschek WM, Brody AR, Klein-Szanto AJ, Witschi H. Animal model of human disease. Diffuse interstitial pulmonary fibrosis. Pulmonary fibrosis in mice induced by treatment with butylated hydroxytoluene and oxygen. *Am J Pathol*. 1981;105(3):333-5.
53. Haschek WM, Witschi H. Pulmonary fibrosis--a possible mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1979;51(3):475-87.
54. Martins V, Valenca SS, Farias-Filho FA, Molinaro R, Simoes RL, Ferreira TP, et al. ATLa, an aspirin-triggered lipoxin A4 synthetic analog, prevents the inflammatory and fibrotic effects of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Immunol*. 2009;182(9):5374-81.
55. Parra ER, Boufelli G, Bertanha F, Samorano Lde P, Aguiar AC, Jr., Costa FM, et al. Temporal evolution of epithelial, vascular and interstitial lung injury in an experimental model of idiopathic pulmonary fibrosis induced by butyl-hydroxytoluene. *Int J Exp Pathol*. 2008;89(5):350-7.

56. Valenca SS, da Hora K, Castro P, Moraes VG, Carvalho L, Porto LC. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicol Pathol.* 2004;32(3):351-6.
57. Lillie RD, Fullmer, H. M. *Histopathologic technic and practical histochemistry.* 4th ed. New York 1976.
58. Fullmer HM, Sheetz JH, Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers: a review. *J Oral Pathol.* 1974;3(6):291-316.
59. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int.* 1996;20(1):15-27.
60. Woessner JF, Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1961;93:440-7.
61. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
62. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(4 Pt 1):1301-15.
63. Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, Danoff S, Su SC, Cogan JD, et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):13051-6.
64. Nozaki Y, Liu T, Hatano K, Gharaee-Kermani M, Phan SH. Induction of telomerase activity in fibroblasts from bleomycin-injured lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(4):460-5.

65. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2007;356(13):1317-26.
66. Park SH, Saleh D, Giaid A, Michel RP. Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156(2 Pt 1):600-8.
67. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, Rajkumar VS, Pantelides P, Xu SW, et al. Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol.* 1997;151(3):831-41.
68. Starcher BC, Kuhn C, Overton JE. Increased elastin and collagen content in the lungs of hamsters receiving an intratracheal injection of bleomycin. *Am Rev Respir Dis.* 1978;117(2):299-305.
69. Saldiva PH, Delmonte VC, de Carvalho CR, Kairalla RA, Auler Junior JO. Histochemical evaluation of lung collagen content in acute and chronic interstitial diseases. *Chest.* 1989;95(5):953-7.
70. Selman M, Montano M, Ramos C, Chapela R. Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 1986;41(5):355-9.
71. Yamaguchi M, Takahashi T, Togashi H, Arai H, Motomiya M. The corrected collagen content in paraquat lungs. *Chest.* 1986;90(2):251-7.
72. Fulmer JD. An introduction to the interstitial lung diseases. *Clin Chest Med.* 1982;3(3):457-73.
73. Bateman ED, Turner-Warwick M, Haslam PL, Adelmann-Grill BC. Cryptogenic fibrosing alveolitis: prediction of fibrogenic activity from immunohistochemical studies of collagen types in lung biopsy specimens. *Thorax.* 1983;38(2):93-101.

74. Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;70:1-32.
75. Parra ER, Teodoro WR, de Moraes J, Katayama ML, de Souza R, Yoshinari NH, et al. Increased mRNA expression of collagen V gene in pulmonary fibrosis of systemic sclerosis. *Eur J Clin Invest.* 2010;40(2):110-20.
76. Parra ER, Aguiar AC, Jr., Teodoro WR, de Souza R, Yoshinari NH, Capelozzi VL. Collagen V and vascular injury promote lung architectural changes in systemic sclerosis. *Clin Respir J.* 2009;3(3):135-42.
77. Teodoro WR, Velosa AP, Witzel SS, Garippo AL, Farhat C, Parra ER, et al. Architectural remodelling in lungs of rabbits induced by type V collagen immunization: a preliminary morphologic model to study diffuse connective tissue diseases. *Pathol Res Pract.* 2004;200(10):681-91.
78. Vittal R, Mickler EA, Fisher AJ, Zhang C, Rothhaar K, Gu H, et al. Type V collagen induced tolerance suppresses collagen deposition, TGF-beta and associated transcripts in pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 2013;8(10):e76451.
79. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007;170(6):1807-16.
80. Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(3):334-7.
81. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012;180(4):1340-55.
82. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003;425(6958):577-84.

83. Dugina V, Fontao L, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 18):3285-96.
84. Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Matsumoto K, Maruoka S, Horie T. Transforming growth Factor-beta1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblast through a c-Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(1):152-7.
85. White ES, Atrasz RG, Hu B, Phan SH, Stambolic V, Mak TW, et al. Negative regulation of myofibroblast differentiation by PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on chromosome 10). *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(1):112-21.
86. Bonniaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, Kolb M. TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis. *J Immunol.* 2005;175(8):5390-5.
87. Uemura M, Swenson ES, Gaca MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell.* 2005;16(9):4214-24.
88. Hu B, Wu Z, Phan SH. Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(3 Pt 1):397-404.
89. Cordova G, Rochard A, Riquelme-Guzman C, Cofre C, Scherman D, Bigey P, et al. SMAD3 and SP1/SP3 Transcription Factors Collaborate to Regulate Connective Tissue Growth Factor Gene Expression in Myoblasts in Response to Transforming Growth Factor beta. *J Cell Biochem.* 2015;116(9):1880-7.

90. Hu B, Ullenbruch MR, Jin H, Gharaee-Kermani M, Phan SH. An essential role for CCAAT/enhancer binding protein beta in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Pathol.* 2007;211(4):455-62.
91. Arensdorf AM, Rutkowski DT. Endoplasmic reticulum stress impairs IL-4/IL-13 signaling through C/EBPbeta-mediated transcriptional suppression. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 17):4026-36.
92. Li Y, Bevilacqua E, Chiribau CB, Majumder M, Wang C, Croniger CM, et al. Differential control of the CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) products liver-enriched transcriptional activating protein (LAP) and liver-enriched transcriptional inhibitory protein (LIP) and the regulation of gene expression during the response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2008;283(33):22443-56.
93. Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.* 2002;365(Pt 3):561-75.
94. Buck M, Chojkier M. C/EBPbeta-Thr217 phosphorylation signaling contributes to the development of lung injury and fibrosis in mice. *PLoS One.* 2011;6(10):e25497.

Apêndice

FIZZ1 induced myofibroblast transdifferentiation from adipocytes and its potential role in dermal fibrosis and lipoatrophy

Vanessa Martins¹, Francina Gonzalez De Los Santos², Zhe Wu², Vera Capelozzi¹, Sem H. Phan^{2*}, and
Tianju Liu^{2*}

¹Faculty of Medicine University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil; ²University of Michigan School of
Medicine, Ann Arbor, MI 48109, USA

Running title: FIZZ1 in adipocyte-myofibroblast transdifferentiation

Number of text pages: 21

Number of figures: 5

Funding: This study is supported by NIH grants HL052285, HL091775 and HL112880

Address correspondence to:

Tianju Liu, M.D., Ph.D., or Sem H. Phan, M.D., Ph.D.

Department of Pathology

University of Michigan Medical School

109 Zina Pitcher Pl.

Ann Arbor, MI 48109-2200, USA

Phone: (734) 763-5731

Fax: (734) 615-2331

Email: tianliu@umich.edu (Tianju Liu), or shphan@umich.edu (Sem H. Phan)

Abstract

Subcutaneous lipoatrophy characteristically accompanies dermal fibrosis with de novo emergence of myofibroblasts such as in systemic sclerosis (SSc)/scleroderma. Recently dermal adipocytes were shown to have the capacity to differentiate to myofibroblasts in an animal model. TGF β can induce this phenomenon in vitro, however its in vivo significance is unclear. Since FIZZ1 (Found in Inflammatory Zone 1) is an inducer of myofibroblast differentiation but an inhibitor of adipocyte differentiation, this study investigated its potential role in adipocyte trans-differentiation to myofibroblast in dermal fibrosis. The results showed that FIZZ1 caused significant and rapid suppression of fatty acid binding protein 4 (FABP4) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) expression in adipocytes, consistent with dedifferentiation with loss of lipid and Oil red O staining. This was accompanied subsequently with stimulation of α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen expression indicative of myofibroblast differentiation. In vivo FIZZ1 expression was significantly elevated in the murine bleomycin (BLM) induced dermal fibrosis model, which was associated with significant reduction in adipocyte marker gene expression and subcutaneous lipoatrophy. Finally, FIZZ1 knockout mice exhibited significantly reduced BLM-induced dermal fibrosis with greater preservation of the subcutaneous fat compared to wild type mice. These findings suggested that the FIZZ1 induction of adipocyte transdifferentiation to myofibroblast might be a key pathogenic mechanism for the accumulation of myofibroblasts in dermal fibrosis.

Introduction

Developmentally the precise origin of dermal adipocytes is uncertain although they are known to be derived from mesenchymal precursors expressing PDGFR- α .¹ In adult skin adipocyte precursors expressing CD29, CD34 and Sca-1 have been reported¹. In addition to its association with hair follicle cycling,² adipogenesis or adipocyte differentiation is activated in dermal wound healing, wherein it plays a role in fibroblast recruitment and extracellular matrix deposition.³ Moreover suppression of adipogenesis results in marked reduction in myofibroblast numbers in the wound bed, suggesting that adipocytes may also be important in chronic fibrotic disorders wherein myofibroblasts are known to play a key role.⁴ However other studies suggest that inhibition of adipocyte differentiation by profibrotic factors such as TGF β 1 is associated with dermal fibrosis in an animal model.⁵ The mechanism may be mediated by TGF β 1 suppression of PPAR- γ expression a key indicator of adipocyte differentiation.⁶ Another profibrotic factor and inhibitor of adipocyte differentiation is Found in Inflammatory Zone 1 (FIZZ1), also known as resistin-like molecule alpha (RELM α), a member of the newly described cysteine-rich secreted family of FIZZ/RELM.⁷⁻⁹ The FIZZ family has a unique tissue expression pattern. FIZZ1, initially found in lung allergic inflammation, is expressed predominantly in white adipose tissue with low levels of expression noted in lung, heart, and mammary glands. FIZZ2 is specifically expressed by goblet cells and epithelial cells mainly in gastrointestinal tract, and recently found in airway epithelium as well, but not in white adipose tissue where FIZZ3/resistin is exclusively expressed.⁸ FIZZ1 is dramatically induced in rodent BLM-induced pulmonary fibrosis and chronic hypoxia model of pulmonary hypertension.^{9,10} FIZZ1 increases α -SMA expression through Jagged1/Notch1 signaling and thus promote lung myofibroblast differentiation.¹¹ In humans, FIZZ2/RELM- β are induced in lung tissues of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), scleroderma-associated pulmonary hypertension, as well as in serum of patients with SSc, respectively.¹²⁻¹⁴ Interestingly, FIZZ1 is reported to inhibit adipocyte differentiation from preadipocytes *in vitro*. This inhibitory effect is reflected by a decrease in the mRNA levels of several adipocyte markers, including PPAR- γ , C/EBP- α , and adipocyte

fatty acid binding protein (FABP4).¹⁵ Thus while inhibition of adipocyte differentiation in wound healing results in diminished myofibroblast differentiation, paradoxically profibrotic factors that promote myofibroblast differentiation also inhibit adipocyte differentiation.

This paradox is reflected in dermal fibrosis associated with systemic sclerosis (SSc), wherein lipoatrophy accompanies the fibrosis. SSc is a chronic systemic disease characterized by autoimmunity, vascular lesions and progressive fibrosis of the lungs and skin.^{16, 17} The fibrotic component is dominant in SSc, and is characterized by accumulation of collagens,¹⁶ which results in a loss of tissue function.¹⁸ There are currently no effective treatment, and five-year mortality approaches ~30%.¹⁹ The specific physiological and biochemical properties of the skin, the primary tissue affected by SSc, are based on increase of α -SMA expression, myofibroblast differentiation and deposition of collagen.²⁰ In the bleomycin (BLM)-induced animal model of SSc, myofibroblasts are observed in the dermis, and gradually increases in parallel with the induction of dermal fibrosis and lipoatrophy.²¹

A potential resolution of this paradox is the hypothesis that adipocytes and/or adipocyte precursors can transdifferentiate to myofibroblasts under the influence of the profibrotic factor FIZZ1, an inhibitor of adipocyte differentiation¹⁵ but stimulator of myofibroblast differentiation⁹ and known to be essential for BLM-induced pulmonary fibrosis.²² To test this hypothesis the ability of FIZZ1 to suppress adipogenesis and induce myofibroblast differentiation was examined in a pre-adipocyte cell line. The results showed FIZZ1 treatment caused significant repression of adipocyte fatty acid binding protein (FABP4) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ expression in fully differentiated adipocytes that induced from 3T3-L1 cells, which was accompanied subsequently with elevated levels of α -SMA and type I collagen expression indicative of myofibroblast differentiation. The in vivo significance of this finding was affirmed by demonstration of reduced fibrosis and lipoatrophy in FIZZ1 knockout mice. Thus FIZZ1 may

be important in pathogenesis of dermal fibrosis by induction of adipocyte trans-differentiation to myofibroblasts

Materials and Methods

Cell Culture and adipocyte differentiation

The murine preadipocyte cell line 3T3-L1 from American Tissue Culture Collection (ATCC) was grown in DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY) containing 10% fetal bovine serum (Sigma, St Louis, MO) and antibiotics (standard medium, SM). To induce adipocyte differentiation, 3T3-L1 pre-adipocytes were grown to confluence in standard medium. Two days after the cells were confluent (day0), the cells were induced to differentiate to adipocytes by supplementation with 15 µg/ml insulin, 1 µM dexamethasone, 0.5 mM IBMX (Sigma) known as differentiation medium (DM). After 48 hours (day 2) the DM was replaced with SM containing 15 µg/ml insulin only (post-DM). The medium was changed every other day for an additional 5 days (day 7), when >90% of cells differentiated to mature adipocytes. In some experiments the mature adipocytes at day 7 were treated with FIZZ1 at the indicated doses and times. Untreated cells were kept in the same culture condition except in the absence of FIZZ1. Cell RNA and protein lysates were collected for qRT-PCR and western blotting analyses, respectively, after confirmation of differentiation by Oil Red O (Sigma) staining as previously described.²³

Animals and induction of dermal fibrosis

C57BL/6 mice (8~10 weeks old) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). FIZZ1 KO mouse on C57BL/6 background was generated as previously described,²² and propagated at the University of Michigan. To induce dermal fibrosis, BLM (Blenoxane, Mead Johnson, NJ) was dissolved in sterile PBS, and subcutaneously injected (5 mg/kg) daily into the shaved upper backs of mice using a 27-gauge needle, while control mice received the same volume of PBS. At 21 days after BLM injection, the animals were sacrificed and the injected skin samples were removed for mRNA and

hydroxyproline analyses. Where indicated, the skin tissues were fixed with 10% buffered formalin for H & E, Masson trichrome staining or immunohistochemistry.

mRNA analysis by quantitative RT-PCR

For quantitative mRNA analysis, total RNA was isolated from cells or skin tissue samples. 6-FAM conjugated primers/probes were then purchased from Life Technologies. For each assay, 100 ng of total RNA was used as template. GAPDH mRNA was used as internal control to normalize the amount of input RNA. One-step real time was undertaken with TaqMan One Step RT-PCR Master Mix (Life Technologies) using a GeneAmp 7500 Sequence Detection System (Life Technologies). Results were expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Cell transfection with Notch1 siRNAs

Fully differentiated adipocytes from 3T3-L1 cells were transfected with 100 nmol/L of Notch1 or control siRNA by electroporation using Nucleofector II (Amaxa Biosystem, Gaithersburg, MD). After 20 hours, recombinant mouse FIZZ1 was added and incubation continued for another 48 hours. Notch1 siRNA (5'-UGGCUUGCAGUAGCAAGGAAGCUAA-3') and control siRNA (5'-UGGACGUGAUGGAACGAAGCUCUAA-3') were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA).

Western blotting and immunohistochemistry analyses

Western blotting: Cell lysate was prepared with RIPA buffer (Thermo, Rockford, IL). Equal amount of protein was loaded onto SDS-PAGE gels for separation and transferred to nitrocellulose membrane for immunoblotting. The following antibodies were used: anti- α smooth muscle actin (Sigma), anti-collagen type I (Bioscience International, Saco, ME), anti-PPAR- γ (Cell signaling Technology, Inc., Danvers, MA), anti-FABP4 (Cayman, Ann Arbor, MI), anti-FIZZ1 (R & D), anti-Notch1 (Cell signaling Technology, Inc.), and HRP-conjugated anti-GAPDH (Sigma). For immunohistochemistry, the paraffin-embedded skin tissue sections were deparaffinized/rehydrated followed by antigen retrieval in 10 mM sodium citrate (pH 6.0) in the microwave for 20 minutes. Rat anti-FIZZ1/RELM α antibody (R & D), Cy3-anti- α smooth muscle actin (Sigma), anti-FABP4 (Cayman) were used as primary antibodies. 557-conjugated goat anti-

rat IgG (R & D Systems, Minneapolis, MN), Alexa fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG were used as secondary antibodies for FIZZ1 and FABP4, respectively. Mounting medium containing DAPI (Vector, Burlingame, CA) was applied and the tissue sections were examined using a Nikon Eclipse E600 fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

Hydroxyproline assay

Skin tissue samples were homogenized for hydroxyproline assays as previously described.²⁴

Results

FIZZ1 inhibited adipocyte differentiation in 3T3-L1 cell

As a secreted protein, FIZZ1 is expressed in white adipose tissue. To evaluate the effects of FIZZ1 on the fate of cultured adipocytes, we cultured 3T3-L1 preadipocytes in DM to induce adipocyte differentiation. FIZZ1 was added at day 6 after differentiation induction when the cells were fully differentiated with ~90% of cells positively stained by Oil Red O (Figure 1 middle panels) in contrast to the mostly Oil Red O negative cells in undifferentiated preadipocytes (Figure 1 left panels). In cells further treated with FIZZ1, the number of lipid droplet containing adipocytes induced by differentiation media (DM) was reduced by FIZZ1 treatment (Figure 1 right panels). These morphological alterations suggested that FIZZ1 might have a potential role in adipocyte de-differentiation. Interestingly, FIZZ1 expression was markedly induced when 3T3-L1 cells were fully differentiated into adipocytes, which was almost undetectable in undifferentiated cells at both mRNA (Figure 1B) and protein levels (Figure 1C), suggesting the differentiated adipocyte as a possible cellular source of FIZZ1 in vivo. FIZZ1 was expressed in virtually all FABP4 positive adipocytes in culture as shown by double immunofluorescence (Figure 1D).

To confirm the FIZZ1 dedifferentiation effect, FIZZ1-treated fully differentiated adipocytes were analyzed for adipocyte specific gene expression. Three days after FIZZ1 treatment, PPAR- γ , FABP4 and C/EBP- α were significantly suppressed at both mRNA (Figure 2A) and protein (Figure 2B) levels. Such

suppression remained up to seven days after FIZZ1 treatment (see below, Figure 3C). This FIZZ1 suppression of adipogenesis was accompanied subsequently with increased levels of type I and α -SMA mRNA, two key parameters for myofibroblast differentiation (Figure 3A). Western blotting analysis confirmed FIZZ1 induced increase in α -SMA at the protein level in a dose-dependent manner. Significant induction by TGF β was observed as expected (Figure 3B). Kinetic analysis of α -SMA, FABP4 and PPAR- γ expression as a function of FIZZ1 treatment duration indicated prompt reduction in FABP4 and PPAR- γ expression, which was essentially maximal (>50% inhibition by FIZZ1) by day 1 (Figure 3C). However FIZZ1-induced upregulation of α -SMA expression was delayed with maximal effect achieved only on day 7. Double immunofluorescence staining for FABP4 and α -SMA was also performed to confirm such differentiation. Only a few weak α -SMA signals were observed in untreated cells whereas significant increase in α -SMA staining including those within cytoskeletal fibers were induced after 7 days of FIZZ1 treatment (Supplemental Figure 1). In contrast, FIZZ1 failed to significantly alter the mRNA levels of myofibroblast markers α -SMA and procollagen I in 3T3-L1 preadipocytes (Supplemental Figure 2) Thus FIZZ1 caused rapid adipocyte dedifferentiation, which preceded myofibroblast differentiation, suggesting a sequential process of transdifferentiation.

FIZZ1 expression and role in dermal fibrosis of BLM-induced mouse model of SSC

To evaluate the possible *in vivo* role of FIZZ1 in inducing trans-differentiation of adipocyte to myofibroblast thus contributing to lipotrophy and emergence of α -SMA expressing myofibroblasts, we used the murine BLM-induced model of dermal fibrosis. C57Bl/6 mice were injected intradermally and daily with BLM at the upper back. Twenty-one days later, skin tissue samples were collected for gene expression analysis by qPCR. The data showed that while skin type I procollagen and α -SMA gene expression was increased as expected (Figure 4A), FIZZ1 expression was also significantly induced. The FIZZ1 expression was induced by >10 fold 10 days after BLM injection, and remained > 6-fold elevated

at day 21 (Figure 4B). Thus induced FIZZ1 expression was associated with dermal fibrosis. A potential cellular source for its expression in skin was evaluated using the adipocyte marker FABP4 since FIZZ1 is expressed in fully differentiated adipocytes in cell culture studies and predominately in adipose tissue. Dual immunofluorescence for FIZZ1 and FABP4 revealed that in normal skin tissue FIZZ1 expression was detectable, mainly localized to the intradermal adipose tissue layer, and co-localized with FABP4 signals (Figure 4C, upper panels). Scattered signals were also observed in the reticular dermis, as well as in hair follicle epithelial cells (not shown). The FIZZ1 signals were readily apparent and more abundant in the fibrotic skin tissue 21 days after BLM injection (Figure 4C lower panels). The FIZZ1 staining was mainly localized in FABP4 negative cells, indicating predominant expression in non-adipocytes unlike in normal skin wherein co-localization of FIZZ1 and FABP4 staining was extensively encountered. These manifestations of increased FIZZ1 expression and dermal fibrosis were accompanied by significant reduction in adipocyte specific marker gene (PPAR- γ and FABP4) mRNA levels (Figure 4D), consistent with the dermal lipotrophy noted in tissue sections (see below). Of note, the number of α -SMA-expressing skin cells was increased, some of which were found to be positive for adipocyte marker FABP4 by double immunohistochemistry staining in dermal fibrosis after BLM injection (Supplemental Figure 3), but such co-localization was not seen in PBS-treated control skin (data not shown).

To further evaluate the *in vivo* role of FIZZ1 in this BLM model of SSc, the effects of FIZZ1 deficiency on dermal fibrosis and subcutaneous lipotrophy were analyzed using FIZZ1 KO mice. While dermal fibrosis in wild type (WT) mice was confirmed by increased hydroxyproline content 21 days after BLM injection, it was significantly reduced in FIZZ1 KO mice (Figure 4E). The reduced dermal fibrosis in FIZZ1 deficient mice was also reflected in the skin tissue histopathology. Compared to the substantially thickened fibrotic dermis with lipotrophy (loss of subcutaneous fat layer) in BLM-treated WT mice, FIZZ1 KO mice exhibited reduced dermal fibrosis, thickness and less dense extracellular matrix deposition with greater preservation of subcutaneous fat (Figure 4F). Reduced collagen content in FIZZ1 KO skin was confirmed by Masson's trichrome staining. The reduction of fibrosis in FIZZ1 KO

mice was accompanied by the reduced protein levels of α -SMA, an indicator of decreased myofibroblast differentiation, and FIZZ1 thus confirming FIZZ1 deficiency (Figure 4G). Collectively, these results indicated that the activation of FIZZ1 signaling plays vital roles in the dermal fibrotic processes caused by BLM.

Notch1 potentially mediates FIZZ1 effects on adipocyte transdifferentiation

To seek the signaling pathway that possibly mediated the FIZZ1 effect on adipocyte transdifferentiation, the role of Notch1 was examined since Notch1 signaling activation is reported as a potential mechanism by which FIZZ1 induces lung myofibroblast differentiation.¹¹ First, FIZZ1 was able to induce Notch1 mRNA expression in differentiated adipocytes in vitro (Figure 5A), which was associated with increased myofibroblast differentiation and inhibited adipocyte differentiation (Figure 2 and 3). Then the effect of Notch1 knockdown in these adipocytes was analyzed to see if Notch1 essential for FIZZ1 induction of myofibroblast transdifferentiation from adipocytes. The results showed that FIZZ1 stimulated α -SMA, and inhibited FABP4 expression as expected in cells treated with control siRNA, but both these effects were markedly blocked when Notch1 was essentially knocked down upon Notch1 siRNA transfection (Figure 5B). Of note, the BLM induced Notch1 expression observed in dermal fibrosis was reduced in FIZZ1 KO mice (Figure 5C), indicating the potential association with adipocyte transdifferentiation in vivo.

Discussion

Intradermal adipose tissue is now considered to play significant roles in diverse homeostatic as well as disease processes based on its ability to elaborate multiple paracrine factors and to serve as a precursor pool for mesenchymal cells.^{25, 26} Constituent adipocyte differentiation from known preadipocyte precursors involves an intricate transcriptional program involving C/EBPs and PPAR- γ , which occurs in wound healing and certain stages of hair follicle

cycling.^{2,3} Moreover this adipocyte differentiation is required for optimal wound healing with requisite myofibroblast differentiation and matrix deposition, which is significantly impaired in transgenic mice devoid of white adipose tissue.^{3,26,27} On the other hand, loss of adipocytes is characteristic of dermal fibrosis such as in SSc and the BLM model.²⁸ To resolve this apparent paradox, we evaluated the role of FIZZ1, an inhibitor of adipocyte differentiation but an inducer of myofibroblast differentiation, in adipocyte to myofibroblast transdifferentiation. Such a possibility would explain how loss of adipocytes and emergence of myofibroblasts are directly linked to account for the simultaneous importance of the adipocytes and myofibroblasts in dermal fibrosis.

Adipocyte dedifferentiation and myofibroblast differentiation

The present study revealed that FIZZ1 significantly suppressed adipocyte differentiation in differentiated 3T3-L1 cells as shown by decreased adipocyte specific gene expression, including PPAR- γ , FABP4 and C/EBP α consistent with a previous study showing that FIZZ1 had an inhibitory effect on the conversion of preadipocyte into adipocyte when subjected to a differentiation program.¹⁵ Our current findings indicated that the expression levels of myofibroblast differentiation markers α -SMA and type I collagen were elevated while the adipocyte markers were suppressed by FIZZ1 treatment, whereas preadipocytes were not affected by FIZZ1 treatment. Kinetic analysis indicated rapid suppression of adipocyte marker gene expression by FIZZ1, which preceded the increase in myofibroblast marker gene expression by 1-2 days. Thus FIZZ1 caused prompt dedifferentiation of adipocytes that is essentially maximal by day 1, followed by gradual increase in myofibroblast differentiation that became maximal only on day 7. Therefore, FIZZ1 could cause dedifferentiation of adipocytes followed by differentiation into myofibroblasts in vitro, consistent with a role in adipocyte trans-differentiation to the myofibroblast, a key cell in pathogenesis of chronic fibrosis.^{4,29} However since FIZZ1 caused incomplete (<60%) inhibition of adipocyte gene marker expression, direct adipocyte to myofibroblast transdifferentiation without going through a dedifferentiated state cannot be ruled out.

Role of FIZZ1 in dermal fibrosis and lipoatrophy

To evaluate the potential *in vivo* significance of this FIZZ1 *in vitro* on adipocyte to myofibroblast transdifferentiation, we studied the effects of FIZZ1 deficiency on BLM-induced dermal fibrosis that models the myofibroblast accumulation, fibrosis and lipoatrophy characteristic of SSc skin lesions. Our results showed that BLM-induced dermal fibrosis and lipoatrophy in WT mice was accompanied with induction of FIZZ1 expression. Moreover in FIZZ1 KO mice the fibrosis, myofibroblast differentiation and lipoatrophy were all significantly reduced relative to that seen in WT mice. The subcutaneous fat preservation was evident in tissue sections from BLM-injected skin of FIZZ1 KO mice especially when compared to the striking lipoatrophy in similarly treated skin tissue samples from WT mice as confirmed also by reduction in adipocyte marker gene expression. FIZZ1 is dramatically induced in rodent BLM-induced pulmonary fibrosis and its deficiency also impaired fibrosis and myofibroblast differentiation in this model.^{9, 22} In the lung primary sources of induced FIZZ1 expression appear to be macrophages, epithelial and endothelial cells.^{9, 30, 31} In the case of the BLM skin model, major sources appeared to be adipocytes, macrophages and hair follicle epithelial cells. In humans, FIZZ2 is highly induced in the lungs of patient with IPF¹² and scleroderma-associated pulmonary hypertension,¹³ as well as in the serum of patients with SSc.¹⁴ The findings using the BLM-induced dermal fibrosis model revealed loss of adipogenic gene expression that was accompanied with increased myofibroblast differentiation and collagen deposition consistent with the *in vitro* effects of FIZZ1 on adipocytes. Notch1 expression was also noted to be up-regulated simultaneously with elevation of FIZZ1 gene expression in WT, but essentially abolished in FIZZ1 KO skin. Jagged/Notch signaling plays a critical role in cell fate control during development and in mature cells by regulating the implementation of differentiation, proliferation, and apoptotic programs of a wide range of cells. FIZZ1 activated Jagged/Notch signaling mediates induction of myofibroblast differentiation by increasing CSL-dependent transcription of α -SMA.³² While the role of Notch signaling in adipogenesis is somewhat

controversial,³³⁻³⁵ there is mounting evidence that Notch signaling inhibits adipocyte differentiation via Hes-1, which functions as a transcriptional repressor in preadipocytes.^{34, 35} The current study suggested that FIZZ1 induction of adipocyte transdifferentiation to myofibroblast was dependent on Notch signaling. The increase of Notch in BLM-induced dermal fibrosis was dependent on FIZZ1, and possibly mediated FIZZ1-induced dermal myofibroblast differentiation as well as adipocyte de-differentiation. Its precise role, however, will need to be fully elucidated in future studies.

Adipocyte transdifferentiation to myofibroblast as a link between lipoatrophy and fibrosis

SSc causes abnormal collagen deposition with cellular infiltration in the affected skin, resulting in the thickened dermis, which is associated with subcutaneous fat atrophy.^{17, 36} Myofibroblasts are observed in the extensive thickened dermis, and gradually increase in parallel with the induction of dermal sclerosis. The origin of ECM-producing myofibroblasts is controversial.^{21, 37, 38} They may arise from the in situ activation of quiescent resident fibroblasts in response to extracellular stimuli. Alternatively, myofibroblasts may also arise from other cell types, including endothelial cells and pericytes.^{39, 40} Both myofibroblasts and pericytes are associated with vascular remodeling and injury. Pericytes may provide the pathogenetic link between vascular injury and fibrosis of scleroderma.³⁹ In spite of their different origins, myofibroblasts are all characterized by specific properties such as high contractility, *de novo* expression of α -SMA and production of ECM.³⁹ During dermal fibrosis the intradermal adipose layer shows striking atrophy, and is virtually replaced by densely packed connective tissue.^{17, 36} The deficient expression and/or function of adipogenesis marker PPAR- γ and the adipokine adiponectin are noted in SSc patients and BLM-induced dermal fibrosis. These observations suggest that the expansion of dermal fibrous tissue may be closely linked with intradermal adipose atrophy.

The basis for the loss of adipose tissue subjacent to dermal fibrosis is unclear. One potential mechanism might be attributed to the loss of PPAR- γ and related adipogenic factors with consequent failure of adipogenic differentiation. Down-regulation of PPAR- γ expression will cause lipoatrophy and de-repression of collagen I and α -SMA expression leading to myofibroblast differentiation.⁴¹⁻⁴⁴ Indeed,

TGF- β abrogates PPAR- γ ligand-driven adipogenic differentiation of fibroblasts, and induces adipocyte de-differentiation. In contrast, PPAR- γ ligand rosiglitazone administration into mice causes significant expansion of the intradermal adipose layer with accumulation of intracellular lipids. When delivered together with BLM, it partially preserves this adipose layer and attenuates BLM-induced dermal fibrosis.^{6, 43} This is further supported by the development of subcutaneous lipoatrophy and concomitant accumulation of fibrous connective tissue at the same location in the mice with adipocyte-specific deletion of PPAR- γ .^{41, 42} A very recent cell fate-mapping study using transgenic mice with adiponectin promoter driven Cre recombinase to specifically label mature adipocytes also revealed such a novel link between intradermal adipose loss and dermal fibrosis by showing that adiponectin-positive intradermal precursors give rise to dermal myofibroblasts.²⁹ In this study we report a potential role for FIZZ1 in regulating this process in SSc by targeting the dermal adipocyte and/or its progenitor cell, a suggestion that is supported by in vivo observations of upregulation of FIZZ2 expression in SSc.¹⁴

Acknowledgments

We thank Lisa Riggs for the excellent technical assistance in the skin tissue section preparation and the H & E and Masson Trichrome staining.

References

1. Berry R, Rodeheffer MS: Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo, *Nat Cell Biol* 2013, 15:302-308
2. Festa E, Fretz J, Berry R, Schmidt B, Rodeheffer M, Horowitz M, Horsley V: Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling, *Cell* 2011, 146:761-771
3. Schmidt BA, Horsley V: Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing, *Development* 2013, 140:1517-1527
4. Hu B, Phan SH: Myofibroblasts, *Curr Opin Rheumatol* 2013, 25:71-77
5. Ohgo S, Hasegawa S, Hasebe Y, Mizutani H, Nakata S, Akamatsu H: Bleomycin inhibits adipogenesis and accelerates fibrosis in the subcutaneous adipose layer through TGF-beta1, *Exp Dermatol* 2013, 22:769-771
6. Wei J, Ghosh AK, Sargent JL, Komura K, Wu M, Huang QQ, Jain M, Whitfield ML, Feghali-Bostwick C, Varga J: PPARgamma downregulation by TGFss in fibroblast and impaired expression and function in systemic sclerosis: a novel mechanism for progressive fibrogenesis, *PLoS One* 2010, 5:e13778
7. Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD, Lazar MA: A family of tissue-specific resistin-like molecules, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:502-506
8. Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ, Frantz GD, Tumas DB, Peale FV, Jr., Shelton DL, Hebert CC: FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family, *EMBO J* 2000, 19:4046-4055
9. Liu T, Dhanasekaran SM, Jin H, Hu B, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Phan SH: FIZZ1 stimulation of myofibroblast differentiation, *Am J Pathol* 2004, 164:1315-1326

10. Yamaji-Kegan K, Su Q, Angelini DJ, Champion HC, Johns RA: Hypoxia-induced mitogenic factor has proangiogenic and proinflammatory effects in the lung via VEGF and VEGF receptor-2, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006, 291:L1159-1168
11. Liu T, Hu B, Choi YY, Chung M, Ullenbruch M, Yu H, Lowe JB, Phan SH: Notch1 signaling in FIZZ1 induction of myofibroblast differentiation, *Am J Pathol* 2009, 174:1745-1755
12. Liu T, Baek HA, Yu H, Lee HJ, Park BH, Ullenbruch M, Liu J, Nakashima T, Choi YY, Wu GD, Chung MJ, Phan SH: FIZZ2/RELM-beta induction and role in pulmonary fibrosis, *J Immunol* 2011, 187:450-461
13. Angelini DJ, Su Q, Yamaji-Kegan K, Fan C, Teng X, Hassoun PM, Yang SC, Champion HC, Tuder RM, Johns RA: Resistin-like molecule-beta in scleroderma-associated pulmonary hypertension, *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009, 41:553-561
14. Milano A, Pendergrass SA, Sargent JL, George LK, McCalmont TH, Connolly MK, Whitfield ML: Molecular subsets in the gene expression signatures of scleroderma skin, *PLoS One* 2008, 3:e2696
15. Blagoev B, Kratchmarova I, Nielsen MM, Fernandez MM, Voldby J, Andersen JS, Kristiansen K, Pandey A, Mann M: Inhibition of adipocyte differentiation by resistin-like molecule alpha. Biochemical characterization of its oligomeric nature, *J Biol Chem* 2002, 277:42011-42016
16. Derk CT, Jimenez SA: Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis, *Autoimmun Rev* 2003, 2:181-191
17. Varga J, Abraham D: Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder, *J Clin Invest* 2007, 117:557-567
18. Quinones F, Crouch E: Biosynthesis of interstitial and basement membrane collagens in pulmonary fibrosis, *Am Rev Respir Dis* 1986, 134:1163-1171
19. Bryan C, Knight C, Black CM, Silman AJ: Prediction of five-year survival following presentation with scleroderma: development of a simple model using three disease factors at first visit, *Arthritis Rheum* 1999, 42:2660-2665

20. Castelino FV, Varga J: Emerging cellular and molecular targets in fibrosis: implications for scleroderma pathogenesis and targeted therapy, *Curr Opin Rheumatol* 2014, 26:607-614
21. Krieg T, Abraham D, Lafyatis R: Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions, *Arthritis Res Ther* 2007, 9 Suppl 2:S4
22. Liu T, Yu H, Ullenbruch M, Jin H, Ito T, Wu Z, Liu J, Phan SH: The in vivo fibrotic role of FIZZ1 in pulmonary fibrosis, *PLoS One* 2014, 9:e88362
23. Norisada N, Masuzaki H, Fujimoto M, Inoue G, Hosoda K, Hayashi T, Watanabe M, Muraoka S, Yoneda F, Nakao K: Antidiabetic and adipogenic properties in a newly synthesized thiazolidine derivative, FPFS-410, *Metabolism* 2004, 53:1532-1537
24. Koca SS, Isik A, Ozercan IH, Ustundag B, Evren B, Metin K: Effectiveness of etanercept in bleomycin-induced experimental scleroderma, *Rheumatology (Oxford)* 2008, 47:172-175
25. Berry R, Jeffery E, Rodeheffer MS: Weighing in on adipocyte precursors, *Cell Metab* 2014, 19:8-20
26. Rivera-Gonzalez G, Shook B, Horsley V: Adipocytes in skin health and disease, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014, 4:
27. Schmidt B, Horsley V: Unravelling hair follicle-adipocyte communication, *Exp Dermatol* 2012, 21:827-830
28. Lakos G, Takagawa S, Chen SJ, Ferreira AM, Han G, Masuda K, Wang XJ, DiPietro LA, Varga J: Targeted disruption of TGF-beta/Smad3 signaling modulates skin fibrosis in a mouse model of scleroderma, *Am J Pathol* 2004, 165:203-217
29. Marangoni RG, Korman BD, Wei J, Wood TA, Graham LV, Whitfield ML, Scherer PE, Tourtellotte WG, Varga J: Myofibroblasts in murine cutaneous fibrosis originate from adiponectin-positive intradermal progenitors, *Arthritis Rheumatol* 2015, 67:1062-1073
30. St-Laurent J, Turmel V, Boulet LP, Bissonnette E: Alveolar macrophage subpopulations in bronchoalveolar lavage and induced sputum of asthmatic and control subjects, *J Asthma* 2009, 46:1-8

31. Teng X, Li D, Johns RA: Hypoxia up-regulates mouse vascular endothelial growth factor D promoter activity in rat pulmonary microvascular smooth-muscle cells, *Chest* 2002, 121:82S-83S
32. Doi H, Iso T, Sato H, Yamazaki M, Matsui H, Tanaka T, Manabe I, Arai M, Nagai R, Kurabayashi M: Jagged1-selective notch signaling induces smooth muscle differentiation via a RBP-Jkappa-dependent pathway, *J Biol Chem* 2006, 281:28555-28564
33. Nichols AM, Pan Y, Herreman A, Hadland BK, De Strooper B, Kopan R, Huppert SS: Notch pathway is dispensable for adipocyte specification, *Genesis* 2004, 40:40-44
34. Ross DA, Rao PK, Kadesch T: Dual roles for the Notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *Mol Cell Biol* 2004, 24:3505-3513
35. Ross DA, Hannenhalli S, Tobias JW, Cooch N, Shiekhatter R, Kadesch T: Functional analysis of Hes-1 in preadipocytes, *Mol Endocrinol* 2006, 20:698-705
36. Yamamoto T, Nishioka K: Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective, *Exp Dermatol* 2005, 14:81-95
37. Postlethwaite AE, Shigemitsu H, Kanangat S: Cellular origins of fibroblasts: possible implications for organ fibrosis in systemic sclerosis, *Curr Opin Rheumatol* 2004, 16:733-738
38. Varga J, Pasche B: Transforming growth factor beta as a therapeutic target in systemic sclerosis, *Nat Rev Rheumatol* 2009, 5:200-206
39. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G: Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling, *Am J Pathol* 2012, 180:1340-1355
40. Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ: Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis, *Arthritis Res Ther* 2005, 7:R1113-1123
41. Duan SZ, Ivashchenko CY, Whitesall SE, D'Alecy LG, Duquaine DC, Brosius FC, 3rd, Gonzalez FJ, Vinson C, Pierre MA, Milstone DS, Mortensen RM: Hypotension, lipodystrophy, and insulin

resistance in generalized PPARgamma-deficient mice rescued from embryonic lethality, *J Clin Invest* 2007, 117:812-822

42. He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM: Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:15712-15717

43. Wu M, Melichian DS, Chang E, Warner-Blankenship M, Ghosh AK, Varga J: Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, *Am J Pathol* 2009, 174:519-533

44. Bing C, Russell S, Becket E, Pope M, Tisdale MJ, Trayhurn P, Jenkins JR: Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice, *Br J Cancer* 2006, 95:1028-1037

Figure legends

Figure 1. FIZZ1 induction and induced adipocyte dedifferentiation. (A) 3T3-L1 preadipocytes were grown to confluence in standard medium (**left**), and then induced for adipocyte differentiation for 6 days without (**middle**) or with subsequent FIZZ1 treatment (**right**) for an additional 6 days. Oil Red O staining for intracellular lipids with hematoxyline (Thermo Scientific, Runcom, Cheshire, UK) for nuclei counterstaining are shown (magnification, top panel: $\times 100$; bottom panel: $\times 400$). FIZZ1 expression was analyzed in preadipocyte 3T3-L1 and fully differentiated adipocytes for mRNA levels by qRT-PCR, and the results were expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$ with GAPDH as the reference and the corresponding untreated control as calibrator. *, $P < 0.05$ (**B**), or for protein by Western blotting with 50 μg of cell lysates. GAPDH signal was used as an internal control (**C**). The preadipocytes were placed onto coverslips, and induced to undergo adipocyte differentiation. Fully differentiated adipocytes were then subjected to double immunofluorescence microscopy for FABP4 and FIZZ1, while nuclei were stained blue with DAPI (**D**). Magnification, $\times 400$. The single color staining for DAPI, FABP4, FIZZ1 and the merged image are shown.

Figure 2. FIZZ1 inhibited adipocyte gene expression. Fully differentiated 3T3-L1 adipocytes were treated with 25 ng/ml of FIZZ1 for 3 days. The indicated adipocyte specific markers were analyzed by qRT-PCR. *, $P < 0.05$, and the resulting mRNA levels were expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$ with GAPDH as the reference and the corresponding untreated control as calibrator (**A**), or by Western blotting with 20 μg of cell lysates. GAPDH signal was used as an internal control (**B**).

Figure 3. FIZZ1 induced myofibroblast differentiation. Fully differentiated 3T3-L1 adipocytes were treated with 25 ng/ml of FIZZ1 for 7 days. The indicated genes were analyzed by qRT-PCR as described in the legend of Figure 2. *, $P < 0.05$ (**A**). α -SMA protein induction with indicated doses of FIZZ1 was analyzed by western blotting. GAPDH signal was used as an internal control (**B**). The cells were treated with 25 ng/ml of FIZZ1 for the indicated days, and kinetic analysis of gene expressions of α -SMA,

FABP4 and PPAR- γ by qRT-PCR was shown in (C). The horizontal line indicated the control level at 100%, thus values above or below this line indicated stimulation or inhibition by FIZZ1, respectively.

Figure 4. FIZZ1 expression and localization in BLM-induced dermal fibrosis model. Twenty-one days after daily BLM subcutaneous injections, skin tissue RNA was analyzed for α -SMA and type I procollagen by qRT-PCR for fibrogenic gene expression as indicated in. *, $P < 0.05$ (A). FIZZ1 mRNA was also determined at day 10 and 21 after BLM injection and shown in (B), *, $P < 0.05$. FIZZ1 and FABP4 immunofluorescence microscopy was performed on paraffin-embedded skin tissue sections. FIZZ1 signals are shown as red color, FABP as green, and the nuclei are stained with DAPI, with the merged images shown on the right most panels. The images from the section of PBS control (upper panels) or BLM-dermal fibrotic skin (bottom panels) are shown. Magnification, $\times 400$ (C). The indicated adipocyte marker gene (PPAR γ and FABP4) mRNA levels are shown in (D). *, $P < 0.05$. After 21 days of daily BLM injection, skin tissue samples from the respective indicated murine strain were analyzed for hydroxyproline content, The results (μg) were normalized to per g wet weight of the skin sample. *, $P < 0.05$ (E). Histopathology and collagen deposition were examined by H & E and Masson trichrome stained skin tissue sections as shown in (F). Magnification, $\times 100$. The lung tissues from BLM ("B") or PBS-treated ("P") WT or FIZZ1 KO mice were homogenized and lysed in RIPA buffer. The lung tissue α -SMA, and FIZZ1 proteins were analyzed by Western blotting. GAPDH signal was used as an internal control (G).

Figure 5. Notch1 mediated FIZZ1 effect on adipocyte transdifferentiation. Fully differentiated adipocytes were treated with 25 ng/ml of FIZZ1 for 24 hours. Notch1 mRNA was analyzed by qRT-PCR. *, $P < 0.05$ (A). The adipocytes were transfected with 100nM of Notch1 or control siRNA by electroporation, and the cells were treated with FIZZ1 as indicated. Notch1 intracellular domain (NIC), α -SMA and FABP4 protein levels were analyzed by Western blotting (B). NIC protein was also analyzed in WT or FIZZ1 KO mice after PBS ("P") or BLM ("B") treatment (C). GAPDH signals were used as the internal controls.

A

B

C

D

Figure 1

A

B

Figure 2

A

B

C

Figure 3

A

B

C

Figure 4

D

E

Figure 4

F

G

Figure 4

A

B

C

Figure 5

Supplemental figures and figure legends

Figure 1 FIZZ1 induced myofibroblast differentiation in adipocyte. The preadipocytes 3T3-L1 were plated onto coverslips, and induced to undergo adipocyte differentiation. Fully differentiated adipocytes were treated with FIZZ1 (25 ng/ml) for 7 days, and then subjected to FABP4 and α -SMA double immunofluorescence microscopy. FABP4 signals are shown as green color, α -SMA as red, while nuclei were stained blue with DAPI, with merged images shown on the right most panels. The arrows indicate FABP4/ α -SMA double positive cells. Magnification, $\times 400$.

A

B

Figure 2 FIZZ1 had no effect on preadipocytes. Preadipocytes 3T3-L1 were plated into 6-wll plates to sub-confluence, and then treated with 25 ng/ml of FIZZ1 for 7 days. Type I collagen and α-SMA mRNA were analyzed by qRT-PCR, and the results were expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$ with GAPDH as the reference (**A**). α-SMA protein expression by Western blotting was also shown in. GAPDH signals was used as an internal control (**B**).

Figure 3. Expression and localization of FABP4 and α -SMA in bleomycin-induced dermal fibrosis model. FABP4 and α -SMA double immunofluorescence microscopy was performed on paraffin-embedded tissue sections of bleomycin-dermal fibrotic skin. FABP4 signals are shown as green color, α -SMA as red, and nuclei are stained with DAPI, with merged images shown on the right most panels. Magnification, $\times 400$.

Abstract

Telomerase is typically expressed in cellular populations capable of extended replication, such as germ cells, tumor cells, and stem cells, but is also induced in tissue injury, repair and fibrosis. Its catalytic component, telomerase reverse transcriptase (TERT) is induced in lung fibroblasts from patients with fibrotic interstitial lung disease and in rodents with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. To evaluate the fibroblast specific role of TERT in pulmonary fibrosis, transgenic mice bearing a floxed TERT allele were generated, and then crossed with an inducible collagen $\alpha 2(I)$ -Cre mouse line to generate fibroblast specific TERT conditional knockout mice. TERT-specific deficiency in mesenchymal cells caused attenuation of pulmonary fibrosis as manifested by reduced lung hydroxyproline content, type I collagen and α -smooth muscle actin mRNA levels. The TERT-deficient mouse lung fibroblasts displayed decreased cell proliferative capacity and higher susceptibility to induced apoptosis compared with control cells. Additionally TERT deficiency was associated with heightened α -smooth muscle actin expression indicative of myofibroblast differentiation. However the impairment of cell proliferation and increased susceptibility to apoptosis would cause a reduction in the myofibroblast progenitor population necessary to mount a successful myofibroblast-dependent fibrotic response. These findings identified a key role for TERT in fibroblast proliferation and survival essential for pulmonary fibrosis.

1 **Introduction**

2 Telomerase is a ribonucleoprotein complex comprised of a catalytic component, telomerase
3 reverse transcriptase (TERT) and an RNA template (TR). It has a well-established function of adding
4 telomeric DNA forming telomeres to the ends of linear chromosomes [1]. TERT, the protein component
5 of telomerase, is expressed in stem cells and progenitor cells in normal tissues but is undetectable in
6 normal adult human somatic cells [2, 3] although it can be induced in certain cells upon appropriate
7 stimulation [4, 5]. Telomerase activity is widely increased in many germ cells and cancerous cells [6-8].
8 The role of telomerase in telomere maintenance and the importance of telomeres in DNA replication
9 implicate its intimate involvement in cell proliferation, aging and senescence [9-11]. Telomere shortening
10 due to telomerase deficiency and/or other causes is associated with multiple conditions and diseases,
11 including pulmonary fibrosis [12, 13]. However the mechanism is not always clear as to how telomere
12 shortening dependent or independent of telomerase deficiency could result in chronic fibrotic disease for
13 instance. Moreover, in addition to this canonical telomere maintenance function, there is mounting
14 evidence that TERT has non-canonical functions of potential import in development, cell differentiation
15 and certain disease processes [14, 15]. For example TERT in mice (mTERT) promotes hair follicle stem
16 cell proliferation in a mechanism independent of the TR [14]. It enhances keratinocyte proliferation and
17 activates resting hair follicle stem cell through transcriptional regulation of a developmental program
18 associated with the Myc and Wnt pathways [15, 16]. There is also evidence that mammalian TERT has
19 extranuclear function in mitochondria [17, 18]. Mammalian TERT contains a nuclear export signal[19] as
20 well as a putative mitochondrial targeting sequence [20] to guide its oxidative stress induced relocation
21 from the nucleus to mitochondria where its function is not related to maintenance of telomeres [21]. A
22 further complication is that selective telomerase expression and/or activity in different cell types can have
23 different impact on disease processes, such as chronic fibrosis.

24 A growing body of evidence reveals that TERT expression is transiently induced in tissue injury,
25 repair and fibrosis [10, 22, 23]. Selective over-expression of TERT in dermal basal keratinocytes results
26 in increased skin wound healing rate, in addition to increasing susceptibility to tumor formation[10]. This

may reflect a proliferative advantage of high TERT/telomerase expressing tissues in response to proliferative signals associated with wound healing. In a humanized mouse model, human TERT (hTERT) promoter activity is not active in resting liver, but in response to liver injury it is markedly activated in proliferating hepatocytes during liver regeneration with potential involvement of E2F2 and E2F7 transcription factors, thus implicating hTERT as a potential factor underlying the regenerative capacity of human liver [23]. Telomerase is transiently increased in lung injury, induced by bleomycin (BLM), hypoxia or silica [4, 5, 24]. Telomerase induction in lung fibroblasts from BLM-treated mice is accompanied by increased TERT expression but without significant effect on telomere length. In contrast, TERT deficiency reduces myofibroblast differentiation and impairs lung fibrosis, which is partially reversed by transplantation with wild type (WT) bone marrow (BM) resulting in restoration of telomerase induction in BLM-injured lung. These findings implicate the importance of TERT during lung fibrosis [25]. Similarly, marked induction of telomerase activity and TERT expression are found in a murine pulmonary hypertension (PH) model as well as in lungs from patients with idiopathic PH [26]. Moreover TERT deficient mice develop less severe PH with diminished proliferation of vascular smooth muscle cells without affecting telomere length. In contrast, mutant TERT, TR and/or shortened telomeres are suggested as risk factors for IPF [12, 13, 27, 28]. However another study with a different patient population reveals <6% of IPF or hypersensitivity pneumonitis patients exhibited shortened telomeres in peripheral blood leukocytes and <4% in lung fibroblasts [29]. In contrast, about 66% of lung fibroblast samples from IPF patients express telomerase with a much lower percentage in those from hypersensitivity pneumonitis patients, thus suggesting association of fibrotic interstitial lung disease with induction of telomerase in lung fibroblasts without impact on telomere length. These different studies would seem to suggest the potential importance of telomere shortening on the one hand, and the induction of telomerase on the other. This apparent conflict could be due to induction of telomerase in different cell types, which might have diverse effects on the pathogenesis of chronic fibrotic lung diseases. For instance, regeneration and re-epithelialization of the alveolar epithelium in lung repair may benefit from induction of telomerase but may be impaired by telomere shortening, while having similar effects on fibroblasts.

1 However while epithelial regeneration or proliferation is beneficial for repair, fibroblast proliferation is
2 detrimental by promotion of fibrosis instead of proper healing. It is unclear if the induction of telomerase
3 in fibrosis is restricted to lung fibroblasts and/or the role of this induction in fibrosis is restricted to
4 fibroblasts only. While TERT knockout mice are available to study its overall role(s) globally in vivo, the
5 divergent roles of TERT in different cell types vis-à-vis disease processes in different organ systems and
6 tissues necessitate a conditional cell specific approach to study effects of its deficiency.

Materials and Methods

Generation of TERT conditional knockout mice

A 10.65 kb region from C57BL/6 BAC clone (pSP72 as backbone vector, Promega, Fitchburg, WI) was used to construct the targeting vector. A loxP/FRT flanked *neomycin* cassette was inserted on the 3' side of exon 2 and a single loxP site was inserted approximately 1 kb 5' of exon 1. The total size of the targeting construct (including vector backbone and neomycin cassette) was 14.75 kb with 3.02 kb comprising the target region (Fig. 1A). The TERT targeting vector was electroporated into C57BL/6 ES cell Bruce 4. Southern blotting with the digoxin (Dig)-labeled probe was conducted to screen ES cell clones with successful homologous recombination. WT and floxed alleles generated 14.58 kb and 7.3 kb fragments, respectively (Fig. 1B). Three of the ES cell clones were used for blastocyst microinjections. After confirming germline transmission, the chimeras were crossed with FLP mice (The Jackson Laboratory) to remove the *neomycin* cassette. The resulting homozygous mice with LoxP sites as indicated in the TERT gene are hereafter referred to as floxed TERT (or TERT $^{fl/fl}$) mice. Floxed TERT mice were then crossed with C57BL/6J-Tg[*Col1 α 2-Cre-ER(T)*] (Cre $^{+/-}$) mice bearing a tamoxifen-inducible Cre-recombinase under the control of a regulatory sequence from the α 2(I) collagen gene (gift of Dr. Benoit deCrombrughe, University of Texas MD Anderson Cancer Center) to generate TERT $^{fl/fl}$, Cre $^{+/-}$ mice. Tamoxifen-induced Cre excision resulted in the conditional type I collagen expressing mesenchymal ('fibroblast') specific TERT CKO. A new 215 bp PCR fragment was generated after Cre excision with primers 1 and 5 (P1 and P5 in Fig. 1A). Genotyping was done by PCR and a representative result is shown (Fig. 1C). All primers are available upon request.

Fig. 1. Generation and verification of the TERT CKO mice. (A) Schematic gene-targeting map of TERT gene. The construction of TERT floxed and TERT CKO alleles are shown before and after tamoxifen treatment. TERT gene exon 1-2 was floxed after recombination between WT and targeted alleles. Primers pairs P1/P2 and P3/P5 were used to detect floxed TERT alleles. Primer pair P1/P5 was used to detect the TERT gene excision by Cre. (B) Representative Southern blot analysis. The ES clone with homologous recombination was digested with the restriction enzyme BsrGI followed by Southern

blotting with Dig-labeled 5' probe as shown in (A). The detected WT and targeted alleles are 14.58 and 7.3 kb, respectively. (C) PCR genotyping using genomic DNA from mouse tails. The PCR fragments for WT was 154bp, for TERT *fl/+* they were 154 and 343 bp, for TERT *fl/fl* it was 343 bp, and for TERT CKO it was 215bp after tamoxifen-induced Cre excision. "Ladder" referred to 100 bp DNA ladder.

Induction of mouse pulmonary fibrosis model

Pulmonary fibrosis was induced in TERT CKO or relevant control Cre^{+/-} (for simplicity referred to as WT) mice (n=3~5) by endotracheal BLM (Blenoxane, Mead Johnson, NJ) injection at a dose of 2 U/kg bodyweight as before [30]. To induce TERT deficiency in fibroblasts, 1 mg/mouse of 4-OHT (Sigma, St. Louis, MO) was given by i.p. injection daily for 8 consecutive days prior to BLM administration on day 0. Daily tamoxifen injection (1 mg/mouse) was continued after BLM injection until the day of sacrifice as before [31]. Animals were randomly assigned to the indicated treatment groups. Twenty-one days after BLM treatment, the mice were sacrificed and the lungs were harvested rapidly for tissue RNA/protein preparation, fibroblast isolation, hydroxyproline (HYP) assay and histopathological examination. All animal studies were reviewed and approved by the Committee on Use and Care of Animals at the University of Michigan.

Cell isolation and treatments

MLF were isolated using a digestion cocktail containing collagenase III and DNase I (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ), and maintained in DMEM supplemented with 10% plasma-derived fetal bovine serum (PDS; Animal Technologies, Tyler, TX), 10 ng/ml of EGF and 5 ng/ml of PDGF (R&D systems, Inc. Minneapolis, MN) as before [32]. MLF at passages 1-5 were used in the indicated experiments. Where indicated CD11b⁺ cells were depleted from the MLF cultures using MACS system with CD11b microbeads (Miltenyi Biotec., Auburn, CA). To induce Cre expression MLF were transduced with 100 MOI of Ad5CMVCre-eGFP (AdCre; Viral Vector Core Facility, University of Iowa, IA) or by treatment with 5 μ M of 4-OHT in the case of cells from TERT CKO mice. Primary AEC II were isolated as previously described [33]. Briefly, lungs were instilled with dispase II (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) followed by low-melt agarose (Sigma), and digested for 45 minutes. Lungs

were then dissected and treated with DNase. The cell suspensions were negatively selected for CD16/32 and CD45 expressing cells by MACS separation system followed by further negative selection for non-adherent cells by incubation on the petri dishes. The AEC II were then plated and cultured on fibronectin-coated plates (BD Biosciences, San Jose, CA) before use. T and B lymphocytes were isolated and purified from thymus and spleen, respectively using CD90.2 (for T-cells) and CD220 (for B-cells) microbeads (Miltenyi Biotec.). Human normal foreskin fibroblast BJ and its hTERT-immortalized counterpart BJ 5ta were purchased from ATCC (Manassas, VA), and maintained in DMEM supplemented with 10% of fetal bovine serum (Sigma).

qRT-PCR and telomerase activity assay

Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen). The Taqman primers for mouse procollagen I, α -SMA, TERT and 18s RNA were purchased from Life Technologies. 18s RNA was used as reference to normalize the input RNA. One-step real-time RT-PCR was performed on a GeneAmp 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Results were expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$ using the indicated control group as calibrator.

Telomerase activity in the lung tissue or isolated MLF was assayed using a telomerase PCR ELISA kit (Roche) in accordance with the manufacturer's protocol. The heat-inactivated tissue or cell lysates were used for the negative controls.

Cell proliferation and apoptosis assay

Fibroblasts isolated from 4-OHT-treated WT or TERT CKO lungs at passage 1 were seeded into 96-well plates (5×10^3 cells/well). After 24 hours, 10 ng/ml of PDGF (R & D systems) was added and cultured for the indicated times up to 96 hours. The cell number was counted using a Z2 Particle Count and Size Analyzer (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, IN). Where indicated, 10 μ l of WST-1 reagent (Roche) was added 48 hours after PDGF treatment for measuring cell proliferation by WST-1 assay as described before [25]. Apoptosis assay was performed in WT or TERT KO MLF treated with 5 ng/ml TNF α and 500 ng/ml CHX using TACS AnnexinV-FITC kit (R & D systems) and propidium iodide (PI)

as described before [25]. Analysis was undertaken using a FACS Caliber flow cytometer (BD Biosciences). Apoptotic cells were identified as an annexin V+/PI- population.

Hydroxyproline assay

Lung collagen deposition was estimated by measuring the hydroxyproline (HYP) content of whole lung homogenates using Hydroxyproline assay kit (Sigma) in accordance with the manufacturer's protocol. The results were expressed as μg HYP per lung.

Histopathological analysis

The lungs were inflated by intratracheal perfusion and fixed for 24 h with 10% buffered formaldehyde. Lung tissue was then paraffin embedded, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Statistics

All data were expressed as mean $\pm$ SD unless otherwise indicated. Differences between means of various treatment and control groups were assessed for statistical significance by ANOVA followed by *post hoc* analysis using Scheffé's test. A P value < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Characterization of floxed TERT mice and Cre-induced TERT CKO mice

Floxed TERT (TERT *fl/fl*) mice were generated on C57Bl/6 background as described in the Methods. There was no physical difference between the wild type (WT) and floxed mice with respect to general appearance and body weight gain or growth rate. To examine whether or not the insertion of LoxP sites influenced the TERT gene integrity, TERT gene expression and telomerase activity were first examined in mouse lung fibroblasts (MLF). The results showed that TERT gene expression in TERT *fl/fl* MLF was not altered compared with MLF from WT animals. Since the TERT mRNA level is elevated in BLM-induced pulmonary fibrosis, lung TERT expression was also evaluated in BLM-treated TERT *fl/fl* mice. Comparable induction by BLM was observed between TERT *fl/fl* and WT mice in both isolated MLF and lung tissue (Fig. 2A). There was an approximate 2-fold induction for TERT mRNA, which was accompanied with a >60% increase for telomerase activity in MLF and lung tissue (Fig. 2B). These findings indicated that TERT gene expression and function were intact in the TERT *fl/fl* mice and remained capable of responding to regulatory signals in response to lung injury and fibrosis. Next, the effect of Cre recombinase expression on TERT gene expression in MLF from TERT *fl/fl* mice was investigated in vitro. The results showed that Cre adenovirus transfection dramatically inhibited TERT mRNA expression to almost undetectable levels, while the control adenovirus did not affect TERT gene expression compared with untransduced TERT *fl/fl* fibroblast (Fig. 3A). This ablation of TERT expression resulted in a significant reduction in telomerase activity (Fig. 3B). The reduction of TERT expression was also noted in MLF isolated from the TERT *fl/fl*, Cre^{+/+} mice upon in vitro treatment with 5μM 4-hydroxy-tamoxifen (4-OHT) (Fig. 3C), although the 4-OHT effect was not as complete as that attained by induced Cre expression using Cre adenovirus. To confirm that TERT gene is selectively knockout in collagen I-expressing mesenchymal cells, TERT gene expression was evaluated in mouse AEC II, T cells and B cells isolated from thymus and spleen, respectively, of TERT CKO mice. While the >70% inhibition of TERT gene expression was induced in MLF as expected, no alteration was observed in AEC II, T and B cells from TERT CKO mice after 7 days of tamoxifen treatment (Fig. 4A).

These findings confirmed the cell specificity of induced TERT gene deficiency in mesenchymal cells/MLF. Consistent with the TERT mRNA reduction in MLF, the telomerase activity in CD11b depleted MLF was also significantly inhibited (Fig. 4B). This significant reduction in MLF TERT gene expression was also noted in lung tissue from TERT CKO mice compared with that in the control lungs (Fig. 4C). The reduction in TERT gene and telomerase activity in MLF from TERT CKO mice was unchanged with a further 3 days (to a total of 10 days) of 4-OHT treatment (data not shown). These results confirmed that the TERT gene could be successfully excised by tamoxifen-induced Cre recombinase specifically in collagen I-expressing mesenchymal cells, although the extent was incomplete (<30% residual for mRNA).

Fig. 2. TERT and telomerase in floxed TERT vs WT mice. Total RNA or protein lysates were prepared from the lung tissues and MLF from BLM or PBS-injected TERT *fl/fl* or WT mice. TERT gene expression was analyzed by qRT-PCR and expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$ in (A), and the telomerase activities were detected by TRAP-ELISA kit and expressed as fold change over their PBS control, respectively (B). *, $P < 0.05$.

Fig. 3. The in vitro excision of MLF TERT by Cre activation. The MLF were isolated from TERT *fl/fl* mice, and then transduced with 100 MOI of AdCre vector or AdGFP control vector. Six days after transduction, TERT mRNA (A) and telomerase (B) were analyzed, respectively, as described in the legend of Fig. 2. (C) The MLF from TERT *fl/fl* or TERT *fl/fl*, Cre[±] mice were treated with 5 μ M of 4-OHT in vitro at the same time for 6 days, and TERT mRNA was analyzed. *, $P < 0.05$.

Fig. 4. Selective knockout of TERT gene in TERT CKO mice. (A) MLF, AEC II, thymic T, and splenic B cells were isolated from TERT CKO and WT mice. TERT mRNA expression was examined in these cells. (B) Telomerase activity was measured in the MLF from TERT CKO and control mice. (C) The TERT mRNA expressions in TERT CKO and control lung tissues are shown. *, $P < 0.05$.

The effect of mesenchymal specific TERT deficiency on BLM-induced pulmonary fibrosis

We have previously shown that TERT is induced MLF and required for BLM-induced pulmonary fibrosis using TERT traditional KO mice [25]. However it is not clear whether TERT/telomerase in the

different cell types play similar or diverse roles in fibrosis. To specifically determine the importance of TERT in the mesenchymal compartment vs that in epithelial and immune/inflammatory cell compartments, pulmonary fibrosis was induced in TERT CKO and control mice by endotracheal injection of BLM. TERT gene expression was first examined in both isolated MLF and lung tissues to confirm the TERT ablation after tamoxifen treatment. The level of TERT mRNA expression in MLF isolated from control (PBS-treated) TERT CKO mice was ~38% of that in MLF from control WT mice (Fig. 5A). While MLF TERT mRNA was significantly increased upon BLM treatment of WT mice, it was not altered in TERT CKO mice, resulting in a >70% inhibition of TERT mRNA in the cells from BLM treated TERT CKO mice. Analysis of total lung collagen content by hydroxyproline (HYP) assay at 21 days post BLM injection revealed similar levels of HYP in lungs of control WT and TERT CKO mice (Fig. 5B). However while BLM treatment caused the expected significant increase of HYP in lungs of WT mice, this effect essentially vanished in the TERT CKO mice. Consistent with this reduction in BLM-induced increase in TERT CKO lung HYP content lung the increase in WT lung type I collagen gene expression was similarly suppressed in the TERT CKO lungs (Fig. 5C). Moreover the > BLM-induced 2-fold stimulation of α -smooth muscle actin (α -SMA) protein expression in WT lungs was essentially abolished in TERT CKO lungs (Fig. 5D). Finally, histopathological assessment revealed that TERT CKO mice displayed less extensive fibrosis compared with the more diffuse fibrotic lesions affecting larger areas in lungs of WT mice (Fig. 5E). Taken together, the fibroblast/mesenchymal-specific TERT deficiency resulted in impaired pulmonary fibrosis.

Fig. 5. The impairment of pulmonary fibrosis in TERT CKO mice. (A) The MLF were isolated from TERT CKO or WT mice at 21 days after BLM injection, and analyzed for TERT mRNA by qRT-PCR. The expression was expressed as the fold change of the level in PBS-treated WT MLF. (B) The lungs from TERT CKO and control mice were homogenized at day 21 after BLM treatment, and measured for whole lung collagen content by HYP assay. n = 3-5 mice per group. (C) Lung tissue RNA extracted from the indicated murine strains was also analyzed for type I collagen mRNA by qRT-PCR. (D) Lung tissue lysates were prepared by RIPA buffer, and analyzed for α -SMA protein in the indicated murine strain by

Western blotting (right panel). Quantitative data was normalized by the internal control GAPDH, and shown as the percentage of the GAPDH signals (left panel). (E) Representative H & E stained lung tissue sections at day 21 after BLM treatment are shown. Original magnification $\times 20$.

The role of TERT in the cellular process of proliferation, survival and differentiation

Given the multiple roles of TERT, including non-canonical effects unrelated to telomere maintenance [16, 34, 35] and in myofibroblast differentiation [25], its role in mesenchymal cells in fibrosis require further exploration. Specifically, to seek out a potential mechanism for the impaired fibrosis in TERT CKO mice, the direct effects of TERT on cell proliferation, apoptosis, and differentiation were investigated. MLF from TERT CKO or WT mice were treated with PDGF and then analyzed for cell proliferation. WT cells doubled in 24 hours of culture, which were further significantly increased at 48 hours or later (up to 96 hours) upon treatment with PDGF (Fig. 6A). In contrast, TERT CKO cells failed to proliferate in the absence or presence of PDGF. The TERT effect on cell proliferation was confirmed by WST-1 assay at 48 hours after PDGF stimulation (Fig. 6B).

Fig. 6. Effects of TERT CKO on MLF proliferation, apoptosis and differentiation. (A) The MLF were isolated from TERT CKO and control mice, and analyzed for proliferation by counting the cell numbers at the indicated time points. (B) MLF proliferation by WST-1 assay at 48 hours after PDGF treatment. (C) Apoptosis was also detected in MLF by annexin V-FITC/PI staining and flow cytometry without and with TNF- α /CHX treatment. The FITC+/PI- cells were referred to as the apoptotic cells. (D) MLF isolated from TERT CKO or control mice were cultured and analyzed for TERT and α -SMA mRNA expression after treatment with buffer only or with TGF- β 1 for 48 hours. The mRNA expression levels were expressed as the fold changes over the WT MLF for each gene. *, $P < 0.05$.

The effect on MLF susceptibility to apoptosis was then determined in TERT deficient MLF by evaluating the response to a known apoptotic stimulus, TNF- α combined with cycloheximide (CHX). Analysis of the treated cells by flow cytometry showed that in the absence of stimuli, WT MLF displayed a low apoptotic rate of 0.42%, which was >3 -fold elevated but not statistically significant in TERT deficient MLF. However TNF- α /CHX treatment caused a significantly higher apoptosis rate (>4 -fold) in

1 TERT deficient MLF than in WT MLF (not statistically significant) when compared to their respective
2 untreated controls (Fig. 6C). Thus in addition to impaired proliferation TERT deficient MLF were more
3 susceptible to apoptosis.

4 Finally, the effect of TERT deficiency on myofibroblast differentiation was analyzed. The
5 expression level of α -SMA, a key marker of myofibroblast differentiation, was assessed in MLF from WT
6 or TERT CKO mice. While the TERT mRNA was significantly decreased by >2-fold in MLF isolated
7 from TERT CKO mice vs. WT mice, the α -SMA mRNA was significantly higher (2.8-fold increase) in
8 TERT CKO MLF compared to that in WT MLF (Fig. 6D). TGF- β 1 treatment caused a further reduction in
9 TERT mRNA but caused a further significant increase in α -SMA mRNA in TERT CKO cells. This
10 inverse relationship between TERT and α -SMA expression was similarly observed in comparing BJ
11 human foreskin fibroblasts, which are telomerase negative to the BJ5ta fibroblasts stably transfected with
12 hTERT (Fig. 7). While the expression of α -SMA could be easily detected by western blotting in BJ
13 fibroblasts, it was barely detectable in BJ5ta fibroblasts with overexpressed TERT. Although TGF- β 1
14 increased α -SMA levels in both BJ and BJ5ta cells, the increase in telomerase deficient BJ cells was more
15 substantial. Taken together TERT had the potential property of controlling cell proliferation,
16 fate/differentiation, and susceptibility to apoptosis, which might mediate its mesenchymal cell specific
17 role in pulmonary fibrosis.

18 **Fig. 7. Effect of TERT overexpression on α -SMA expression.** BJ and BJ 5ta fibroblasts were plated in
19 6-well plates. The cells were starved with DMEM supplemented with 0.5% FBS for 4 hours before TGF-
20 β 1 treatment for an additional 48 hours. The cell lysates were harvested in RIPA buffer, and analyzed for
21 α -SMA protein expression by Western blotting. A representative blot was shown. The GAPDH was used
22 as internal control.

Discussion

The evidence from recent years suggest that in addition to maintaining telomeres, non-telomeric roles for TERT may also be important in regulation of proliferation [14, 16], apoptosis [34], and mitochondrial function [17]. We previously demonstrated that telomerase and / or TERT are induced and required for BLM-induced pulmonary fibrosis, by comparing responses in TERT KO vs wild type mice [4, 25, 29]. However it is unclear if the deficient fibrotic response in TERT KO mice is solely due to ablation of TERT in the mesenchymal compartment, where TERT induction in the BLM model and in IPF lung fibroblasts has been observed. To elucidate this possibility, in this study, we established a floxed TERT mouse strain and further generated a Cre-inducible TERT CKO mouse line to conditionally knockout TERT gene specifically in type I collagen-expressing mesenchymal cells. Using this TERT CKO mouse line we established that TERT and its induction in mesenchymal/MLF was essential for pulmonary fibrosis since BLM-induced fibrosis was significantly attenuated in TERT CKO mice along with decreased telomerase activity in the lung tissue resulting from mesenchymal TERT deficiency. This was consistent with the previous finding that the induction of telomerase in lung fibroblasts is positively associated with IPF and other fibrotic interstitial lung diseases [29]. The involvement of telomerase induction in injury has also been reported in other studies. A rare but heterogeneous population of TERT-expressing cells, including cardiomyocytic, endothelial, fibroblastic and putative stem cells, is identified in mTERT promoter-drive GFP reporter mice. Cardiac injury results in 6.45-fold and 500-fold expansions of this mTERT-GFP cell population in the adult heart and within the “injury-zone”, respectively compared with sham-operated controls at 14 days following cryoinjury. Moreover, the identification of the TERT-expressing putative cardiac stem cells suggests that they represent a possible target for cardiac regeneration potential [36]. It is noteworthy that TERT deficiency in the current study was associated with reduced proliferation and increased differentiation, which would be consistent with the observation of TERT expression in less differentiated stem cell populations and their expansion in the cardiac injury study. A pivotal role of telomerase/TERT is also implicated in the allergic reactions in mice sensitized with IgE-specific TNP antibody followed by administration of TNP-OVA. IgE-mediated anaphylactic

1 responses are largely attenuated in TERT KO mice with decreased number of mast cells in vivo [37].
2 However the demonstration of selective mesenchymal cell TERT deficiency is unique to the current study
3 and revealed for the first time the importance of TERT induction in this select cell population in
4 pulmonary fibrosis. Of note, TERT ablation in MLF was not complete after tamoxifen-induced Cre
5 activation both in vitro and in vivo. There was still ~30% of residual TERT gene expression remaining in
6 TERT CKO MLF, and about a 50% reduction in telomerase activity. These may be partly due to
7 insufficient Cre-activation by tamoxifen and level of type I collagen expression present in the crossed
8 mice TERT fl/fl,Cre+/- . The lesser inhibition of telomerase activity was likely due to the relative stability
9 of the TERT protein vs. mRNA, thus even after the gene is disrupted persistence of the protein would still
10 enable activity to be detected. Nevertheless, this degree of TERT/telomerase deficiency was sufficient to
11 cause significant impairment of pulmonary fibrosis, indicative of the essential role of induced TERT in
12 mesenchymal cells for fibrosis.

13 While telomerase is significantly induced in lung fibroblasts from rodents with pulmonary
14 fibrosis as well as a majority of patients with fibrotic interstitial lung diseases, including IPF [29],
15 shortened telomeres in peripheral blood leukocytes have been reported in familial IPF and a minority of
16 patients with sporadic IPF [12, 25, 27-29]. Moreover lung fibroblasts from animal models and most
17 patients with IPF do not exhibit shortened telomeres, while shortened telomeres in late generation TERC
18 deficient mice are not associated with increased susceptibility to BLM-induced pulmonary fibrosis. The
19 basis of this apparent discrepancy between shortened telomeres in peripheral blood leukocytes vs. lung
20 fibroblasts and their significance for fibrosis is unclear, but may be related to the different functional
21 significance of telomerase and/or telomere length in different cell types. Exploration of the significance of
22 telomerase in the context of cell type is important for the elucidation of the differential pathophysiological
23 role of telomerase in different cell types, for example, in epithelial versus mesenchymal cells during lung
24 fibrosis. Accumulating evidence supports the emergence of an “apoptosis paradox” paradigm, suggesting
25 two seemingly contrasting tendencies exist in IPF/UIP: increased apoptosis in epithelial cells, and
26 decreased apoptosis in fibroblasts [38]. While induced telomerase is beneficial for epithelial cell repair

1 attributed to improved survival and proliferation/regeneration, such induction in mesenchymal/MLF may
2 be harmful to the tissue repair due to enhanced proliferation and persistence of fibroblasts resulting in an
3 exuberant and pathological chronic fibrotic response. The findings in the current study revealed that it is
4 the induced TERT/telomerase in mesenchymal cells that is important for BLM-induced pulmonary
5 fibrosis. The role or importance of TERT in other cell types can be evaluated in future studies using these
6 floxed TERT mice crossed to cell specific marker gene promoter driven Cre. The generation of this
7 floxed TERT mouse makes it possible to study its cell context specific role in the particular cell type of
8 interest in diverse animal models.

9 The increased number of fibroblasts and persistence of differentiated myofibroblasts are the key
10 features during pulmonary fibrosis [39]. The impact of TERT deficiency in decreasing cell proliferation
11 but increasing apoptosis rate in the collagen I-expressing MLF provides possible mechanisms for the
12 impaired pulmonary fibrosis in TERT CKO animals. The results here suggested that TERT deficient MLF
13 showed much lower proliferation rate and failed to respond to growth factor stimulation. This decreased
14 proliferation ability was also seen in the MLF isolated from systemic TERT KO lungs after BLM
15 treatment [25]. This role of TERT in cell proliferation has been reported also in other cells and tissues.
16 BM cells from TERT KO mice show a limited cell expansion capacity and enlarged senescent
17 morphology both in vitro and in vivo [37]. The epidermis of the transgenic mice with TERT
18 overexpression in basal keratinocytes, is highly sensitive to the mitogenic effects of phorbol esters with
19 increased proliferation of basal keratinocytes [10]. The exogenously TERT transduced Dyskeratosis
20 Congenital fibroblasts have a significantly extended lifespan, which is greater than three times that of
21 controls in long-term cultures. These TERT-expressing fibroblasts display similar morphology to early
22 passage normal fibroblasts by visual examination, however the extended fibroblast lifespan by
23 transduction of TERT is not accompanied by telomere elongation [40, 41]. These findings suggest the
24 promotion of proliferative potential and resistance to apoptosis by TERT may be responsible for the
25 mechanism of increased number of mesenchymal cells or fibroblasts in pulmonary fibrosis.

Our data revealed that TERT deficient MLF had a higher apoptosis rate in comparison to control MLF, and these cells exhibited more susceptible to apoptosis induction, suggesting that TERT may play a key anti-apoptotic role. Telomerase is a known apoptosis alleviating factor. The knockdown of hTERT in scar fibroblasts by liposome-adenoviral transduction caused significantly increased apoptosis rate along with reduced telomerase activity and shortened telomere length [42]. In BLM-treated AEC II, the initially increased level of telomerase delays AEC II apoptosis, but the declined telomerase at a later stage of treatment is associated with a significant increase in apoptosis rate [4, 43]. There may also be a time or stage dependent interaction between TERT induction and myofibroblast differentiation. Notably, the basal level of α -SMA in TERT deficient MLF was higher than that in control cells, even though the BLM caused induction of α -SMA was significantly reduced. The induced TERT in fibrosis may be responsible for the cell proliferation, and lead to the increase in number of collagen-expressing fibroblasts, which are the precursors for the myofibroblasts. Thus the lack of TERT would result in a reduction in the precursor fibroblasts, eventually resulting in reduced myofibroblasts as reflected in lower α -SMA expression. This might be a potential mechanism by which myofibroblast differentiation was suppressed in BLM injury in TERT CKO mice. The evidence from previous and current studies shows TERT is transiently induced in this lung fibrosis model during day 7-14 after BLM treatment [4, 43], which precedes the peak of α -SMA expression or myofibroblast differentiation that is typically seen on 21 days post BLM treatment [4, 44]. Thus the inhibitory effect of TERT deficiency in mesenchymal cell proliferation, survival and persistence may lead to less severe fibrosis in TERT CKO mice.

1 **Acknowledgments**

2 We thank Lisa Riggs for the excellent technical assistance in the lung tissue section preparation
3 and the H & E and Masson Trichrome straining.

References

1. Greider CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:337-65.
2. Morrison SJ, Prowse KR, Ho P, Weissman IL. Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity.* 1996;5(3):207-16.
3. Yui J, Chiu CP, Lansdorp PM. Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood.* 1998;91(9):3255-62.
4. Nozaki Y, Liu T, Hatano K, Gharaee-Kermani M, Phan SH. Induction of telomerase activity in fibroblasts from bleomycin-injured lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(4):460-5.
5. Driscoll B, Buckley S, Bui KC, Anderson KD, Warburton D. Telomerase in alveolar epithelial development and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(6):L1191-8.
6. Bernardes de Jesus B, Blasco MA. Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet.* 2013;29(9):513-20.
7. Hackett JA, Greider CW. Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene.* 2002;21(4):619-26.
8. Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, Anton R, Hierholzer A, Del Valle I, et al. Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science.* 2012;336(6088):1549-54.
9. Cao K, Blair CD, Faddah DA, Kieckhafer JE, Olive M, Erdos MR, et al. Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2833-44.
10. Gonzalez-Suarez E, Samper E, Ramirez A, Flores JM, Martin-Caballero J, Jorcano JL, et al. Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *EMBO J.* 2001;20(11):2619-30.
11. Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C, et al. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell.* 1999;96(5):701-12.
12. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2007;356(13):1317-26.

- 1 13. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset
2 pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7552-7.
- 3 14. Sarin KY, Cheung P, Gilson D, Lee E, Tennen RI, Wang E, et al. Conditional telomerase
4 induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature*. 2005;436(7053):1048-52.
- 5 15. Park JI, Venteicher AS, Hong JY, Choi J, Jun S, Shkreli M, et al. Telomerase modulates
6 Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*. 2009;460(7251):66-72.
- 7 16. Choi J, Southworth LK, Sarin KY, Venteicher AS, Ma W, Chang W, et al. TERT
8 promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental
9 program. *PLoS Genet*. 2008;4(1):e10.
- 10 17. Gordon DM, Santos JH. The emerging role of telomerase reverse transcriptase in
11 mitochondrial DNA metabolism. *J Nucleic Acids*. 2010;2010.
- 12 18. Saretzki G. Extra-telomeric functions of human telomerase: cancer, mitochondria and
13 oxidative stress. *Curr Pharm Des*. 2014;20(41):6386-403.
- 14 19. Seimiya H, Sawada H, Muramatsu Y, Shimizu M, Ohko K, Yamane K, et al.
15 Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J*. 2000;19(11):2652-61.
- 16 20. Santos JH, Meyer JN, Skorvaga M, Annab LA, Van Houten B. Mitochondrial hTERT
17 exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage. *Aging Cell*. 2004;3(6):399-411.
- 18 21. Simonicova L, Dudekova H, Ferenc J, Prochazkova K, Nebohacova M, Dusinsky R, et al.
19 *Saccharomyces cerevisiae* as a model for the study of extranuclear functions of mammalian telomerase.
20 *Curr Genet*. 2015.
- 21 22. Buseman CM, Wright WE, Shay JW. Is telomerase a viable target in cancer? *Mutat Res*.
22 2012;730(1-2):90-7.
- 23 23. Sirma H, Kumar M, Meena JK, Witt B, Weise JM, Lechel A, et al. The promoter of
24 human telomerase reverse transcriptase is activated during liver regeneration and hepatocyte proliferation.
25 *Gastroenterology*. 2011;141(1):326-37, 37 e1-3.

24. Kim JK, Lim Y, Kim KA, Seo MS, Kim JD, Lee KH, et al. Activation of telomerase by silica in rat lung. *Toxicol Lett.* 2000;111(3):263-70.
25. Liu T, Chung MJ, Ullenbruch M, Yu H, Jin H, Hu B, et al. Telomerase activity is required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3800-9.
26. Mouraret N, Houssaini A, Abid S, Quarck R, Marcos E, Parpaleix A, et al. Role for Telomerase in Pulmonary Hypertension. *Circulation.* 2014.
27. Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, Danoff S, Su SC, Cogan JD, et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):13051-6.
28. Cronkhite JT, Xing C, Raghu G, Chin KM, Torres F, Rosenblatt RL, et al. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178(7):729-37.
29. Liu T, Ullenbruch M, Young Choi Y, Yu H, Ding L, Xaubet A, et al. Telomerase and telomere length in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;49(2):260-8.
30. Liu T, Yu H, Ullenbruch M, Jin H, Ito T, Wu Z, et al. The in vivo fibrotic role of FIZZ1 in pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 2014;9(2):e88362.
31. Hu B, Wu Z, Nakashima T, Phan SH. Mesenchymal-specific deletion of C/EBPbeta suppresses pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 2012;180(6):2257-67.
32. Huaux F, Liu T, McGarry B, Ullenbruch M, Phan SH. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. *J Immunol.* 2003;170(4):2083-92.
33. Yang J, Wheeler SE, Velikoff M, Kleaveland KR, LaFemina MJ, Frank JA, et al. Activated alveolar epithelial cells initiate fibrosis through secretion of mesenchymal proteins. *Am J Pathol.* 2013;183(5):1559-70.
34. Gazzaniga FS, Blackburn EH. An antiapoptotic role for telomerase RNA in human immune cells independent of telomere integrity or telomerase enzymatic activity. *Blood.* 2014;124(25):3675-84.
35. Liu T, Hu B, Chung MJ, Ullenbruch M, Jin H, Phan SH. Telomerase regulation of myofibroblast differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34(5):625-33.

- 1 36. Richardson GD, Breault D, Horrocks G, Cormack S, Hole N, Owens WA. Telomerase
2 expression in the mammalian heart. *FASEB J.* 2012;26(12):4832-40.
- 3 37. Ujike-Asai A, Okada A, Du Y, Maruyama M, Yuan X, Ishikawa F, et al. Large defects of
4 type I allergic response in telomerase reverse transcriptase knockout mice. *J Leukoc Biol.*
5 2007;82(2):429-35.
- 6 38. Thannickal VJ, Horowitz JC. Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary
7 fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(4):350-6.
- 8 39. Phan SH. Genesis of the myofibroblast in lung injury and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.*
9 2012;9(3):148-52.
- 10 40. Westin ER, Chavez E, Lee KM, Gourronc FA, Riley S, Lansdorp PM, et al. Telomere
11 restoration and extension of proliferative lifespan in dyskeratosis congenita fibroblasts. *Aging Cell.*
12 2007;6(3):383-94.
- 13 41. Wong JM, Collins K. Telomerase RNA level limits telomere maintenance in X-linked
14 dyskeratosis congenita. *Genes Dev.* 2006;20(20):2848-58.
- 15 42. Shang Y, Yu D, Hao L. Liposome-Adenoviral hTERT-siRNA Knockdown in Fibroblasts
16 from Keloids Reduce Telomere Length and Fibroblast Growth. *Cell Biochem Biophys.* 2015.
- 17 43. Fridlender ZG, Cohen PY, Golan O, Arish N, Wallach-Dayana S, Breuer R. Telomerase
18 activity in bleomycin-induced epithelial cell apoptosis and lung fibrosis. *Eur Respir J.* 2007;30(2):205-13.
- 19 44. Waisberg DR, Parra ER, Barbas-Filho JV, Fernezlian S, Capelozzi VL. Increased
20 fibroblast telomerase expression precedes myofibroblast alpha-smooth muscle actin expression in
21 idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinics (Sao Paulo).* 2012;67(9):1039-46.
- 22

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7