

University of Groningen

## Self-assembling nanofiber hydrogels to attenuate epithelial mesenchymal transition in lens epithelial cells

da Cruz Barros, Raquel Sofia

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2018

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

da Cruz Barros, R. S. (2018). *Self-assembling nanofiber hydrogels to attenuate epithelial mesenchymal transition in lens epithelial cells*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

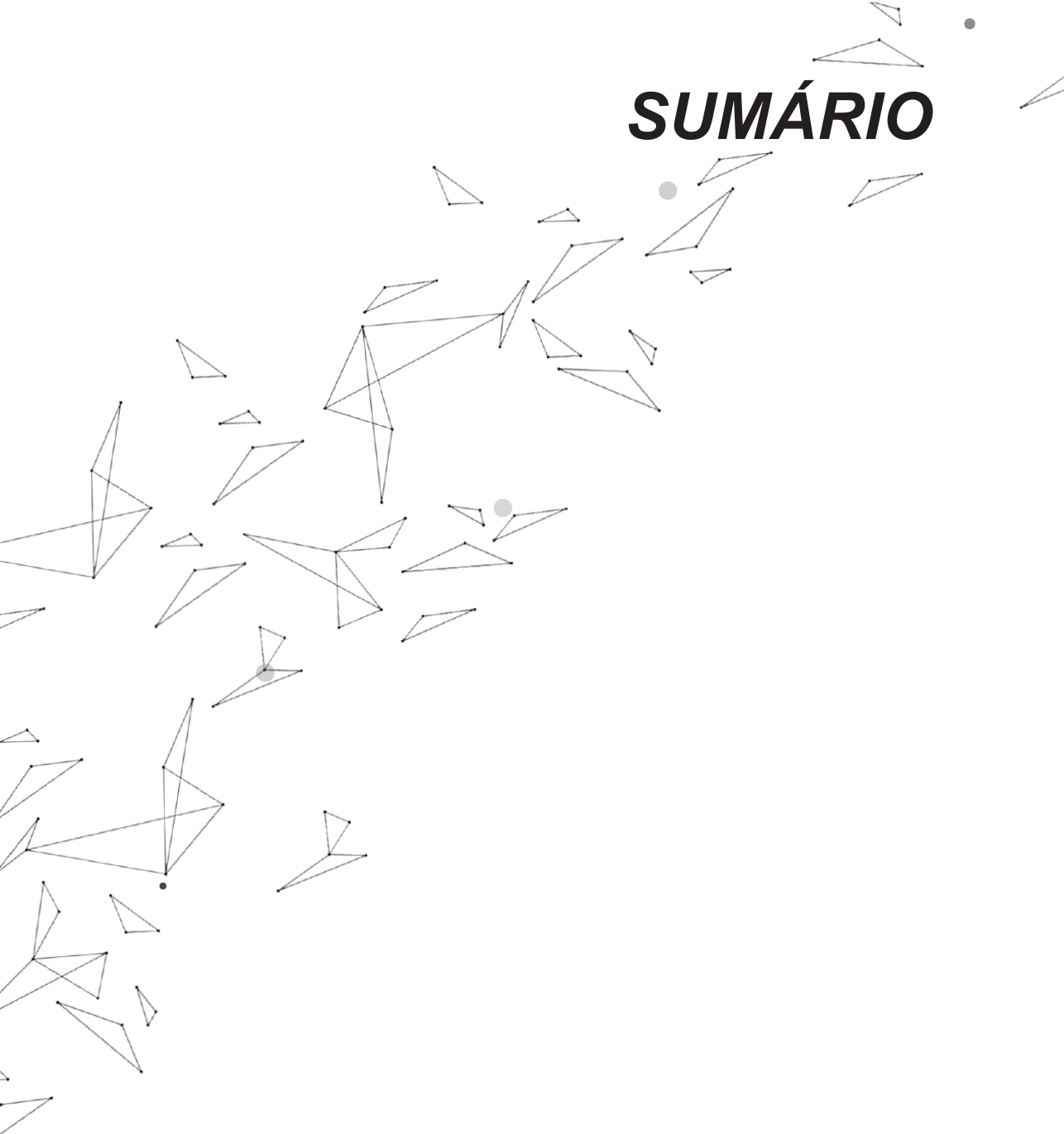
The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

# SUMÁRIO



O trabalho descrito nesta tese reflecte o uso de novos hidrogéis para redução da EMT (Transição Epitelial para Mesenquimal) presente na lente do olho. Os hidrogéis mencionados têm por base um núcleo de nanofibras que pode ser ligado a diferentes péptidos criando assim diferentes graus de gelificação ao ponto de estes se tornarem géis injectáveis.

Priori ao uso destas nanofibras como gel, foram realizados testes para identificar o núcleo mais adequado para as mesmas. No **capítulo 2**, demonstramos que a escolha de blocos de construção em sistemas de nanofibra de auto-montagem pode ser usada para controlar o comportamento celular. O uso de nanofibras revestidas em 2D foi investigado no controle de células epiteliais da lente, fibroblastos e células estaminais mesenquimais, com foco na expressão de genes e proteínas relacionada na resposta fibrótica. Assim, três nanofibras com características diferentes (morfologia, topografia e hidrofobicidade) foram comparadas com dois materiais padrão frequentemente usados em cultivo celular, TCPS e um revestimento de colagénio *tipo 1*. A actividade metabólica celular, a morfologia celular e a expressão de genes e proteínas foram analisadas. A nanofibra mais hidrofílica com uma rede mais compacta constituída por fibras pequenas provou fornecer um ambiente 2D benéfico para a proliferação celular e a formação da matriz, ao mesmo tempo que diminui o comportamento fibrótico / stress em todas as linhas celulares quando comparado com TCPS e o revestimento de colagénio *tipo 1*. Esta nanofibra demonstra potencial para ser usado como revestimento biomimético para estudar o desenvolvimento da fibrose através da transição epitelial para mesenquimal. Este estudo também mostra que as estruturas das nanofibras não aumentam a função celular por definição, uma vez que as características físico-químicas das nanofibras também influenciam o comportamento celular e podem ser usadas para regular o comportamento celular em direcção a um desempenho ideal.

Com base nos conhecimentos adquiridos no **capítulo 2** sobre a influência da química e propriedades de hidrofobicidade no comportamento celular, foi criado um gel de baixo peso molecular (LMWG). A bioactividade do LMWG foi melhorada pela adição de péptidos ao núcleo do gel. A escolha dos péptidos baseou-se no conhecimento de que a polaridade celular é perdida durante o processo de migração da EMT e uma separação da membrana basal permite a migração celular, um comportamento característico da EMT. No **capítulo 3**, géis com base em LMWG e funcionalizados com péptidos derivados de proteínas da membrana basal: laminina, colagénio e fibronectina foram utilizados para investigar os efeitos da composição da matriz em LEC (células epiteliais da lente) e avaliar o seu potencial como moduladores da EMT. As LEC foram cultivadas por cima ou por baixo dos géis e estas foram analisadas quanto à sua actividade metabólica, morfologia, expressão de  $\alpha$ -SMA e expressão de genes EMT / fibrótica. As LEC cultivadas em LMWG misturado com péptidos tiveram um aumento significativo na actividade metabólica em comparação com LMWG sem péptidos. Somente as LEC cultivadas em cima da mistura da membrana basal (BM) e do matrigel foram capaz de se propagar em uma monocamada semelhante à sua morfologia natural. A expressão de fibras de  $\alpha$ -SMA

a nível proteico e a expressão de mRNA de outros genes fibróticos foram mais altas no matrigel. Em geral, a mistura de BM foi capaz de manter as LEC em um estado fibrótico inferior ao dos outros géis, incluindo o matrigel. Os dados sugerem que o hidrogel contém uma composição de péptidos apropriada para atenuar o processo de EMT.

Uma vez que a mistura BM e LMWG mostrou resultados benéficos, um novo modelo de estudo foi desenvolvido no **capítulo 4**. Embora a laminina seja um dos principais constituintes da membrana da lente do olho, a combinação de péptidos de laminina (IKVAV + YIGSR) não mostrou vantagens na sobrevivência das LEC, conforme concluído no **capítulo 3**. Uma nova combinação de fibronectina e colagénio foi estudada no **capítulo 4**. Neste capítulo, LMWG sozinho e em combinação com derivados de laminina (IKVAV + YIGSR), fibronectina, colagénio (RGD + DGEA) e a mistura da membrana basal foram estudados na presença de LEC derivadas directamente da capsula da lente de porcos. O uso de LEC com o saco completo da cápsula assemelha-se ao seu ambiente natural. Assim sendo, a alteração celular deve-se principalmente à interacção com os hidrogéis e não ao stress induzido pela preparação da amostra. Os sacos da cápsula e as LEC foram cultivados em contacto directo com os LMWGs e as alterações morfológicas foram investigadas. As diferenciações celulares foram analisadas por alterações típicas das células com EMT: alongamento do citoesqueleto, aumento do tamanho do núcleo e consequentemente diminuição do número de células. A alteração do nível de proteínas também foi detectada pela activação de novos sinais de integrinas e produção de novas proteínas, como  $\alpha$ -SMA (devido à ligação de diferentes péptidos com a membrana celular). A ligação dos péptidos ao LMWG melhorou a sobrevivência celular. A combinação de fibronectina e derivados de colagénio (RGD + DGEA) começou com uma fraca sobrevivência celular mas passado 5 dias de cultivo mostrou uma considerável regeneração celular em paralelo com alongamento celular e aumento de proteínas  $\alpha$ -SMA. Essas células apresentavam características de miofibroblastos ao invés do fenótipo epitelial. A combinação de laminina (IKVAV + YIGSR) também apareceu com baixa sobrevivência celular no início da cultura, no entanto, esta mistura mostrou-se com altos níveis de morte celular após 5 dias de cultura. A mistura que se assemelha à membrana basal (BM), com a combinação de fibronectina, colagénio e laminina, estimulou uma significativa sobrevivência celular e baixa diferenciação celular, mesmo no final da cultura. Foram detectadas baixas quantidades de  $\alpha$ -SMA com ausência de fibras nesta mesma mistura. O BM com LMWG não evitou o processo de EMT, porém as células que interagiram com este hidrogel diminuíram a sua diferenciação em fibras e não aumentaram a produção de  $\alpha$ -SMA como nas demais combinações. Nos nossos estudos, uma composição peptídica ideal para evitar totalmente a EMT e, consequentemente, a fibrose ainda não foi alcançada. Mas um potencial hidrogel (LMWG BM) para retardar a EMT foi identificado. Além das propriedades de transporte medicinais e possibilidade de ser um gel injectável, este hidrogel também pode ser usado como revestimento. Abordagens para revestir as comerciais IOLs (lentes intraoculares) também podem ser exploradas.

Nesta tese, também foram investigadas novas abordagens para estudar e detectar danos epiteliais da córnea do olho. No **capítulo 5**, os danos mecânicos na córnea e os

efeitos desses danos usando lubrificantes foram analisados por um novo tribômetro associado a técnicas microscópicas, especialmente o confocal. A glicerina é um lubrificante comum adicionado às lágrimas artificiais. Um dispositivo de medição de fricção com intervenção mínima com o filme lacrimal da córnea de porco revelou um baixo coeficiente de fricção de 0,011 na solução de glicerina. As moléculas de glicerina presumivelmente ligam-se à água, mucinas e células epiteliais e, com isso, melhoram a película de hidratação e a lubrificação melhora. Usando microscopia confocal, determinamos que a solução de glicerina reduziu o dano nas células epiteliais em 50% em comparação com a solução salina tampão de fosfato.

No **capítulo 6** está descrita uma discussão geral sobre a teoria e praticabilidade do trabalho realizado nesta tese. Algumas das melhorias adicionais deste trabalho também foram mencionadas neste capítulo.

*P.S. – É extremamente difícil sumariar o meu trabalho em português, porque nunca escrevi (ou descrevi) ciência em português e porque há muitos termos científicos que não são traduzíveis.*