

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Daniele Evangelista Leite da Silva

Protective effect of decellularized lung extracellular matrix hydrogel in idiopathic pulmonary fibrosis models

Abstract: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an interstitial lung disease with no cure, characterized by fibroblast proliferation, excessive extracellular matrix (ECM) deposition, and disorganized lung architecture, with costly treatments. Finding cheaper and more efficient therapeutic alternatives is imperative. Therefore, the goal of this project was to produce a cytocompatible decellularized porcine lung ECM-derived hydrogel and evaluate its properties on human lung fibroblasts and rat lungs in both normal and fibrotic conditions. The hypothesis was that ECM-derived hydrogel reduces fibrosis by attenuating oxidative stress, modulating tissue remodeling, preventing epithelial to mesenchymal transition (EMT), and myofibroblast differentiation. Porcine lungs were decellularized and later digested with pepsin to produce the ECM-derived hydrogel. This hydrogel's physical and mechanical properties, including its ability to gelate at 37°C, were tested by scanning electron microscopy and turbidity analysis. Furthermore, the ECM-derived hydrogel peptide composition was analyzed with peptidomics. In vitro studies with primary human lung fibroblasts and A549 lung epithelial cells exposed to transforming growth factor beta-1 (TGFβ1) and treated with ECM-derived hydrogel were protected from myofibroblast differentiation and EMT, respectively, in a dose-dependent matter, as evaluated by immunocytochemistry, western blot, and RT-qPCR. The treatment also attenuated collagen synthesis (visualized by immunocytochemistry and quantified by RT-qPCR), reduced reactive oxygen species (observed by DCFH-DA assay), and altered matrix metalloproteinases remodeling activity (visualized by immunocytochemistry and analyzed by zymography and RT-qPCR). In vivo studies with bleomycin exposed rat lungs confirmed the observations from the in vitro studies and identified stronger inflammatory activity in a higher ECM-

derived hydrogel concentration. Proteomic and transcriptomic analysis of rat lung samples identified that the protective effect of the ECM-derived hydrogel in lung fibrosis is caused by: the modulation of inflammatory chemokines, leukocyte chemotaxis, interference in the lung hemostasis, changes in tissue remodeling and cell adhesion pathways, downregulation of TGF β receptors, interference with key fibrosis-related signaling pathways like Smad and PI3K/AKT. Uncovering the molecular pathways involved with the ECM-derived hydrogel protective effect in an IPF animal model has not been done as extensively as in this study. Moreover, this was also the first work to determine the sequences of all the peptides that compose the ECM-derived hydrogel using peptidomics analysis. These results cover important landmarks for small animal preclinical studies with the ECM-derived hydrogel essential to advance large animal studies. Ultimately, this study points to a promising future for ECM-derived hydrogel treatments in IPF and other diseases that generate fibrosis.

Efeito protetor de hidrogel de matriz extracelular pulmonar descelularizada em modelos de fibrose pulmonar idiopática

Resumo: A fibrose pulmonar idiopática (FPI) é uma doença pulmonar intersticial sem cura, caracterizada por proliferação de fibroblastos, deposição excessiva de matriz extracelular (MEC) e arquitetura pulmonar desorganizada, com tratamentos dispendiosos. Encontrar alternativas terapêuticas mais baratas e eficientes é imperativo. Portanto, o objetivo deste projeto foi produzir um hidrogel derivado de MEC de pulmão suíno descelularizado citocompatível para avaliar suas propriedades em fibroblastos pulmonares humanos e pulmões de ratos sujeitos à condições normais e fibróticas. A hipótese era que o hidrogel derivado da MEC reduz a fibrose por atenuar o estresse oxidativo, alterar a remodelação tecidual, prevenir a transição epitelial para mesenquimal (EMT) e a diferenciação de miofibroblastos. Para produzir o hidrogel derivado de MEC, livre de detergente e citocompatível, pulmões suínos foram descelularizados, lavados e posteriormente digeridos com pepsina. As propriedades físicas e mecânicas desse hidrogel, incluindo sua capacidade de gelificar a 37°C, foram testadas por microscopia eletrônica de varredura e análise de turbidez. Além disso, a composição peptídica do hidrogel derivada da MEC foi analisada com peptidômica. Estudos in vitro com fibroblastos de pulmão humano e células epiteliais pulmonares A549 expostas ao fator de crescimento transformador beta-1 (TGF β 1) e tratadas com hidrogel derivado da MEC foram protegidos da diferenciação de miofibroblastos e EMT, respectivamente, de forma dose-dependente, conforme avaliado por imunocitoquímica, western blot e RT-qPCR. O tratamento também atenuou a síntese de colágeno (visualizada por imunocitoquímica e quantificada por

RT-qPCR), reduziu as espécies reativas de oxigênio (observadas pelo ensaio DCFH-DA) e alterou a atividade de remodelação da MEC por metaloproteinases de matriz (visualizada por imunocitoquímica e analisada por zimografia e RT-qPCR). Estudos in vivo com pulmões de ratos expostos à bleomicina confirmaram as observações dos estudos in vitro e identificaram uma atividade inflamatória mais forte em uma concentração mais alta de hidrogel derivado da MEC. A análise proteômica e transcriptômica de amostras de pulmão de ratos identificou que o efeito protetor do hidrogel derivado da MEC na fibrose pulmonar é causado por: modulação de quimiocinas inflamatórias, quimiotaxia de leucócitos, interferência na hemostasia pulmonar, alterações nas vias de remodelação tecidual e adesão celular, regulação negativa de receptores TGF β , e interferência com as principais vias de sinalização relacionadas a fibrose como a Smad e PI3K/AKT. A descoberta das vias moleculares envolvidas com o efeito protetor do hidrogel derivado da MEC em um modelo animal de FPI não foi feito antes tão extensivamente quanto neste estudo. Além disso, este também foi o primeiro trabalho a determinar as sequências de todos os peptídeos que compõem o hidrogel derivado da MEC por meio de análise peptidômica. Em conjunto, esses resultados abrangem marcos importantes de estudos pré-clínicos em pequenos animais para o hidrogel derivado da MEC e que são essenciais para avançar os estudos em animais de grande porte. Em última análise, os resultados dessa tese apontam para um futuro promissor dos tratamentos de hidrogel derivado da MEC para a FPI e outras doenças que geram fibrose.