

Alberto Brüning Guimarães

**Avaliação da viabilidade estrutural de traqueias descelularizadas para engenharia de tecidos em até seis meses de armazenamento: estudo experimental**

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

Programa de: Cirurgia Torácica e Cardiovascular  
Orientador: Dr. Paulo F. Guerreiro Cardoso

São Paulo

2023

Alberto Brüning Guimarães

**Avaliação da viabilidade estrutural de traqueias descelularizadas para engenharia de tecidos em até seis meses de armazenamento: estudo experimental**

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

Programa de: Cirurgia Torácica e Cardiovascular  
Orientador: Dr. Paulo F. Guerreiro Cardoso

São Paulo

2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Guimarães, Alberto Brüning

Avaliação da viabilidade estrutural de traqueias  
descelularizadas para engenharia de tecidos em até  
seis meses de armazenamento : estudo experimental /  
Alberto Brüning Guimarães. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.  
Orientador: Paulo Francisco Guerreiro Cardoso.

Descritores: 1.Transplante 2.Traqueia  
3.Bioengenharia 4.Estenose traqueal 5.Medicina  
regenerativa 6.Fenômenos biomecânicos  
7.Criopreservação

USP/FM/DBD-142/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

# DEDICATÓRIA

---

## DEDICATÓRIA

A minha amada esposa, Ana Paula Pearson Guimarães. Obrigado pelo amor, carinho e compreensão, inclusive nos momentos em que estive distante. Obrigado por trazer ao mundo e cuidar das nossas duas obras mais importantes. Obrigado por ter enfrentado comigo a pandemia de SARS-CoV2, são inesquecíveis os dias que passamos isolados e doentes

Ao meu pai, Carlos Alberto Guimarães, pelo exemplo de dedicação à Cirurgia Torácica e às carreiras médica e acadêmica. Proporcionou-me a primeira defesa de Tese, que assisti ainda menino.

À minha mãe, por ser o alicerce da nossa família, mãe presente e avó carinhosa.

À minha avó, Dilce Bonifácio Sabino (in memoriam), pessoa que iluminava o ambiente e tornou possível toda a minha formação.

Ao meu amado filho, Gustavo Pearson Guimarães, que veio ao mundo já durante o período do Doutorado e que sempre me cobra mais tempo para passar ao seu lado.

À minha amada filha, Catarina Pearson Guimarães, que também veio ao mundo durante o período do Doutorado e que me proporciona momentos inenarráveis de carinho.

À minha sogra, Tereza Zarth, pelo convívio e parceria nesses anos.

# **AGRADECIMENTOS**

---

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Paulo Francisco Guerreiro Cardoso, orientador desta tese e amigo, pela orientação, pelo incentivo e pela confiança depositada em mim para desbravar como pioneiro no laboratório a linha de pesquisa de engenharia de tecidos em vias aéreas.

Ao Dr. Aristides Tadeu Correia, pesquisador e amigo, pela parceria, perseverança, dedicação e inquietação frente às nossas dúvidas e desafios dentro da pesquisa. Sem a sua colaboração não haveria esta Tese.

Ao Prof. Dr. Paulo Manoel Pêgo-Fernandes, Professor Titular da disciplina de Cirurgia Torácica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de cursar o programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular na modalidade de Doutorado.

Aos acadêmicos Ronaldo Soares da Silva, Bruno Paulo Alves, Mariane Moreira de Oliveira, Bruna Regina Oliveira, Hugo Garcia Fortunato e Juliana Kitagawa Martins, alunos do laboratório de iniciação científica pela ajuda nos processos de bancada, inclusive aos finais de semana.

À colega de pós-graduação, Elizabete Silva dos Santos, pelas inúmeras vezes que me ajudou na quantificação da citotoxicidade e DNA do meu material.

À Dra. Iadagene Cestari, pela colaboração intelectual para produção do método de análise biomecânico utilizado na nossa pesquisa.

À Dra. Marina Maizato, pesquisadora do Laboratório de Bioengenharia, sem a qual a determinação das propriedades biomecânicas traqueais não teria migrado do campo das ideias para o campo da ação. Agradeço por todas as etapas, elaboração do protocolo, execução dos ensaios e revisão dos textos.

À Dra. Marisa Dolhnikoff, coordenadora do Laboratório de Patologia, pela colaboração intelectual para produção do método de análise histopatológica utilizado na nossa pesquisa.

À Natália de Souza Xavier Costa, pesquisadora do Laboratório de Patologia, por todo o tempo dispensado na discussão, elaboração e ensino das técnicas de leitura das lâminas.

À senhora Sonia Maria Neumayr, funcionária do Laboratório de Patologia, pela ajuda com a correta destinação e cuidado com as lâminas de histologia.

Ao Prof. Dr. José Pinhata Otoch pela colaboração e cessão das traqueias dos porcos ao final da aula de Cirurgia Experimental. Essas

traqueias foram essenciais para o desenvolvimento do protocolo de descelularização em traqueia suína.

Aos técnicos do Laboratório de Cirurgia Experimental pela colaboração e apoio durante o processo de obtenção das traqueias de porco.

Às pesquisadoras Karina Andrighetti, Liliane Ruiz e Natália Nepomuceno do LIM 61, por toda ajuda com insumos, equipamentos e esclarecimentos de dúvidas nos processos de bancada.

À Sônia Souza, pesquisadora do Laboratório de Órgãos e Tecidos do InCor, pela parceria em todos os processos realizados no laboratório.

Às Senhoras Neusa R. Dini, Juliana L. Sobrinho, Monica Souto, Valdecira B. Ferreira e ao senhor Sidnei Silva, funcionários do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Torácica e Cardiovascular, pelas orientações dos trâmites da Pós-Graduação.

Aos meus colegas de trabalho e residentes, que sempre me incentivaram a seguir com a pesquisa e compreenderam os momentos em que me ausentei para me dedicar à pós-graduação, sem essas manifestações, não teria sido possível a conclusão deste trabalho.

**“Licht, mehr Licht.”**

**“Luz, mais luz.”**

JW Goethe

# **NORMATIZAÇÃO**

---

## **NORMATIZAÇÃO ADOTADA**

Esta 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. Serviço 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: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

# SUMÁRIO

---

# SUMÁRIO

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE GRÁFICOS

## RESUMO

## ABSTRACT

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 1  |
| <b>2 OBJETIVO</b> .....  | 7  |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....   | 9  |
| 3.1 A traqueia .....   | 10 |
| 3.2 Lesões complexas traqueais .....   | 12 |
| 3.3 Estenose traqueal .....  | 13 |
| 3.4 Tumores traqueais .....  | 15 |
| 3.5 Malformações congênitas da traqueia .....  | 17 |
| 3.6 Tratamentos paliativos não operatórios para as lesões traqueais<br>complexas ..... | 18 |
| 3.7 Próteses traqueais .....   | 19 |
| 3.8 Substitutivos traqueais .....  | 22 |
| <b>4 MÉTODOS</b> .....   | 28 |

|   |    |
|---|----|
| 4.1 Aspectos éticos .....   | 29 |
| 4.2 Obtenção das traqueias.....   | 29 |
| 4.3 Divisão dos grupos .....  | 30 |
| 4.4 Protocolo de descelularização traqueal .....  | 31 |
| 4.5 Métodos de armazenamento .....  | 32 |
| 4.6 Quantificação de DNA residual .....   | 33 |
| 4.7 Análise histopatológica de material celular remanescente após a<br>descelularização ..... | 34 |
| 4.8 Determinação do limiar de toxicidade do detergente .....                                  | 35 |
| 4.9 Determinação da citotoxicidade do scaffold.....   | 36 |
| 4.10 Determinação das propriedades biomecânicas da traqueia e do scaffold<br>.....            | 38 |
| 4.11 Quantificação do colágeno .....  | 40 |
| 4.12 Análise estatística .....  | 41 |
| 4.12.1 Estatística descritiva .....   | 41 |
| 4.12.2 Estatística inferencial.....   | 42 |
| <b>5 RESULTADOS</b> .....   | 43 |
| 5.1 Quantificação de DNA residual .....   | 44 |
| 5.2 Análise histopatológica de material celular remanescente após a<br>descelularização ..... | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 5.3 Determinação do limiar de toxicidade do detergente .....  | 48 |
| 5.4 Determinação da citotoxicidade do scaffold.....   | 50 |
| 5.5 Determinação do efeito da descelularização sobre as propriedades<br>biomecânicas da traqueia .....  | 51 |
| 5.6 Determinação do efeito do armazenamento sobre as propriedades<br>biomecânicas do scaffold sob os três diferentes protocolos: PBS, álcool e<br>criopreservação ..... | 54 |
| 5.7 Determinação dos efeitos da descelularização e do armazenamento<br>sobre a quantidade de colágeno.....  | 61 |
| <b>6 DISCUSSÃO</b> .....  | 64 |
| <b>7 CONCLUSÕES</b> .....   | 79 |
| <b>8 ANEXO</b> .....  | 81 |
| <b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 88 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

(em ordem alfabética)

|                |  |
|----------------|--|
| <b>µL</b>      | Microlitro   |
| <b>ANOVA</b>   | Análise de Variância   |
| <b>ASTM</b>    | American Society for Testing and Materials   |
| <b>BEAS-2B</b> | Linhagem celular epitelial brônquica humana (do inglês: bronchial epitelial cells) |
| <b>BEGM</b>    | Meio brônquico epitelial (do inglês: bronchial epitelial cell growth basal medium) |
| <b>CA</b>      | Califórnia   |
| <b>CBF</b>     | Células de linhagem vascular pulmonar endotelial humana primária                   |
| <b>DNA</b>     | Ácido desoxirribonucleico  |
| <b>DNAse</b>   | Desoxirribonuclease  |
| <b>DMSO</b>    | Dimetilsulfóxido   |
| <b>DP</b>      | Desvio padrão  |
| <b>DS</b>      | Desoxicolato de sódio  |
| <b>EDTA</b>    | Ácido etilendiamino tetra-acético  |
| <b>FMUSP</b>   | Faculade de Medicina da Universidade de São Paulo                                  |
| <b>HE</b>      | Hematoxicilia-eosina   |

|             |  |
|-------------|--|
| <b>HEB</b>  | Células epiteliais brônquicas humanas          |
| <b>HLF</b>  | Fibroblastos pulmonares humanos                |
| <b>hMSC</b> | Células-tronco mesenquimais humanas            |
| <b>IQ</b>   | Intervalo interquartil                         |
| <b>ISO</b>  | International Organization for Standardization |
| <b>kg</b>   | Quilograma                                     |
| <b>MD</b>   | Mariland                                       |
| <b>mg</b>   | Miligrama                                      |
| <b>MHC</b>  | Complexo principal de histocompatibilidade     |
| <b>mL</b>   | Mililitro                                      |
| <b>mM</b>   | Milimolar                                      |
| <b>mPa</b>  | Megapascal                                     |
| <b>N</b>    | Newton   |
| <b>ng</b>   | Nanograma                                      |
| <b>nm</b>   | Nanometro                                      |
| <b>p</b>    | Valor-p  |
| <b>PBS</b>  | Solução tampão fosfato-salino                  |
| <b>PET</b>  | Tomografia por emissão de pósitrons            |
| <b>pH</b>   | Potencial de hidrogênio                        |
| <b>SPSS</b> | Pacote Estatístico para Ciências Sociais       |
| <b>USA</b>  | Estados Unidos da América                      |
| <b>vs</b>   | Versus   |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação da traqueia aspectos coronal e axial. FONTE: Monnier P. Pediatric Airway Surgery. 1a ed. Berlin Heidelberg. 2011..... 11
- Figura 2** A) Tomografia de tórax evidenciando condroma traqueal com redução > 80% da luz. B) Imagem broncoscópica de tumor adenoide cístico brônquico causando obstrução completa da luz do brônquico principal direito. FONTE: Arquivo pessoal..... 16
- Figura 3** Imagem broncoscópica evidenciando anel traqueal completo em terço médio da traqueia (seta azul). FONTE: (Resheidat, 2019) ..... 18
- Figura 4** A) Corte coronal de tomografia de tórax evidenciando traqueobroncopatia osteocondroplásica complicada como traqueobroncomalácia. B) Aplicação de Stent traqueal em Y (seta branca)..... 21
- Figura 5** Traqueia de porco in natura ..... 30
- Figura 6** Organograma com a divisão dos grupos, Traqueias in natura (n:12), scaffold no momento zero (n:12), armazenamento em criopreservação (n:24), armazenamento em álcool (n:24) e armazenamento em PBS (n:24). ..... 31

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 7</b>  | Corpo de prova tipo V. (W= 3,18 mm, L= 9,53 mm, G= 7,62 mm, R= 12,7 mm) .....   | 39 |
| <b>Figura 8</b>  | A) Aparelho padrão Instron 3365 para ensaio de tração<br>B) Detalhe do corpo de prova .....   | 40 |
| <b>Figura 9</b>  | Segmento traqueal descelularizado (scaffold) .....  | 44 |
| <b>Figura 10</b> | A) Lâmina de histologia mostrando epitélio traqueal. B) Lâmina de scaffold mostrando ausência de cobertura epitelial (Coloração HE, magnificação 100x) .....  | 46 |
| <b>Figura 11</b> | A) Lâmina de traqueia do grupo controle evidenciando condrócitos normais. B) Lâmina de scaffold evidenciando lacunas acelulares na matriz extracelular da cartilagem. (Coloração HE, magnificação de 100x)..... | 47 |
| <b>Figura 12</b> | Placa de 96 poços após desafio com diferentes concentrações de DS. Coloração crescente da cor laranja traduz a viabilidade celular.....   | 49 |
| <b>Figura 13</b> | Foto de lâmina de histologia de traqueia in natura (grupo controle) para quantificação de colágeno. (Coloração picrossírius, magnificação 400x).....  | 61 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Gráfico 1</b> | Comparação da quantidade de DNA na traqueia in natura e scaffold. ....   | 45 |
| <b>Gráfico 2</b> | Comparação do percentual material nuclear residual identificado nas lacunas da matriz extracelular entre as traqueias in natura e scaffold. ....   | 48 |
| <b>Gráfico 3</b> | Curva de citotoxicidade do detergente desoxicolato de sódio. Linha tracejada indica o limiar de 70% de viabilidade celular e encontra-se num ponto abaixo da concentração de 0,065%...50 | 50 |
| <b>Gráfico 4</b> | Comparação da citotoxicidade do homogeneizado com o controle negativo por meio da determinação do percentual da viabilidade celular. ....  | 51 |
| <b>Gráfico 5</b> | Comparação do módulo de Young antes e após a descelularização em ambos os eixos (longitudinal e transversal). ....   | 52 |
| <b>Gráfico 6</b> | Comparação da carga máxima antes e após a descelularização em ambos os eixos (longitudinal e transversal). ....  | 53 |
| <b>Gráfico 7</b> | Comparação do estresse sob carga máxima antes e após a descelularização em ambos os eixos (longitudinal e transversal). ....   | 54 |
| <b>Gráfico 8</b> | Comparação do efeito do armazenamento no Módulo de Young entre os momentos zero, três e seis meses no eixo longitudinal.   |    |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
|                   | Apresentação dos três grupos: PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo.....  | 55 |
| <b>Gráfico 9</b>  | Comparação do efeito do armazenamento na carga máxima entre os momentos zero, três e seis meses no eixo longitudinal. Apresentação dos três grupos: PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo.....              | 56 |
| <b>Gráfico 10</b> | Comparação do efeito do armazenamento no estresse sob carga máxima entre os momentos zero, três e seis meses no eixo longitudinal. Apresentação dos três grupos: PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo..... | 57 |
| <b>Gráfico 11</b> | Comparação do efeito do armazenamento no módulo de Young entre os momentos zero, três e seis meses no eixo transversal. Apresentação dos três grupos: PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo.....            | 58 |
| <b>Gráfico 12</b> | Comparação do efeito do armazenamento na carga máxima entre os momentos zero, três e seis meses no eixo transversal. Apresentação dos três grupos: PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo.....               | 59 |
| <b>Gráfico 13</b> | Comparação do efeito do armazenamento no estresse sob carga máxima entre os momentos zero, três e seis meses no eixo transversal. Apresentação dos três grupos: PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo.....  | 60 |

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Gráfico 14</b> | Comparação do percentual de colágeno entre as traqueias <i>in natura</i> e descelularizadas. ....  | 62 |
| <b>Gráfico 15</b> | Comparação entre tempos zero, três e seis meses no três nos três grupos de armazenamento. Quantificação de percentual de colágeno por área. .... | 63 |

## **RESUMO**

---

## RESUMO

Guimaraes AB. *Avaliação da viabilidade estrutural de traqueias descelularizadas para engenharia de tecidos em até seis meses de armazenamento: estudo experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023. 125p.

**Introdução:** O tratamento cirúrgico definitivo das afecções da traqueia compreende a ressecção da área afetada com reconstrução primária. O fator limitante do tratamento cirúrgico é a extensão da ressecção, situada em 50% do comprimento longitudinal da traqueia em adultos e 30% em crianças. O transplante de via aérea vem sendo estudado como alternativa para os casos não ressecáveis. Os aloenxertos traqueais são gerados por engenharia tecidual, que combina processos de descelularização da traqueia do doador com subsequente recelularização por células tronco mesenquimais do próprio receptor. A técnica de descelularização é considerada como eficaz quando há remoção de todo o material celular e nuclear restando apenas a matriz extracelular, que é imunocompatível com o receptor. Recentemente validamos um protocolo de descelularização de via aérea em coelhos, entretanto o protocolo ainda não foi testado em traqueias de outras espécies de animais. Ademais, após a descelularização, os períodos seguros de armazenamento ainda não foram estudados. O presente estudo visa empregar a técnica de descelularização em segmentos de traqueia suínos, submetendo-os a métodos de avaliação de sua integridade e toxicidade por período de até 6 meses de armazenamento. **Objetivo:** Avaliar a viabilidade estrutural e toxicidade de scaffolds para enxertos traqueais em até seis meses após descelularização com três métodos distintos de armazenamento. **Método:** Foram obtidas 96 traqueias de um frigorífico, limpas e acondicionadas em solução com antibiótico e antimicótico por 12h. 12 traqueias foram separadas como grupo controle. 84 traqueias foram submetidas ao protocolo detergente-enzimático para descelularização de órgãos e tecidos. 12 traqueias descelularizadas foram analisadas imediatamente após a descelularização e o restante (72) foram divididas em três grupos: imersão em PBS a 4°C, imersão em álcool 4°C e criopreservação com congelamento lento e adição de crioprotetores. Para a confirmação da descelularização foi determinada a quantidade de DNA residual no scaffold, assim como foram preparadas lâminas de histologia para quantificação de restos nucleares permeados à matriz extracelular. A qualidade do scaffold gerado foi avaliada pela determinação de sua citotoxicidade, das propriedades biomecânicas obtidas no ensaio de tração e da quantificação de fibras de colágeno por análise histológica. Os possíveis efeitos do armazenamento sobre os scaffolds foram avaliados pela comparação das propriedades

biomecânicas e da quantificação de fibras colágenas após três e seis meses de armazenamento. **Resultados:** Os resultados mostraram que foi possível a obtenção de um scaffold de traqueia de porco adequadamente descelularizado, porém mesmo após as lavagens empregadas o mesmo apresentou citotoxicidade. Houve a manutenção das propriedades biomecânicas do scaffold após a descelularização e os métodos de armazenamento não comprometeram a viabilidade estrutural do scaffold após três ou seis meses de armazenamento. **Conclusão:** A descelularização de traqueia de porco gerou um scaffold com viabilidade estrutural. No entanto, o scaffold permaneceu citotóxico mesmo após as lavagens empregadas. A comparação entre os três protocolos de armazenamento, PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo não mostrou alterações na quantificação de colágeno, tampouco houve mudanças relevantes nas propriedades biomecânicas do scaffold. O simples armazenamento em solução de PBS a 4°C por seis meses não foi deletério para os scaffolds.

**Descritores:** Transplante; Traqueia; Bioengenharia; Estenose traqueal; Medicina regenerativa; Fenômenos biomecânicos; Criopreservação.

# **ABSTRACT**

---

## ABSTRACT

Guimaraes AB. *Evaluation of the structural viability of decellularized tracheas for bionengineering up to six months of storage: experimental study* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023. 125p.

**Introduction:** The definitive treatment for the tracheal diseases is based in the tracheal resection and primary anastomosis. However, the limitation for such technic is the length of tracheal resection, limited in 50% in adults and 30% in children. Tracheal transplantation is studied as an alternative the unresectable cases. The allografts are made through bioengineering, what combines descellularization of the donor trachea and posterior reseeding with receptor mesenchymal own cells. The goal of decellularization is to preserve only the extracellular matrix, that is immune compatible with the receptor. Recently, we validated a decellularization protocol for rabbit airway, nevertheless this protocol wasn't tested for other animals. Besides, after decellularization it's not stablished for how long could the scaffold be safely storage. This study evaluates the decellularization technic in segments of porcine tracheas. We tested their cytotoxicity and structural viability for a period up to six months of storage. **Objective:** To evaluate the structural viability and the cytotoxicity of the scaffold up to six months under three different protocols of storage. **Methods:** 96 tracheas were bought from a slaughter, cleaned and immersed in an antibiotic-antimycotic solution for 12h. 12 were analyzed as control. 84 were submitted to detergent-enzymatic treatment for decellularization. 12 were analyzed immediately after decellularization and the remaining (72) were dived into three groups: immersed in PBS at 4°C, immersed in alcohol at 4°C and cryopreservation with slow cooling protocol with cryoprotectants. To confirm decellularization, we quantified the residual amount of DNA, in addition the residual nuclear material inside the extracellular matrix with the analysis of histological slides. The quality of the scaffolds was accessed by the determination of its cytotoxicity, determination of its biomechanical properties in the uniaxial stress-strain test and quantification of collagen fibers in the histological analysis. The effects of storage were accessed by the determination of the biomechanical properties and quantification of collagen fibers after three and six months of storage. **Results:** It was possible to decellularize porcine tracheas, however the scaffold was cytotoxic even after the washes. After the decellularization the scaffold maintained the biomechanical properties of the trachea and the storage protocols didn't compromise the structural viability after three and six months of storage. **Conclusion:** The decellularization protocol produces a scaffold with structural viability. The scaffolds became cytotoxic despite the employed washes. The storage in PBS, alcohol and cryopreservation did not change the amount of

collagen or the biomechanical properties of the scaffold. The storage in PBS at 4°C for six months was not harmful for the scaffold.

**Descriptors:** Transplantation; Trachea; Bioengineering; Tracheal stenosis; Regenerative medicine; Biomechanical phenomena; Cryopreservation.

# INTRODUÇÃO

---

## 6 INTRODUÇÃO

As estenoses traqueias possuem alta prevalência em nosso meio. Tal fato decorre dos cuidados inadequados no manuseio da intubação prolongada, bem como da confecção tecnicamente inadequada e manutenção da traqueostomia. O tratamento cirúrgico definitivo compreende a ressecção com anastomose primária, sendo a extensão da ressecção o principal fator limitante. A limitação técnica de extensão de ressecção que permita a reconstrução primária com anastomose término-terminal consiste em aproximadamente 50% do comprimento de uma traqueia de adulto e 30% de comprimento de uma traqueia na população pediátrica <sup>1</sup>.

As neoplasias primárias da via aérea central são infrequentes. Cerca de 80% dos tumores traqueais são malignos, sendo a maioria representada pelo carcinoma epidermóide e o carcinoma adenoide cístico. A exemplo de outras neoplasias, os tumores tratados com ressecção com intenção curativa requerem margens livres de neoplasia que, na dependência da extensão, pode ser incompatível com a reconstrução primária. Isso se torna particularmente importante no carcinoma adenoide cístico, o qual frequentemente cursa com grandes extensões de invasão da submucosa da via aérea.

A proposta de substituir-se o segmento de traqueia por um enxerto homólogo possui problemas similares aos demais transplantes de órgãos sólidos, tais como a necessidade de imunossupressão, possibilidade de rejeição, problemas inerentes à mecânica intrínseca complexa do órgão, além

de vasculatura de distribuição segmentar, que impede as anastomoses vasculares. Esses fatores em conjunto tornam o alotransplante de traqueia cadavérica uma impossibilidade. Até os dias de hoje, não dispomos de um substitutivo traqueal adequado <sup>1</sup>.

Na investigação clínica e experimental dos substitutos traqueais orgânicos, destacam-se os compostos híbridos que combinam tecido traqueal autólogo e arcabouço de colágeno <sup>3,4</sup>, as traqueias geradas por engenharia de tecidos <sup>5</sup> e os enxertos repovoados com células do receptor *in situ* <sup>6</sup>.

Após o primeiro relato de alotransplante traqueal em humanos em 1979 <sup>7</sup>, somente nas duas últimas décadas retomou-se um grande interesse pelo tema. Diferentes métodos têm sido empregados para esse fim, desde a geração de via aérea a partir de engenharia de tecidos até a utilização de aloenxertos como dito anteriormente <sup>5,6</sup>.

A substituição traqueal utilizando enxertos gerados por engenharia tecidual combina um processo de descelularização seguido de repovoamento celular do enxerto com células do próprio receptor. A baixa imunogenicidade dos enxertos produzidos por esse método obvia a necessidade de imunossupressão. Isso é particularmente desejável uma vez que a imunossupressão eleva o risco de infecções, deiscências e a necessidade do uso de órteses traqueais, causa alterações metabólicas e endócrinas além de limitarem o seu emprego nos portadores de doenças neoplásicas.

Os arcabouços biológicos naturais (scaffolds) representados pelos segmentos de via aérea descelularizados servem ao propósito de prover uma estrutura tridimensional de suporte para a recelularização <sup>8,9</sup>. As traqueias

homólogas descelularizadas possuem as propriedades para esse fim, são biocompatíveis, possuem propriedades pró-angiogênicas, apresentam baixa imunogenicidade, devem ser não-carcinogênicas e, preferencialmente possibilitem o crescimento junto com o receptor, no caso de receptor infantil<sup>10</sup>.

A razão para a descelularização dos enxertos situa-se na necessidade de redução dos antígenos celulares alogênicos e xenogênicos, os quais são reconhecidos pelo hospedeiro como estranhos e, por conseguinte, ativam reação inflamatória e rejeição do tecido. O processo de descelularização objetiva a remoção de todo o material celular e nuclear, preservando-se a composição, atividade biológica e integridade mecânica da matriz extracelular restante.

Estudos demonstraram que a descelularização de traqueias murinas é possível e que a matriz extracelular possui a histoarquitetura da cartilagem e a integridade da membrana basal mantidas após o processo, tornando o scaffold adequado para recelularização ulterior por células tronco e epiteliais<sup>11</sup>. Os mesmos autores avaliaram a resposta in vivo dos ratos receptores de traqueia descelularizada. Após o implante subcutâneo da traqueia, observou-se que a matriz extracelular não induz rejeição ou reação de corpo estranho in vivo<sup>12</sup>.

A despeito de avanços na engenharia tecidual, há pouco embasamento na literatura para a determinação do melhor método de armazenamento dos scaffolds.

Observou-se que o molde traqueal sofre degradação natural e perde suas propriedades mecânicas após um ano de armazenamento em solução tamponada, meio esse que seria capaz de reproduzir a condição fisiológica tecidual, tornando-se assim inadequado após um ano para o eventual repovoamento celular e uso clínico <sup>13</sup>.

Estudo visando a preservação da matriz extracelular de válvulas cardíacas comparou o congelamento simples com a criopreservação com adição de solução crioprotetora. Observou-se que com a criopreservação com crioprotetor há uma melhor manutenção da microestrutura do colágeno e das fibras elásticas, sendo provavelmente essa a razão de um melhor resultado clínico a longo prazo <sup>14</sup>.

Outro grupo analisou o congelamento progressivo com adição de crioprotetor e o armazenamento em vapor de nitrogênio líquido (-196°C) para scaffolds de esôfago. Ao final do processo, os scaffolds esofágicos apresentavam um resultado biomecânico adequado e estariam aptos para repovoamento e posterior uso para a engenharia tecidual <sup>15</sup>.

Considerando-se o provável avanço da engenharia tecidual no tratamento de doenças graves da traqueia e a necessidade de disponibilização das neotraqueias no menor intervalo de tempo para uso clínico; vimos como uma limitação a ser vencida a pronta disponibilidade de scaffolds para repovoamento com células do receptor. Para isso, é de fundamental relevância a determinação do melhor e mais seguro método de armazenamento dos scaffolds.

Considerando a escassa documentação disponível sobre o armazenamento dos scaffolds traqueais propusemos a avaliação do processo de descelularização e armazenamento em até seis meses sob três diferentes protocolos de armazenamento. A efetividade do processo de descelularização proposto foi avaliado pela quantificação de DNA residual no scaffold, além da avaliação histopatológica da celularidade; a viabilidade do scaffold foi determinada pela mensuração das propriedades biomecânicas, determinação da citotoxicidade e quantificação de colágeno na matriz. A viabilidade dos scaffolds após serem submetidos à criopreservação ou armazenados em imersão de PBS ou álcool 70% em geladeira a 4oC, foi determinado pela quantificação de colágeno e mensuração das propriedades biomecânicas nos tempos de três e seis meses.

## **OBJETIVOS**

---

## 2 OBJETIVOS

### **Primário**

Avaliar a viabilidade estrutural e toxicidade de scaffolds para enxertos traqueais em até seis meses após descelularização com três métodos distintos de armazenamento.

### **Secundários**

Avaliar a eficácia do protocolo de descelularização em traqueias suínas.

Analisar a toxicidade do processo de descelularização dos scaffolds.

Analisar as propriedades mecânicas dos scaffolds em até seis meses de armazenamento.

Analisar a integridade da matriz extracelular dos scaffolds em até seis meses de armazenamento.

Comparar três métodos de armazenamento (imersão em PBS, imersão em álcool e criopreservação).

# REVISÃO DA LITERATURA

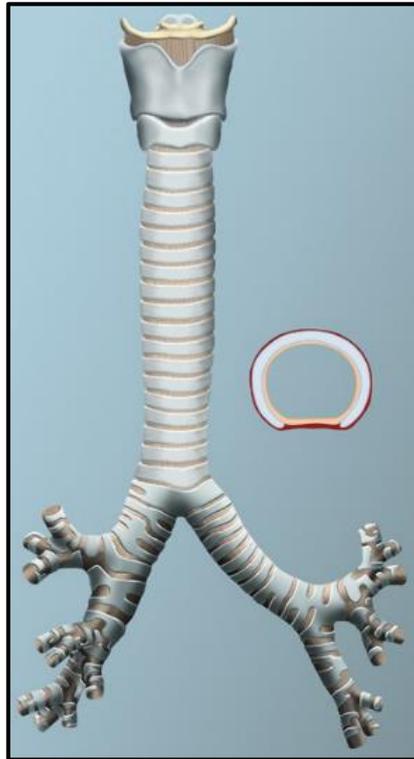
---

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A traqueia

A traqueia é um órgão que se estende do pescoço, desde a laringe, até a bifurcação brônquica, situada no interior do tórax. A borda inferior da cartilagem cricoide marca o início da traqueia, seu término dá-se na carina traqueal ao nível da quarta vértebra torácica. A traqueia tem o formato de ferradura com dois terços anterolaterais sustentados por anéis de cartilagem, que são conectados na porção posterior pela membrana, que é uma fina membrana composta pelo músculo trachealis. Desde o nascimento até a adolescência, a traqueia duplica de comprimento, triplica em diâmetro e aumenta mais de seis vezes em área transversa. Na idade adulta, a traqueia tem comprimento de 11,8 cm (10-13 cm em homens), diâmetro de cerca de 23 mm no plano coronal e 18 mm no sagital, sendo que em toda a sua extensão são contados de 16 a 20 anéis traqueais <sup>16,17</sup>.

A traqueia tem a função de conduzir o ar para a ventilação, depurar secreções, aquecer e umedecer o ar, além de proteger o pulmão de material exógeno por meio da tosse.



**Figura 1.** Representação da traqueia aspectos coronal e axial. FONTE: Monnier P. Pediatric Airway Surgery. 1a ed. Berlin Heidelberg. 2011.

A traqueia é composta por quatro camadas, mucosa, submucosa, cartilaginosa e adventícia. A mucosa é composta pelo epitélio cilíndrico ciliado respiratório, células basais, células caliciformes e células neuroendócrinas. A submucosa apresenta as glândulas exócrinas e músculo liso. A cartilaginosa é formada pela matriz extracelular hialina densa com condrócitos. Já a adventícia é composta por tecido conjuntivo frouxo, que conecta a traqueia à camada musculo-cutânea e ao tecido conjuntivo adjacente.

O suprimento vascular traqueal é pobre e segmentar, oriundo de ramos das artérias tiroidianas inferior, subclávia, intercostal suprema, torácica interna, inominada, além das brônquicas superior e média. A porção membranosa ainda recebe vascularização direta das esofagianas <sup>18</sup>.

### **3.2 Lesões complexas traqueais**

As lesões encontradas nas vias aéreas centrais constituem-se de estenose, malacia, laceração, fístula, vegetação ou infiltração da mucosa.

Sabidamente, quando essas lesões são longas e/ou associadas, serão necessárias ressecções mais extensas. A ressecção de mais do que aproximadamente 50% do comprimento traqueal em adultos e 30% em crianças pequenas não é factível <sup>1</sup>, apesar da utilização de manobras de liberação traqueal como rebaixamento laríngeo ou liberação do hilo pulmonar.

Dados da literatura recomendam que estenoses até 5 cm de extensão devam ser tratadas com anastomose término-terminal <sup>19</sup>, no entanto esse limite não carrega consigo a garantia de ausência de complicações no pós-operatório.

Um estudo do grupo da traqueia e vias aéreas do InCor-HCFMUSP mostrou que variáveis como ressecção traqueal prévia e extensão da ressecção maior do que 4 cm acompanham-se de uma razão de probabilidade de 49,1 e 5,1 para complicações no pós-operatório, respectivamente<sup>20</sup>

### 3.3 Estenose traqueal

As estenoses são as lesões benignas mais comuns. As estenoses pós-intubação laringotraqueal e pós-traqueostomia são as mais frequentes, com incidência documentada entre 0,6 e 21% <sup>21</sup>. Numa frequência menor encontram-se as idiopáticas, as secundárias às doenças autoimunes (poliangeíte granulomatosa, sarcoidose ou colite ulcerativa), as decorrentes da cicatrização pós-tuberculose ou pós-transplante de pulmão <sup>22</sup>.

As estenoses podem ter apresentação isolada, múltipla ou associada. A múltipla seria, por exemplo, um paciente portador de duas estenoses em níveis diferentes, sendo a primeira causada pelo balão do tubo orotraqueal e a segunda pelo balão da cânula de traqueostomia. A associada seria a apresentação de estenose traqueal com outra afecção, como uma fístula traqueoesofágica.

No nosso meio, o cuidado ao paciente com intubação orotraqueal ou traqueostomizado em ventilação mecânica é inadequado, usualmente por falta de cuidados nas unidades de terapia intensiva, que carecem de mão-de-obra especializada e possuem um quadro insuficiente de fisioterapeutas com formação em fisioterapia respiratória para o atendimento a todos os pacientes. Durante o período em que o paciente se encontra dependente de ventilação mecânica invasiva, não se consegue manter a pressão do balão em 20mmHg; tracionam-se demais as cânulas, porque não há suportes articulados adequados para os circuitos ou os pacientes permanecem agitados, fora do

plano de sedação adequado; os pacientes permanecem por longos períodos com CNE, sem a devida progressão para gastrostomia.

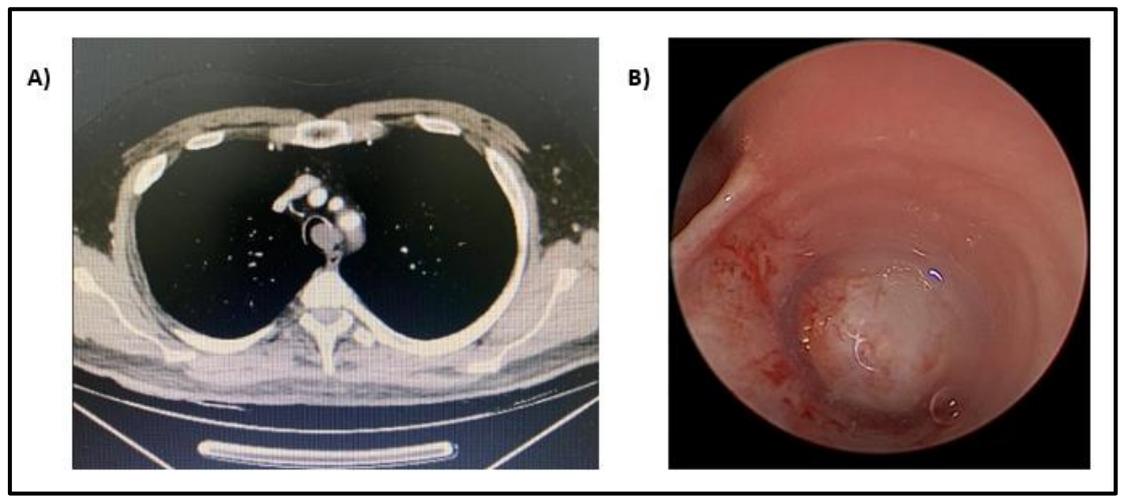
Os mecanismos envolvidos na patogenia da estenose traqueal por intubação fundamentam-se na lesão endoluminal da parede traqueal. A lesão limitada à mucosa traqueal é rapidamente recuperada pelo epitélio respiratório ciliado. Entretanto, quando a lesão atinge a submucosa e expõe a cartilagem, frequentemente evoluiu com depósito de colágeno e subsequente estenose traqueal <sup>19</sup>. Tanto os fatores de ação local como o trauma direto do tubo endotraqueal, a hiperinsuflação do balão, erros técnicos na confecção da traqueostomia e a proliferação bacteriana endoluminal, quanto os fatores sistêmicos como doença cardiovascular ou metabólica descompensadas e infecções contribuem para a lesão traqueal e conseqüente estenose. Existem os outros fatores que provavelmente modulam a resposta multifatorial de estenose subglótica, sendo o refluxo gastroesofágico de importância significativa. A presença de refluxo gastroesofágico, antes mesmo de se poder caracterizar como doença do refluxo gastroesofágico, já contribui de forma negativa para a evolução das afecções das vias aéreas e pulmonares. Provavelmente fatores intrínsecos ao suco gástrico estimulam a produção e depósito exagerado de colágeno, assim como, a mudança da microbiota nas vias aéreas superiores gera alteração na resposta imune local com conseqüente formação de granulomas <sup>21</sup>.

### 3.4 Tumores traqueais

Os tumores traqueais são afecções raras e de difícil manejo clínico-cirúrgico. Representam apenas 0,2% de todos os tumores do trato respiratório; sendo a sua frequência cerca de 40 vezes menor do que os tumores de laringe e 400 vezes menor que os tumores brônquicos. Em adultos, cerca de 90% dos tumores traqueais são malignos, desses, 60% dos casos são representados por carcinoma epidermóide (44,8%) e carcinoma adenoide cístico (16,3%)<sup>23</sup>. Outros tumores malignos mais raros são carcinoma indiferenciado, carcinoma de pequenas células, adenocarcinoma, carcinoma de grandes células e os sarcomas. Os tumores malignos apresentam uma sobrevida global de 27% em 5 anos. Quando o tumor se encontra localizado, a sobrevida chega a 46% em 5 anos. Dentre os tumores benignos mais frequentes situam-se o papiloma escamoso, o condroma, o tumor de células granulares, os hamartomas, os hemangiomas, os leiomiomas, os tumores neurogênicos e o adenoma pleomórfico<sup>24</sup>.

O diagnóstico das lesões envolve a broncoscopia flexível ou rígida, a tomografia de alta resolução e o PET scan. Geralmente, obtém-se material para exame anatomopatológico por meio da biópsia guiada por broncoscopia. O tratamento dos tumores traqueais compreende a ressecção com margens livres e anastomose término-terminal com ou sem radioterapia adjuvante, a depender da histologia tumoral. No entanto, a maioria dos tumores primários da traqueia são diagnosticados quando há surgimento de sintomas e já evoluíram para redução de aproximadamente 75% da luz traqueal. Nesses

casos a ressecção cirúrgica e a obtenção de margens seguras é muito difícil. Portanto, empregam-se as alternativas terapêuticas capazes de prolongar o tempo de evolução da doença como tunelização tumoral, radioterapia e aplicação de stents <sup>25,26</sup>



**Figura 2.** A) Tomografia de tórax evidenciando condroma traqueal com redução > 80% da luz. B) Imagem broncoscópica de tumor adenoide cístico brônquico causando obstrução completa da luz do brônquio principal direito. FONTE: Arquivo pessoal.

Os tumores traqueais secundários são heterogêneos com relação aos tipos histológicos e, provavelmente, devem ser mais prevalentes do que os tumores primários traqueais. O surgimento desses tumores dá-se por invasão após disseminação linfática para linfonodos mediastinais, por disseminação hematogênica e principalmente por invasão direta. Neoplasias de várias estruturas podem cursar com invasão traqueal direta, principalmente esôfago

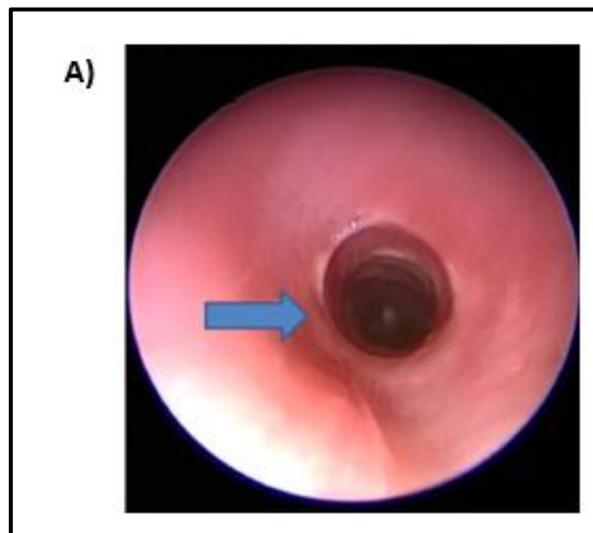
e tireoide. Já a disseminação hematogênica pode ser causada por carcinoma de células renais, câncer de cólon, câncer de mama e melanoma<sup>23,27</sup>.

Madariaga, em 2018, publicou uma revisão sistemática com 1.697 pacientes, que apresentavam câncer traqueal secundário, dos quais 74% apresentavam câncer de tireoide, 6% câncer de esôfago e 3% câncer de pulmão. Apesar de a invasão traqueal secundária caracterizar estágio avançado de doença, foi possível identificar 1.527 pacientes submetidos a algum tratamento invasivo, 50% à cirurgia (ressecção circunferencial, raspagem, confecção de “janela”, exenteração ou “debulking”) e 19% intervenções endoscópicas puras. Devido à heterogeneidade dos tipos histológicos e condutas, a sobrevida em 5 anos variou de menos de 10 a 100%<sup>27</sup>.

### **3.5 Malformações congênitas da traqueia**

A estenose traqueal congênita é uma entidade rara, com incidência de 1:64.500 nascidos-vivos, definida pela redução da luz traqueal em pelo menos 50% devido à presença de anel traqueal cartilaginoso completo, com ausência da porção membranosa, ou quase completo. A maioria dos pacientes com estenose traqueal congênita apresenta malformações cardíacas associadas, dentre elas o “sling” de artéria pulmonar esquerda. Aproximadamente 80% dos pacientes são assintomáticos ou apresentam sintomas leves, o restante apresenta estridor bifásico e desconforto respiratório grave. As alternativas

cirúrgicas vão variar conforme a extensão da estenose e do tamanho do paciente, sendo que as segmentares curtas permitem a ressecção e anastomose ou dilatação por balonamento, enquanto as longas demandam técnicas mais elaboradas como alargamentos traqueais com emprego de cartilagem ou pericárdio, além da traqueoplastia de deslizamento <sup>28</sup>. A mortalidade dessa afecção, mesmo com a correção cirúrgica, chega a 73% nos neonatos e cai para 19% nos bebês maiores de um mês <sup>29,30</sup>.



**Figura 3.** Imagem broncoscópica evidenciando anel traqueal completo em terço médio da traqueia (seta azul). FONTE: (Resheidat, 2019)

### **3.6 Tratamentos paliativos não operatórios para as lesões traqueais complexas**

Entende-se que a principal propriedade fisiológica da traqueia esteja relacionada com a passagem de ar entre as vias aéreas superiores e o

pulmão, portanto a imensa maioria das abordagens terapêuticas paliativas tentam garantir que a traqueia fique pérvia.

A abordagem inicial consiste na recanalização da luz traqueal a partir de dilatação ou desobstrução traqueal. Tanto a avaliação inicial quanto a abordagem terapêutica podem ser feitas com o uso dos broncoscópios flexível e rígido de forma isolada ou combinada. A principal característica do broncoscópio rígido é permitir a ventilação contínua do paciente enquanto diversos dispositivos podem ser empregados através da sua luz, incluindo o broncoscópio flexível.

A dilatação traqueal pode ser realizada com tubo de broncoscopia rígida, tubos orotraqueais convencionais ou balão hidrostático para dilatação traqueal. As desobstruções brônquicas, que consistem na remoção do tecido, que oclui a traqueia, podem ser feitas com laser, coagulação com plasma de argônio, eletrocautério ou braquiterapia <sup>31</sup>. Após a recanalização traqueal, pode-se colocar um stent para a manutenção da luz por um período mais longo.

### **3.7 Próteses traqueais**

O correto uso das próteses traqueais (stents) compreende os casos em que há a impossibilidade do tratamento cirúrgico definitivo e/ou em que a dilatação e desobstrução traqueal não foram suficientes.

O pioneiro no uso de stents traqueais foi William Montgomery, que em 1965, desenvolveu os tubos-T de silicone, que levam seu nome. Em 1990,

Jean François Dumon desenvolveu uma família de stents de silicone com aplicação exclusivamente endotraqueal. Em 1994, Lutz Freitag concebeu os moldes traqueobrônquios dinâmicos, que consistem de stents longos, em forma de Y para contemplar os brônquios e que possuem uma porção anterior semicircular rígida e uma posterior maleável, simulando a porção membranosa traqueal <sup>31</sup>.

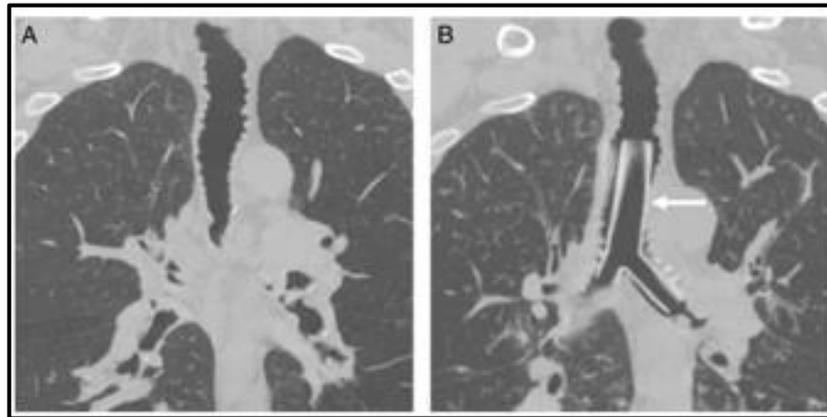
O uso das próteses promove alívio da dispneia, melhora da função pulmonar e da qualidade de vida, porém é acompanhado de altas taxas de complicações, principalmente quando usado por longos períodos em afecções benignas <sup>22,32,33</sup>.

O melhor cenário para uso de stents consiste nas estenoses pós-intubação/traqueostomia curtas, com menos de 1cm de comprimento. No entanto, após a retirada observa-se luz inadequada das vias aéreas em mais do que 50% dos casos. No caso de estenoses complexas a taxa de sucesso é ainda menor (17,6%), necessitando de múltiplas abordagens com trocas periódicas <sup>32</sup>.

O tempo de permanência do stent não está completamente determinado. Usualmente, os stents siliconados são retirados entre 6 e 18 meses, no entanto um estudo sugere que após um período de 12 meses obteve-se menor taxa de insucesso e necessidade de colocação de novo stent <sup>34</sup>.

Alguns autores defendem que os stents metálicos recobertos (nitinol) devem ser usados em todos os cenários clínicos, no entanto apresentam até 30% de complicações como intensa formação de tecido de granulação,

fratura, migração, formação de rolha de secreção, perfuração ou sangramento das vias aéreas <sup>32,35,36</sup>.



**Figura 4.** A) Corte coronal de tomografia de tórax evidenciando traqueobroncopatia osteocondroplásica complicada como traqueobroncomalácia. B) Aplicação de stent traqueal em Y (seta).

Atualmente dispomos de stents biodegradáveis de polydaxone, que mantem a sua resistência por seis semanas e são absorvidos em três a quatro meses <sup>37</sup>. Mesmo esses novos dispositivos não são isentos de problemas, como absorção antes da resolução da estenose e toxicidade dos produtos de degradação da órtese <sup>33</sup>.

### 3.8 Substitutos traqueais

Em 1950, Belsey propôs que a via aérea reconstruída deveria ser lateralmente rígida, longitudinalmente flexível, ter o lúmen impermeável ao ar e prover uma camada contínua de epitélio ciliado respiratório <sup>38</sup>.

Em 2022, Grillo complementou o conceito para substituto traqueal, o qual deveria ser biocompatível; não poderia ser tóxico; não poderia gerar resposta imune; não poderia causar ou induzir neoplasia; não deveria deslocar ou erodir as estruturas adjacentes; deveria permitir a reepitelização do seu lúmen com epitélio ciliado respiratório; não deveria estenotar ou contrair com o tempo; deveria resistir à colonização bacteriana; deveria evitar o acúmulo de secreções; e, eventualmente, crescer junto com o seu receptor, no caso de receptores bebês ou crianças <sup>1</sup>.

Os substitutivos traqueais podem ser divididos em cinco tipos: sintéticos, aloenxertos, transplante traqueal heterólogo, traqueia obtida por bioengenharia e substitutivo composto por tecido autólogo <sup>39</sup>.

Os materiais sintéticos testados para substituição traqueal mostraram-se inadequados e não devem ser utilizados como substitutivos traqueais por longo prazo. A falta de incorporação aos tecidos adjacentes gera granulomas e obstrução da luz traqueal. A incapacidade de depuração de microrganismos leva a formação de biofilme, infecção local, deiscência, migração e erosão das estruturas adjacentes como aorta ou tronco braquiocefálico, tal evento causa hemoptise maciça com alta letalidade. A colonização crônica desses dispositivos também causa halitose e aumento da expectoração purulenta.

Entre as décadas de 40 e 50, descreveu-se o uso de diversos materiais para substituição traqueal. Foram testados materiais duros como vitallium (liga metálica), vidro, aço inoxidável, polietileno, biocarbono e tantálio; mistos com associação de tantálio e fascia lata; ou plásticos como tela de marlex, ivalon,

dacron, teflon ou nylon <sup>40</sup>. Todas essas próteses caíram em desuso devido à alta morbi-mortalidade relacionada aos implantes.

Entre 1963 e 67, o grupo da Universidade de Toronto utilizou uma estrutura tubular feita com tela de Marlex para substituir longos segmentos de traqueia acometidos por tumor adenoide cístico em quatro pacientes, obtendo-se uma mortalidade relacionada à prótese de 50%, um paciente morreu devido à fístula da prótese com a artéria inominada e outro com deiscência distal e pneumonia <sup>41</sup>.

Nas décadas de 70 e 80, tentou-se o emprego das próteses de borracha de silicone flexíveis e um anel de Dacron<sup>®</sup>, a prótese de Neville, que podiam ser tubulares retas ou bifurcadas. No entanto, esses materiais apesar de mais flexíveis e da melhor incorporação ao organismo, também geraram taxas de complicações impeditivas. Toomes et al., em 1985, publicou uma série com nove pacientes operados em que oito morreram, seja de complicações precoces em até quatro semanas de pós-operatório, ou de complicações tardias, dentre elas, sangramento de fístula traqueo-inominada ou deiscência com mediastinite.

Em 2006, Azorin et al. publicaram a primeira experiência clínica com substituição da traqueia com um autoenxerto de aorta abdominal. Tal técnica teria as vantagens de prescindir de imunossupressão ou uso de fatores de crescimento, fatos desejados quando se pensa no tratamento de neoplasias traqueais. A cirurgia consistiu na retirada da aorta abdominal com interposição de uma prótese de Dacron<sup>®</sup>, ressecção do tumor traqueal e interposição do autoenxerto aórtico sustentado por um stent de Dumon na luz. Houve boa

evolução do paciente, retirada do enxerto após três meses, no entanto, o paciente complicou com pneumotórax e sepse de foco pulmonar aos seis meses de pós-operatório <sup>42</sup>.

Wurz et al. compararam os aloenxertos aórticos frescos (n:2) ou criopreservados (n:4) para a substituição de traqueias acometidas por tumores primários como mucoepidermóide ou adenoide cístico. A técnica consistia na ressecção ampla do tumor traqueal com substituição por enxerto aórtico envolto por um retalho vascularizado muscular e stent intraluminal, sem a utilização de imunossupressão no processo. Apesar de quatro dos seis pacientes estarem vivos no momento da publicação, o número de complicações graves, torna essa técnica de difícil incorporação clínica. Três dos quatro primeiros pacientes apresentaram fístula traqueoesofágica, um paciente evoluiu com isquemia de medula, houve um caso de necrose do enxerto com necessidade de retransplante. A longo prazo, documentou-se encurtamento e estreitamento dos enxertos, o que poderia levar a disfunção do mesmo. Dado positivo do estudo foi que os enxertos ficaram bem vascularizados e reepitelizados, com epitélio respiratório do receptor <sup>43</sup>.

Rose et al. em 1979, realizaram o primeiro transplante traqueal. Eles consideraram que a traqueia teria como característica própria do órgão ser pouco imunogênica e que o maior problema experimental encontrado nos transplantes traqueais seriam a isquemia e infecção. A técnica consistia no implante heterotópico no plano muscular adjacente à traqueia e após três semanas, já com revascularização, foi completado o transplante com

posicionamento do enxerto tópic. Foi apresentado o caso com seguimento de nove semanas sem rejeição ou infecção <sup>7</sup>.

Em 1996, Elliot et al. publicaram a experiência de substituição traqueal com enxerto descelularizado de traqueia cadavérica. A técnica consistia na captação da traqueia de cadáver, fixação em formol 5% por duas semanas, imersão por 56 dias em uma solução de timerosal, álcool e acetona. A avaliação histológica realizada à época revelou a morte de todas as células e a ausência de marcadores MHC. A cirurgia consistia na ressecção de toda a porção anterior da traqueia, da cricoide até a carina traqueal com consequente abertura de toda a estenose. Preservava-se a parede posterior da traqueia em toda a sua extensão, sobre a parede posterior era suturado o enxerto. Os cinco pacientes selecionados para serem submetidos a essa técnica apresentavam deterioração respiratória grave. Todos encontravam-se em ventilação mecânica e dois sob suporte de membrana de oxigenação extracorpórea e já tinham sido submetidos à traqueoplastia no mesmo tempo da correção do defeito cardíaco, pois apresentavam estenose traqueal congênita de segmento longo. Dos cinco pacientes operados, quatro sobreviveram. Entretanto todos necessitaram de manejos endoscópicos recorrentes para controle de granulomas, um apresentou estenose residual com necessidade de dilatação com balão e o único óbito foi decorrente de sepse por mediastinite <sup>44</sup>.

Também em 1996, Jacobs et al, publicou uma série de duas instituições com 24 pacientes operados pela técnica de transplante de homoenxerto cadavérico com resultados muito parecidos, com as mesmas limitações e 83%

de sobrevida <sup>45</sup>. Em 1999, o mesmo grupo publicou uma atualização dos resultados da técnica de homoenxerto com 31 pacientes operados, sendo três adultos, e sobrevida mantida em 83%. Nessa série, cinco pacientes necessitaram de uso prolongado de stent devido à traqueomalácia <sup>46</sup>. Em 2011, Propst et al. apresentaram a experiência de 10 pacientes submetidos a 14 homoenxertos, com sobrevida de 90% e taxa de decanulação de 60% <sup>47</sup>. Todos os trabalhos citados ressaltam que a melhor indicação para a técnica de homoenxerto seria para pacientes com defeitos traqueais longos, para os quais não haveria alternativa cirúrgica evidente, normalmente já submetidos a operações traqueais prévias. Destaca-se ainda a limitação para emprego da técnica em pacientes portadores de neoplasias, tendo em vista a necessidade de preservação da parede posterior traqueal para o adequado implante do homoenxerto.

Em 2010, Delaere et al. publicou o primeiro caso de transplante de enxerto traqueal com técnica híbrida. A técnica consiste na obtenção de traqueia cadavérica com implante da mesma no antebraço do receptor, nesse momento iniciava-se terapia imunossupressora oral. O enxerto permanecia por quatro meses no antebraço e nesse período havia a completa necrose do epitélio, seguido de repovoamento com enxerto de mucosa bucal do próprio receptor e revascularização por angioneogênese. Após esse período foi realizado o transplante ortotópico, com revascularização por microanastomose dos vasos radiais do enxerto livre aos vasos cervicais. A imunossupressão foi suspensa sete meses após o transplante <sup>48</sup>. Em 2021, Greaney publicou uma revisão sobre substitutivos traqueais em que

considerou a técnica híbrida de Delaere, conhecida como protocolo de Leuven, como a mais promissora até o presente momento, pois já havia sido realizada em 75 pacientes e dentre as estudadas era a que apresentava maior tempo de seguimento médio, cerca de 6 anos. No entanto, ressaltou a complexidade exigida devido às múltiplas abordagens, à necessidade de microanastomose e imunossupressão, o que limitaria sua utilização para o tratamento de afecções benignas <sup>49</sup>.

Em 2004, Macchiarini et al. publicaram a primeira experiência com enxerto de vias aéreas produzido por técnica de engenharia de tecidos *in vitro*. Uma matriz de jejuno de porco descelularizada foi repovoada com cultura celular do próprio receptor e foi gerado um pequeno enxerto para a cobertura de uma deiscência de coto brônquico após uma pneumonectomia direita <sup>10</sup>. Em 2008, o mesmo grupo publicou o primeiro transplante de um segmento de via aérea totalmente produzido por bioengenharia. Os desdobramentos dessa técnica serão por vezes abordados nos capítulos da presente Tese.

## **MÉTODOS**

---

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos

O protocolo experimental proposto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa Animal (CEUA-FMUSP, protocolo 172/15).

### 4.2 Obtenção das traqueias

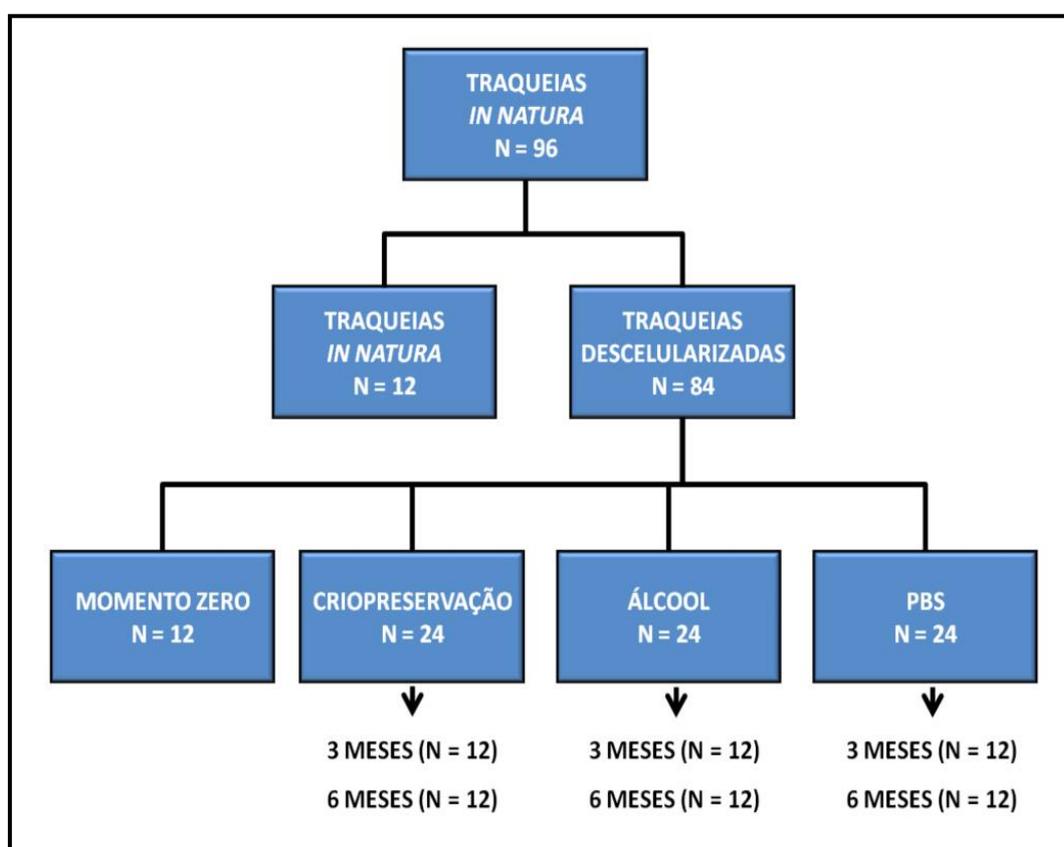
Para a realização do estudo foram adquiridas 96 peças de vias aéreas de um frigorífico da cidade de São Paulo. As peças consistiam de toda a via aérea do porco, habitualmente com laringe, traqueia, brônquios, cadeias linfáticas com linfonodos paratraqueais, esôfago e tecido conjuntivo adjacente. Os porcos tinham cerca de dez meses de idade, com peso de aproximadamente 100 kg. Imediatamente o sacrifício dos porcos, as peças de via aérea eram acondicionadas em gelo e transferidas para o laboratório. Ao chegarem no laboratório, as peças de vias aéreas eram lavadas e a traqueia era dissecada (Figura 1) de forma a obterem-se segmentos traqueais semelhantes em comprimento ( $59 \pm 8,2$  nm) e peso ( $8.69 \pm 1,7$  g). A seguir, os segmentos foram imersos em solução de antibiótico e antimicótico [penicilina 1%, estreptomicina 1% e anfotericina 1% (Sigma-Aldrich – A5955)] por 12h durante a noite na geladeira.



**Figura 1.** Traqueia de porco in natura

### 4.3 Divisão dos grupos

Dos 96 segmentos traqueais preparados, 12 foram separados para o grupo controle. Os outros 84 segmentos foram submetidos ao processo de descclularização. Após a descclularização foram separados 12 segmentos para a o grupo de traqueia descclularizada. Os 72 segmentos remanescentes foram então separados em três grupos (n= 24 em cada grupo), conforme protocolos de armazenamento: PBS, álcool e criopreservação. Dentre os 24 segmentos descclularizados de cada grupo, 12 após três meses e os 12 restantes após seis meses de armazenamento (Figura 2).



**Figura 2.** Organograma com a divisão dos grupos, Traqueias *in natura* (n:12), scaffold no momento zero (n:12), armazenamento em criopreservação (n:24), armazenamento em álcool (n:24) e armazenamento em PBS (n:24).

#### 4.4 Protocolo de descelularização traqueal

Os segmentos traqueais foram submetidos ao método de tratamento detergente-enzimático, um protocolo previamente publicado <sup>5</sup>. A descelularização consistia em dez ciclos de agitação por 48h em 30mL de detergente deoxicolato de sódio 2% (DS) (Merk, Millipore, Darmstadt, Germany) e ácido etilenodiamino tetra-acético 0,02% (EDTA; Sigma-Aldrich,

MO, USA) numa incubadora a 36°C com 180 rpm seguido de três lavagens com solução tampão de fosfato (PBS) por 10 minutos. Ao final, os arcabouços foram imersos em 30mL de solução de DNase [30 µg/mL de DNase I (Roche – 11284932001), 3 µL de DNase + 1 mL of 1,3 mM MgSO<sub>4</sub> e 2 mM CaCl<sub>2</sub>) a 37°C e submetidos à agitação constante por 12h.

A descelularização dos segmentos de traqueia de porco gerou um scaffold com as mesmas dimensões do segmento *in natura*.

#### 4.5 Métodos de armazenamento

**PBS:** Os scaffolds foram imersos em 30 mL de solução tampão de fosfato (PBS) em tubos Falcon de 50 mL e armazenados na geladeira a 4°C.

**Álcool:** Os scaffolds foram imersos em 30 mL de álcool 70% em tubos Falcon de 50 mL e armazenados na geladeira a 4°C.

**Criopreservação com congelamento lento (SCM):** Os scaffolds foram imersos em 30 mL de meio composto por 90% de soro fetal bovino (BFS) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Me<sub>2</sub>SO; Sigma, UK) em tubo Falcon de 50 mL. O congelamento lento e progressivo ocorreu numa taxa de -1°C/min até atingir-se -80°C. O congelamento progressivo foi obtido pela acomodação do tubo Falcon dentro de um contêiner Nalgene em um freezer a -80°C por 12h durante a noite. Pela manhã, os scaffolds foram transferidos e imersos em tanques com nitrogênio líquido a -196°C. Para a realização do descongelamento os tubos foram transferidos para um freezer a -80°C por 45 minutos, seguido de aquecimento por 10 minutos em banho-maria a 37°C. O

DMSO remanescente foi lavado com banhos com 30 mL de 0,5 M seguido de 0,25 M de manitol, e por fim PBS.

Metade dos scaffolds de cada grupo foi analisada após três meses e o restante após 6 meses de armazenamento.

#### **4.6 Quantificação de DNA residual**

A eficácia da descelularização foi determinada pela quantificação de DNA residual presente no scaffold.

Após o processo de descelularização foram obtidos fragmentos do scaffold e submetidos à liofilização em um liofilizador de bancada (Thermo Electron Corporation, modelo D-115, Milford, MA, EUA) por 12h. Do scaffold traqueal liofilizado foram separados 300 mg, os quais foram digeridos por solução com 333  $\mu$ L de proteinase K (3 mL de solução tampão, 300  $\mu$ L de SDS 10%, 30  $\mu$ L de proteinase K) a 55°C durante uma noite. Pela manhã, as amostras foram divididas em seis tubos de Eppendorf com 555  $\mu$ L cada. A cada tubo Eppendorf foram adicionados 222  $\mu$ L de solução saturada de 6 M de NaCl e 777  $\mu$ L de clorofórmio, agitados manualmente e incubados por uma hora no agitador. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm a 20°C por 10 minutos, 600  $\mu$ L do sobrenadante com DNA foram transferidos para um novo tubo, e adicionados 600  $\mu$ L de etanol 100% gelado. Os tubos foram então centrifugados a 13.000 rpm a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, adicionado 1 mL de álcool 70% e novamente centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante foi descartado, os tubos foram abertos e

postos para descansar em pé em temperatura ambiente por uma hora. O DNA foi então diluído em 100 µL de água milli-q, as amostras foram aquecidas a 55°C por 5 minutos para promover a dissolução da pelota de DNA. As amostras foram submetidas ao turbilhão, e 2 µl da solução foram quantificadas no espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop one, Waltham, MA, USA). A massa de DNA dos seis tubos foi somada e dividida por 300, o resultado foi apresentado em ng/mg de tecido seco.

#### **4.7 Análise histopatológica de material celular remanescente após a descelularização**

Uma fatia de cada traqueia *in natura* e scaffold foi cortada, imersa em formaldeído 20% para confecção de lâmina de histologia. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Optou-se por quantificar sob magnificação de 100x o número de células epiteliais por micrômetro de comprimento de membrana basal antes e após a descelularização. Foi gerado um índice de células remanescentes sobre o encontrado *in natura*. Optou-se também pela determinação de número de condrócitos por área de cartilagem sob magnificação de 400x. Neste caso, considerou-se positivo para condrócito a presença de material nuclear dentro de lacunas de condrócitos na matriz extracelular cartilaginosa. Da mesma forma, o valor gerado seria apresentado em números de núcleos por campos.

#### 4.8 Determinação do limiar de toxicidade do detergente

Para a determinação do limiar de citotoxicidade do detergente foi utilizado o Cell Count Kit-8 (Sigma-Aldrich, EUA). Esse teste molecular colorimétrico mostra a atividade mitocondrial, a qual é quantificada pela absorbância em 450 nm de comprimento de onda no espectrofotômetro (BioTek, model Elx808, Santa Clara, CA, EUA). Inicialmente, uma concentração de 5.000 células BEAS-2B [linhagem celular epitelial brônquica humana; BEAS-2B (ECACC 951022433)] foi semeada em uma placa de 96 poços revestida com colágeno Collagen I (0,06 mg/mL PureCol, Advanced BioMatrix, Carlsbad, CA, EUA) e meio brônquico-epitelial (BEGM, Lomza, Basel, Suíça). A quantificação de células foi feita na câmara de Neubauer por meio da diluição de 10  $\mu$ L de células ressuspendidas com azul tripano. Após 24h de semeadura, foi avaliada visualmente a adesão celular no microscópio invertido. Com a plotagem de cinco pontos (5.000, 2.500, 1.250, 625 e 313 células/poço), foi gerada uma curva padrão de concentração celular. A qualidade da reação foi confirmada pelos poços branco, controle positivo e negativo.

Para a determinação do limiar de toxicidade do DS, foram preparadas seis concentrações progressivas de detergente (0,0625%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1% e 2%). O desafio foi realizado com a adição de 100  $\mu$ L da solução aos poços com 5.000 células por 8 horas.

Após quatro horas na incubadora, a cada poço foram adicionados 10  $\mu$ L de sal de tetrazólio hidrossolúvel. O sal de tetrazólio permanece no meio

extracelular e torna a solução alaranjada conforme o contato com a superfície de células vivas. O sobrenadante foi transferido para uma nova placa de 96 poços e quantificado no espectrofotômetro de 450 nm de comprimento de onda.

Cada amostra foi testada em triplicata. A regressão linear obtida na curva padrão foi usada para o cálculo da quantidade de células em cada poço. A viabilidade celular encontrada após cada desafio foi apresentada em percentual. A citotoxicidade foi considerada como a diferença de 100% menos a viabilidade celular encontrada e foi expressa em percentual.

A norma ISO 10993-1:2009 (Padrão, I. Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos) define 70% de viabilidade celular como limiar de citotoxicidade (6). Utilizamos essa norma como referência para o estudo.

#### **4.9 Determinação da citotoxicidade do scaffold**

Para a determinação da citotoxicidade do scaffold foi utilizado o Cell Count Kit-8 (Sigma-Aldrich, USA). Esse teste molecular colorimétrico mostra a atividade mitocondrial, a qual é quantificada pela absorbância em 450 nm de comprimento de onda no espectrofotômetro. Inicialmente, uma concentração de 5.000 células BEAS-2B [linhagem celular epitelial brônquica humana; BEAS-2B (ECACC 951022433)] foi semeada em uma placa de 96 poços revestida com colágeno Collagen I (0,06 mg/mL PureCol, Advanced BioMatrix, Carlsbad, CA, EUA) e meio brônquico-epitelial (BEGM, Lomza, Basel, Suíça). A quantificação de células foi feita na câmara de Neubauer por

meio da diluição de 10  $\mu$ L de células ressuspendidas com azul tripano. Após 24h de semeadura, foi avaliada visualmente a adesão celular no microscópio invertido. Com a plotagem de cinco pontos (5.000, 2.500, 1.250, 625 e 313 células/poço), foi gerada uma curva padrão de concentração celular. A qualidade da reação foi confirmada pelos poços branco, controle positivo e negativo.

Para a determinação da citotoxicidade do scaffold, foi produzido um homogeneizado. Primeiro, os scaffolds foram lavados com 30 mL de etanol 70% na incubadora por 12h. A seguir, lavados mais dez vezes diariamente com 30 mL de PBS na incubadora. As amostras foram então cortadas com uma faca molde cilíndrica com área de 0,33 cm<sup>2</sup> (correspondente à área do fundo do poço da placa de 96 poços). Dois pedaços pesando aproximadamente 75 mg foram separados para cada ensaio de citotoxicidade. As amostras foram moídas no homogeneizador (Ultra Stirrer, model 80, Índia) com 1 mL de PBS, submetidas à centrifugação e então aspirado o sobrenadante. O desafio foi realizado com a adição de 100  $\mu$ L do sobrenadante aos poços com 5.000 células por oito horas.

Após quatro horas na incubadora, a cada poço foram adicionados 10  $\mu$ L de sal de tetrazólio hidrossolúvel. O sal de tetrazólio permanece no meio extracelular e torna a solução alaranjada conforme o contato com a superfície de células vivas. O sobrenadante foi transferido para uma nova placa de 96 poços e quantificado no espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm.

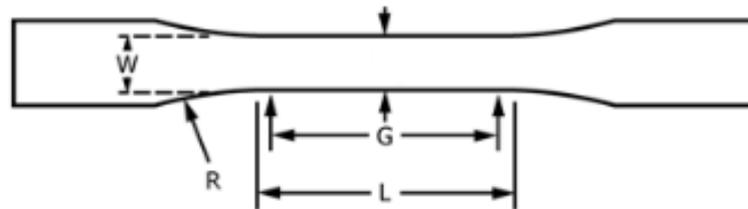
Cada amostra foi testada em triplicata. A regressão linear obtida na curva padrão foi usada para o cálculo da quantidade de células em cada poço. A viabilidade celular encontrada após cada desafio foi apresentada em percentual. A citotoxicidade foi considerada como a diferença de 100% menos a viabilidade celular encontrada e foi expressa em percentual.

A norma ISO 10993-1:2009 (Padrão, I. Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos) define 70% de viabilidade celular como limiar de citotoxicidade (6). Utilizamos essa norma como referência para o estudo.

#### **4.10 Determinação das propriedades biomecânicas da traqueia e do scaffold**

Para a determinação das propriedades biomecânicas das traqueias de porco *in natura* e dos scaffolds foi utilizado o ensaio de tração, o qual foi realizado no aparelho padrão (Instron 3365, Norwood, MA, EUA). Os scaffolds foram testados imediatamente após a descélularização e após três e seis meses de armazenamento sob os três protocolos testados. Os dados foram gerados pelo programa de computador Bluehill 3. Os espécimes foram cortados longitudinalmente no meio da parede membranosa traqueal, abertos para se tornarem planos. Realizaram-se os testes de tensão-deformação seguindo a norma ASTM D638-14 (Método padrão para teste das propriedades tênses dos plásticos), os testes foram executados em ambos os eixos da traqueia (longitudinal e transversal) <sup>62</sup>. As amostras foram obtidas da parede anterior da traqueia e cortadas nos eixos longitudinal e transversal

com uma faca molde com formato em “gravata borboleta” com tamanho V, descrito na norma.



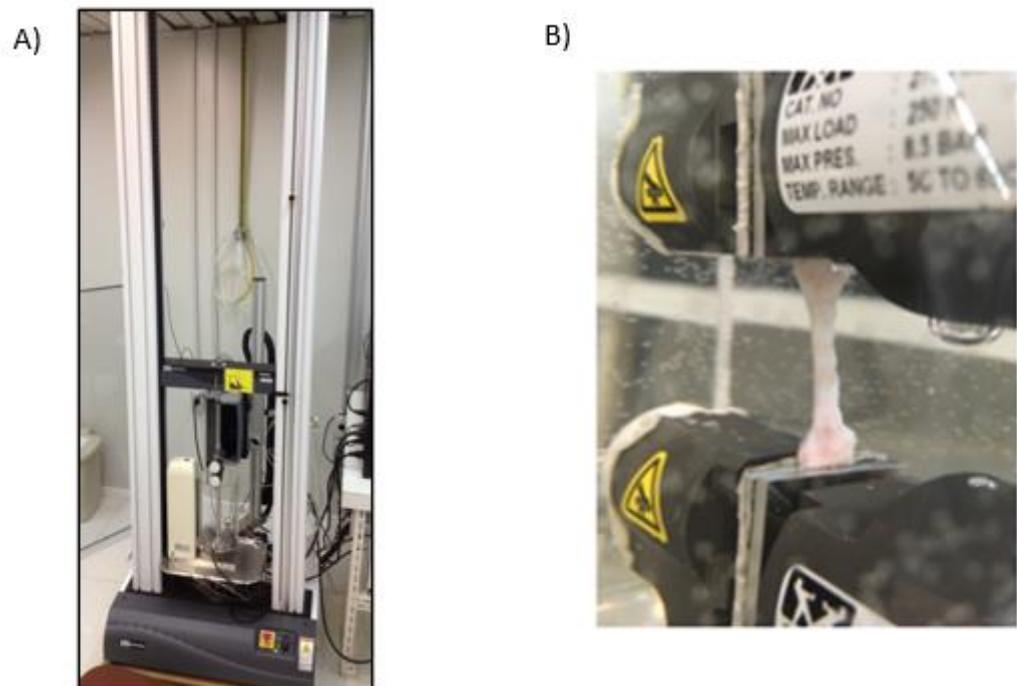
**Figura 7.** Corpo de prova tipo V. ( $W= 3,18$  mm,  $L= 9,53$  mm,  $G= 7,62$  mm,  $R= 12,7$  mm)

Devido às irregularidades das amostras, com as faixas de cartilagens mais espessas do que o tecido conjuntivo intercartilagenoso, calculou-se a área de secção transversa do espécime a partir da medida do seu peso e densidade. Com esses dados, pode-se obter o volume (densidade = massa/volume), o que nos permite determinar a área da secção transversa (volume= área x altura).

Os espécimes obtidos no eixo transversal eram constituídos basicamente por um anel cartilagenoso. Os espécimes obtidos no eixo longitudinal eram compostos por cartilagem e tecido conjuntivo denso.

O ensaio de tração era realizado com a taxa de distração de 10 mm/min em condição fisiológica, com a amostra imersa em solução salina a 36°C para evitar a desidratação e manter o controle da temperatura.

A curva de tensão-deformação foi gravada pelo programa de computador Bluehill 3, o qual gerou uma tabela com os dados brutos: módulo de Young em Mpa, carga máxima em N e estresse na carga máxima em Mpa.



**Figura 8.** A) Aparelho padrão Instron 3365 para ensaio de tração

B) Detalhe do corpo de prova

#### 4.11 Quantificação do colágeno

Foi cortada uma fatia circunferencial de cada amostra do grupo controle, traqueia descelularizada e scaffold três e seis meses de armazenamento. As fatias foram imersas em formaldeído 20% e processadas para obtenção de lâminas de histologia, as quais foram coradas com

picrosirius. As lâminas foram então digitalizadas no aparelho Scanscope System (Aperio Technologies, CA, EUA) (Figura 6). Utilizando-se do software Case Viewer (CaseViewer 2.4, 3DHISTECH, Budapest, Hungary) foram tiradas dez fotos em magnificação de 400x da área correspondente à submucosa da traqueia *in natura*. As fotografias foram analisadas no software Image Pro Plus (Image Pro Plus V9.0, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Como as fibras colágenas ficam coradas em tons de rosa a vermelho pelo picrosirius, foi definida uma paleta de cores em tons de vermelho para que o programa de computador contasse o número de píxeis correspondente à área corada por área de tecido da fotografia. Os resultados foram apresentados em percentual de colágeno/campo.

#### **4.12 Análise estatística**

##### **4.12.1 Estatística descritiva**

As análises descritivas para os dados quantitativos que apresentaram distribuição normal foram realizadas, apresentado as médias acompanhadas dos respectivos desvios padrão (+dp). Para os dados quantitativos sem distribuição normal, foram expressos através das medianas e intervalo interquartil IQ (25 – 75%). Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados respectivamente, com o teste de Shapiro-Wilk e com o teste de Levene.

#### **4.11.2 Estatística inferencial**

Para as variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal onde foram analisados dois fatores (grupo e tempo), foi utilizada a Análise de Variância de Duplo Fator (ANOVA), e quando foi necessária a realização de comparações múltiplas de médias, foi utilizado o teste de Dunnett. Quando a variável não apresentou distribuição normal, recorreremos ao teste Kruskal-Wallis para o fator grupo e quando foi necessário a realização de comparações múltiplas, foi utilizado o teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas no programa de computador Statistic Package for Social Scienses (SPSS 21 version for Windows). O nível de significância foi definido em  $\alpha=0,05$ .

## **RESULTADOS**

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Quantificação de DNA residual

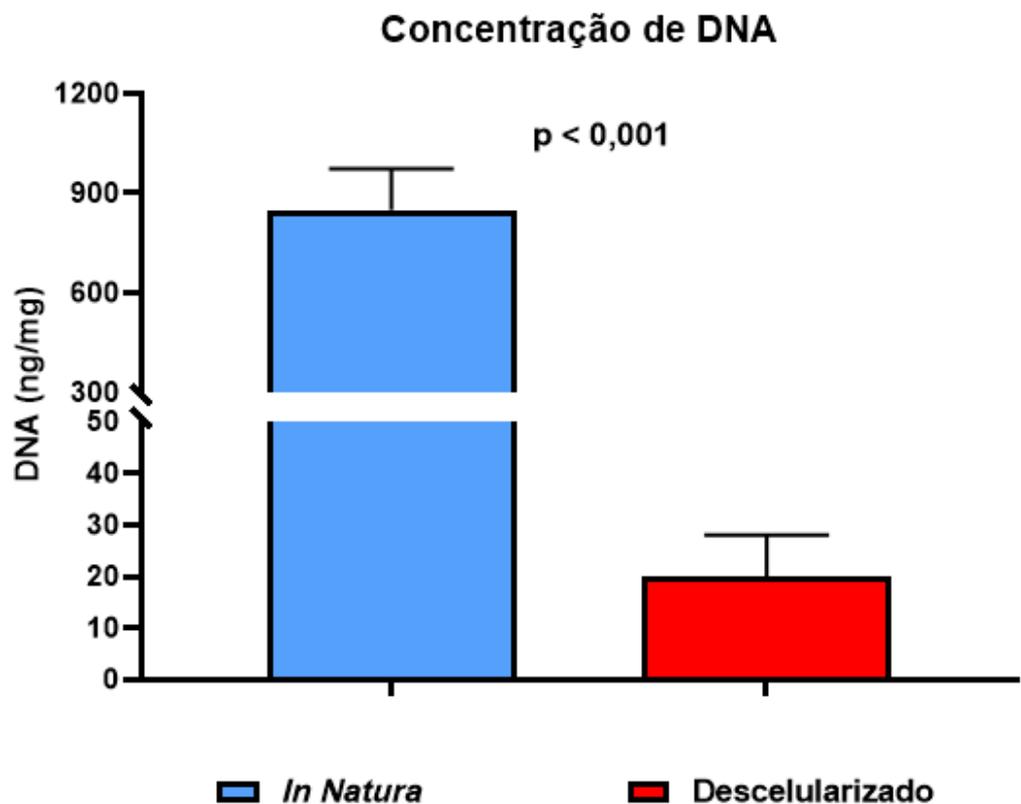
Para assegurar a adequada descelularização dos segmentos traqueais, foi feita a quantificação de DNA residual nos scaffolds.

Observou-se uma queda significativa da quantidade de DNA com uma redução de  $850 \pm 123$  ng/mg para  $20 \pm 8$  ng/mg de tecido seco ( $p < 0.001$ ) (Gráfico 1).



**Figura 9.** Segmento traqueal descelularizado (scaffold).

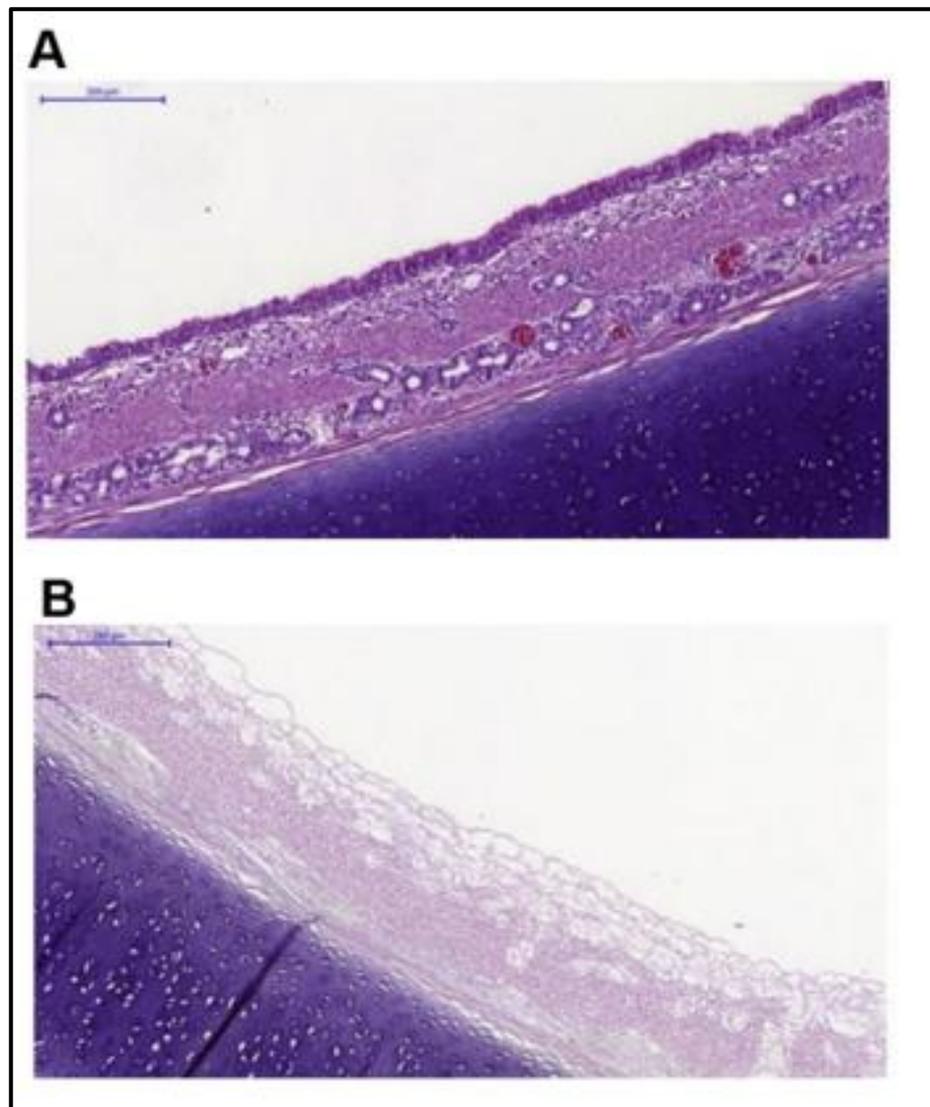
**Gráfico 1.** Comparação da quantidade de DNA na traqueia *in natura* e scaffold.



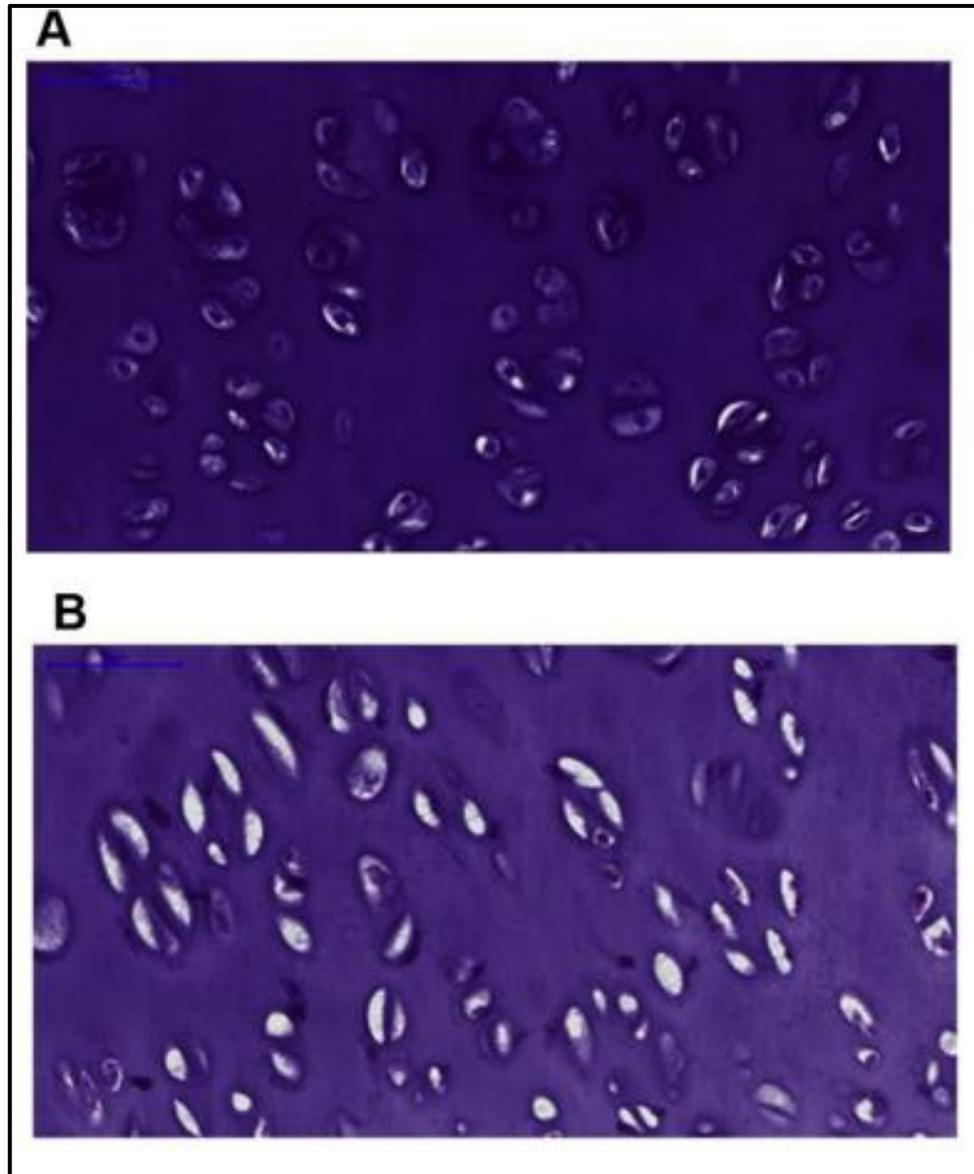
## 5.2 Análise histopatológica de material celular remanescente após a descelularização

A avaliação histopatológica sob magnificação de 100x, após a descelularização, mostrou completa desnudação do epitélio e das glândulas da submucosa (Figura 10), não sendo possível a identificação de células epiteliais sobre a lâmina própria.

Na porção cartilaginosa, sob magnificação de 400x, observou-se uma significativa redução de material nuclear por campo ( $73,7 \pm 12$  núcleos vs  $26 \pm 8$  núcleos,  $p < 0,001$ ) (Figura 2) (Gráfico 2).

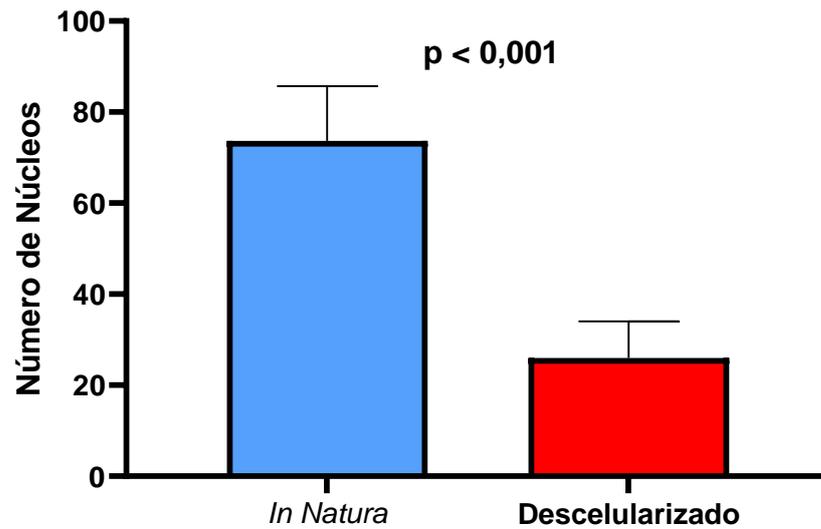


**Figura 10.** A) Lâmina de histologia mostrando epitélio traqueal. B) Lâmina de scaffold mostrando ausência de cobertura epitelial (Coloração HE, magnificação 100x).



**Figura 11.** A) Lâmina de traqueia do grupo controle evidenciando condrócitos normais. B) Lâmina de scaffold evidenciando lacunas acelulares na matriz extracelular da cartilagem. (Coloração HE, magnificação de 100x)

**Gráfico 2.** Comparação do percentual material nuclear residual identificado nas lacunas da matriz extracelular entre as traqueias *in natura* e scaffold.



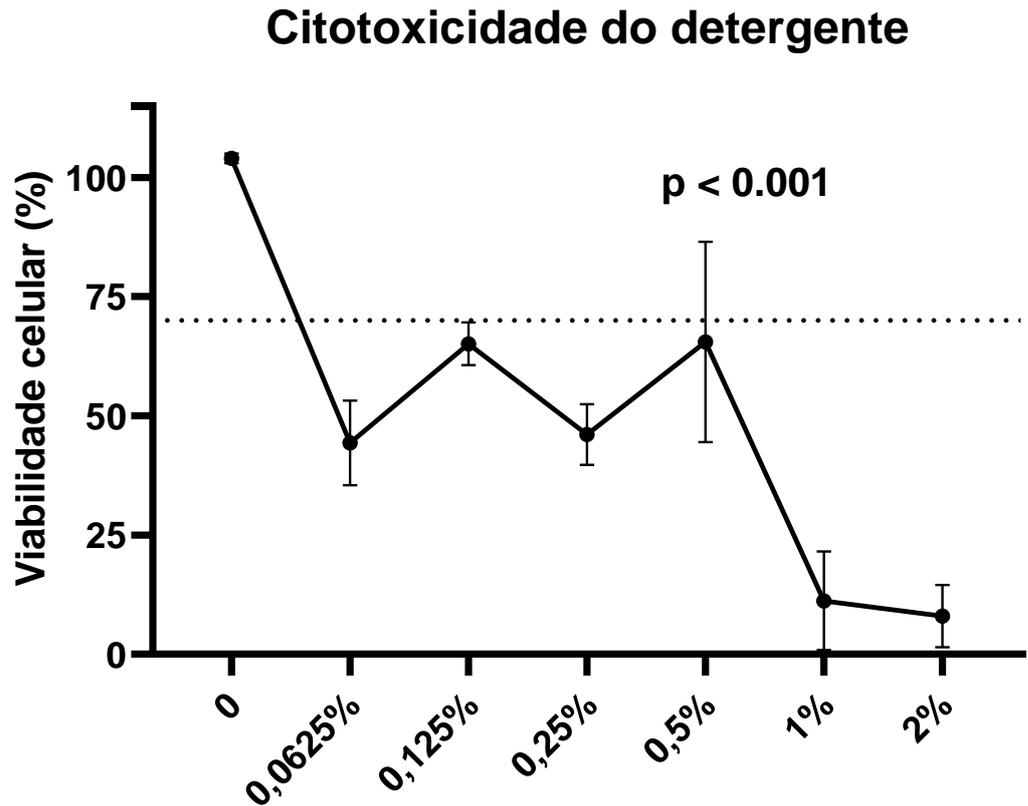
### 5.3 Determinação do limiar de toxicidade do detergente

Por meio da determinação da viabilidade celular obtida após o desafio com diferentes concentrações de detergente, obtivemos que o limiar de citotoxicidade do detergente desoxicolato de sódio corresponderia a uma concentração menor do que 0,065%. Essa foi a menor concentração do detergente testada (Gráfico 3).



**Figura 12.** Placa de 96 poços após desafio com diferentes concentrações de DS. Coloração crescente da cor laranja (3 primeiras fileiras de poços) traduz a viabilidade celular.

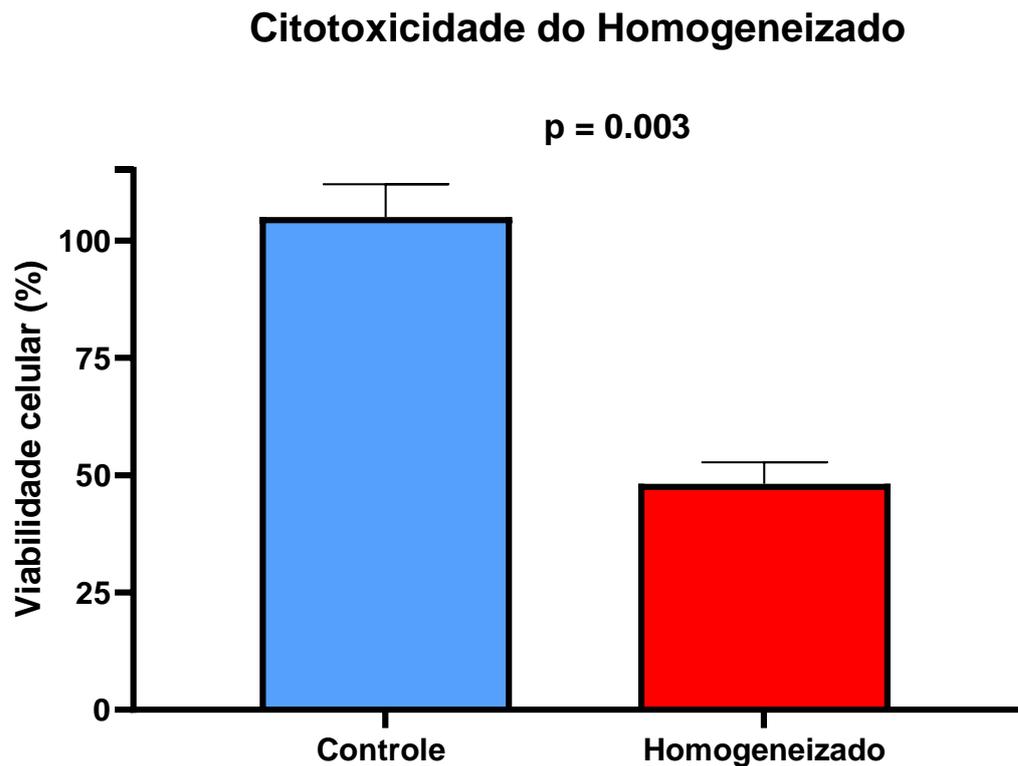
**Gráfico 3.** Curva de citotoxicidade do detergente desoxicolato de sódio. Linha tracejada indica o limiar de 70% de viabilidade celular e encontra-se num ponto abaixo da concentração de 0,065%.



#### 5.4 Determinação da citotoxicidade do scaffold

Por meio da determinação da viabilidade celular obtida após o desafio com o homogeneizado, concluímos que o scaffold gerado após o tratamento detergente-enzimático das traqueias de porco apresenta citotoxicidade, promovendo a viabilidade celular de 42,7% (Gráfico 4).

**Gráfico 4.** Comparação da citotoxicidade do homogeneizado com o controle negativo por meio da determinação do percentual da viabilidade celular.

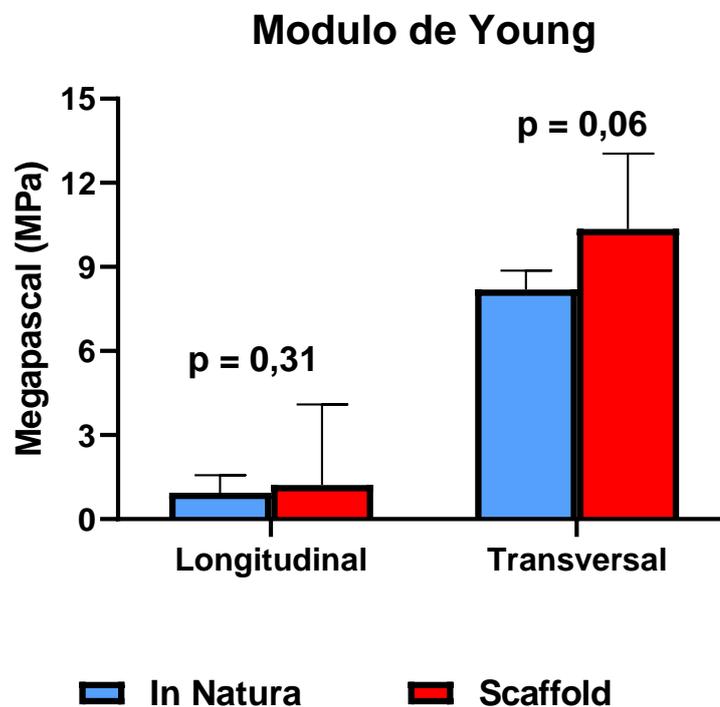


### 5.5 Determinação do efeito da descelularização sobre as propriedades biomecânicas da traqueia

Quando analisamos as propriedades biomecânicas do scaffold e comparamos com os dados obtidos das traqueias *in natura*, percebemos que o processo de descelularização não gera modificação significativa no módulo de Young (módulo de elasticidade) nos dois eixos estudados.

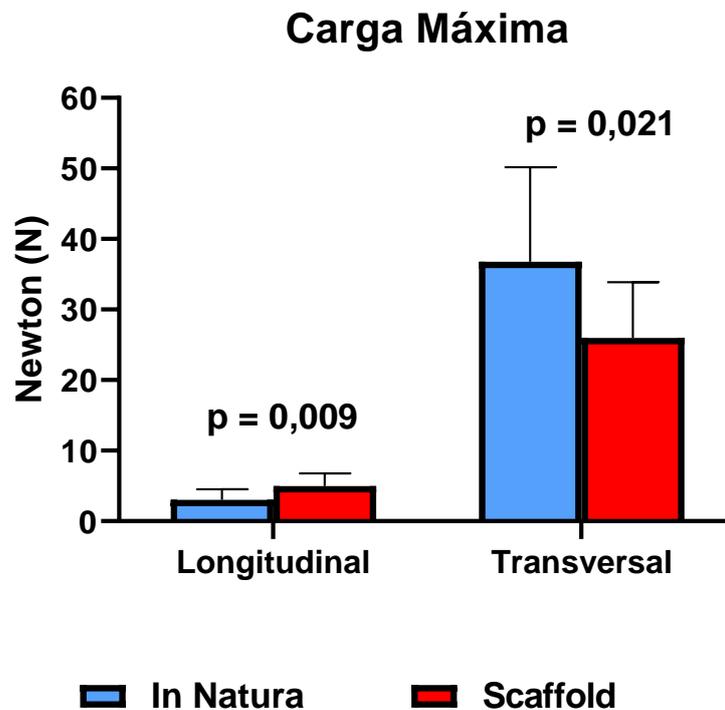
No eixo longitudinal, encontramos  $0,94 \pm 0,61$  MPa vs.  $1,21 \pm 2,87$  Mpa,  $p=0,31$ . No eixo transversal, encontramos  $8,18 \pm 0,61$  MPa vs.  $10,35 \pm 2,68$  MPa,  $p=0,06$  (Gráfico 5).

**Gráfico 5.** Comparação do módulo de Young antes e após a descelularização em ambos os eixos (longitudinal e transversal).



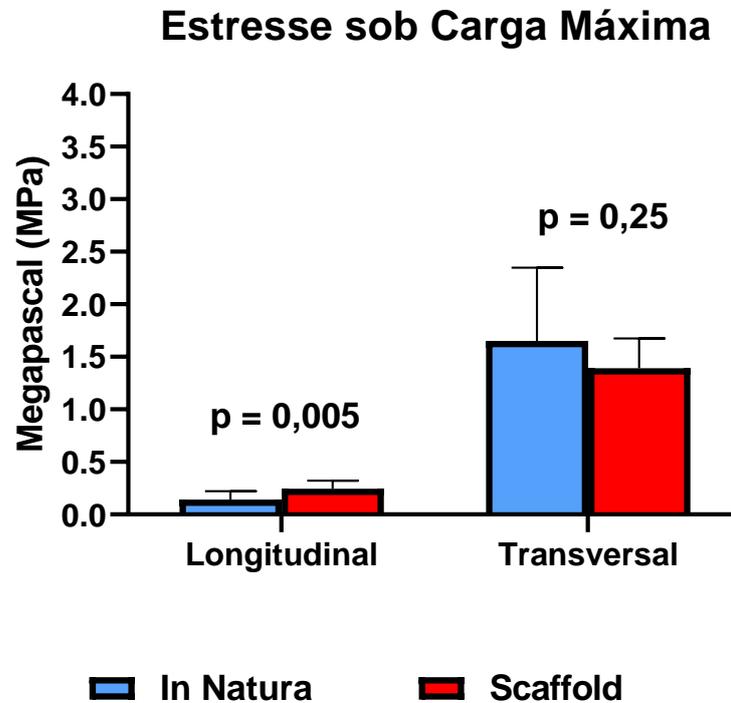
Ao avaliarmos a carga máxima, observamos que no eixo longitudinal há um aumento significativo da carga máxima ( $3,03 \pm 1,47$  N vs.  $4,99 \pm 1,78$  N,  $p= 0,009$ ). Já no eixo transversal ocorre uma queda nos valores ( $36,79 \pm 13,39$  N vs.  $25,98 \pm 7,87$  N,  $p= 0,002$ ). Esse efeito reflete as mudanças na matriz extracelular na cartilagem (eixo transversal) e no tecido conjuntivo denso (eixo longitudinal) (Gráfico 6).

**Gráfico 6.** Comparação da carga máxima antes e após a descelularização em ambos os eixos (longitudinal e transversal).



Ao analisarmos o estresse sob carga máxima, a mesma tendência pode ser notada, há um aumento do estresse no eixo longitudinal ( $0,14 \pm 0,08$  MPa vs.  $0,24 \pm 0,07$  MPa,  $p=0.005$ ), porém no eixo transversal o efeito da queda não chega a atingir diferença significativa ( $1,65 \pm 0,69$  MPa vs.  $1,39 \pm 0,28$  Mpa,  $p=0,25$ ) (Gráfico 7).

**Gráfico 7.** Comparação do estresse sob carga máxima antes e após a descelularização em ambos os eixos (longitudinal e transversal).



### 5.6 Determinação do efeito do armazenamento sobre as propriedades biomecânicas do scaffold sob os três diferentes protocolos: PBS, álcool e criopreservação

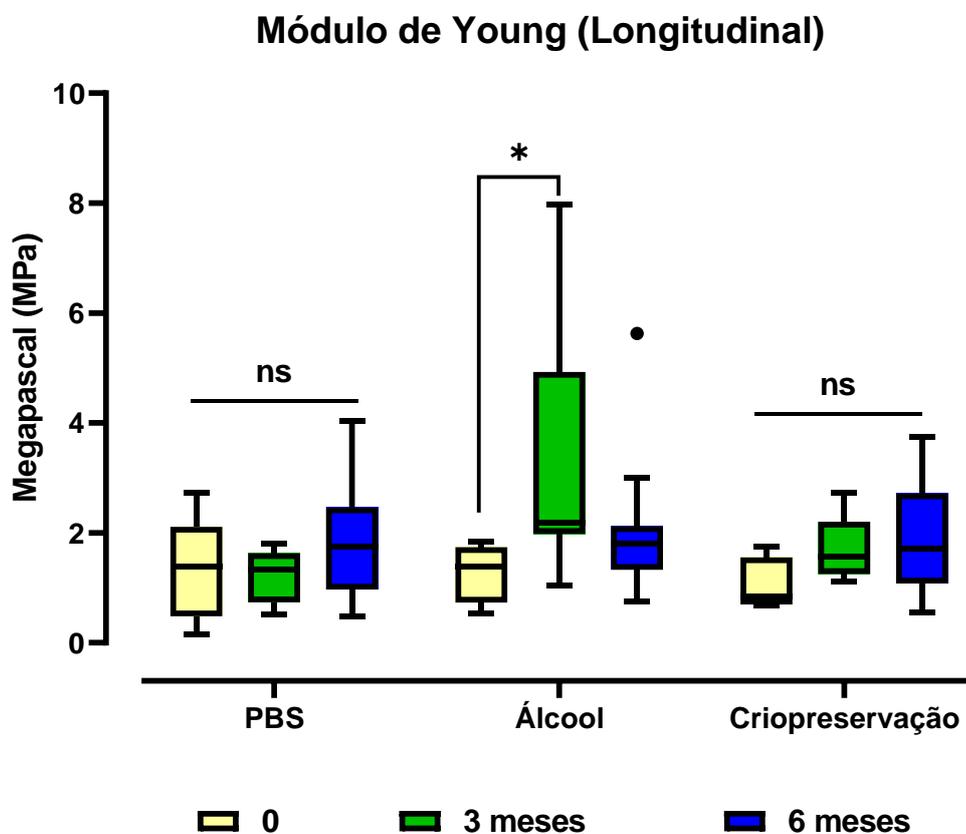
As propriedades biomecânicas dos scaffolds foram analisadas após três e seis meses de armazenamento imersas em PBS ou álcool ou submetidas à criopreservação.

Ao analisarmos o efeito do armazenamento sobre o módulo de Young no eixo longitudinal, foi possível observar diferença estatística apenas no armazenamento em imersão em álcool em três meses. Houve um aumento

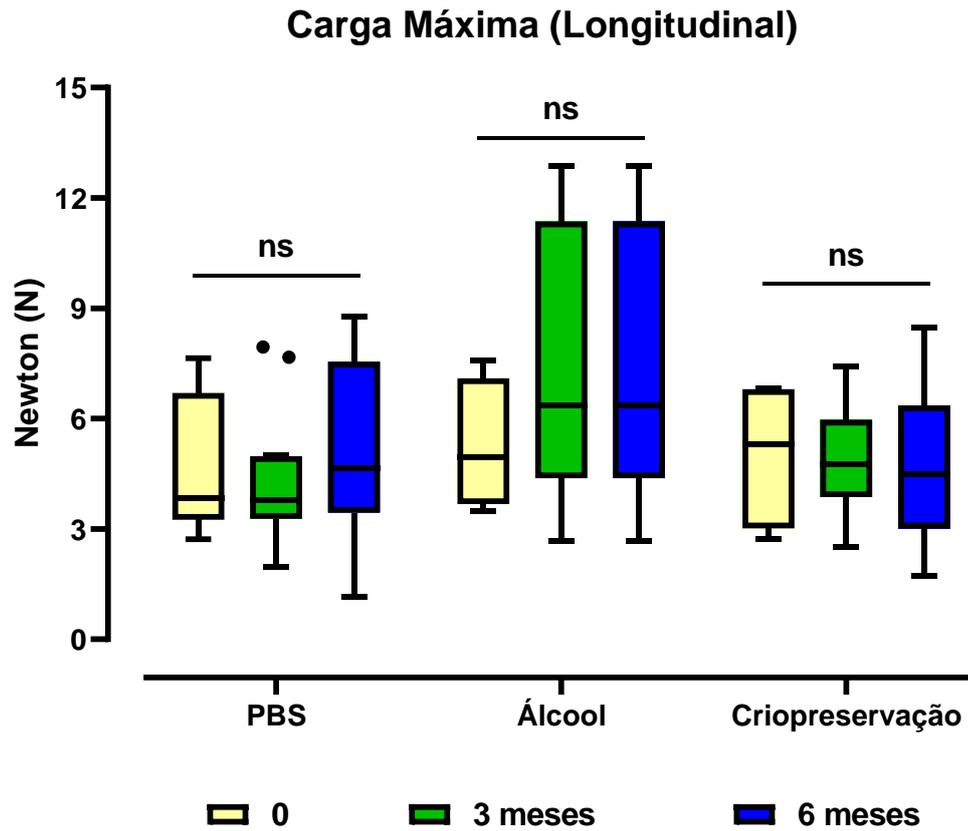
do módulo de Young nesse grupo, e, esse efeito foi revertido com o passar do tempo. Após seis meses não se observou diferença entre seis meses e o momento zero (Gráfico 8).

Ao analisarmos tanto a carga máxima (Gráfico 9) quanto o estresse sob carga máxima (Gráfico 10) no eixo longitudinal, não se observou diferença entre os tempos zero, três e seis meses em cada método de armazenamento.

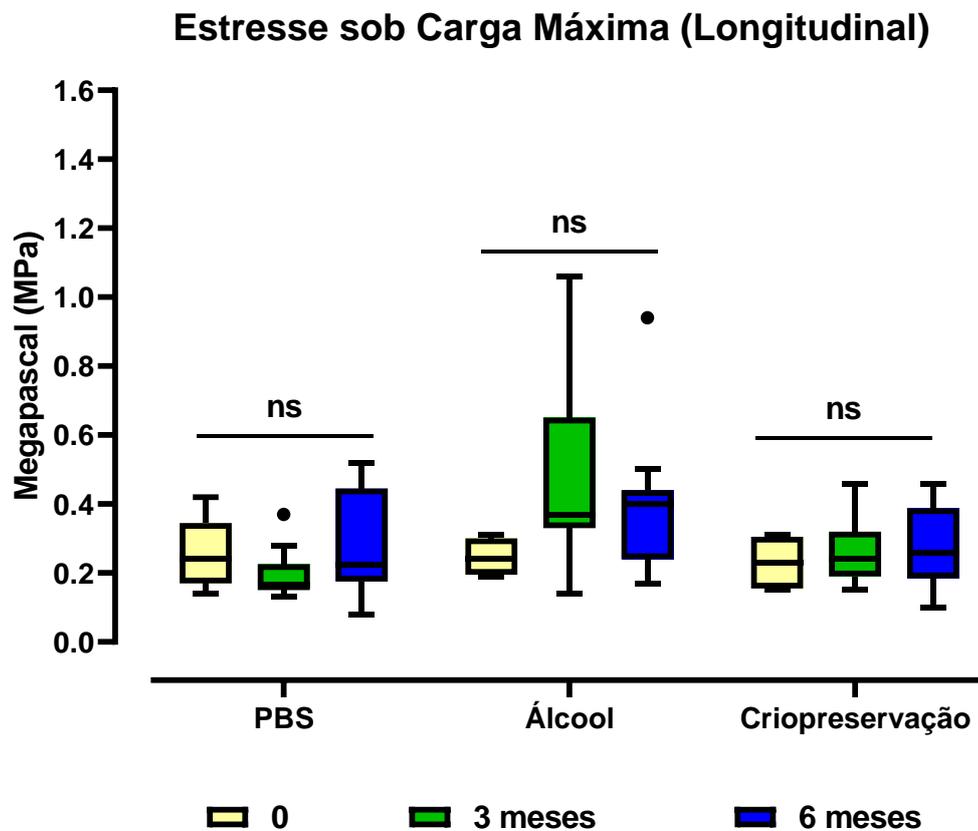
**Gráfico 8.** Comparação do efeito do armazenamento no Módulo de Young entre os momentos zero, três e seis meses no eixo longitudinal. Apresentação dos três grupos: PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo. (\*)  $p < 0,05$



**Gráfico 9.** Comparação do efeito do armazenamento na carga máxima entre os momentos zero, três e seis meses no eixo longitudinal. Apresentação dos três grupos: PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo.



**Gráfico 10.** Comparação do efeito do armazenamento no estresse sob carga máxima entre os momentos zero, três e seis meses no eixo longitudinal. Apresentação dos três grupos: PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo.

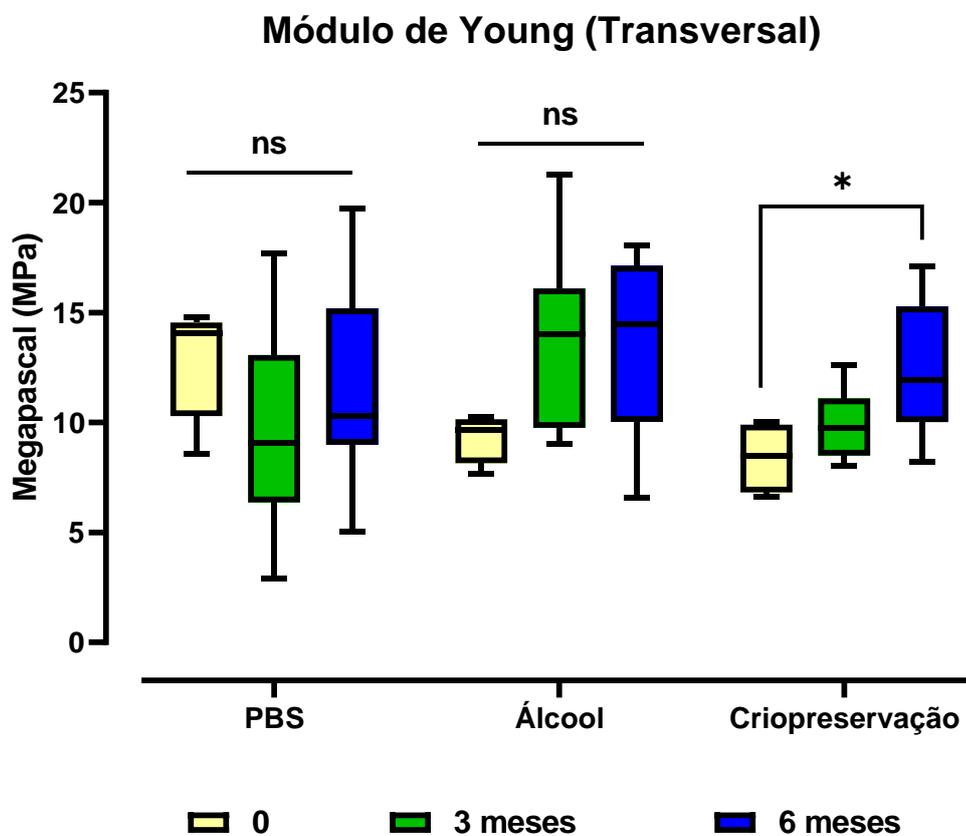


Ao analisarmos o efeito do armazenamento sobre o módulo de Young no eixo transversal, foi possível observar diferença estatística apenas no armazenamento sob criopreservação em seis meses. Houve um progressivo aumento do módulo de Young nesse grupo, sendo que após três meses não

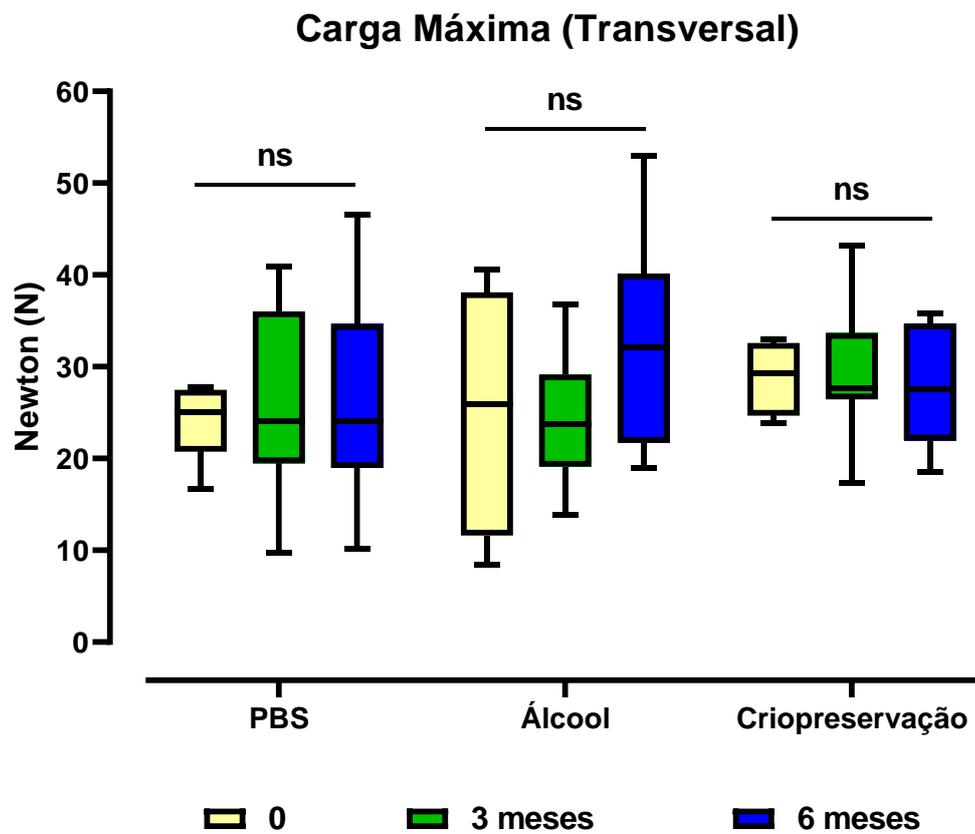
havia diferença estatisticamente significativa, o que foi evidenciado apenas após seis meses de armazenamento (Gráfico 11).

Ao analisarmos tanto a carga máxima (Gráfico 12) quanto o estresse sob carga máxima (Gráfico 13) no eixo transversal, não houve diferença entre os tempos zero, três e seis meses em cada método de armazenamento.

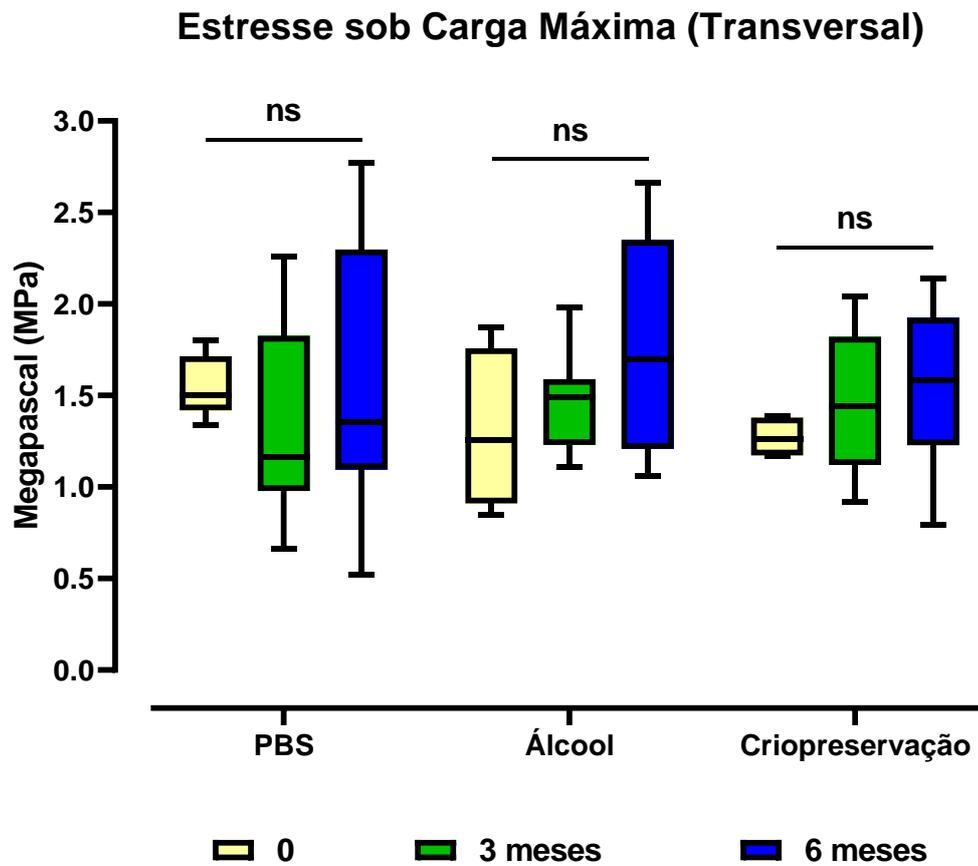
**Gráfico 11.** Comparação do efeito do armazenamento no módulo de Young entre os momentos zero, três e seis meses no eixo transversal. Apresentação dos três grupos: PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo. (\*)  $p < 0,05$



**Gráfico 12.** Comparação do efeito do armazenamento na carga máxima entre os momentos zero, três e seis meses no eixo transversal. Apresentação dos três grupos: PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo.



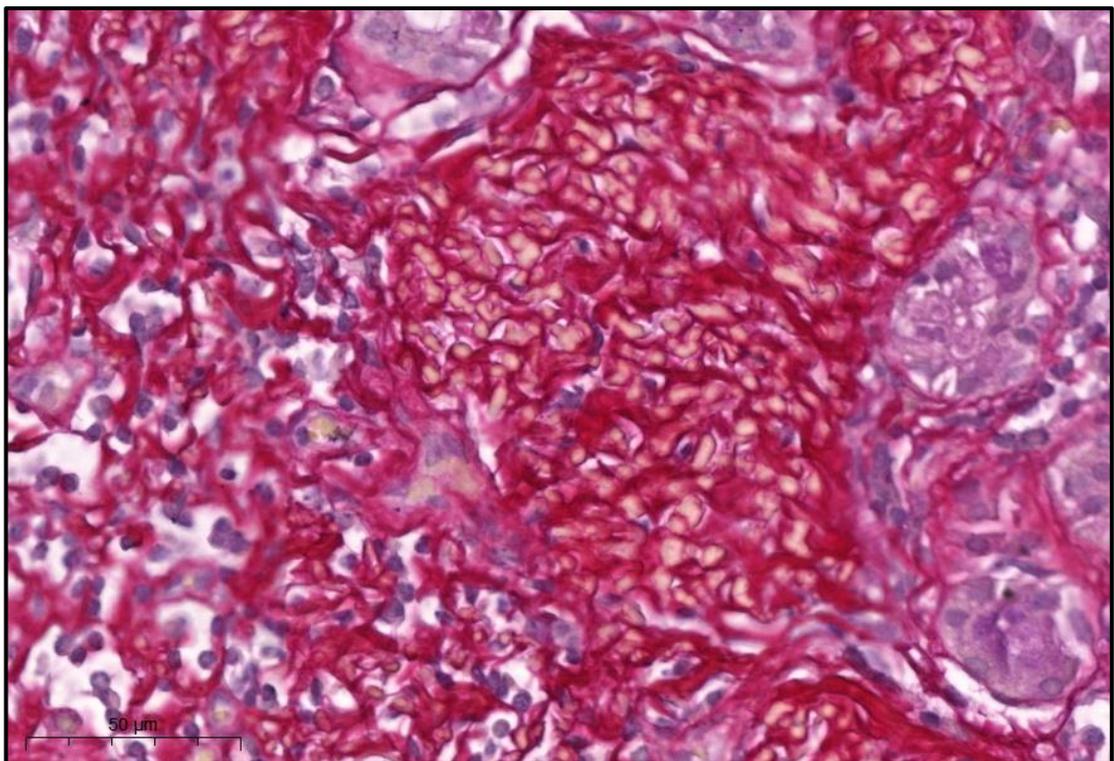
**Gráfico 13.** Comparação do efeito do armazenamento no estresse sob carga máxima entre os momentos zero, três e seis meses no eixo transversal. Apresentação dos três grupos: PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo.



### 5.7 Determinação dos efeitos da descelularização e do armazenamento sobre a quantidade de colágeno.

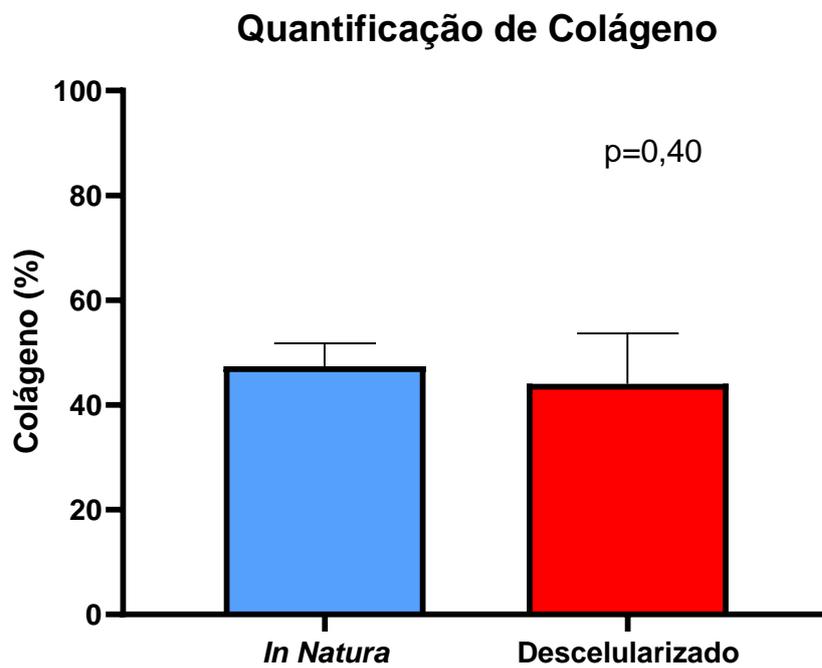
A comparação do percentual de colágeno por área na região da submucosa antes e após o processo de descelularização não mostrou mudança significativa ( $47 \pm 4,3\%$  vs  $44 \pm 9,6\%$ ,  $p= 0,40$ ).

O armazenamento dos scaffolds sob os três métodos de armazenamento não produziu diferença em três e seis meses de análise. (Gráficos 14, 15 e 16).

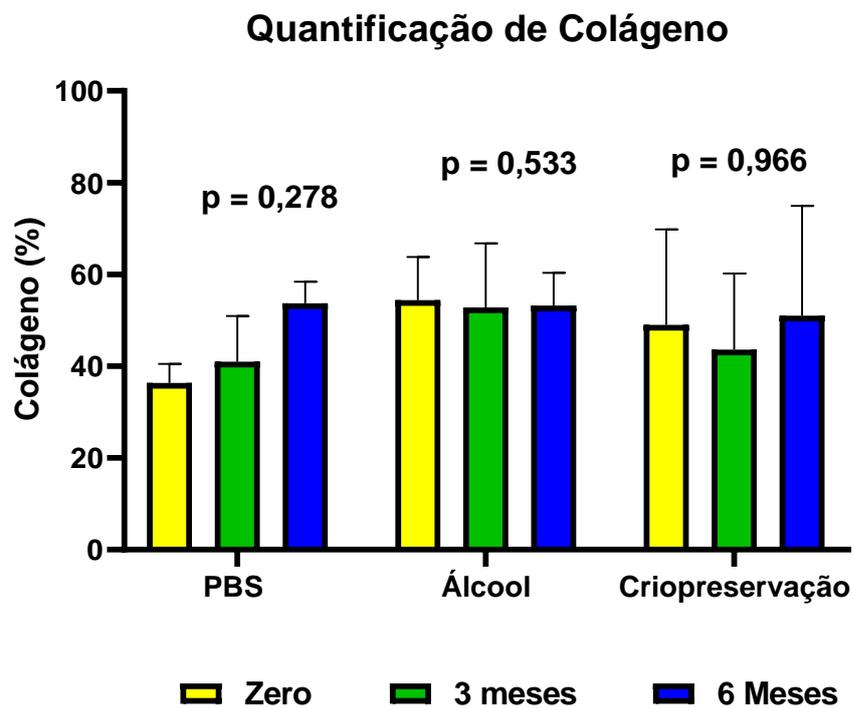


**Figura 13.** Foto de lâmina de histologia de traqueia *in natura* (grupo controle) para quantificação de colágeno. (Coloração picrosírius, magnificação 400x)

**Gráfico 14.** Comparação do percentual de colágeno entre as traqueias *in natura* e descelularizadas.



**Gráfico 15.** Comparação entre tempos zero, três e seis meses no três nos três grupos de armazenamento. Quantificação de percentual de colágeno por área.



## **DISCUSSÃO**

---

## 6 DISCUSSÃO

O protocolo de descelularização testado foi considerado eficaz pelo método de testagem utilizado. A comparação entre os grupos de armazenamento não mostrou alterações relevantes tanto com relação às propriedades mecânicas testadas quanto ao percentual de colágeno encontrado.

O protocolo empregado promoveu uma descelularização adequada dos segmentos de traqueia suína. A escolha pela traqueia suína para o estudo fundamentou-se na histomorfologia similar à traqueia humana.

Para a descelularização das traqueias foi utilizado um tratamento detergente-enzimático baseado em desoxicolato de sódio, DNase e um agente quelante (EDTA), modificado de um protocolo previamente publicado<sup>50</sup>. Suprimiu-se a primeira passagem em freezer -80°C, porque um único congelamento e descongelamento não tem efeito sobre as propriedades teciduais<sup>51,52</sup>. O desoxicolato de sódio (DS) é um detergente iônico, que solubiliza as membranas celular e nuclear; EDTA é um agente quelante, que se liga aos íons metálicos divalentes e rompe as adesões à matriz extracelular; e, DNase, a qual quebra fragmentos de DNA<sup>53-55</sup>.

Preferiu-se o detergente iônico DS, por sua habilidade de preservar as proteínas estruturais necessárias para a manutenção da mecânica próximo ao que seria a do tecido *in natura*. Em comparação com outros detergentes, a descelularização com DS preserva a quantidade de fibras de elastina, além da quantidade e alinhamento das fibras colágenas<sup>55</sup>.

O scaffold mostrou-se adequadamente descelularizado, pois a quantificação de DNA residual atingiu  $20 \pm 8$  ng/mg de tecido seco. Considera-se uma descelularização eficaz, quando há menos de 50ng/mg de tecido seco de DNA na amostra <sup>8,55</sup>. A avaliação histopatológica evidenciou completo desnudamento do epitélio sobre a matriz extracelular da membrana basal, além de significativa redução do material nuclear nas lacunas de condrócitos. No processo de descelularização de órgãos com cartilagem, recomenda-se um balanço entre a completa descelularização da cartilagem e a preservação das propriedades biomecânicas. Para se tentar atingir a completa remoção de todo o material celular ou nuclear da matriz extracelular densa da cartilagem, faz-se necessário o emprego de múltiplos ciclos de descelularização às custas de prejuízo da matriz extracelular, com consequente falência estrutural da mesma <sup>56</sup>. Entende-se que a porção imunogênica do enxerto estaria localizada na mucosa e submucosa, ricas em complexos principais de histocompatibilidade (MHC). A relevância do material celular dentro da cartilagem para gerar imunogenicidade parecer ser mínima, pois aparentemente a cartilagem não apresenta MHC <sup>57</sup>. O completo desnudamento das camadas epitelial e submucosa no scaffold garante o baixo potencial de imunogenicidade.

Com o intuito de se produzir um dispositivo biológico implantável, é necessária a avaliação da sua citotoxicidade. O limiar de citotoxicidade definido em 70% de viabilidade celular deve ser quantificado a partir do ensaio de citotoxicidade <sup>58</sup>. No nosso estudo, o limiar de toxicidade encontrado para o detergente desoxicolato testado em células BEAS-2B, foi inferior à

concentração de 0,065%. No nosso estudo, não chegamos a testar concentrações menores do que 0.065%. Estudo prévio sobre a citotoxicidade do DS feito sobre quatro linhagens distintas de células humanas, já havia mostrado que o mesmo seria tóxico em concentrações superiores a 0,002%, além de que, há um comportamento distinto sobre cada linhagem celular, o que representa distintas resistências das células ao detergente. Encontraram-se diferentes limiares de citotoxicidade: 0,0078% para células epiteliais brônquicas humanas (HBE); 0,0078% para células-tronco mesenquimais humanas (hMSC); 0,002% para células de linhagem vascular pulmonar endotelial humana primária (CBF); 0,016% para fibroblastos pulmonares humanos (HLF) <sup>59</sup>. Tais achados fundamentam a necessidade da lavagem do scaffold para a redução da citotoxicidade, caso contrário, o detergente residual na matriz extracelular prejudica a adesão celular e o crescimento das células semeadas <sup>55,60</sup>.

Cebotari et al., produziram um scaffold e testaram até 10 lavagens consecutivas com PBS para reduzir a citotoxicidade. Foi identificada uma melhora progressiva da viabilidade celular, a qual após o terceiro ciclo atingia 50% e 85%  $\pm$  3% após o décimo ciclo <sup>61</sup>.

No nosso estudo, mesmo após as lavagens com etanol 70% e PBS por dez vezes, nosso scaffold não atingiu o limiar desejável de 70% de viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade. A citotoxicidade encontrada deve estar relacionada a uma pequena concentração de detergente residual na matriz extracelular, já que mesmo em concentrações muito baixas o desoxicolato permanece ativo e tóxico.

Após o processo de descelularização é fundamental que o scaffold preserve as características biomecânicas próximas às da traqueia *in natura*, prevenindo um colapamento do enxerto no futuro receptor. A viabilidade estrutural do scaffold foi analisada por meio do ensaio biomecânico de tração. Após a determinação das propriedades biomecânicas da traqueia *in natura*, determinou-se também as propriedades do scaffold. Seguiu-se a norma preconizada pela ASTM International e utilizou-se o método de teste padrão para determinação das propriedades tênsis dos plásticos, para que nossos resultados sejam reproduzíveis em outros cenários <sup>62</sup>.

A traqueia é composta de vários tecidos conjuntivos frouxos, adventícia, mucosa, submucosa e o músculo traquealis, que compõe a sua parede posterior. Os anéis cartilagosos com formato em “D” mantem a sua estabilidade. Decidiu-se analisar a parede cartilaginosa traqueal, por ser essa porção a principal responsável pela manutenção da sua estabilidade. Optou-se por analisar os eixos transversal e longitudinal, pois cada eixo possui composição tecidual distintas. A faca molde em formato de gravata borboleta produziu no eixo longitudinal um corpo de prova composto por cartilagem e tecido conjuntivo frouxo entremeado aos anéis cartilagosos. Já no eixo transversal foi gerado um corpo de prova composto por apenas um anel traqueal.

Na traqueia de porco *in natura* encontrou-se comportamentos biomecânicos distintos entre os eixos. A traqueia é mais rígida no seu eixo transversal do que no longitudinal, com o módulo de Young de  $8,18 \pm 2,87$  MPa x  $0,94 \pm 0,61$  MPa, semelhante ao publicado por Hoffman et al. ( $5,62 \pm$

2,01 MPa x  $1,10 \pm 0,68$  MPa,  $p=0.001$ ) ao estudar traqueias de porcos nos dois eixos. Esse comportamento anisotrópico da traqueia já havia sido demonstrado quando apenas partes moles foram isoladas e testadas em dois eixos por ensaio de tração. Mucosa, submucosa e adventícia traqueias são mais rígidas no eixo transversal <sup>63</sup>. Esse comportamento biológico é desejável, tendo em vista que durante o ciclo respiratório há a necessidade de manutenção da rigidez látero-lateral e elasticidade longitudinal.

A comparação dos scaffolds às traqueias *in natura* em ambos os eixos mostrou que não houve diferença no módulo de Young. O módulo de Young ou módulo de elasticidade representa a rigidez do material. Estudos prévios, que utilizaram o protocolo de descelularização detergente-enzimático, não encontraram diferença significativa no módulo de Young ao analisarem: traqueia humana <sup>64</sup>, traqueia de porco <sup>56</sup>, esôfago de coelho <sup>15</sup> e diafragma de rato <sup>65</sup>. Durante o processo de bioengenharia de tecidos, a fase de repovoamento celular do scaffold natural ou sintético depende dos agentes quimiotáticos e fatores mecânicos para correta migração celular das células tronco mesenquimais através dos tecidos. É desejável que o novo meio mantenha a rigidez tecidual semelhante ao tecido *in natura* para proporcionar a adequada migração e diferenciação celular <sup>66,67</sup>. As células semeadas sobre substratos com topologias e moléculas de adesão semelhantes reagem diferentemente e mudam de morfologia conforme há o aumento da rigidez do substrato <sup>68</sup>. Portanto, a manutenção do módulo de Young nos dois eixos torna o scaffold promissor para semeadura celular.

No eixo transversal, a análise do estresse sob carga máxima não apresentou diferença e houve a queda de 30% na avaliação da carga máxima após a descelularização. Outros estudos, que testaram o eixo transversal (circunferencial) de traqueia de porco <sup>69</sup> e traqueia de coelho <sup>70</sup> não encontraram diferença no estresse sob carga máxima após a descelularização. Concluímos que nesse eixo, as propriedades biomecânicas da traqueia não foram afetadas, porque foram preservadas a rigidez e o estresse do material.

No eixo longitudinal, foi encontrado um comportamento distinto, houve um aumento no estresse sob carga máxima e na carga máxima após a descelularização. Outros estudos, que analisaram o estresse sob carga máxima no eixo longitudinal não encontraram diferença em traqueias humanas <sup>64</sup> e até uma discreta queda em traqueia de porco <sup>69</sup>. No entanto, o comportamento das propriedades mecânicas após a descelularização com tratamento detergente-enzimático não é uniforme para todos os órgãos e tecidos. Foi identificado o aumento da carga máxima e aumento do estresse sob carga máxima em rins descelularizados de rato <sup>71</sup>, assim como documentou-se um aumento da rigidez em carótidas descelularizadas de coelhos <sup>72</sup>. Nesse último, a análise estrutural mostrou a preservação dos principais elementos da matriz extracelular, as fibras elásticas pareciam intactas e observou-se o afrouxamento e desembaraço das fibras colágenas, com consequente aumento do espaçamento entre elas. O desembaraço das fibras colágenas pode estar associado ao aumento da rigidez <sup>72</sup>. A análise da microestrutura do arcabouço de tecido conjuntivo frouxo do scaffold em nosso

estudo pode vir a corroborar esses achados de desarranjo das fibras colágenas e explicar o aumento do estresse no eixo longitudinal.

Portanto, o scaffold gerado sugere ser adequado para a recelularização e posterior implante. A preservação do módulo de Young favorece a migração e diferenciação celular. No eixo transversal, a preservação da rigidez, preveniria o colapso da luz do enxerto durante os ciclos respiratórios, e no eixo longitudinal, o aumento da carga máxima e do estresse sob carga máxima favorecem a realização de anastomose sob algum grau de tensão.

O processo de engenharia de tecidos, tanto na etapa de pesquisa laboratorial quanto na fase de implementação de programa clínico necessitará de scaffolds. Idealmente esses scaffolds devem permanecer armazenados para que estejam prontamente disponíveis e nos mais diversos tamanhos. Pode-se prever a necessidade de scaffold com tamanhos de traqueias de bebês para tratamento de estenoses congênitas ou tamanhos compatíveis com adultos, para o tratamento de estenoses complexas ou tumores. O armazenamento dos scaffolds pode abreviar o tempo de disponibilização da traqueia produzida por bioengenharia, pois suplanta a etapa de descelularização, previne uma eventual indisponibilidade momentânea de doadores cadavéricos, ao mesmo tempo que permite uma resposta rápida a um eventual transplante clínico malsucedido. Os biobancos ou biorrepositórios são laboratórios criados para o manuseio de bioespécimes para pesquisas ou ensaios clínicos. Portanto, a criação de biobancos de scaffolds traqueais facilitaria e promoveria a pesquisa translacional.

A terapia de substituição traqueal com uso de enxertos construídos por bioengenharia teve seus primeiros passos dados por Macchiarini et al., que em 2008, substituíram um segmento do brônquio principal esquerdo por um enxerto produzido em laboratório. A paciente sofria de broncomalácia grave, com grande impacto negativo em sua qualidade de vida. A traqueia de um doador cadáver foi descelularizada, todas as células e antígenos MHC foram retirados por meio de um tratamento cíclico detergente-enzimático. A seguir, o scaffold foi repovoado com cultura de células de condrócitos, obtida com células precursoras retiradas da medula óssea da paciente. Para a reconstrução do epitélio foi utilizada cultura primária de mucosa brônquica obtidas por meio de biópsias em broncoscopia. A paciente recebeu alta dez dias após o transplante e após dois meses apresentava bons testes funcionais, dentro dos valores normais para sexo e idade <sup>5,10</sup>.

Após o sucesso inicial da nova terapêutica, outros 14 pacientes foram tratados com o transplante de vias aéreas construídas por bioengenharia. No entanto, o acompanhamento desses pacientes mostrou as limitações desse tratamento. O enxerto apresentou colapso e os pacientes precisaram ser tratados com endopróteses. Dentre esses pacientes, houve duas mortes provavelmente relacionadas a complicações dos implantes <sup>73</sup>.

Portanto, o emprego e difusão da técnica teve que ser interrompido. Houve a necessidade do retorno à bancada para que melhor se compreendesse o processo e a proposta de uma solução para as limitações encontradas. Aparentemente, o enxerto construído por bioengenharia mantinha a viabilidade celular e a funcionalidade da mucosa. O principal

problema que deveria ser abordado seria o colapso do enxerto com consequente prejuízo da ventilação.

As fibras de elastina e colágeno são as principais proteínas da matriz extracelular, sendo elas que determinam o comportamento mecânico dos tecidos biológicos <sup>74</sup>. Todavia, não foi esclarecido se a falência da estrutura do enxerto ao longo do tempo se dá por degradação intrínseca dessas fibras ou por efeito do remodelamento *in vivo*.

Sabe-se que a matriz extracelular em tecidos vivos sofre remodelamento decorrente de degradação enzimática ou hidrolítica. O colágeno de dentina, por exemplo, quando armazenado em água por 500 dias muda de aspecto e sua rede de colágeno torna-se escassa, os espaços interfibrilares de alargam de 20 nm para 80nm, como resultado da hidrólise <sup>75</sup>. No entanto, o armazenamento em imersão em PBS na geladeira a 4°C é muito difundido, especialmente para períodos curtos de armazenamento <sup>76</sup>. Scaffolds de traqueia de porco foram armazenados por até dois meses na geladeira e permaneceram aptos para o repovoamento celular <sup>76</sup>.

Com o intuito de entender melhor como a degradação da matriz extracelular dos scaffolds impacta nas propriedades mecânicas e viabilidade dos enxertos, Baiguera et al. propuseram o armazenamento de scaffolds traqueais imersos em PBS por um ano em geladeira a 4°C. O meio PBS reproduziria o meio tecidual *in vitro*. Tal experimento evidenciou um significativo aumento da distensão até a ruptura após um ano ( $96 \pm 10\%$  vs  $50 \pm 11\%$ ,  $p < 0,05$ ). Nesse estudo, também foi encontrado que a quantidade de elastina e colágeno não se altera ao longo do tempo de armazenamento

Um estudo, que testou o armazenamento de scaffolds de pulmão em imersão em PBS a 4°C por três e seis meses, evidenciou a progressiva perda da arquitetura pulmonar, que resultava em atelectasia que podia ser revertida aos três meses, mas que se tornava irreversível aos seis meses<sup>77</sup>. A conclusão de que os scaffolds tornavam-se inadequados após longos períodos de armazenamento em PBS ajudava a explicar a falência do enxerto após o implante, porém gerava o questionamento de qual método seria o ideal para o armazenamento desses scaffolds. Não há na literatura consenso sobre o melhor método de armazenamento de scaffold para utilização no processo de bioengenharia, nem está definido quanto tempo o scaffold pode permanecer armazenado antes de sofrer degradação.

Estudou-se os scaffolds armazenados em imersão em PBS a 4°C e não se obteve diferença estatística nas variáveis do módulo de Young, carga máxima e estresse sob carga máxima após três e seis meses de armazenamento. Não houve diferenças nos dois eixos estudados.

Testou-se também outro método de armazenamento simples, barato e disponível em qualquer laboratório, o armazenamento em imersão em álcool 70% a 4°C. Os Otorrinolaringologistas utilizam a imersão em álcool 70% para o armazenamento de enxertos de cartilagem para cirurgia de septoplastia. No entanto, as alterações que o armazenamento em álcool faz à cartilagem são pouco estudadas. Uma análise histopatológica comparando álcool com outras modalidades de armazenamento (solução de gentamicina, cefazolina, salina e clorofórmio) sugeriu que o armazenamento em álcool preservaria melhor e

preveniria a necrose dos condrócitos <sup>78</sup>. Assim sendo, decidiu-se testar a preservação dos scaffolds traqueais em álcool 70%.

Após três meses de armazenamento em álcool 70% a 4°C observou-se um significativo aumento do módulo de Young apenas no eixo longitudinal. No entanto, esse efeito reverteu-se após seis meses. Ainda no eixo longitudinal, as variáveis carga máxima e estresse sob carga máxima não atingiram diferença significativa. No eixo transversal, não houve diferença nas variáveis analisadas. Estudo com fragmentos ósseos armazenados por sete semanas em álcool 70% demonstrou o aumento de 24,5% na rigidez. O mesmo estudo sugere que a reidratação do osso após o armazenamento seria incapaz de reverter esse efeito <sup>79</sup>. Portanto, o armazenamento em álcool deve ser melhor estudado para a melhor caracterização do efeito sobre a matriz de colágeno, pois há uma tendência ao aumento da rigidez com períodos de até três meses de armazenamento, que não se mantem após o período mais longo de armazenamento de seis meses.

A técnica de criopreservação foi desenvolvida para permitir a preservação de órgãos e tecidos por longos períodos. O objetivo era recuperar um grande número de estruturas celulares e componentes teciduais após o descongelamento. Na temperatura de -196°C em nitrogênio líquido, todas as reações químicas, processos biológicos e atividades físicas intra e extracelulares são suspensas. Em tecidos não-descelularizados, o processo de simples congelamento causa: a perda de 95% da água intracelular, o que leva ao aumento da concentração dos eletrólitos tanto no meio intracelular quanto no extracelular; formação de cristais no espaço intracelular, que

deformam e comprimem as células, destruindo as estruturas intracelulares. O método de congelamento lento e progressivo dos tecidos permite a desidratação das células, evitando que a cristalização ocorra dentro delas. Os crioprototores como o dimetilsulfóxido (DMSO) tem o peso molecular menor do que 400 e atravessam a membrana celular facilmente. DMSO forma ligações com hidrogênio na água mantendo o estado líquido abaixo da temperatura de congelamento, esse soluto constitui um solvente para os eletrólitos reduzindo o efeito do aumento da concentração intracelular. O DMSO também bloqueia a cristalização pela inativação do núcleo de condensação <sup>80</sup>.

O uso dos agentes crioprotetores na criopreservação de scaffolds pode ser questionado, já que o seu principal benefício se dá sobre a viabilidade celular <sup>81</sup>. No entanto, o efeito dos cristais de gelo dentro da matriz extracelular deve desorganizar as fibras colágenas e fibras de elastina. A prevenção da formação de cristais e consequente formação de rachaduras na matriz extracelular auxilia a manutenção das propriedades desejáveis de porosidade e rigidez dos scaffolds <sup>82</sup>.

A protocolo de criopreservação com congelamento lento e progressivo é simples, seguro e reprodutível na maioria dos laboratórios e biobancos com o emprego de equipamentos básicos de criopreservação. O protocolo de congelamento lento e progressivo tem a vantagem de ser menos variável do que o método de vitrificação. A vitrificação é um protocolo de criopreservação, que previne a formação de cristais de gelo. No entanto, a vitrificação pode ser citotóxica com mínimas mudanças, por exemplo, na espessura do scaffold, no

grau de deposição da matriz extracelular e de citotolerância celular, o que leva a necessidade de constantes mudanças no protocolo <sup>83</sup>.

A análise das propriedades mecânicas do scaffold após a criopreservação com protocolo lento e progressivo mostrou um significativo aumento do módulo de Young na comparação entre zero e seis meses apenas no eixo transversal. As variáveis de carga máxima e estresse sob carga máxima não apresentaram diferenças em ambos os eixos. Wang et al. também não encontraram diferença no estresse sob carga máxima após três meses de criopreservação de traqueias de porco <sup>84</sup>. Já o estudo que analisou a mecânica dos scaffolds esofágicos de coelho após seis meses de criopreservação com congelamento lento e progressivo observou um decréscimo tanto no módulo de Young quanto no estresse sob carga máxima <sup>15</sup>. Provavelmente, a criopreservação promove efeitos diferentes na musculatura lisa (esôfago) e na cartilagem traqueal (eixo transversal).

Para melhor caracterização da matriz extracelular optou-se pela quantificação do percentual de colágeno presente na traqueia e nos scaffolds. Testaram-se os scaffolds imediatamente após a descélularização, em três e seis meses de armazenamento. Não foi observada diferença no percentual de colágeno antes e após a descélularização ( $47 \pm 4,3\%$  vs  $44 \pm 9,6\%$ ,  $p= 0,40$ ). O percentual de colágeno no scaffold não apresentou diferença quando comparados três e seis meses de armazenamento ao controle *in natura* nos três protocolos testados. Estudos prévios com traqueia porcina <sup>57,69</sup>, diafragma <sup>65</sup> e rim de rato <sup>71</sup> confirmam que não há diferença na quantidade de colágeno na matriz extracelular após a descélularização com o

tratamento detergente-enzimático. A criopreservação após descclularização também não causa mudanças na quantidade de colágeno nos scaffolds de porco <sup>84,85</sup>.

A confecção de substitutos traqueais utilizando técnicas de engenharia de tecidos oferece uma oportunidade de pesquisa na busca de soluções para os problemas clínicos complexos envolvendo a via aérea central. O preparo e armazenamento futuro de scaffolds de via aérea descclularizados em biobancos poderá ensejar a implantação e difusão da técnica para o uso clínico futuro.

## **CONCLUSÕES**

---

## 7 CONCLUSÕES

A descelularização das traqueias suínas com o protocolo proposto produziu scaffolds com viabilidade estrutural adequada em virtude da preservação da matriz extracelular. No entanto, o scaffold permaneceu citotóxico mesmo após as lavagens empregadas.

As propriedades biomecânicas dos scaffolds obtidos não demonstraram alterações significativas na comparação entre os protocolos de armazenamento estudados (PBS, álcool e criopreservação com congelamento lento e progressivo).

A comparação entre os três protocolos de armazenamento também não revelou alterações na quantificação de colágeno e, por conseguinte, na integridade da matriz extracelular.

O simples armazenamento em solução de PBS a 4°C por seis meses não foi prejudicial aos scaffolds.

Novos estudos estão em curso para a otimização do processo de descelularização, em particular no que tange à toxicidade residual dos scaffolds obtidos.

**ANEXO**

---

## 8 ANEXO

## Anexo A – Aprovação da Comissão de Ética

13429



**MEDICINA**  
USP

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo  
Avenida Dr. Arnaldo, 455  
Pacaembu – São Paulo – SP

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Certificamos que o projeto intitulado “Técnica de decelularização e armazenamento de segmentos de traquéia em banco de órgãos e tecidos” protocolo nº **172/15** sob a responsabilidade de **Paulo Francisco Guerreiro Cardoso e Alberto Brunning Guimarães**, apresentado pela Comissão Científica do INCOR - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 17.02.16

|                     |                        |
|---------------------|------------------------|
| Vigência do Projeto | 09-2019                |
| Espécie/linhagem    | Ratos/Suínos           |
| Nº de animais       | 30 ratos e 25 suínos   |
| Peso/Idade          | 300-350g/30-25 Kg      |
| Sexo                | Machos/machos          |
| Origem              | Biotério ICB/Granja RG |

CEUA-FMUSP, 17 de Fevereiro de 2016



**Dr. Eduardo Pompeu**  
Coordenador  
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP  
e-mail: [ceua.fm@usp.br](mailto:ceua.fm@usp.br)

## Anexo B – Publicação do artigo: “Evaluation of a physical-chemical protocol for porcine tracheal decellularization.”



### Evaluation of a Physical-Chemical Protocol for Porcine Tracheal Decellularization

A.B. Guimaraes<sup>a,\*</sup>, A.T. Correia<sup>a</sup>, B.P. Alves<sup>a</sup>, R.S. Da Silva<sup>a</sup>, J.K. Martins<sup>a</sup>, P.M. Pêgo-Fernandes<sup>a</sup>, N.S. Xavier<sup>b</sup>, M. Dolhnikoff<sup>c</sup>, and P.F.G. Cardoso<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Investigação Médica - LIM 61, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; <sup>b</sup>Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LIM05), Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; and <sup>c</sup>Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental - LIM 06, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina FAMUSP, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

#### ABSTRACT

**Introduction/Objective.** Tracheal resection with primary reconstruction is the definitive treatment for many tracheal benign and malignant diseases. When primary resection is not deemed feasible as a result of the length of the stenosis, airway transplantation may become a solution. Tissue engineering offers an alternative way for creating tracheal substitutes. The development of tracheal allograft transplantation includes the decellularized tracheal scaffolds made of extracellular matrix that are seeded with the receptor's cells. Many protocols are used to obtain a decellularized scaffold. Most of them consist of cyclical physical-chemical steps with enzymes. This study proposes a protocol for decellularization based only in physical-chemical steps.

**Methods.** Decellularization of pig tracheal segments was carried out using a standardized protocol consisting of freezing and thawing, 10 cycles of agitation, exposure to sodium deoxycholate, and washing. The degree of decellularization was determined by quantifying residual DNA. We also analyzed the morphology under hematoxylin and eosin staining.

**Results.** Fourteen porcine tracheal segments were decellularized. All scaffolds obtained showed less than 2% of residual DNA (mean  $20 \pm 8$  ng/mg) when compared to the fresh samples (mean  $850 \pm 123$  ng/mg),  $P = .001$ . Morphological analysis showed that the epithelium and mixed glands were completely removed. It was possible to identify residual nuclei inside the cartilaginous rings ( $73.7 \pm 12 \times 26 \pm 8$  nuclei/field,  $P < .001$ ).

**Conclusion.** The protocol tested was able to provide effective decellularization of porcine tracheas.

**A**IRWAY resection with primary reconstruction remains the definitive treatment modality for benign and malignant tracheal diseases. However, it poses a major challenge depending on the extent of resection, which cannot exceed 50% of the length of the organ in adults and 30% in children [1].

Tracheal substitutes for the damaged trachea were evaluated using cadaveric allografts and synthetic material, but none resulted in clinical success.

Tissue engineering techniques have become an alternative for the production of a functional, biocompatible, noncarcinogenic, and nonimmunogenic trachea that would be the ideal material for tracheal transplantation. In this

regard, decellularized tracheal scaffold capable of being reseeded with receptor own cells has been investigated.

This study evaluates a cyclic protocol for tracheal decellularization based only in physical-chemical processes using freezing, agitation and a detergent.

#### METHODS

The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA FAMUSP).

\*Address correspondence to Alberto Bruning Guimaraes, InCor, AV Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 44, São Paulo-SP, Brazil, 05403-900. E-mail: albertobruningui@yahoo.com.br

1612

GUIMARAES, CORREIA, ALVES ET AL

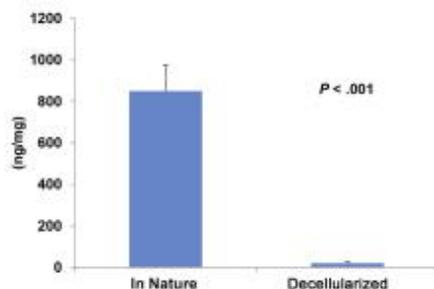


Fig 1. DNA Quantification.

Fourteen fresh 6-centimeter-long tracheal segments were obtained from Landrace pigs (18–22 kg). Eleven were decellularized, and 3 were kept as controls. The decellularization protocol was based in a physical-chemical process as follows. The segments were cleaned and kept in antibiotics/antimycotics solution (penicillin/streptomycin/amphotericin B 1%) at 4°C for 24 hours.

The samples were changed in dry Falcon tube and frozen without cryoprotectant solution at -80°C for 24 hours. Samples were thawed for 40 min in a 36°C water bath and washed 3 times with phosphate-buffered saline solution and then exposed to sodium deoxycholate 2%. The tracheal samples were shaken in the incubator at 180 rpm, 36°C for a 48-hour cycle. These cycles were repeated 10 times.

At the end of the protocol, the samples were washed with phosphate-buffered saline solution and divided in 2 halves. One was submitted to the DNA extraction protocol, and the other sent to histopathological analysis.

The DNA extraction protocol was carried out using DNase solution for 12 hours, Proteinase K for 12 hours, extraction with phenol-chloroform, and quantified by absorbance in the Nanodrop spectrophotometer. The results were obtained in ng/mg of tissue. The control group was not exposed to DNase.

The histopathological HE staining was used to determine the residual epithelial cells over the lamina propria in 10X magnification. The residual chondrocytes were counted on the cartilaginous portion with 40X magnification.

Data were presented as mean and standard deviation. The groups were compared using Student *t* test. The level of significance was set for  $P < .05$ .

## RESULTS

After 10 cycles of detergent protocol the extraction of DNA showed marked reduction of the DNA content ( $850 \pm 123 \times 20 \pm 8$  ng/mg,  $P < .001$ ) (Fig 1).

The histopathologic evaluation showed complete denudation of the epithelium and mixed glands over the cartilage (Fig 2). It was not possible to identify any epithelial cell over the lamina propria.

In the cartilaginous part of the trachea we observed a marked reduction in the number of visible nuclei ( $73.7 \pm 12 \times 26 \pm 8$  nuclei/field,  $P < .001$ ) (Figs 3 and 4).

## DISCUSSION

The present decellularization protocol was effective in removing all the epithelium and mixed glands, and 65% of the chondrocytes.

Since many indications of tracheal transplantation focus on benign diseases. The tracheal substitute must be functional, biocompatible, noncarcinogenic, and non-immunogenic, in order to prevent the complications of a lifetime immunosuppression [1].

Many different protocols have been proposed to obtain an organ scaffold for tissue engineering.

The majority of decellularization processes are based in detergent and enzymatic protocols with multiple cycles [2–4]. Few changes were tested to the main cyclic detergent and enzymatic protocol. Evaristo et al presented a method with the addition of photomagnetic energy [5]. Giraldo-Gomez et al introduced ethylenediaminetetraacetic acid and trypsin in order to reduce the number of cycles [6].

Regardless of the protocols used, it was shown that there is residual chondrocytes nuclei inside the cartilage rings. Partington et al, after 25 cyclic protocol using detergent and enzymes, found a decrease in the number of viable chondrocytes ( $1.257 \pm 412 \times 629 \pm 192$  nuclei/field,  $P < .01$ ) [2].

Furthermore, the amount of the DNA found in the scaffold belongs to the residual chondrocytes inside the

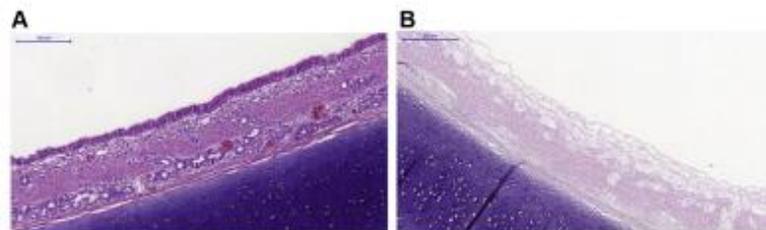


Fig 2. (A) Control with regular epithelium. (B) Decellularized without epithelium.

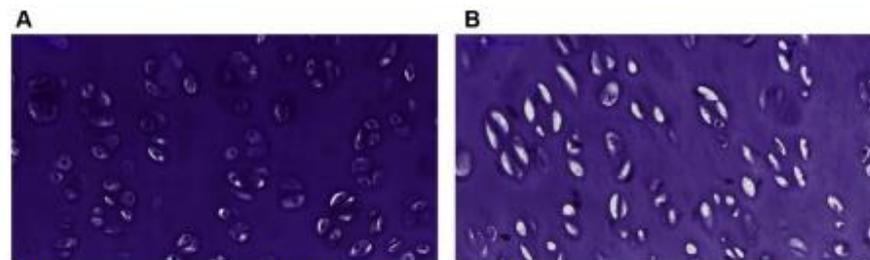


Fig 3. (A) Control cartilage showing regular chondrocytes. (B) Decellularized trachea showing acellular cartilage lacunae.

cartilaginous portion, probably because the cartilage is made of a dense extracellular matrix and the methods used were not able to wash it out properly.

It has been described that the major histocompatibility complex in the trachea is located in the epithelium and mixed glands. Even if there is viable cartilage in the scaffold it doesn't seem to induce a host response [7].

Commercially available scaffold materials were tested for the presence of residual DNA, and the results confirmed its presence in different amounts ( $1.13 \pm 0.03$  to  $0$  ng/mg) [8]. The successful clinical experience with the use of these extracellular matrix scaffolds suggests that the residual DNA found in the tracheal scaffold is probably not a clinical limitation for its clinical use.

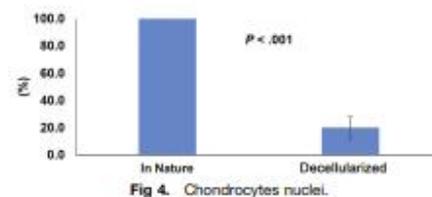


Fig 4. Chondrocytes nuclei.

#### CONCLUSION

The protocol proposed offers an adequate decellularization of tracheal segments.

The generated scaffolds should be further tested for cellular integration and potential immunogenicity.

#### REFERENCES

- [1] Grillo HC. Tracheal replacement: a critical review. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1995-2004.
- [2] Partington L, Mordant NJ, Mason C, Knowles JC, Kim HW, Lowdell MW, et al. Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds. *Acta Biomater* 2013;9:5251-61.
- [3] Conconi MT, De Coppi P, Di Liddo R, Vigolo S, Zanon GF, Parnigotto PP, et al. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. *Transpl Int* 2005;18:727-34.
- [4] Haykal S, Soteras JP, Salma M, Hofer SOP, Waddell TK. Evaluation of the structural integrity and extracellular matrix components of tracheal allografts following cyclical decellularization techniques: comparison of three protocols. *Tissue Eng Part C Methods* 2012;18:614-23.
- [5] Evaristo TC, Maciel da Cruz Alves FC, Moroz A, Mion W, Acorsi-Valério MJ, Felisbino SL, et al. Light-emitting diode effects on combined decellularization of tracheae. A novel approach to obtain biological scaffolds. *Acta Cir Bras* 2014;29:485-92.
- [6] Giraldo-Gomez DM, Leon-Mancilla B, Del Prado-Audelo ML, Sotres-Vega A, Villaiba-Caloca J, Garcíadiego-Cazares D, et al. Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: morphological and biophysical characterization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2016;59:930-7.
- [7] Lu T, Huang Y, Qiao Y, Zhang Y, Liu Y. Evaluation of changes in cartilage viability in detergent-treated tracheal grafts for immunosuppressant-free allotransplantation in dogs. *Eur J Cardiothorac Surg* 2018;53:672-9.
- [8] Gilbert TW, Freund JM, Badyak SF. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *J Surg Res* 2009;152:135-9.

## Anexo C – Publicação do resumo: “Biomechanical properties of the porcine trachea before and after decellularization for airway transplantation.”

### Abstracts

S385

diseases with improved DA compared to TBFB, but with insufficient evidence in diagnosis and screening of ACR. This study aims to provide data on safety, diagnostic utility and impact on treatment decisions after TBLC in lung transplant recipients (LTRs).

**Methods:** Between December 2019 and June 2020, both TBFB and LBLC were obtained serially in LTRs during the same bronchoscopy session to detect ACR. According to our protocol, after 5 TBFB samples, 2 samples by TBLC were taken from different lung segments. The biopsies were scored according to the recent ISHLT criteria by a dedicated transplant pathologist, assessing TBFB and TBLC samples independently. The severity of bleeding as assessed with the Nashville Bleeding Scale (grade 1 - 4), and pneumothoraces were excluded with routine chest radiography.

**Results:** Totally, 25 consecutive procedures in 17 LTRs (13 males, median age 58) were performed either as routine surveillance bronchoscopy (n=19) or as clinically indicated (n=6) using flexible bronchoscopy. Retrospective analysis of 125 TBFB and 50 TBLC samples was performed. ACR (A1 - A3) was detected in 6 cases (24%) by TBLC resulting in a change of immunosuppressive strategy, compared to 0% by TBFB. Non-diagnostic biopsy samples were noted in 3 cases (12%) of TBLC compared to 21 (84%) of TBFB. The biopsy procedure was complicated by moderate (grade 2) bleeding in 6 (24%) cases as a complication of TBFB, since it occurs immediately after this procedure. No pneumothorax was detected.

**Conclusion:** TBLC provided improved DA for diagnosis of ACR with an acceptable safety profile, leading to reclassification and a change of treatment strategy in 24% of the cases. Further prospective studies are needed to confirm these findings and recommend TBLC as gold standard to detect ACR.

### (966)

#### Annual Surveillance Biopsies for Detection of Acute Cellular Rejection Have Limited Utility More Than Two Years Post-Transplant

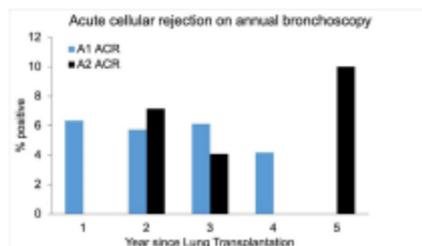
C.M. Shaver, S.G. Norfolk and J.M. Robbins Allergy, Pulmonary, and Critical Care Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN.

**Purpose:** Purpose: Surveillance bronchoscopy for the diagnosis of subclinical rejection are common after lung transplantation. Our center previously performed annual surveillance bronchoscopy with transbronchial biopsy for up to 5 years post-transplant. The goal of this study was to determine the utility of annual surveillance bronchoscopy.

**Methods:** Medical records were reviewed for patients who underwent lung transplantation between 1/1/2014 and 12/31/2017, survived greater than 1 year, and underwent at least 2 annual bronchoscopy procedures (n=80). Pathology reports for acute cellular rejection were reviewed. Clinical notes and pulmonary function tests were reviewed to determine whether detected rejection was associated with clinical symptoms or a decline in FEV1.

**Results:** A total of 232 annual surveillance bronchoscopies were performed in 80 patients. 21/232 (9%) of annual bronchoscopies showed A grade rejection and 7/232 (3%) of bronchoscopies showed B grade rejection. Acute cellular rejection (A or B grade) was diagnosed in 22/80 (27.5%) of patients on at least 1 annual procedure. A2 rejection was detected on 8 annual bronchoscopies. A2 rejections occurring after the 2<sup>nd</sup> annual bronchoscopy were associated with >10% decline in FEV1 and were clinically apparent, whereas A2 rejections within 2 years of transplant were not.

**Conclusion:** Conclusion: Annual surveillance bronchoscopy beyond 2 years after lung transplantation has limited clinical utility. After 2 years, significant acute cellular rejection (A2 or greater) was associated with a decline in FEV1.



### (967)

#### Patterns of Daily Physical Activity and Sedentary Behaviors in Recent Lung Transplant Recipients

M.M. Altamini,<sup>1</sup> K. Jones,<sup>1</sup> E. Moon,<sup>1</sup> M.L. Vendetti,<sup>1</sup> B. Willey,<sup>1</sup> A.L. Hergenroeder,<sup>2</sup> M. Morrell,<sup>1</sup> F. Sciurba,<sup>1</sup> A. DeVito Dabbs,<sup>1</sup> and C. Ines,<sup>1</sup> <sup>1</sup>School of Nursing, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA; <sup>2</sup>School of Health & Rehabilitation Science, Department of Physical Therapy, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA; and the <sup>3</sup>Division of Pulmonary, Allergy, and Critical Care Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA.

**Purpose:** Greater physical activity (PA) and less time in sedentary behavior are associated with better recovery post lung transplantation and reduced all-cause mortality. The aim of this analysis was to describe and examine associations between participant characteristics and objectively measured activity among recent lung transplant recipients (LTRs).

**Methods:** In this descriptive study, actigraph accelerometers were used to measure baseline PA for 20 LTRs enrolled in an ongoing tele-rehabilitation intervention study. Participants were instructed to wear the accelerometer during waking hours for 7 days. Average time spent in sedentary and moderate-to-vigorous PA (MVPA) were calculated in minutes per day. Spearman correlations were used to examine the relationships between activity measures and baseline characteristics (age, sex, body mass index (BMI), underlying lung condition, length of stay (LOS) of transplant hospitalization, hypertension stage, Charlson Comorbidity Index Scores (CCI), and days post-transplantation).

**Results:** Baseline PA data were collected at a mean of 252±131 days post-transplantation. LTRs were mostly white (95%) and female (60%) with a mean age of 55.6±13.4 years. Most participants had a double lung transplant (90%), non-obstructive lung disease (60%), elevated blood pressure (55%), normal BMI (50%), and scored ≤3 on the CCI (80%). The mean LOS for transplant hospitalization was 25.8±11.4 days. Participants wore the actigraph accelerometers for an average of 6.8±0.6 days. Time spent in sedentary behavior and MVPA were 700±97 and 15±14 min/day, respectively. Time spent in sedentary behavior was significantly higher among males (757±112 vs. 662±67 p=0.045). CCI (r=-.482, p=0.031), days post-transplantation (r=-.597, p=0.005), and sex (r=-.460, p=0.041) were significantly positively correlated with time spent in sedentary behavior. No other significant correlations were found between PA measures and baseline characteristics.

**Conclusion:** Participants spend the majority of the day in sedentary behavior and had less than desirable levels of MVPA. Comorbidity index, days post-transplantation, and sex were found to be moderately correlated with sedentary time. Further studies are planned to evaluate physical activity patterns of LTRs over time and examine the influence on lung transplantation recovery.

### (968)

#### Biomechanical Properties of the Porcine Trachea before and after Decellularization for Airway Transplantation

A.B. Guimarães,<sup>1</sup> A.T. Correa,<sup>1</sup> P.M. Pego-Fernandes,<sup>1</sup> M.J. Maizato,<sup>2</sup> I. A. Cestari,<sup>1</sup> and P.F. Cardoso,<sup>1</sup> <sup>1</sup>Division of Thoracic Surgery, LIM 61, Organ and Tissue Laboratory, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; and the <sup>2</sup>Bioengenharia, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

**Purpose:** Tracheal replacement based on a tissue engineered tracheal scaffold is an alternative for extensive benign or malignant tracheal disease. The mechanics of the scaffold depends on the decellularization protocol used. This study focuses on the mechanical properties of tracheal scaffolds obtained from the decellularization protocol used in our laboratory.

**Methods:** The protocol was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA-FMUSP). Fresh tracheas (24) were obtained from adult Landrace pigs (100kg). Twelve were decellularized and 12 were tested *in natura*. Decellularization protocol included 10 cycles of detergent (DS 2%) followed by 3 washings with PBS for 10 min and agitation for 48h in an incubator (36°C). Decellularization of the scaffold was assessed by measuring residual DNA contents. The scaffolds were then submitted to freeze-

drying, immersion in DNase and Proteinase K for 12h each. The DNA extraction was done with the phenol-chloroform technique and quantified by absorbance in a spectrophotometer. Tracheal mechanical properties were assessed using a tensile test system (INSTROM Model 3365, Norwood, MA) in two axes according to the norm of the American Society for Testing and Material (ASTM D638-14). Data is represented as mean±STD. Comparison between data used Student t test and Mann-Whitney. Significance was assumed for p<0.05.

**Results:** There was no difference in the Young's (elastic) module in both axes between decellularized scaffolds and tracheas *in natura*. The maximum load increased in the longitudinal axis and decreased in the transverse axis of the decellularized scaffolds reflecting the changes in the extracellular matrix in the cartilage (transverse) and connective tissue (longitudinal) (table).

**Conclusion:** The mechanical properties of the scaffolds obtained after the decellularization protocol suggest that despite the changes in the extracellular matrix the decellularized scaffolds will be able to retain its physiological properties.

| DNA: ng/mg dry tissue; MPa: Megapascal; N: Newtons |                   |                  |                |         |
|--|-------------------|------------------|----------------|---------|
| Parameters   | Measurements      | <i>In Nature</i> | Decellularized | p value |
| Young Module (MPa)                                 | DNA contents      | 2,912 ±49        | 329 ±18        | <0,001  |
|  | Longitudinal axis | 0,94 ±0,61       | 1,21 ±0,67     | 0,31    |
| Maximum Load (N)                                   | Transverse axis   | 8,18 ±2,87       | 10,35 ±2,68    | 0,06    |
|  | Longitudinal axis | 3,03 ±1,47       | 4,99 ±1,78     | 0,009   |
|  | Transverse axis   | 36,79 ±13,39     | 25,98 ±7,87    | 0,02    |

#### (969)

##### Jehovah's Witness Patients "Going the Extra Mile" for Bloodless LVAD Implantation

U.A. Siddiqui,<sup>1</sup> P.S. Combs, C. Stonebraker, E. Gonzalez, S. Mirzai, A. Lee, J. Cruz, K. Hu, T. Synnala, C. LaBuhn, S. Pinney and V. Jeevanandam University of Chicago, Chicago, IL.

**Purpose:** Due to their religious beliefs, Jehovah's Witnesses (JWs) do not accept blood products; consequently, these patients with end-stage heart failure frequently seek a center willing to perform bloodless left ventricular assist device (LVAD) implantation. We assessed the challenges JWs confront in obtaining access to care, based on our center's experience orchestrating bloodless LVAD implantation.

**Methods:** We retrospectively reviewed the medical records of 36 patients - 18 JWs and 18 non-JWs - undergoing LVAD implantation at our center.

**Results:** Our findings revealed that JWs travelled a significantly greater distance to receive treatment than non-JWs (median: 293 (107.75, 667.5) vs 32.5 miles (15.3, 74.5),  $P=0.006$ ). Pre-operative characteristics, including INTERMACS profiles and re-operative status at implant, were comparable between the two groups ( $P > 0.05$  for all). However, all JWs underwent concomitant surgeries at the time of bloodless LVAD implantation, as compared to 67% of non-JWs ( $P=0.019$ ). Length of stay, discharge location, and peri-operative outcomes were not significantly different ( $P > 0.05$ ). We found that JWs currently face barriers in the availability, appropriateness, preference, and timeliness of access to care (Figure 2). In particular, being refused implantation at centers nearer to their residence causes JWs to travel excessive distances in hopes of treatment; however, long-distance travel may prolong the time until treatment and may not be an option for patients with financial or logistical challenges.

**Conclusion:** Our center's experience has shown that JWs face unnecessary barriers in access to care, but they can be successfully operated on with the use of optimization protocols and open communication between the patient and care team. Further research is needed to elucidate the challenges JWs face in accessing care and identify potential solutions which balance ethical considerations with patient autonomy.

The outlier from the Non-JW group is a patient who was treated as part of an international shared care program at our center.

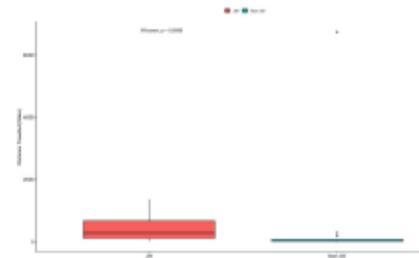


Figure 2. Access to Care in the JW Patient Population



#### (970)

##### Thromboelastography of Limited Benefit in LVAD Patient Management

S.J. Fanelli,<sup>1</sup> M. Elzein,<sup>2</sup> A. Mahmoud,<sup>3</sup> E.I. Jeng,<sup>4</sup> G.

Arnaoutakis,<sup>4</sup> M. Al-Ani,<sup>2</sup> A. Parker,<sup>3</sup> J. Vilare,<sup>3</sup> J. Aranda,<sup>3</sup> and M.M.

Ahmed,<sup>3</sup> College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL;

<sup>2</sup>Internal Medicine, University of Florida, Gainesville, FL;

<sup>3</sup>Cardiovascular Medicine, University of Florida, Gainesville, FL; and the

<sup>4</sup>Thoracic and Cardiovascular Surgery, University of Florida, Gainesville, FL.

**Purpose:** The role of utilizing thromboelastography (TEG) in managing antiplatelet therapy (APT) in LVAD patients is controversial. The purpose of this study was to determine if the removal of TEG from APT protocol reduced late onset bleeding without an increase in thromboembolic events.

**Methods:** We performed a single-center retrospective cohort study at the University of Florida including all recipients of a HeartMate II, HeartMate III, or Heartware LVAD between April 2005 and November 2019 (n=293). LVAD recipients before June 1<sup>st</sup>, 2017 (n=221) whose APT was monitored and adjusted using TEG were compared to LVAD recipients after June 1<sup>st</sup>, 2017 (n=72) where TEG was not utilized. The occurrence of late-onset bleeding events after post-operative day 7, as defined by INTERMACS major bleeding, as well as thromboembolic events were collected. Patients were followed up to one year post-implantation or to time of death, transplant, or pump exchange. APT doses, warfarin use and INR values were collected at discharge as well as 1, 3, 6 and 12 months post-implantation.

**Results:** Over a median follow-up period of 12 months, INTERMACS major bleeding events occurred in 35% of patients where TEG was utilized compared to 29% where TEG was not utilized (p-value 0.375), and procedural intervention was required in 29% compared to 18% respectively (p-value 0.058). After June 1<sup>st</sup>, 2017, patients had a higher average BMI (31 compared to 29, p-value 0.020), were more likely to be on digoxin on discharge (24% compared to 12%, p-value 0.019), and were less likely to be of white race (p-value 0.043) or have ischemic cardiomyopathy (p-value 0.019). In a multivariable Cox proportional-hazards regression model including all these variables, older age was the only independent predictor of bleeding events (HR 1.03 for each additional year of age, 95% CI 1.01-1.05, p 0.008). Use of TEG was associated with use of higher doses of aspirin (>325mg 41% vs. 0%), and use of a second antiplatelet (43% vs. 1%). There was no significant difference in thromboembolic events (15% in each).

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grillo HC. Tracheal replacement: A critical review. *Ann Thorac Surg.* 2002;73(6):1995–2004.
2. Udelsman B, Mathisen DJ, Ott HC. A reassessment of tracheal substitutes-A systematic review. *Ann Cardiothorac Surg.* 2018;7(2):175–82.
3. Nakamura T, Sato T, Araki M, Ichihara S, Nakada A, Yoshitani M. In situ tissue engineering for tracheal reconstruction using a luminal remodeling type of artificial trachea. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;138(4):811–9.
4. Sato T, Araki M, Nakajima N, Omori K, Nakamura T. Biodegradable polymer coating promotes the epithelization of tissue-engineered airway prostheses. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;139(1):26–31.
5. Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet.* 2008;372(9655):2023–30.
6. Delaere P, Vranckx J, Verleden G, De Leyn P, Van Raemdonck D. Tracheal Allotransplantation after Withdrawal of Immunosuppressive Therapy. *N Engl J Med.* 2010;362(2):138–45.
7. Rose KG, Sesterhenn K WF. Tracheal allotransplantation in man. *Lancet.* 1979;313(8113):433.
8. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;32(12):3233–43.
9. Jungebluth P, Moll G, Baiguera S, MacChiarini P. Tissue-engineered airway: A regenerative solution. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;91(1):81–93.
10. Macchiarini P, Walles T, Biancosino C, Mertsching H. First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;128(4):638–41.
11. Zang M, Zhang Q, Chang EI, Mathur AB, Yu P. Decellularized tracheal matrix scaffold for tissue engineering. *Plast Reconstr Surg.* 2012;130(3):532–40.
12. Zang M, Zhang Q, Chang EI, Mathur AB, Yu P. Decellularized tracheal matrix

- scaffold for tissue engineering. *Plast Reconstr Surg*. 2013;130(3):532–40.
13. Baiguera S, Del Gaudio C, Jaus MO, Polizzi L, Gonfiotti A, Comin CE. Long-term changes to in vitro preserved bioengineered human trachea and their implications for decellularized tissues. *Biomaterials*. 2012;33(14):3662–72.
  14. Brockbank KGM, Schenke-Layland K, Greene ED, Chen Z, Fritze O, Schleicher M. Ice-free cryopreservation of heart valve allografts: Better extracellular matrix preservation in vivo and preclinical results. *Cell Tissue Bank*. 2012;13(4):663–71.
  15. Urbani L, Maghsoudlou P, Milan A, Menikou M, Hagen K, Totonelli G, et al. Long-term cryopreservation of decellularised oesophagi for tissue engineering clinical application. *PLoS ONE*. 2017;12(6):1–14.
  16. Furlow PW, Mathisen DJ. Surgical anatomy of the trachea. *Ann Cardiothorac Surg*. 2018;7(2):255–60.
  17. Griscom NT, Wohl MEB. Dimensions of the growing trachea related to age and gender. *Am J Roentgenol*. 1986;146(2):233–7.
  18. Haykal S, Salna M, Waddell TK, Hofer SO. Advances in tracheal reconstruction. *Plast Reconstr Surgery*. 2014;2(7):e178.
  19. Delaere P, Van Raemdonck D. Tracheal replacement. *J Thorac Dis*. 2016;8(Suppl 2):S186–96.
  20. Bibas BJ, Terra RM, Oliveira Junior AL, Tamagno MFL, Minamoto H, Cardoso PFG. Predictors for postoperative complications after tracheal resection. *Ann Thorac Surg*. 2014;98(1):277–82.
  21. Francisco P, Cardoso G, Minamoto H, Bibas BJ, Pego-fernandes PM. Impact of gastroesophageal reflux in the pathogenesis of tracheal stenosis. *Transl Cancer Res*. 2020;9(3):2123–35.
  22. Murgu SD, Egressy K, Laxmanan B, Doblare G, Ortiz-Comino R, Hogarth DK. Central airway obstruction: benign strictures, tracheobronchomalacia, and malignancy-related obstruction. *Chest*. 2016;150(2):426–41.
  23. Junker K. Pathology of tracheal tumors. *Thorac Surg Clin*. 2014;24(1):7–11.
  24. Diaz-Mendoza J, Debiante L, Peralta AR, Simoff M. Tracheal tumors. *Curr Opin Pulm Med*. 2019;25(4):336–43.

25. Heuermann M, Bekker S, Czczok T, Gregory S, Sharma A. Tracheal chondrosarcoma: A case report, systematic review, and pooled analysis. *Cancer Rep.* 2022;5(7):1–8.
26. Haag JC, Jungebluth P, MacChiarini P. Tracheal replacement for primary tracheal cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;21(2):171–7.
27. Madariaga ML, Gaissert HA. Secondary tracheal tumors: A systematic review. *Ann Cardiothorac Surg.* 2018;7(2):183–96.
28. Resheidat A, Kelly T, Mossad E. Incidental diagnosis of congenital tracheal stenosis in children with congenital heart disease presenting for cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2019;33(3):781–4.
29. Morita K, Maeda K, Yabe K, Oshima Y. Management of congenital tracheal stenosis in the neonatal period. *Pediatr Surg Int.* 2017;33(10):1059–63.
30. Chiu PPL, Kim PCW. Prognostic factors in the surgical treatment of congenital tracheal stenosis: A multicenter analysis of the literature. *J Pediatr Surg.* 2006;41(1):221–5.
31. Dunlap DG, Ravenel J, Sechrist J, Semaan R. Interventional therapies for central airways. *J Thorac Imaging.* 2019;34(4):W49–59.
32. Murgu SD, Egressy K, Laxmanan B, Doblare G, Ortiz-Comino R, Hogarth DK. Central airway obstruction: benign strictures, tracheobronchomalacia, and malignancy-related obstruction. *Chest.* 2016;150(2):426–41.
33. Herth FJF, Eberhardt R. Airway stent: What is new and what should be discarded. *Curr Opin Pulm Med.* 2016;22(3):252–6.
34. Eom JS, Kim H, Park HY, Jeon K, Um S-W, Koh W-J. Timing of silicone stent removal in patients with post-tuberculosis bronchial stenosis. *Ann Thorac Med.* 2013;8(4):218–23.
35. Menna C, Poggi C, Ibrahim M, D’Andrilli A, Ciccone AM, Maurizi G. Coated expandable metal stents are effective irrespective of airway pathology. *J Thorac Dis.* 2017;9(11):4574-83.
36. Marchese R, Poidomani G, Paglino G, Crimi C, Lo Nigro C, Argano V. Fully covered self-expandable metal stent in tracheobronchial disorders: Clinical

- experience. *Respiration*. 2015;89(1):49–56.
37. Fuehner T, Suhling H, Greer M, Wiesner O, Dierich M, Warnecke G. Biodegradable stents after lung transplantation. *Transpl Int*. 2013;26(7):58–60.
38. Belsey R. Resection and reconstruction of the intrathoracic trachea. *Br J Surg*. 1950;38(150):200–5.
39. Etienne H, Fabre D, Caro AG, Kolb F, Mussot S, Mercier O. Tracheal replacement. *Eur Respir J*. 2018;51(2):1–9.
40. Toomes H, Mickisch G, Vogt-Moykopf I. Experiences with prosthetic reconstruction of the trachea and bifurcation. *Thorax*. 1985;40(1):32–7.
41. Maziak DE, Todd TRJ, Keshavjee SH, Winton TL, Van Nostrand P, Pearson FG. Adenoid cystic carcinoma of the airway: Thirty-two-year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996;112(6):1522–32.
42. Azorin JF, Bertin F, Martinod E, Laskar M. Tracheal replacement with an aortic autograft. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 2006;29(2):261–3.
43. Wurtz A, Porte H, Conti M, Dusson C, Desbordes J, Copin MC. Surgical technique and results of tracheal and carinal replacement with aortic allografts for salivary gland-type carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;140(2):387-393.e2.
44. Elliott MJ, Haw MP, Jacobs JP, Bailey CM, Evans JNG, Herberhold C. Tracheal reconstruction in children using cadaveric homograft trachea. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 1996;10(9):707–12.
45. Jacobs JP, Elliott MJ, Haw MP, Bailey CM, Herberhold C, De Leval MR, et al. Pediatric tracheal homograft reconstruction: A novel approach to complex tracheal stenoses in children. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996;112(6):1549–60.
46. Chicago CLB, Jacobs ILD. Tracheal allograft reconstruction. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:1043–52.
47. Propst EJ, Prager JD, Meinzen-Derr J, Clark SL, Cotton RT, Rutter MJ. Pediatric tracheal reconstruction using cadaveric homograft. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2011;137(6):583–90.
48. Delaere P, Vrancks J, Verleden G, De Leyn P, van Raemdonck D. Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy. *Bull Acad*

- Natl Med. 2010;194(7):1335–7.
49. Greaney AM, Niklason LE. The history of engineered tracheal replacements: interpreting the past and guiding the future. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2021;27(4):341–52.
50. Guimaraes AB, Correia AT, Alves BP, Da Silva RS, Martins JK, Guerreiro Cardoso PF. Evaluation of a physical-chemical protocol for porcine tracheal decellularization. *Transplant Proc.* 2019;51(5):1611–3.
51. Hoffman B, Martin M, Brown BN, Bonassar LJ, Cheetham J. Biomechanical and biochemical characterization of porcine tracheal cartilage. *Laryngoscope.* 2016;126(10):E325–31.
52. Nonaka PN, Campillo N, Uriarte JJ, Garreta E, Melo E, De Oliveira LVF. Effects of freezing/thawing on the mechanical properties of decellularized lungs. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014;102(2):413–9.
53. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006;27(19):3675–83.
54. Khorramirouz R, Sabetkish S, Akbarzadeh A, Muhammadnejad A, Heidari R, Kajbafzadeh AM. Effect of three decellularisation protocols on the mechanical behaviour and structural properties of sheep aortic valve conduits. *Adv Med Sci.* 2014;59(2):299–307.
55. Gilpin A, Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int.* 2017;2017.
56. Partington L, Mordan NJ, Mason C, Knowles JC, Kim HW, Lowdell MW. Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds. *Acta Biomater.* 2013;9(2):5251–61.
57. Haykal S, Soleas JP, Salna M, Hofer SOP, Waddell TK. Evaluation of the structural integrity and extracellular matrix components of tracheal allografts following cyclical decellularization techniques: comparison of three protocols. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18(8):614–23.
58. Iso BSEN. Biological Evaluation of Medical Devices. *Biomed Saf Stand.* 1996;26(7):54.

59. Zvarova B, Uhl FE, Uriarte JJ, Borg ZD, Coffey AL, Bonenfant NR. Residual detergent detection method for nondestructive cytocompatibility evaluation of decellularized whole lung scaffolds. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2016;22(5):418–28.
60. Alizadeh M, Rezakhani L, Soleimannejad M, Sharifi E, Anjomshoa M, Alizadeh A. Evaluation of vacuum washing in the removal of SDS from decellularized bovine pericardium: method and device description. *Heliyon*. 2019;5(8)e02253.
61. Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, Hilfiker A, Dorfman S, Ternes W. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: Toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs*. 2010;34(3):206–10.
62. ASTM International. Standard test method for tensile properties of plastics. *ASTM Int*. 2003;08:46–58.
63. Teng Z, Trabelsi O, Ochoa I, He J, Gillard JH, Doblare M. Anisotropic material behaviours of soft tissues in human trachea: An experimental study. *J Biomech*. 2012;45(9):1717–23.
64. Butler CR, Hynds RE, Crowley C, Gowers KHC, Partington L, Hamilton NJ. Vacuum-assisted decellularization: an accelerated protocol to generate tissue-engineered human tracheal scaffolds. *Biomaterials*. 2017;124:95–105.
65. Piccoli M, Urbani L, Alvarez-Fallas ME, Franzin C, Dedja A, Bertin E. Improvement of diaphragmatic performance through orthotopic application of decellularized extracellular matrix patch. *Biomaterials*. 2016;74:245–55.
66. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song G. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*. 2019;8(8):1-18.
67. Janmey PA, Wells RG, Assoian RK, McCulloch CA. From tissue mechanics to transcription factors. *Differentiation*. 2013;86(3):112–20.
68. Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, Marg B, Ortiz M, Funaki M. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005;60(1):24–34.
69. Lange P, Greco K, Partington L, Carvalho C, Oliani S, Birchall MA, et al. Pilot study

- of a novel vacuum-assisted method for decellularization of tracheae for clinical tissue engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(3):800–11.
70. Hong P, Bezuhly M, Graham ME, Gratzner PF. Efficient decellularization of rabbit trachea to generate a tissue engineering scaffold biomatrix. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2018;112(June):67–74.
71. Chani B, Puri V, Sobti RC, Jha V, Puri S. Decellularized scaffold of cryopreserved rat kidney retains its recellularization potential. *PLoS One*. 2017;12(3):1–20.
72. Williams C, Liao J, Joyce EM, Wang B, Leach JB, Sacks MS. Altered structural and mechanical properties in decellularized rabbit carotid arteries. *Acta Biomater*. 2009;5(4):993–1005.
73. Vogel G. Trachea transplants test the limits. *Science*. 2013;340(6130):266–8.
74. Trabelsi O, del Palomar AP, López-villalobos JL, Ginel A, Doblaré M. Experimental characterization and constitutive modeling of the mechanical behavior of the human trachea. *Med Eng Phys*. 2010;32(1):76–82.
75. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, et al. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2003;66(1):287–98.
76. Jungebluth P, Go T, Asnaghi A, Bellini S, Martorell J, Calore C. Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;138(3):586–93.
77. Bonenfant NR, Sokocevic D, Wagner DE, Borg ZD, Lathrop MJ, Lam YW. The effects of storage and sterilization on de-cellularized and re-cellularized whole lung. *Biomaterials*. 2013;34(13):3231–45.
78. Sari H, Hanci D, Sari B, Kumral TL, Gurpinar B, Tanrisever O, et al. Preservation of autogenous septal cartilage for revision surgery. *J Craniofac Surg*. 2019;30(3):E272–5.
79. Vesper EO, Hammond MA, Allen MR, Wallace JM. Even with rehydration , preservation in ethanol influences the mechanical properties of bone and how bone responds to experimental manipulation. *Bone*. 2017;97:49–53.
80. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues. *Organogenesis*.

2009;5(3):119–26.

81. Poornejad N, Frost TS, Scott DR, Elton BB, Reynolds PR, Roeder BL. Freezing/thawing without cryoprotectant damages native but not decellularized porcine renal tissue. *Organogenesis*. 2015;11(1):30–45.
82. Brockbank KGM, Wright GJ, Yao H, Greene ED, Chen ZZ, Schenke-Layland K. Allogeneic heart valve storage above the glass transition at -80°C. *Ann Thorac Surg*. 2011;91(6):1829–35.
83. Arutyunyan I, Elchaninov A, Sukhikh G, Fatkhudinov T. Cryopreservation of tissue-engineered scaffold-based constructs: from concept to reality. *Stem Cell Rev Reports*. 2022;18(4):1234–52.
84. Wang J, Zhang H, Feng Y, Sun Y, Ma R, Cui P. Biomechanical changes of freezer-stored and decellularized pig tracheal scaffoldings. *J Biomater Appl*. 2021;35(9):1208–17.
85. Milian L, Sancho-Tello M, Roig-Soriano J, Foschini G, Martínez-Hernández NJ, Más-Estellés J. Optimization of a decellularization protocol of porcine tracheas. Long-term effects of cryopreservation. A histological study. *Int J Artif Organs*. 2021;44(12):998–1012.