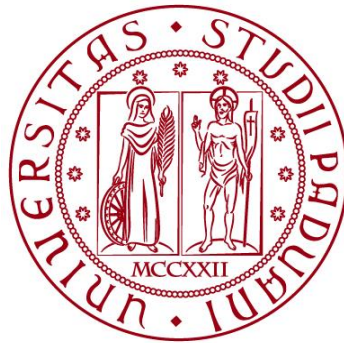


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**LA DECELLULARIZZAZIONE PARZIALE QUALE
STRATEGIA EFFICACE PER L'ALLESTIMENTO DI GRAFT
TRACHEALI NON IMMUNOGENICI**

Tutor: Prof.ssa Elena Stocco

Dipartimento di Neuroscienze

Co-tutor: Prof.ssa Silvia Barbon

Dipartimento di Neuroscienze

Laureanda: Annachiara Caioni

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

ABSTRACT

1. STATO DELL'ARTE

- 1.1. Anatomia della trachea
- 1.2. Strategie terapeutiche avanzate per le lesioni tracheali
 - 1.2.1. La decellularizzazione parziale
 - 1.2.2. La crioconservazione

2. SCOPO DELLA TESI

3. MATERIALI E METODI

- 3.1. Dichiarazione etica e cura degli animali
- 3.2. Fabbricazione di PDTG
- 3.3. Impianto di innesti tracheali
- 3.4. Preparazione istologica e analisi degli innesti tracheali
 - 3.4.1. Infiltrazione di cellule T
 - 3.4.2. Analisi dell'epitelizzazione
 - 3.4.3. Spessore sottomucoso
 - 3.4.4. Tomografia micro-computerizzata (microCT)
 - 3.4.5. Analisi statistica

4. RISULTATI

- 4.1. Confronto morfologico degli innesti a diversi end-point
 - 4.1.1. Analisi dell'altezza dell'epitelio
 - 4.1.2. Analisi del ripopolamento dell'innesto da parte delle cellule epiteliali
- 4.2. Analisi dell'infiltrazione di cellule T CD8+ e CD4+ a diversi end-point

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

- 5.1. Il potenziale della decellularizzazione parziale nell'eliminare l'immunogenicità degli allotrapianti tracheali
- 5.2. Limiti e prospettive future
- 5.3. Conclusione

BIBLIOGRAFIA

APPENDICE

ABSTRACT

La ricostruzione tracheale si configura come una sfida complessa nell'eventualità in cui l'anastomosi termino-terminale dell'organo non sia praticabile. In tale contesto, l'ingegneria tissutale si sta dedicando allo sviluppo di strutture quali allograft o xenograft per future applicazioni in ambito clinico, tuttavia, sebbene la decellularizzazione parziale sembri essere una strategia interessante a tale scopo, capace di preservare le proprietà meccaniche dello scaffold, l'efficacia del metodo nella riduzione dell'immunogenicità dei campioni è ancora controversa. Lo studio oggetto di questo lavoro di tesi dimostra come l'impianto di allograft immunogenici porti a desquamazione delle cellule epiteliali del graft con sostituzione di queste stesse da parte di cellule displastiche di epitelio colonnare. Diversamente, la decellularizzazione parziale sostiene la rigenerazione di un epitelio adeguato, senza mostrare evidenze di rigetto. Inoltre, l'impianto di allograft ha stimolato l'infiltrazione di cellule T CD8+, noti mediatori della risposta immunitaria, mentre questo non è avvenuto con gli innesti tracheali parzialmente decellularizzati. I risultati dello studio dimostrano come la decellularizzazione parziale sia un approccio promettente nella prospettiva di applicazioni cliniche future.

1. STATO DELL'ARTE

1.1. Anatomia della trachea

La trachea è una struttura tubolare delimitata superiormente dalla laringe ed inferiormente dalla carena che si continua con i bronchi principali destro e sinistro. La sua principale funzione è quella di consentire il passaggio dell'aria durante la respirazione. Durante l'inspirazione, l'aria carica di ossigeno è condotta dalla trachea ai polmoni; durante l'espirazione, l'anidride carbonica raccolta negli alveoli polmonari viene espulsa dai polmoni verso l'esterno.

Tipicamente, la lunghezza della trachea è di circa 11,8 cm, con un range compreso tra i 10 e i 13 cm nei maschi, mentre nelle femmine la trachea tende ad essere più corta. L'architettura della trachea è costituita da un numero variabile di anelli cartilaginei incompleti posteriormente (da 18 a 22), la porzione posteriore della trachea è infatti delimitata da una parete membranosa (*pars membranacea*) ove scorre longitudinalmente, lungo il suo versante posteriore, il muscolo tracheale che, attraverso dei fascetti muscolari, si connette all'esofago anteriore. Anteriormente, gli anelli cartilaginei sono connessi tra loro da una membrana intercartilaginea.

Il lume della trachea è rivestito da epitelio cilindrico, ciliato, pseudostratificato contenente cellule caliciformi che secernono muco. La mucosa, inoltre, presenta dei condotti che collegano le ghiandole mucose della sottomucosa alla superficie del lume tracheale. Le ciglia svolgono il compito di spostare il muco, all'interno del quale sono intrappolati microrganismi e particelle, in modo tale che questi ultimi possano essere espulsi dalle vie respiratorie.

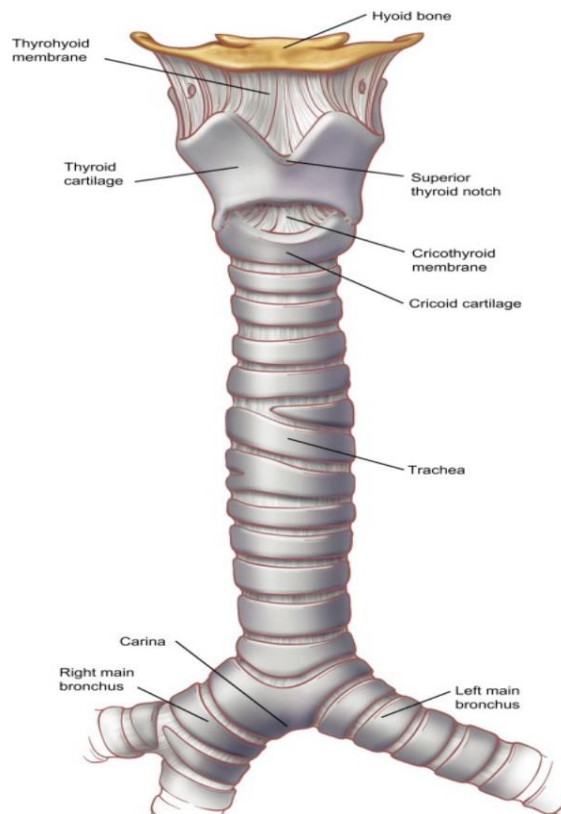


Figura 1: Struttura della trachea^[1]

La vascolarizzazione della trachea è garantita dall'arteria tiroidea inferiore, attraverso i propri rami tracheali, e dall'arteria toracica interna. I vasi arteriosi che emergono da esse decorrono lateralmente ed irrorano l'organo con vasi segmentali, anastomizzati tra loro superiormente ed inferiormente all'interno dei legamenti intercartilaginei. Successivamente tali vasi decorrono circonfenzialmente all'organo, fino ad anastomizzarsi con il vaso controlaterale.^[1]

1.2. Strategie terapeutiche avanzate per le lesioni tracheali

La gestione chirurgica della lesione tracheale costituisce una sfida significativa in ambito clinico a causa delle difficoltà intrinseche agli interventi a carico delle vie aeree.

Allo stato dell'arte, l'escissione di un segmento tracheale compromesso con successiva anastomosi termino-terminale dei due monconi (TRA, *tracheal resection anastomosis*) costituisce il trattamento di elezione nel *management* di una serie di condizioni quali le stenosi tracheali congenite, le lesioni traumatiche, le malattie infiammatorie croniche, le neoplasie o eventuali esiti da intubazione. Tuttavia, la fattibilità della TRA è vincolata dalla percentuale del tratto tracheale da rimuovere, che non deve superare il 50% nei pazienti adulti e il 30% nei pazienti pediatrici. Questa limitazione è dovuta al rischio di tensione eccessiva nell'anastomosi, che potrebbe rendere impraticabile il ricongiungimento delle due estremità tracheali nell'eventualità di difetti con dimensioni maggiori.^[2]

Attualmente, nei pazienti che presentano lesioni tracheali di estensione considerevole, l'approccio adottato prevede il ricorso a dispositivi quali stent endotracheali, cannule tracheostomiche o tubi di Montgomery a T. Nonostante ciò, è fondamentale evidenziare che tali *devices* risultano intrinsecamente associati a una significativa riduzione della qualità della vita dei pazienti associandosi spesso ad una serie di complicanze, tra cui infezioni, migrazione dei dispositivi di supporto, occlusione delle mucose e la formazione di tessuto di granulazione. Inoltre, è importante sottolineare che, nell'eventualità di lesioni tracheali maligne, l'utilizzo di stent delle vie aeree rappresenta solamente una strategia palliativa.

Al fine di superare le limitazioni tecniche presentate dalla procedura di TRA e di rispondere alle esigenze cliniche dei pazienti quando non sono disponibili altre opzioni terapeutiche, è stata avanzata l'ipotesi di ricorrere alla sostituzione tracheale, attraverso l'impiego di sostituti tracheali.^[3]

Un sostituto tracheale ideale dovrebbe presentare una struttura che imita le caratteristiche anatomiche e morfologiche della trachea naturale permettendo alle cellule di aderire, migrare, proliferare e specializzarsi. Inoltre, dovrebbe essere sufficientemente resistente dal punto di vista biomeccanico e biocompatibile. Brevemente, si ricerca un graft:

- abbastanza rigido latero-lateralmente ma comunque flessibile in lunghezza così da assecondare i movimenti del capo sul collo;
- con una superficie interna che assomigli all'epitelio ciliato delle vie respiratorie;

- che possa essere suturato adeguatamente ai monconi prossimale e distale;
- compatibile con i tessuti circostanti alla sede d'impianto per evitare problemi come infiammazioni, formazione di tessuto cicatriziale, infezioni ed erosioni;
- facile da allestire e impiantare oltre che riproducibile;
- che non richieda l'uso prolungato di farmaci immunosoppressori post-impianto.^[4]

Tra i vari studi volti all'identificazione di un valido sostituto tracheale è stato valutato l'allotrapianto aortico. Matrici aortiche combinate con stent sono state dunque impiegate per la ricostruzione tracheale e bronchiale. Un possibile limite associato a questa strategia è la mancanza di una specifica vascolarizzazione dell'impianto stesso, che potrebbe portare alla possibile degenerazione della protesi.^[5]

Il trapianto tracheale potrebbe essere un'opzione interessante, tuttavia si tratta di una procedura molto complessa non scevra da criticità, tra cui:

1. la terapia immunosoppressiva è spesso necessaria dopo il trapianto, ma non è sicura per i pazienti con tumori maligni, perché potrebbe far progredire la malattia o causare recidive più velocemente.
2. La trachea è alimentata da un sistema complesso di piccoli vasi sanguigni, che sono troppo piccoli e segmentati per essere facilmente riattivati dopo un trapianto diretto.
3. Il trapianto d'organo, in generale, è una procedura chirurgica molto complessa. Nel caso del trapianto di trachea, mantenere il flusso di sangue adeguato attraverso i piccoli vasi sanguigni è particolarmente difficile.^[6]

Al fine di superare i limiti descritti, l'attenzione dei ricercatori si sta volgendo verso l'allestimento e la valutazione di particolari tipi di scaffold quali trachee allogene decellularizzate da donatore cadavere. Attraverso l'impiego di una combinazione di metodi chimici e fisici o una combinazione di metodi chimici ed enzimatici insieme a metodi fisici è possibile, infatti, creare specifiche strutture che mantengono la loro forma nativa e contengono elementi importanti, capaci di supportare/favorire la rigenerazione del tessuto compromesso.

1.2.1 La decellularizzazione parziale

Tra gli scaffold più promettenti, si identificano le matrici extracellulari (ECM) ottenute da tessuti allogene decellularizzati e quindi ripopolati con cellule autologhe o staminali. I protocolli di decellularizzazione devono essere efficaci nel rimuovere le cellule del donatore che potrebbero scatenare una risposta immunitaria da parte dell'ospite, mantenendo al contempo l'impalcatura proteica propria della matrice stessa. I protocolli di decellularizzazione possono avere una durata variabile e prevedono l'alternanza di metodi chimici/fisici/enzimatici volti a promuovere la rottura delle membrane cellulari, degradare il materiale genetico associato alla

presenza di cellule del donatore, per poi rimuovere i detriti cellulari stessi ed eventuali sostanze chimiche residue.^[7]

Ad oggi, l'impianto di un allograft tracheale decellularizzato è considerato una procedura compassionevole. Questo tipo di graft è infatti ancora oggetto di studio in quanto non sono completamente note le modificazioni morfo-strutturali della ECM che derivano dall'impiego di protocolli potenzialmente aggressivi.

Sebbene l'utilizzo di strutture completamente acellulari comporti un minor rischio di risposta immunitaria da parte dell'ospite, l'integrità strutturale dell'impianto potrebbe essere compromessa. Da qui l'interesse verso costrutti parzialmente decellularizzati che rappresentino delle soluzioni di equilibrio tra una ridotta immunogenicità e una buona meccanicità del tessuto.^[8]

1.2.2 La crioconservazione

La crioconservazione è un processo che preserva organelli, cellule, tessuti o qualsiasi altro costrutto biologico raffreddando i campioni biologici a temperature molto basse, permettendo quindi di conservarli per un periodo considerevole e preservare la struttura finale delle cellule. L'efficacia della crioconservazione di cellule e tessuti è dovuta all'utilizzo di agenti crioprotettivi e apparecchiature per il controllo della temperatura.^[9]

La crioconservazione è, quindi, una delle procedure più comuni per la conservazione degli allotrapianti: dopo essere stati congelati in modo controllato con l'uso di un crioprotettore, i tessuti vengono conservati in azoto liquido in fase vapore per un periodo specifico. Successivamente, prima di essere utilizzati, vengono scongelati con un processo di riscaldamento controllato.

La crioconservazione, inoltre, potrebbe essere una tecnica interessante per ridurre l'antigenicità degli allotrapianti tracheali grazie a delle alterazioni dell'epitelio tracheale e della lamina propria, quali bersagli principali del meccanismo del rigetto.

Tuttavia, anche in questo caso, gli effetti complessivi legati a tale procedura non sono del tutto chiari: ci sono ancora diverse lacune riguardo le conseguenze della crioconservazione e il successivo scongelamento, sulla vitalità delle cellule del tessuto tracheale, sulla risposta immunitaria e sulle caratteristiche della matrice extracellulare.^[8]

2. SCOPO DELLA TESI

Attualmente, non esiste uno standard di cura per la ricostruzione tracheale nell'eventualità di lesioni severe. L'obiettivo di questo lavoro è quello di ricorrere all'ingegneria tissutale per allestire un allotrapianto o uno xenotrapianto che possa supportare la rigenerazione di un tessuto tracheale simile a quello nativo. In particolare, la decellularizzazione parziale e la crioconservazione del tessuto sono state oggetto d'interesse.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Dichiarazione etica e cura degli animali

Il protocollo (AR15-00090) è stato approvato dall'Institutional Animal Care and Use Committee of the Abigail Wexner Research Institute dell'ospedale Nationwide Children (Columbus, OH). Tutti gli animali sono stati trattati secondo gli standard etici pubblicati dal servizio sanitario pubblico, National Institutes of Health e secondo le norme del Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti (USDA) definiti nella legge sul benessere degli animali (Animal Welfare Act).

3.2. Fabbricazione di PDTG

Gli innesti tracheali sono stati prelevati da topi di genere femminile C57BL/6 e Balb/c a 6-8 settimane dalla nascita. Le trachee prossimali sono state sezionate, ed è stato estratto da ciascuna di esse un segmento tracheale lungo 5 mm conservato a -80°C in 1 mL di soluzione criopreservante composta dal Dulbecco's Modified Eagle Medium, siero bovino fetale 10%, penicillina/streptomicina 1% e dimetilsolfossido 5%.

A seguire sono stati fabbricati gli innesti tracheali parzialmente decellularizzati (PDTG, partially decellularized tracheal grafts).

Sia i PDTG derivati da Balb/c, ovvero allotrapianti tracheali parzialmente decellularizzati (PDTA, partially decellularized tracheal allografts) che derivati da C7BL6, ovvero sintrapianti tracheali parzialmente decellularizzati (PDTS, partially decellularized tracheal syngrafts) sono stati ottenuti seguendo un protocollo di decellularizzazione della durata di 7 ore.

In sintesi, le trachee sono state lavate con penicillina/streptomicina 1% in PBS 1x e successivamente trattate con sodio dodecil solfato (SDS) 0,01% e cloruro di sodio (NaCl) 0,9% per 5 minuti.

Le trachee sono state trattate con soluzioni SDS graduate al 0,01% e al 0,1% in modo consecutivo per 3 ore ciascuna, per poi procedere con un'immersione in SDS 0,2% e 0,1% per 15 minuti ciascuna. Successivamente sono state trattate con Triton X-100 1% in acqua distillata per 5 minuti in modo tale da eliminare gli acidi nucleici; in seguito, è stato eseguito un lavaggio finale con NaCl 0,9% per 15 minuti. Tutte le operazioni sono state eseguite su un agitatore alla velocità di 48 giri/min. I PDTG sono stati poi crioconservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

3.3. Impianto di innesti tracheali

Sono stati allestiti quattro gruppi sperimentali in cui sono stati impiantati innesti tracheali singenici (N=5/STG), allotrapianti tracheali parzialmente decellularizzati (N=10/PDTA), sintrapianti tracheali parzialmente decellularizzati (N=10/PDTS) e allotrapianti (N=10/ATG).

Durante l'intervento, è stato reciso un segmento tracheale di 4 mm e impiantato ortotopicamente il graft lungo 5 mm, precedentemente immerso in una soluzione tampone fosfato salino (Figura 2). Gli innesti sono stati impiantati in base al "giorno

della procedura" e "chirurgo" in modo randomizzato per garantire una distribuzione equilibrata tra i gruppi sperimentali. Gli animali sono stati sottoposti a eutanasia in tempi diversi: 10 giorni per valutare il rigetto acuto, 1 e 3 mesi per valutare il rigetto cronico. Esclusivamente topi di sesso femminile sono stati utilizzati per evitare influenze legate al sesso sulle risposte dell'ospite agli innesti. Un monitoraggio attento è stato condotto per rilevare la necessità di eutanasia precoce, come difficoltà respiratorie o perdita di peso superiore al 20% rispetto al peso precedente all'intervento. Gli animali sono stati sottoposti ad eutanasia, obbligata o ad endpoint pianificato, mediante un mix di ketamina/xilazina. Una volta confermata l'eutanasia, l'intera trachea, comprendente di innesto, è stata rimossa e fissata in formalina neutra tamponata al 10%.

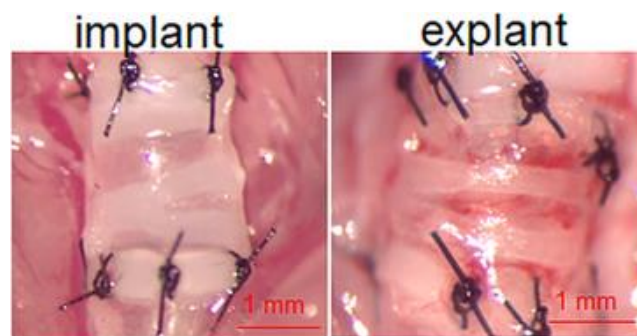


Figura 2: Immagine rappresentativa del trapianto tracheale ortotopico

3.4. Preparazione istologica e analisi degli innesti tracheali

Gli innesti STG, PDTA e PDTTS, e ATG, precedentemente fissati in formalina, sono stati decalcificati in EDTA al 15% a 4°C per tutta la notte e in seguito inclusi in paraffina. Tramite l'utilizzo di un microtomo, sono state poi ottenute delle sezioni longitudinali dello spessore di 4 µm in modo tale da ottenere delle sezioni sottili ottimali per l'analisi microscopica. Le sezioni sono state de-paraffinate con xilene, reidratate tramite concentrazioni decrescenti di etanolo, colorate con ematossilina per evidenziare i nuclei delle cellule e controcolorate con eosina per evidenziare le componenti citoplasmatiche. Le fibre collagene sono state individuate tramite colorazione tricromica di Masson, mentre le cellule apoptotiche attraverso il saggio TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay) il quale permette di rilevare il DNA frammentato di tali cellule.

3.4.1. Infiltrazione di cellule T

L'infiltrazione delle cellule T è stata valutata tramite immunofluorescenza (IF) per le cellule T CD4 e CD8. Brevemente, sono stati utilizzati rispettivamente gli anticorpi primari Rabbit Anti-CD4 (diluizione 1:500) e Rabbit Anti-CD8 (diluizione 1:250) e Anti-rabbit Alexa Fluor 594 come anticorpo secondario. L'infiltrazione delle cellule T è stata valutata quantificando il numero di cellule T per area sottomucosa.

3.4.2. Analisi dell'epitelizzazione

La formazione e lo sviluppo di un nuovo strato epiteliale sono stati valutati in sezioni tracheali post-impianto tramite ematossilina ed eosina e analisi a immunofluorescenza. Le immagini delle sezioni sono state ottenute utilizzando la microscopia in campo chiaro e a immunofluorescenza.

Le sezioni longitudinali dei tessuti sono state colorate utilizzando l'anti-Acyl Alpha-tubulin di topo (ACT) per identificare la presenza di cellule epiteliali ciliate, tipiche dell'epitelio tracheale. In seguito, l'infiltrazione epiteliale è stata valutata misurando la percentuale di copertura delle cellule ACT-positive rispetto alla lunghezza dell'innesto, in modo da comprendere la distribuzione delle cellule ciliate.

3.4.3. Spessore sottomucoso

La quantificazione dello spessore dello strato sottomucoso situato tra la cartilagine e la membrana basale è stata condotta tramite l'utilizzo del software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD). Sono state eseguite cinque misurazioni regolarmente distanziate dell'altezza sottomucosa per ciascun anello cartilagineo e calcolata la media.

3.4.4. Tomografia micro-computerizzata (microCT)

La tomografia micro-computerizzata (microCT) è stata utilizzata per valutare la pervietà dell'innesto a 1 mese e 3 mesi dopo l'intervento, così da poterne monitorare l'efficienza tramite l'utilizzo del sistema μ PET/CT su animali vivi. Dopo essere stati anestetizzati con isoflurano, un gas anestetico, somministrato attraverso inalazione in aria ambiente a un flusso di 1-3 L/min, gli animali sono stati disposti in posizione prona per eseguire la scansione che prevede una rotazione completa di 360° con un tubo a raggi X da 0,33 mA e 55 kV. L'angolo di rotazione per ogni passo è di $0,750^\circ$, con una proiezione per ogni passo, binning 1×1 e un tempo di esposizione di 40 ms. Le immagini sono state ricostruite tramite il software MILabs v12.0 (Utrecht, The Netherlands) con una griglia voxel da $40 \mu\text{m}$, filtro di proiezione Hann e filtro di volume gaussiano ($160 \mu\text{m}$). Infine, a partire da ogni fetta di scansione dell'innesto, è stata quantificata l'area del lume delle vie aeree e poi analizzata con il software ImageJ.

3.4.5. Analisi statistica

I dati che seguono una distribuzione normale sono stati confrontati utilizzando il t-test di Welch per i dati con varianze non uguali e il t-test non accoppiato e l'ANOVA per i dati con varianze uguali.

Test non parametrici (Mann Whitney-U) sono stati utilizzati per dati non normalmente distribuiti. I test statistici sono stati svolti con il software GraphPad Prism 8. La differenza tra gruppi è stata considerata statisticamente significativa a valori di p inferiori a 0,05 e i risultati sperimentali sono stati riportati in termini di medie \pm deviazioni standard (SD).

4. RISULTATI

4.1. Confronto morfologico degli innesti a diversi end-point

Gli innesti sono rimasti pervi, senza segni di restringimento delle vie aeree (Figura 3); inoltre, gli animali che hanno subito il trapianto ortotopico hanno ben tollerato l'intervento senza manifestare segni di difficoltà respiratoria al momento dell'eutanasia, presentando tassi di sopravvivenza simili (Figura 4).

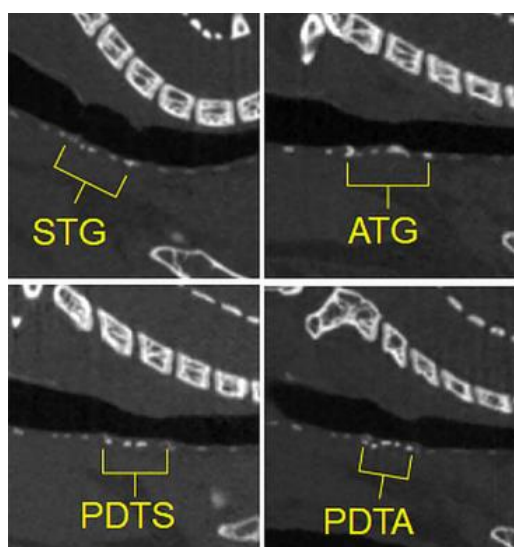


Figura 3: Tomografia micro-computerizzata che dimostra la pervietà dell'innesto

Graft type	Percent Survival		
	10d (N)	1m (N)	3m (N)
STG	60% (3/5)	100% (4/4)	100% (4/4)
ATG	80% (8/10)	100% (8/8)	80% (8/10)
PDTS	80% (8/10)	100% (8/8)	90% (9/10)
PDTA	70% (7/10)	90% (9/10)	80% (8/10)

Figura 4: Tassi di sopravvivenza

La valutazione degli innesti è stata eseguita a diversi end-point programmati; infatti, gli animali sono stati sottoposti ad eutanasia rispettivamente a 10, 30 e 90 giorni dall'intervento. In particolare, al giorno 10 (Figura 5 e 6):

- Gli allotrapianti (ATG) hanno iniziato a mostrare segni di rigetto acuto, caratterizzato dalla presenza di infiltrato eosinofilo all'interno della lamina propria e dalla desquamazione dell'epitelio tracheale con conseguente perdita di cellule ciliate e aumento dell'altezza epiteliale.
- Nei sintrapianti (STG), che rappresentano il controllo chirurgico, non ci sono stati segni di infiltrato eosinofilo o di danni strutturali all'epitelio, il quale è rimasto anatomicamente identico a quello della trachea nativa.
- Gli innesti tracheali parzialmente decellularizzati (PDTG) hanno manifestato una rapida crescita dell'epitelio senza segni di infiltrazione di eosinofili, i quali sarebbero compatibili con una risposta immunitaria. Le cellule ciliate dell'epitelio hanno raggiunto al giorno 10 uno stadio terminale di differenziazione, con ricostruzione dell'epitelio pseudostratificato ciliato entro un mese (Figura 9). Tra gli innesti parzialmente decellularizzati singenici (PDTS) e quelli di derivazione da allotrapianto (PDTA) non si evidenziano differenze a livello anatomico e strutturale dell'epitelio.

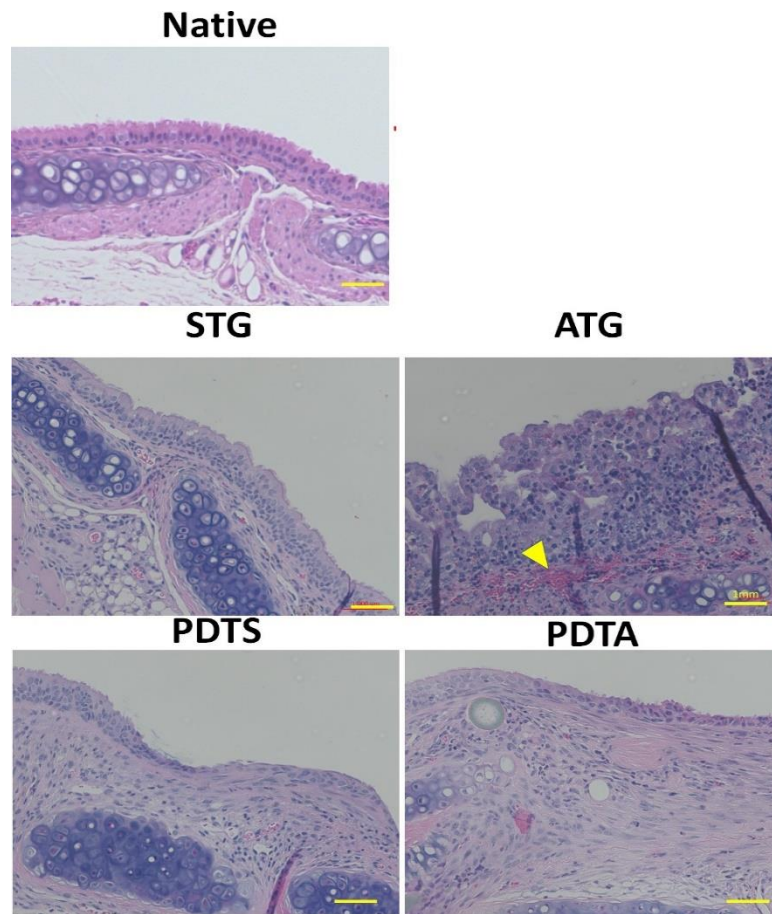


Figura 5: Immagini rappresentative della trachea nativa e degli innesti tracheali a 10 giorni dall'impianto. La trachea nativa e l'STG mostrano un epitelio colonnare pseudostratificato mentre l'ATG presenta desquamazione epiteliale e infiltrati eosinofili. PDTS e PDTA si presentano con un neoepitelio ciliato che ripopola l'innesto.

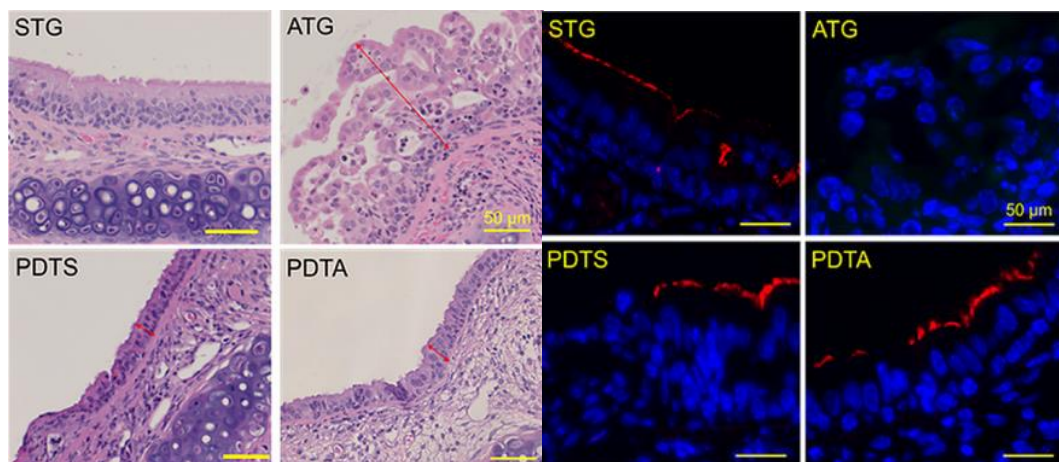


Figura 6: a sinistra, sezioni longitudinali di innesti tracheali a 10 giorni dalla chirurgia; a destra, immagine IF dell'epitelio tracheale con cellule ciliate a 10 giorni dalla chirurgia.

4.1.1. Analisi dell'altezza dell'epitelio

Negli ATG, a 10 giorni dall'innesto, si riscontra un aumento dell'altezza dell'epitelio rispetto alla trachea nativa, con una successiva diminuzione a 1 e 3 mesi.

Negli STG l'altezza dell'epitelio rimane pressoché costante durante i diversi end-point e confrontabile rispetto alla trachea nativa.

Sia nei PDTA che nei PDTS si osserva un progressivo aumento dell'altezza epiteliale, a partire da 10 giorni fino ad arrivare a 3 mesi, che può essere associato alla rapida ripitelizzazione del tessuto con formazione dell'epitelio pseudostratificato.

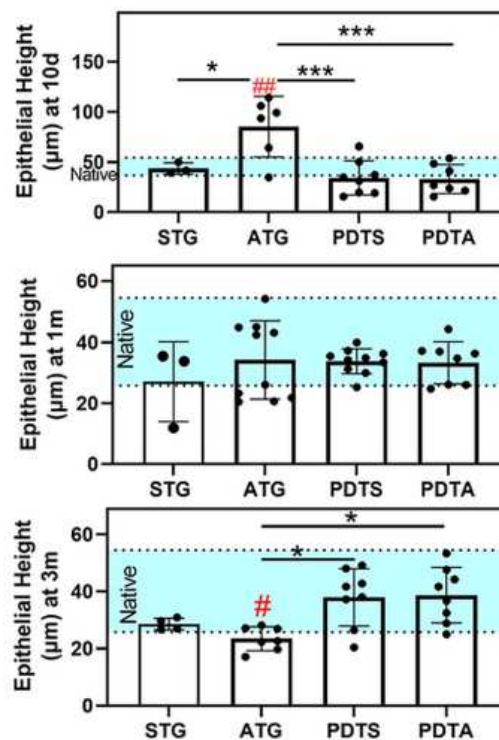


Figura 7: altezza epiteliale a 10 giorni, 1 mese e 3 mesi

4.1.2. Analisi del ripopolamento dell'innesto da parte delle cellule epiteliali

Gli STG e i PDTG mostrano un progressivo aumento dell'epitelizzazione durante i tre diversi end-point programmati, fino al raggiungimento del livello nativo. Quanto detto, però, non può essere affermato anche per gli ATG, in cui il ripopolamento dell'innesto da parte delle cellule epiteliali non raggiunge il livello nativo; infatti, gli allotrapianti mostrano un epitelio smussato e con meno ciliazione (Figura 8 e 9).

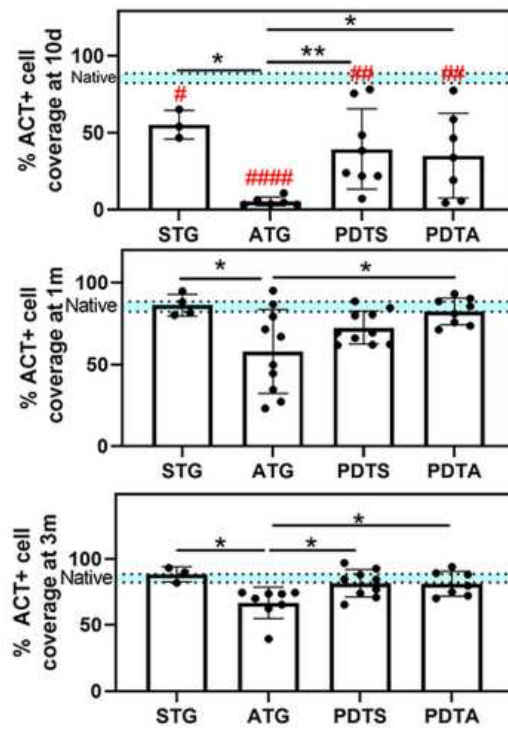


Figura 8: Percentuale di copertura dell'innesto con cellule epiteliali ACT+ a 10 giorni, 1 e 3 mesi

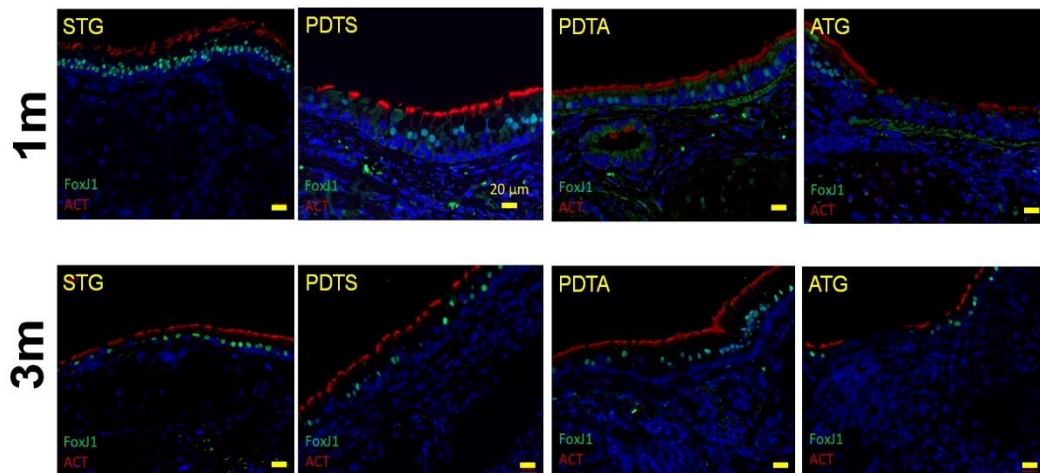


Figura 9: Immagini IF rappresentative dell'epitelizzazione (ACT+) degli innesti a 1 e 3 mesi dalla chirurgia. Il verde mostra cellule ciliate differenziate terminalmente, mentre il rosso denota epitelio ciliato (ACT). PDTA e PDTS hanno un'epitelizzazione simile rispetto agli STG mentre gli ATG hanno un epitelio con un ridotto numero di ciglia.

4.2. Analisi dell'infiltrazione di cellule T CD8+ e CD4+ a diversi end-point

L'immunogenicità dei PDTG è stata valutata mediante l'analisi dell'infiltrazione di cellule T in acuto (10 giorni) ed in cronico (1 e 3 mesi).

Negli ATG è stato riscontrato un aumento sia in acuto che in cronico delle cellule T CD8+ nella lamina propria, tale incremento può essere associato a cellule apoptotiche, assenti sia nei PDTG che negli STG (Figura 10 e 11).

Nei PDTA e nei PDTS la percentuale di cellule T CD8+ è simile, suggerendo che la decellularizzazione parziale ha efficacemente eliminato l'immunogenicità dell'allograft (Figura 12 e 13).

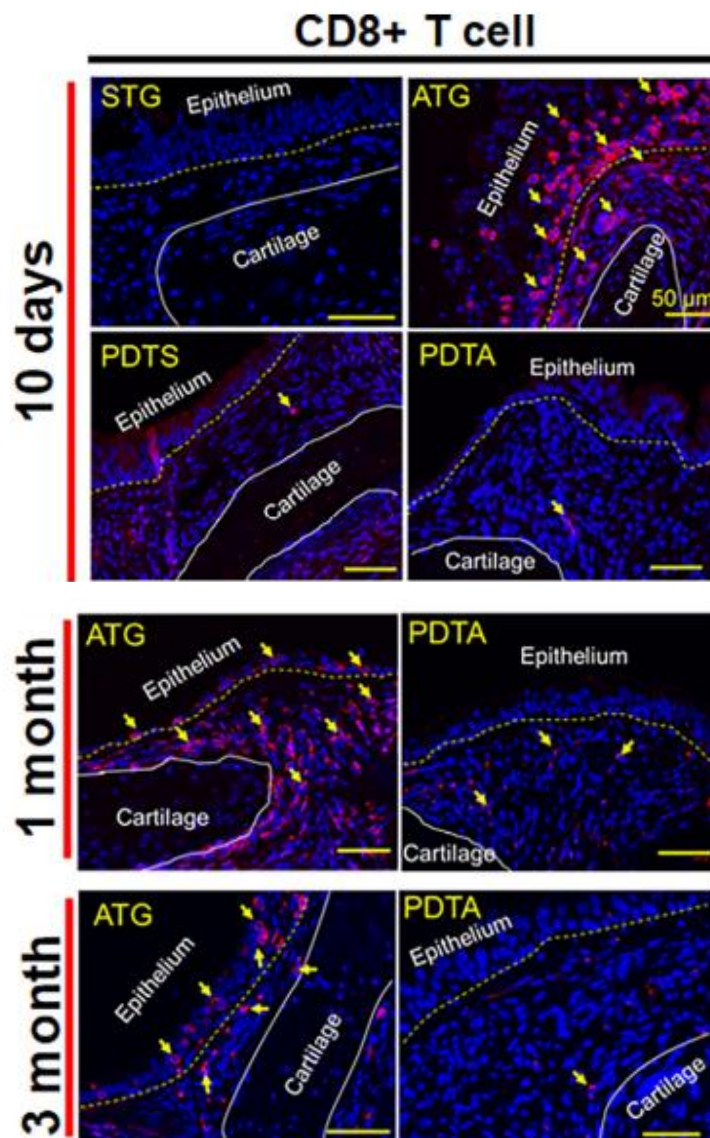


Figura 10: Immagini IF rappresentative di cellule T CD8+ in innesti a 10 giorni, 1 mese e 3 mesi.

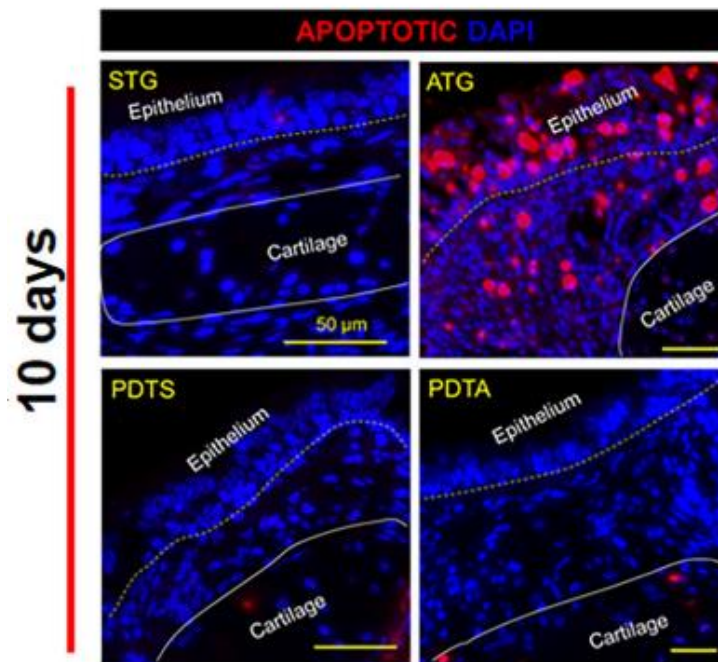


Figura 11: Immagine del test TUNEL. Il rosso mostra le cellule apoptotiche mentre il blu evidenzia i nuclei cellulari.

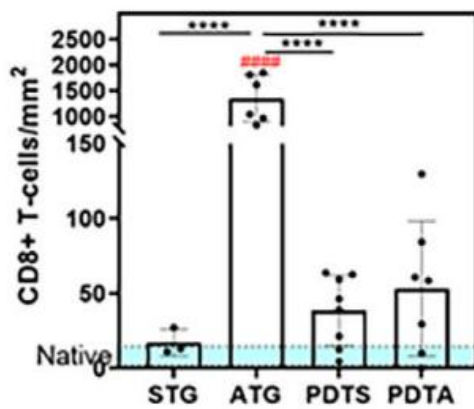


Figura 12: cellule T CD8+/mm² a 10 giorni

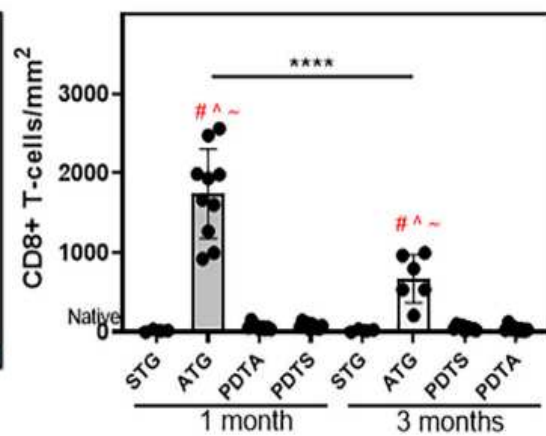


Figura 13: Cellule T CD8+/mm² a 1 mese e a 3 mesi

Inoltre, si ha un aumento delle cellule T CD4+, a 10 giorni (Figura 16) e a 1 mese, sia nei PDTG che negli ATG. A 3 mesi, invece, le cellule T CD4+ sono risultate uguali al controllo nei PDTG, mentre negli allotrapianti sono aumentate notevolmente (Figura 14 e 15).

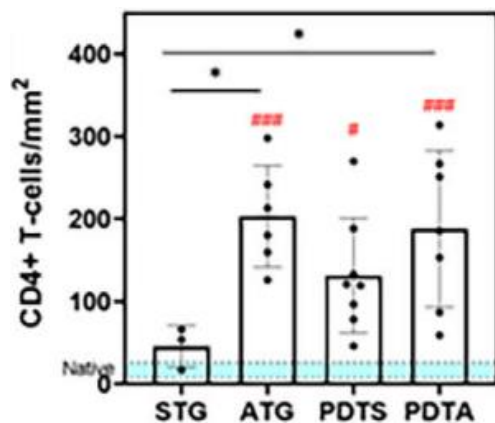


Figura 14: Cellule T CD4+/mm2 a 10 giorni

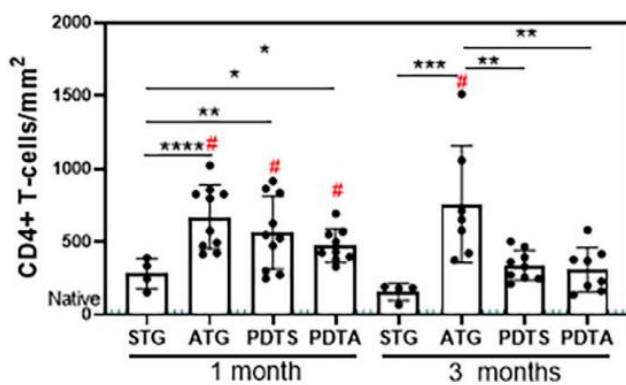


Figura 15: Cellule T CD4+/mm2 a 1 mese e 3 mesi

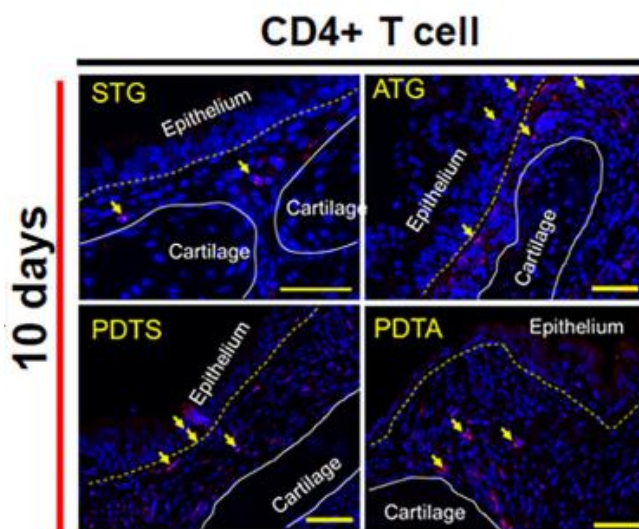


Figura 16: Immagini IF rappresentative di cellule T CD4+ in innesti a 10 giorni

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

5.1. Il potenziale della decellularizzazione parziale nell'eliminare l'immunogenicità degli allotrapianti tracheali

Attraverso l'uso di un modello murino, mediante un approccio microchirurgico, è stata investigata l'immunogenicità degli innesti tracheali. I risultati hanno evidenziato una modificazione delle cellule epiteliali e la loro sostituzione con epitelio colonnare displastico caratterizzato da un'alterazione dell'altezza dell'epitelio stesso e dalla presenza di specifiche cellule ciliate. La presenza di cellule T CD4⁺ e CD8⁺ non può essere associata ad una condizione di restringimento delle vie aeree e quindi a stenosi; piuttosto, l'aumento delle cellule T CD8⁺ sembra correlare con le modifiche epiteliali negli allotrapianti.

Per quanto riguarda la decellularizzazione parziale, si può affermare che tale procedura permette di eliminare l'immunogenicità dell'innesto sia nei PDTA che nei PDTG, senza alcuna differenza tra i due tipi durante la rigenerazione dell'epitelio; inoltre, in tali innesti i livelli di cellule T CD8⁺ risultano simili ai livelli basali.

Considerando che il PDTA deriva da una trachea allogenica, lo studio dimostra come la decellularizzazione parziale non provochi rigetto in acuto o in cronico.

Interpretando i risultati, è possibile affermare che la ricostruzione dell'epitelio tracheale è, in parte, guidata dalle cellule T CD4⁺, in particolare le cellule T-regolatorie svolgono un ruolo cruciale nella rigenerazione tissutale. Quanto appena detto è dimostrato dal fatto che nei PDTG si osservano livelli elevati di cellule T CD4⁺ a un mese, seguiti però da una successiva diminuzione a tre mesi dopo la rigenerazione dell'epitelio ciliato; tale conclusione è ulteriormente supportata dai livelli basali di cellule T CD4⁺ negli STG che fungono da controllo.

Negli ATG, invece, l'aumento di questo tipo di cellule viene associato a rigetto.

Le evidenze dimostrano che la decellularizzazione parziale ha il potenziale di ridurre l'immunogenicità degli allotrapianti tracheali, creando in concomitanza una struttura di supporto adeguata e garantendo una rigenerazione adeguata delle vie aeree.

5.2. Limiti e prospettive future

Le dimensioni particolarmente ridotte della trachea del modello animale adottato hanno impedito l'utilizzo della citometria a flusso per un'analisi più approfondita delle cellule T e della loro reattività, costituendo un limite importante di questo studio. Inoltre, nella prospettiva di una futura applicazione clinica del metodo, il modello murino a cui viene fatto riferimento potrebbe non riflettere pienamente la risposta immunitaria umana data la sua maggiore complessità.

In futuro, la crioconservazione potrà essere valutata come metodo efficace per l'allestimento di graft capaci di supportare la rigenerazione del tessuto tracheale; infatti, associandosi a una notevole riduzione del materiale genetico del campione, con una minima manipolazione dello stesso, emerge come un metodo di particolare interesse per l'allestimento di graft non immunogenici.

Sia la decellularizzazione parziale che la crioconservazione si presentano come opzioni promettenti nel contesto dei trapianti tracheali: visto il potenziale della criopreservazione nel ridurre l'immunogenicità dei tessuti, ricorrere ad essa preliminarmente alla decellularizzazione potrebbe contribuire a ridurre il numero di cicli con conseguente beneficio in termini di preservazione delle proteine di matrice e contenimento dei costi associati alla procedura. L'integrazione delle due tecniche potrebbe dunque rappresentare una svolta significativa nello scenario clinico-chirurgico associato ai trapianti di trachea.^[8]

5.3. Conclusione

La decellularizzazione parziale consente l'ottenimento di innesti che favoriscono la formazione di epitelio; tali innesti mantengono al contempo la pervietà in vivo con tassi di sopravvivenza comparabili ai gruppi controllo. È inoltre emerso che la decellularizzazione parziale non induce rigetto, suggerendo la sua capacità di ridurre l'immunogenicità degli allotrapianti tracheali. La crioconservazione potrebbe essere una possibile opzione per l'allestimento di graft volti al recupero di lesioni tracheali a lungo segmento.

BIBLIOGRAFIA


1. Furlow PW, Mathisen DJ. Surgical anatomy of the trachea. *Ann Cardiothorac Surg.* 2018 Mar;7(2):255-260. doi: 10.21037/acs.2018.03.01. PMID: 29707503; PMCID: PMC5900092.
2. Lei C, Mei S, Zhou C, Xia C. Decellularized tracheal scaffolds in tracheal reconstruction: An evaluation of different techniques. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials.* 2021;19. doi:10.1177/22808000211064948.
3. Stocco E, Barbon S, Mammana M, Zambello G, Contran M, Parnigotto PP, Macchi V, Conconi MT, Rea F, De Caro R, Porzionato A. Preclinical and clinical orthotopic transplantation of decellularized/engineered tracheal scaffolds: A systematic literature review. *J Tissue Eng.* 2023 Feb 27;14:20417314231151826. doi: 10.1177/20417314231151826. PMID: 36874984; PMCID: PMC9974632.
4. Grillo HC. Tracheal replacement: a critical review. *Ann Thorac Surg.* 2002 Jun;73(6):1995-2004. doi: 10.1016/s0003-4975(02)03564-6. PMID: 12078821.
5. Martinod E, Chouahnia K, Radu DM, Joudiou P, Uzunhan Y, Bensidhoum M, Santos Portela AM, Guiraudet P, Peretti M, Destable MD, Solis A, Benachi S, Fialaire-Legendre A, Rouard H, Collon T, Piquet J, Leroy S, Vénissac N, Santini J, Tresallet C, Dutau H, Sebbane G, Cohen Y, Beloucif S, d'Audiffret AC, Petite H, Valeyre D, Carpentier A, Vicaut E. Feasibility of Bioengineered Tracheal and Bronchial Reconstruction Using Stented Aortic Matrices. *JAMA.* 2018 Jun 5;319(21):2212-2222. doi: 10.1001/jama.2018.4653. PMID: 29800033; PMCID: PMC6134437.
6. Etienne H, Fabre D, Gomez Caro A, Kolb F, Mussot S, Mercier O, Mitilian D, Stephan F, Fadel E, Darteville P. Tracheal replacement. *Eur Respir J.* 2018 Feb 14;51(2):1702211. doi: 10.1183/13993003.02211-2017. PMID: 29444919.
7. Damiano G, Palumbo VD, Fazzotta S, Curione F, Lo Monte G, Brucato VMB, Lo Monte AI. Current Strategies for Tracheal Replacement: A Review. *Life (Basel).* 2021 Jun 25;11(7):618. doi: 10.3390/life11070618. PMID: 34202398; PMCID: PMC8306535.
8. Stocco E, Barbon S, Mammana M, Trojan D, Bianchin A, Favaretto F, Contran M, Zambello G, Vogliardi A, Confalonieri M, Todros S, Pavan PG, Romanato F, Conconi MT, Macchi V, De Caro R, Rea F, Porzionato A. Development and In Vitro/In Vivo Comparative Characterization of Cryopreserved and Decellularized Tracheal Grafts. *Cells.* 2023 Mar 13;12(6):888. doi: 10.3390/cells12060888. PMID: 36980229; PMCID: PMC10047860.
9. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han J. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res.* 2017 Mar;6(1):12-18. doi: 10.1016/j.imr.2016.12.001. Epub 2017 Jan 10. PMID: 28462139; PMCID: PMC5395684.

APPENDICE: articolo discusso

Tan ZH, Liu L, Dharmadhikari S, Shontz KM, Kreber L, Sperber S, Yu J, Byun WY, Nyirjesy SC, Manning A, Reynolds SD, Chiang T. Partial decellularization eliminates immunogenicity in tracheal allografts. *Bioeng Transl Med.* 2023 Apr 21;8(5):e10525. doi: 10.1002/btm2.10525. PMID: 37693070; PMCID: PMC10487308.

SHORT COMMUNICATION

Partial decellularization eliminates immunogenicity in tracheal allografts

Zheng Hong Tan^{1,2}  | Lumei Liu¹ | Sayali Dharmadhikari^{1,2} |
Kimberly M. Shontz¹ | Lily Kreber² | Sarah Sperber¹ | Jane Yu² |
Woo Yul Byun² | Sarah C. Nyirjesy³ | Amy Manning³ | Susan D. Reynolds⁴ |
Tendy Chiang^{1,3}

¹Center of Regenerative Medicine, Abigail Wexner Research Institute, Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio, USA

²College of Medicine, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA

³Department of Pediatric Otolaryngology, Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio, USA

⁴Center for Perinatal Research, Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio, USA

Correspondence

Tendy Chiang, Nationwide Children's Hospital, 555 S. 18th Street, Suite 2A, Columbus, OH 43205, USA.

Email: tendy.chiang@nationwidechildrens.org

Funding information

NIH, Grant/Award Numbers: R01HL157039, K08HL138460

Abstract

There is currently no suitable autologous tissue to bridge large tracheal defects. As a result, no standard of care exists for long-segment tracheal reconstruction. Tissue engineering has the potential to create a scaffold from allografts or xenografts that can support neotissue regeneration identical to the native trachea. Recent advances in tissue engineering have led to the idea of partial decellularization that allows for the creation of tracheal scaffolds that supports tracheal epithelial formation while preserving mechanical properties. However, the ability of partial decellularization to eliminate graft immunogenicity remains unknown, and understanding the immunogenic properties of partially decellularized tracheal grafts (PDTG) is a critical step toward clinical translation. Here, we determined that tracheal allograft immunogenicity results in epithelial cell sloughing and replacement with dysplastic columnar epithelium and that partial decellularization creates grafts that are able to support an epithelium without histologic signs of rejection. Moreover, allograft implantation elicits CD8⁺ T-cell infiltration, a mediator of rejection, while PDTG did not. Hence, we establish that partial decellularization eliminates allograft immunogenicity while creating a scaffold for implantation that can support spatially appropriate airway regeneration.

KEYWORDS

decellularization, immunogenicity, orthotopic tracheal transplantation, regenerative medicine, tissue-engineered tracheal graft

1 | INTRODUCTION

Tracheal defects are rare but life-threatening. End-to-end anastomosis is not feasible beyond a certain length, warranting tissue replacement for reconstruction.¹ Unfortunately, there is no clinical standard for

tracheal replacement. Creation of a graft that can recapitulate the complex structure and function of the trachea is a priority within the field of regenerative medicine.

Decellularization is a proven method of creating non-immunogenic scaffolds via regenerative medicine, with several United States Food

and Drug Administration approved applications.²⁻⁵ When applied to the trachea, complete decellularization has formed scaffolds capable of supporting functional neotissue formation *in vitro*, but *in vivo* performance is limited by the loss of mechanical properties.⁶⁻¹² Tracheal cartilage provides the primary structural support for the organ and efforts to decellularize chondrocytes from the dense extracellular matrix result in a loss of graft patency.^{9,10} However, complete decellularization may not be necessary given the immunoprivileged location of chondrocytes within the dense cartilage extracellular matrix.^{8,13-15} Advances in tracheal tissue engineering have relied upon partial decellularization or de-epithelialization, resulting in removal of the cells within the tracheal epithelium with preservation of graft chondrocytes.^{15,16}

Using a murine model of orthotopic tracheal transplant, we previously established that partially decellularized tracheal grafts (PDTG) are capable of tracheal neotissue formation with preservation of mechanical properties.^{16,17} Still, the ability of partial decellularization to eliminate graft immunogenicity remains unknown, and understanding the immunogenic properties of PDTG is a critical step toward clinical translation. We use our murine microsurgical model to determine if partial decellularization eliminates allograft immunogenicity, and assess the impact of immunogenicity.

2 | METHODS

2.1 | Animal care and ethics statement

The Institutional Animal Care and Use Committee of the Abigail Wexner Research Institute at Nationwide Children's Hospital (Columbus, OH) reviewed and approved the protocol (AR15-00090). All animals received humane care by standards published by the Public Health Service, National Institutes of Health (Bethesda, MD) in the Care and Use of Laboratory Animals (2011), and US Department of Agriculture (USDA) regulations outlined in the Animal Welfare Act.

2.2 | Fabrication of PDTGs

Tracheal grafts were harvested from female 6 to 8-week-old C57BL/6 and Balb/c mice as previously published.^{8,18} Proximal tracheas were dissected, and a 5 mm tracheal segment was harvested and cryopreserved at -80°C in 1 mL cryopreservation solution (Dulbecco's Modified Eagle Medium [ATCC, Manassas, VA] with 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin/streptomycin, and 5% Dimethyl sulfoxide [DMSO, ATCC]).¹⁹

PDTG derived from Balb/c (partially decellularized tracheal allografts [PDTA]) and from C7BL/6 (partially decellularized tracheal syngrafts [PDTS]) were produced with a 7-h decellularization protocol. Briefly, tracheas were rinsed with $1\times$ PBS with 1% penicillin/streptomycin (P/S, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and treated with 0.01% sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma-Aldrich, MO) and 0.9% sodium chloride (NaCl, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ)

for 5 min. The tracheas were then subjected to consecutive 3 h graded SDS treatments of 0.01% and 0.1% SDS before soaking in 0.2% SDS and 0.1% SDS for 15 min each. They were then treated with 1% Triton X-100 in distilled water for 5 min to remove nucleic acids and underwent a final 0.9% NaCl wash for 15 min. All steps were performed on a shaker at the speed of 48 rounds/min. PDTG were cryopreserved at -80°C until use.

2.3 | Implantation of tracheal grafts

Syngeneic tracheal grafts (STG), PDTA, PDTS, and allografts (ATG) were implanted via previously published methods ($N = 5/\text{STG}$, $N = 10/\text{PDTA}$, PDTS, and ATG).^{8,18} A 5 mm tracheal segment was harvested and immersed in phosphate-buffered saline for implantation. At the time of implantation, 4 mm segment was resected and orthotopically implanted.⁸ Type of grafts implanted were randomized within blocks of "day of procedure" and "surgeon" to experimental groups and euthanized at various timepoints. Only female mice were used in this study to avoid sex-specific host responses to implanted grafts.²⁰ 10 days was used as a timepoint for acute rejection and at 1- and 3-months were used for chronic rejection timepoints.²¹⁻²³ Animals were closely monitored for early (humane) euthanasia criteria including respiratory distress (labored breathing, stridor) and/or more than 20% weight loss compared to weight before surgery. At a planned or humane endpoint, animals were euthanized with Ketamine/Xylazine cocktail. Once euthanasia was confirmed, the entire trachea including the graft was harvested and placed in 10% Neutral buffered formalin.

2.4 | Histology

Formalin-fixed STG, PDTA, PDTS, and allografts were decalcified in 15% EDTA at 4°C overnight before being paraffin-embedded. Longitudinal sections ($4\ \mu\text{m}$) were then sectioned with microtome. The sections were then de-paraffinized with xylenes, rehydrated with decreasing concentrations of ethanol, and stained with hematoxylin (Sigma-Aldrich, MO) and counterstained with eosin. Collagen fibers of tracheal grafts implantation were stained with Masson's Trichrome. Apoptotic cells were identified using the Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay (TUNEL).

2.4.1 | T-cell infiltration

T-cell infiltration was assessed via immunofluorescent staining of CD4 and CD8 T-cells. Briefly, the sections were stained with Rabbit Anti-CD4 (1:500 dilution) and Rabbit Anti-CD8 (1:250 dilution) and Anti-rabbit Alexa Fluor 594 as the secondary antibody. T-cell infiltration was assessed by quantifying the number of T-cells per submucosal area.

2.4.2 | Epithelial height

Epithelialization was assessed with hematoxylin and eosin (H&E) and immunofluorescent staining of post-implantation tracheal sections. Images of stained sections were captured using bright field and immunofluorescent microscopy (Zeiss, Oberkochen, Germany). Average epithelial height was measured by dividing the area of the graft epithelium by the length of the graft basement membrane.

2.4.3 | Epithelialization

Longitudinal sections were stained with Mouse anti-Acyl Alpha-tubulin (ACT) to identify ciliated epithelial cells. The extent of epithelial infiltration was measured by dividing percent coverage of the ACT-positive cells by the length of the graft.¹⁸

2.4.4 | Submucosal thickness

Submucosal thickness was quantified using ImageJ software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD) and calculated by averaging five regularly spaced measurements of the submucosal height between the cartilage and basement membrane on each graft cartilage ring.

2.4.5 | Micro-computed tomography

Micro-computed tomography (microCT) imaging was performed on live animals to assess graft patency at 1 month and 3 months using a μ PET/CT system (U-PET6CTHR, MILabs, Utrecht, The Netherlands). The animals were anesthetized with inhalational isoflurane in room air at 1–3 L/min and positioned prone. The scan was set as full 360° rotation, x-ray tube of 0.33 mA and 55 kV, 0.750° per step, 1 projection per step, 1 × 1 binning, and 40 ms exposure time. All microCT images were reconstructed using MILabs reconstruction software v12.0 (Utrecht, The Netherlands) with a 40 μ m voxel grid, Hann projection filter, and Gaussian volume filter (160 μ m). The area of airway lumen was quantified from each slice of graft scans and analyzed using ImageJ software.

2.4.6 | Statistical analysis

Normally distributed data were compared using Welch's *t*-test for data with non-equal variances and unpaired *t*-test and ANOVA for data with equal variances. Non-parametric tests (Mann Whitney-*U*) were used for data that were not distributed normally. Statistical tests were performed using the GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software Inc., CA). Statistical difference was defined as $p < 0.05$. Experimental data were expressed as means \pm standard deviations (SD).

3 | RESULTS

3.1 | Orthotopic tracheal transplantation resulted in similar graft patency and survival among graft types

All graft types remained patent with no evidence of stenosis and had similar survival rates (Figure 1a–c). The animals tolerated orthotopic tracheal transplantation well and did not exhibit signs of respiratory distress at the time of euthanasia. At Day 10, allografts were found to have diffuse epithelial sloughing and eosinophilic cellular infiltrate within the lamina propria consistent with acute rejection. This process also resulted in an increase in epithelial height and the loss of ciliated cells (Figure 1d–l; Figure S1).^{21,24,25} There was no sign of epithelial injury or eosinophilic infiltrate in surgical control (STG), which maintained an epithelium morphologically identical to the native trachea (Figure S1). PDTG also lacked signs of injury and eosinophilic cell infiltration, exhibiting early graft epithelialization. Terminally differentiated ciliated cells were seen repopulating PDTG at Day 10 and recreated pseudostratified epithelium by 1-month (Figure 1i–l; Figure S2). Conversely, allografts demonstrated a blunted epithelium with less ciliation ($p = 0.0149$) (Figure 1j–l). There was no difference in epithelial morphology between allograft-derived (PDTA) and syngeneic-derived (PDTs) partially decellularized grafts (Figure 1d–l; Figures S2 and S3).

3.2 | Partial decellularization attenuates CD8+ T-cell mediated rejection

We measured T-cell infiltration during acute (Day 10) and chronic (1, 3 months) intervals to quantify the immunogenicity of PDTG. In allografts, there was both acute and chronic elevation of CD8+ T-cells within lamina propria (Figure 2a–f). Large amounts of CD8+ T-cells in allografts were associated with apoptotic cells, both of which were not found STG and PDTG (Figure 2g). CD8+ T-cells were found to be similar in PDTA and PDTs, suggesting that partial decellularization eliminated allograft immunogenicity. In both PDTG and allografts, CD4+ T-cells increased at 10 days and 1 month (Figure 2h–k). At 3 months, CD4+ T-cells in PDTG were found to be equivalent to control, while allograft CD4+ T-cells remained persistently elevated.

4 | DISCUSSION

Using a mouse microsurgical model, we determined that tracheal graft immunogenicity results in epithelial cell sloughing and replacement with dysplastic columnar epithelium characterized by both epithelial height and ciliated cell coverage of the graft.^{21,24,25} Presence of CD4+ and CD8+ T-cells was not associated with stenosis. Epithelial changes in allografts also appeared to be associated with an increase in CD8+ T cells, an established mediator of rejection.^{26–28} Furthermore, partial decellularization removed graft immunogenicity, with no differences between PDTA and PDTs neotissue formation, and CD8+

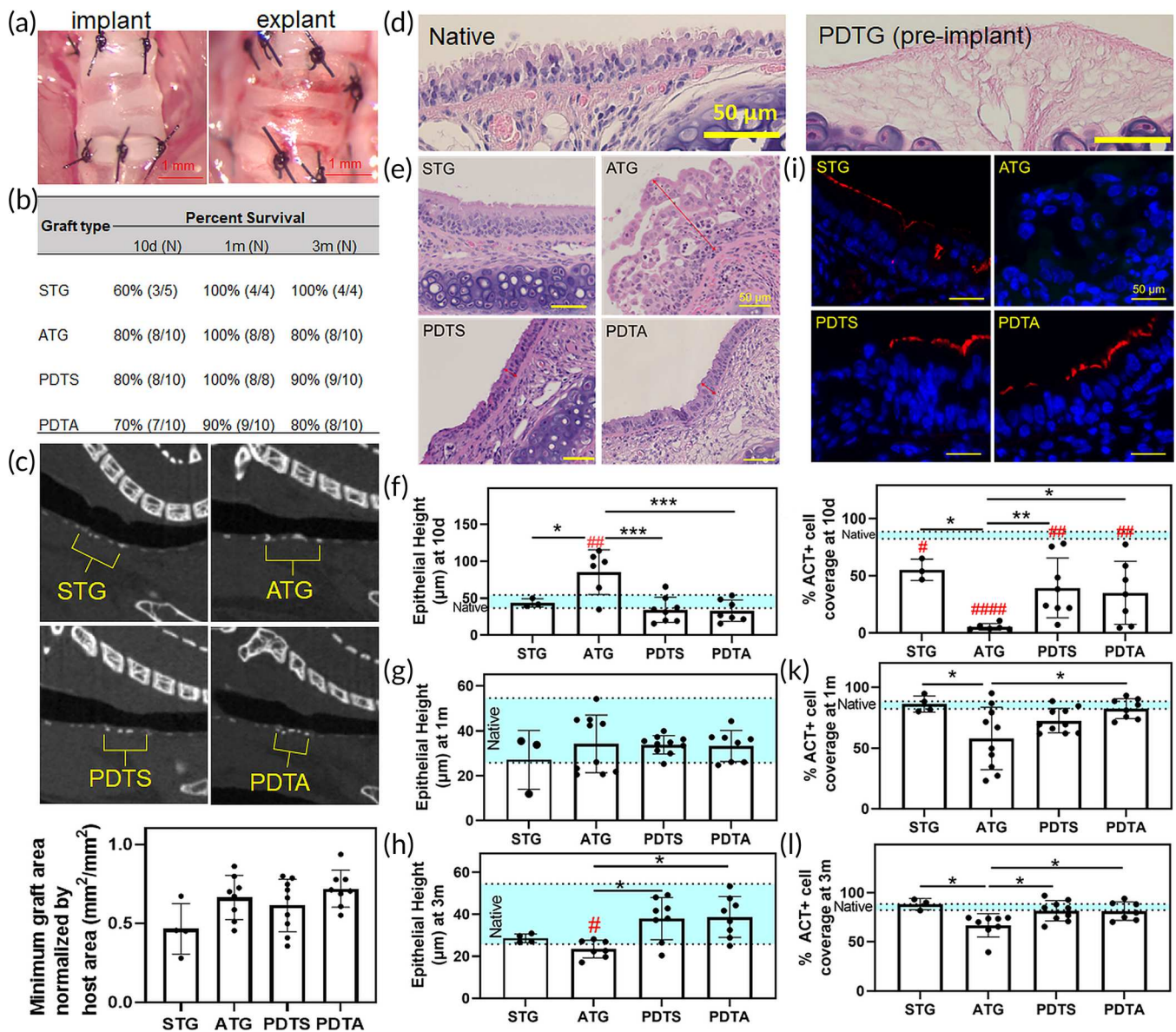


FIGURE 1 Orthotopic tracheal transplantation resulted in similar graft patency and survival among graft types. (a) Representative images of orthotopic tracheal transplantation. (b) Orthotopic tracheal transplantation survival rates. Animals were euthanized at 10 days, 30 days, and 90 days for end-point analysis. (c) Sagittal micro-computed tomography of the airway demonstrating graft patency, quantification of graft cross-sectional area (yellow brackets denote graft). (d) Representative H&E sections of native and PDTG (pre-implant). (e) Representative longitudinal H&E sections of tracheal grafts (10 days). (f) Epithelial height (10 days, # represents increased epithelial height in Allograft [ATG] compared to native, * = increased epithelial height in Allografts vs other graft types [### $p = 0.0063$ vs. native, * $p = 0.028$ vs. STG, *** $p = 0.0003$ vs. PDTA, *** $p = 0.0003$ vs. PDTS]). (g) Epithelial height at 1-month. (h) Epithelial height at 3-month # = decreased epithelial height in Allograft versus native ($p = 0.0493$) * = decreased epithelial height in Allografts compared to other graft types ($p = 0.0143$ ATG vs. PDTA, $p = 0.0211$ Allograft vs. PDTS). (i) Representative IF images of tracheal epithelium and multiciliated cells (ACT+ [red], 10 days). (j) % Graft coverage with ACT+ epithelial cells (10 days, # = decreased epithelialization vs native, $p = 0.0003$ vs. STG, $p = 0.0037$ vs. PDTS, $p = 0.0019$ vs. PDTA, $p < 0.0001$ vs. Allograft, * = change in epithelialization within graft types, $p = 0.0238$ Allograft vs. STG, $p = 0.0013$ ATG vs. PDTS, $p = 0.0221$ Allograft vs. PDTA). (k) % ACT cell coverage at 1-month, * = decreased epithelialization versus other graft types ($p = 0.0313$ Allograft vs. STG, $p = 0.0178$ PDTA vs. Allograft). (l) % ACT cell coverage at 3-month, * = decreased epithelialization compared versus graft types ($p = 0.0242$ STG vs. Allograft, $p = 0.0402$ PDTA vs. ATG, $p = 0.0241$ PDTS vs. Allograft). H&E, hematoxylin and eosin; IF, immunofluorescent; PDTA, partially decellularized tracheal allografts; PDTG, partially decellularized tracheal graft; PDTS, partially decellularized tracheal syngrafts; STG, syngeneic tracheal grafts.

T-cell levels are similar to controls and baseline. Since PDTA is generated from an allogenic trachea, this suggests that partial decellularization does not result in acute or chronic rejection.

Our findings also suggest that neo-epithelialization is at least partially mediated by CD4⁺ T-cells. Some CD4⁺ T-cells phenotypes such as T-regulatory cells are essential for tissue repair and

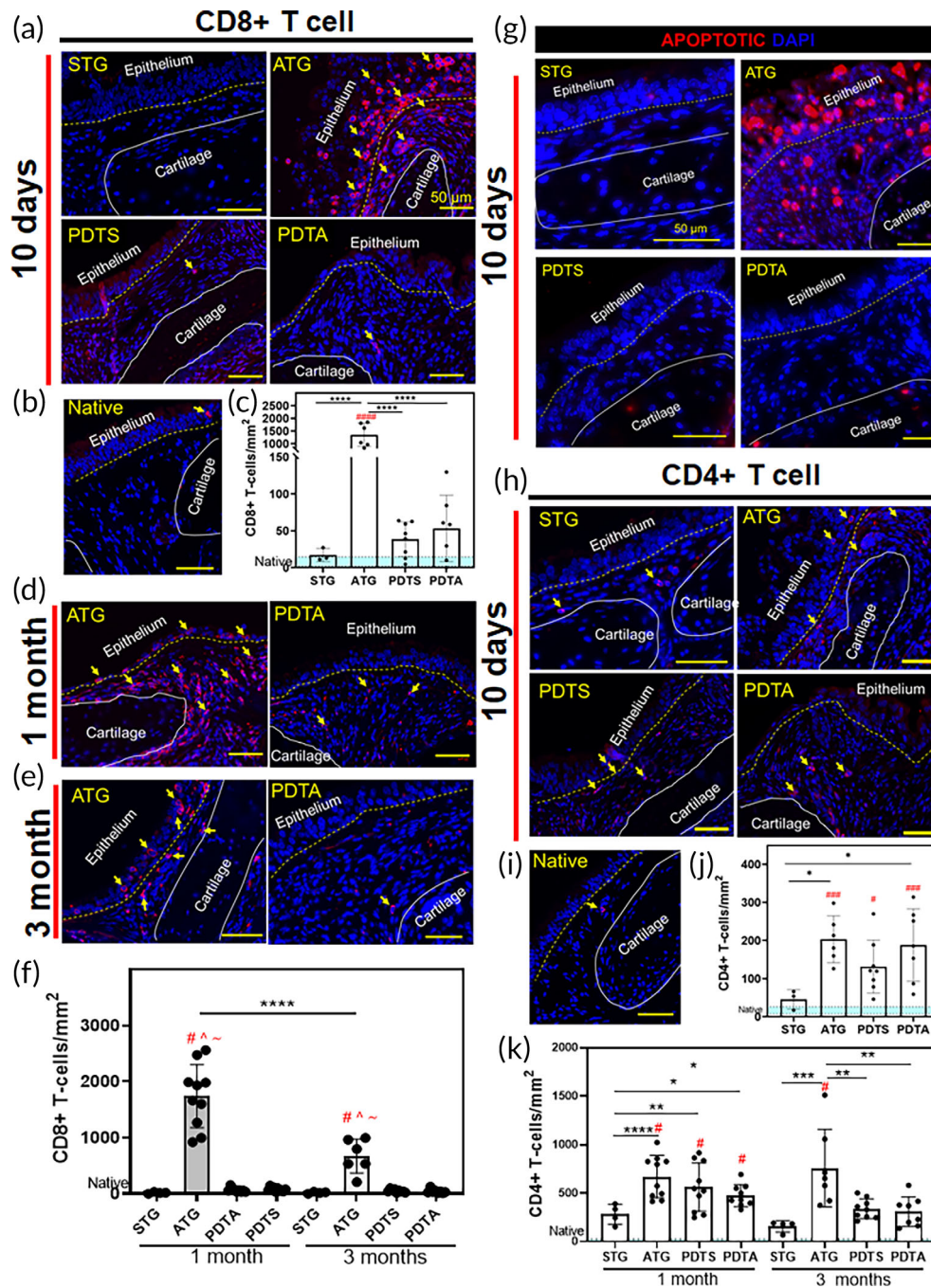


FIGURE 2 Partial decellularization attenuates CD8+ T-cell mediated rejection. (a) Representative IF images of CD8+ T-cells in grafts at 10 days and (b) native trachea (c) CD8+ T-cells/mm² (10 days) ##### = increased CD8+ T-cells vs Native (10 days, $p < 0.0001$) **** = decreased CD8+ T-cells compared to Allograft (ATG) (10 days, $p < 0.0001$ for all graft types) * = decreased CD8+ T-cells compared to Allograft at 10 days ($p = 0.0324$ STG vs. PDTA, $p = 0.0184$ STG vs. Allograft). (d) Representative images of CD8+ T-cells in grafts at 1-month and (e) 3-months. (f) CD8+ T-cells/mm² at 1-month and 3-months # = increased CD8+ T-cells versus STG ($p < 0.0001$ for STG-1 m vs. Allograft-1 m, $p < 0.0001$ for STG-3 m vs. Allograft-3 m), ^ = increased CD8+ T-cells versus PDTA ($p < 0.0001$ for PDTA-1 m vs. Allograft-1 m, $p < 0.0001$ for PDTA-3 m vs. Allograft-3 m), ~ = increased CD8+ T-cells versus PDTS ($p < 0.0001$ for PDTS-1 m vs. Allograft-1 m, $p < 0.0001$ for PDTS-3 m vs. Allograft-3 m), **** = decreased CD8+ T-cells between Allograft at 1- and 3-month ($p < 0.0001$). (g) Representative Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay (TUNEL) images of the implanted grafts. red denotes apoptotic cells while blue denotes cellular nuclei. (h) Representative IF images of CD4+ T-cells in grafts at 10 days and (i) native trachea. (j) CD4+ T-cells/mm² at 10 days # = increased CD4+ T-cells versus Native at 10 days ($p = 0.0242$ vs. PDTS, $p = 0.0007$ vs. PDTA, $p = 0.0004$ vs. Allograft). (k) CD4+ T-cells/mm² at chronic time points * = increase in CD4+ T-cells between grafts ($p = 0.0312$ for STG 1 m vs. PDTA 1 m, $p = 0.0014$ for STG 1 m vs. PDTS 1 m, $p < 0.0001$ for STG 1 m vs. Allograft 1 m, $p = 0.0004$ for STG 3 m vs. Allograft 3 m, $p = 0.0011$ for PDTA 3 m vs. Allograft 3 m, $p = 0.0020$ for PDTS 3 m vs. Allograft 3 m, $p = 0.0066$ for STG 1 m vs. STG 3 m, $p = 0.0219$ for PDTA 1 m vs. PDTA 3 m, $p = 0.0226$ for PDTS 1 m vs. PDTS 3 m). IF, immunofluorescent; PDTA, partially decellularized tracheal allografts; PDTS, partially decellularized tracheal syngrafts; STG, syngeneic tracheal grafts.

regeneration.^{29,30} While the increased CD4⁺ T-cell presence in allografts could be attributed to rejection, the elevated CD4⁺ T-cell levels in PDTG at 1 month with a subsequent decrease at 3 months after ciliated epithelial regeneration, suggests that CD4⁺ presence is associated with neotissue formation. This is further supported by the baseline levels of CD4⁺ T-cells in STG, which serve as a control for tracheal replacement.

One limitation of this study is the inability to use the well-established method of flow cytometry to assess alloreactivity and T-cell phenotypes due to the prohibitive size of the mouse trachea. In summary, we have established the potential of partial decellularization to eliminate the immunogenicity of tracheal allografts while creating a scaffold for implantation that can support spatially appropriate airway regeneration.

5 | CONCLUSION

We have established that partial decellularization creates grafts that are able to support epithelization while remaining patent in vivo with similar survival rates to surgical controls. Moreover, partial decellularization does not result in rejection, indicating its potential to eliminate the immunogenicity of tracheal allografts.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Zheng Hong Tan: Conceptualization (equal); data curation (lead); formal analysis (lead); investigation (lead); methodology (lead); validation (lead); visualization (lead); writing – original draft (lead); writing – review and editing (lead). **Lumei Liu:** Conceptualization (supporting); data curation (equal); formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); supervision (equal); writing – original draft (supporting); writing – review and editing (equal). **Sayali Dharmadhikari:** Formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); validation (equal); visualization (equal); writing – review and editing (equal). **Kimberly M. Shontz:** Investigation (equal); methodology (equal); project administration (equal); validation (equal); visualization (equal); writing – review and editing (equal). **Lily Kreber:** Formal analysis (equal); investigation (equal); methodology (equal); validation (equal); visualization (equal); writing – review and editing (equal). **Sarah Sperber:** Investigation (equal); methodology (equal); validation (equal); visualization (equal); writing – review and editing (equal). **Jane Yu:** Investigation (equal); methodology (equal); validation (equal); visualization (equal); writing – review and editing (equal). **Woo Yul Byun:** Investigation (equal); validation (equal); visualization (equal); writing – review and editing (equal). **Sarah C. Nyirjesy:** Investigation (equal); methodology (equal); validation (equal); writing – review and editing (equal). **Amy Manning:** Investigation (equal); methodology (equal); validation (equal); writing – review and editing (equal). **Susan D. Reynolds:** Data curation (equal); investigation (equal); methodology (equal); resources (equal); supervision (equal); writing – review and editing (equal). **Tendy Chiang:** Conceptualization (equal); data curation (equal); formal analysis (equal); funding acquisition (equal); investigation (equal); methodology (equal); project administration (equal);

resources (equal); supervision (lead); validation (equal); visualization (equal); writing – review and editing (equal).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express gratitude to the animal care, veterinary staff, the Morphology core at the Abigail Wexner Research Institute at Nationwide Children's Hospital, and the Genomics Shared Resource at The Ohio State University.

FUNDING INFORMATION

The work presented was funded by NIH NHLBI K08HL138460 and R01HL157039 (Tendy Chiang is the recipient).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no conflicts of interest to disclose as described by the American Journal of Transplantation.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://www.webofscience.com/api/gateway/wos/peer-review/10.1002/btm2.10525>.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the results of this study, experimental protocols, and additional details regarding methods employed in this study will be made available through request with the corresponding author.

ORCID

Zheng Hong Tan  <https://orcid.org/0000-0003-1571-464X>

REFERENCES

- Chiang T, Pepper V, Best C, Onwuka E, Breuer CK. Clinical translation of tissue engineered trachea grafts. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2016; 125(11):873-885. doi:10.1177/0003489416656646
- Pearlman AM, Mujumdar V, McAbee KE, Terlecki RP. Outcomes of adult urethroplasty with commercially available acellularmatrix. *Ther Adv Urol*. 2018;10(11):351-355. doi:10.1177/1756287218790370
- Taufique ZM, Bhatt N, Zagzag D, Lebowitz RA, Lieberman SM. Revascularization of AlloDerm used during endoscopic skull base surgery. *J Neurol Surg B Skull Base*. 2019;80(1):46-50. doi:10.1055/S-0038-1666851
- Badria AF, Koutsoukos PG, Mavrilas D. Decellularized tissue-engineered heart valves calcification: what do animal and clinical studies tell us? *J Mater Sci Mater Med*. 2020;31(12):132. doi:10.1007/S10856-020-06462-X
- Cheng CW, Solorio LD, Alsberg E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biotechnol Adv*. 2014;32(2):462-484. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2013.12.012
- Elliott MJ, Butler CR, Varanou-Jenkins A, et al. Tracheal replacement therapy with a stem cell-seeded graft: lessons from compassionate use application of a GMP-compliant tissue-engineered medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(6):1458-1464. doi:10.1002/sctm.16-0443
- Kutten JC, McGovern D, Hobson CM, et al. Decellularized tracheal extracellular matrix supports epithelial migration, differentiation, and function. *Tissue Eng - Part A*. 2015;21:75-84. doi:10.1089/ten.tea.2014.0089
- Liu L, Dharmadhikari S, Shontz KM, et al. Regeneration of partially decellularized tracheal scaffolds in a mouse model of orthotopic

- tracheal replacement. *J Tissue Eng.* 2021;12:20417314211017417. doi:[10.1177/20417314211017417](https://doi.org/10.1177/20417314211017417)
9. Liu L, Dharmadhikari S, Spector BM, et al. Tissue-engineered composite tracheal grafts create mechanically stable and biocompatible airway replacements. *J Tissue Eng.* 2022;13:204173142211087. doi:[10.1177/20417314221108791](https://doi.org/10.1177/20417314221108791)
 10. Hamilton NJ, Kanani M, Roebuck DJ, et al. Tissue-engineered tracheal replacement in a child: a 4-year follow-up study. *Am J Transplant.* 2015;15:2750-2757. doi:[10.1111/ajt.13318](https://doi.org/10.1111/ajt.13318)
 11. Hung SH, Su CH, Lin SE, Tseng H. Preliminary experiences in trachea scaffold tissue engineering with segmental organ decellularization. *Laryngoscope.* 2016;126(11):2520-2527. doi:[10.1002/LARY.25932](https://doi.org/10.1002/LARY.25932)
 12. Weber JF, Rehmani SS, Baig MZ, Jadoon Y, Bhora FY. Successes and failures in tracheal bioengineering: lessons learned. *Ann Thorac Surg.* 2021;112(4):1089-1094. doi:[10.1016/J.ATHORACSUR.2020.10.021](https://doi.org/10.1016/J.ATHORACSUR.2020.10.021)
 13. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ. The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. *Transplantation.* 1984;38(3):293-298. doi:[10.1097/00007890-198409000-00019](https://doi.org/10.1097/00007890-198409000-00019)
 14. Liu Y, Nakamura T, Yamamoto Y, et al. Immunosuppressant-free allotransplantation of the trachea: the antigenicity of tracheal grafts can be reduced by removing the epithelium and mixed glands from the graft by detergent treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;120(1):108-114. doi:[10.1067/mtc.2000.106655](https://doi.org/10.1067/mtc.2000.106655)
 15. Aoki FG, Varma R, Marin-Araujo AE, et al. De-epithelialization of porcine tracheal allografts as an approach for tracheal tissue engineering. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-12. doi:[10.1038/s41598-019-48450-4](https://doi.org/10.1038/s41598-019-48450-4)
 16. Liu L, Dharmadhikari S, Shontz KM, et al. Regeneration of partially decellularized tracheal scaffolds in a mouse model of orthotopic tracheal replacement. *J Tissue Eng.* 2021;12:20417314211017417. doi:[10.1177/20417314211017417](https://doi.org/10.1177/20417314211017417)
 17. Tan ZH, Dharmadhikari S, Liu L, et al. Tracheal macrophages during regeneration and repair of long-segment airway defects. *Laryngoscope.* 2021;132:737-746. doi:[10.1002/LARY.29698](https://doi.org/10.1002/LARY.29698)
 18. Dharmadhikari S, Liu L, Shontz K, et al. Deconstructing tissue engineered trachea: assessing the role of synthetic scaffolds, segmental replacement and cell seeding on graft performance. *Acta Biomater.* 2020;102:181-191. doi:[10.1016/j.actbio.2019.11.008](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.11.008)
 19. Chan C, Liu L, Dharmadhikari S, et al. A multimodal approach to quantify chondrocyte viability for airway tissue engineering. *Laryngoscope.* 2022;133:512-520. doi:[10.1002/LARY.30206](https://doi.org/10.1002/LARY.30206)
 20. Blum KM, Roby LC, Zbinden JC, et al. Sex and Tamoxifen confound murine experimental studies in cardiovascular tissue engineering. *Sci Rep.* 2021;11(1):8037. doi:[10.1038/s41598-021-87006-3](https://doi.org/10.1038/s41598-021-87006-3)
 21. Babu AN, Murakawa T, Thurman JM, et al. Microvascular destruction identifies murine allografts that cannot be rescued from airway fibrosis. *J Clin Invest.* 2007;117:3774-3785. doi:[10.1172/JCI32311](https://doi.org/10.1172/JCI32311)
 22. Genden EM, Iskander AJ, Bromberg JS, Mayer L. Orthotopic tracheal allografts undergo reepithelialization with recipient-derived epithelium. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg.* 2003;129(1):118-123. doi:[10.1001/archotol.129.1.118](https://doi.org/10.1001/archotol.129.1.118)
 23. Genden EM, Boros P, Liu J, Bromberg JS, Mayer L. Orthotopic tracheal transplantation in the murine model. *Transplantation.* 2002;73(9):1420-1425. doi:[10.1097/00007890-200205150-00010](https://doi.org/10.1097/00007890-200205150-00010)
 24. Govindaraj S, Fedorova E, Genden EM, et al. Reepithelialization of orthotopic tracheal allografts prevents rejection after withdrawal of immunosuppression. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005;114(4):279-288. doi:[10.1177/000348940511400406](https://doi.org/10.1177/000348940511400406)
 25. Okazaki M, Gelman AE, Tietjens JR, et al. Maintenance of airway epithelium in acutely rejected orthotopic vascularized mouse lung transplants. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37(6):625-630. doi:[10.1165/RCMB.2007-0257RC](https://doi.org/10.1165/RCMB.2007-0257RC)
 26. Richards DM, Dalheimer SL, Hertz MI, Mueller DL. Trachea allograft class I molecules directly activate and retain CD8+ T cells that cause obliterative airways disease. *J Immunol.* 2003;171(12):6919-6928. doi:[10.4049/JIMMUNOL.171.12.6919](https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.171.12.6919)
 27. Harper SJF, Ali JM, Wlodek E, et al. CD8 T-cell recognition of acquired alloantigen promotes acute allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(41):12788-12793. doi:[10.1073/PNAS.1513533112/SUPPL_FILE/PNAS.201513533SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1513533112/SUPPL_FILE/PNAS.201513533SI.PDF)
 28. Choy JC. Granzymes and perforin in solid organ transplant rejection. *Cell Death Differ.* 2010;17(4):567-576. doi:[10.1038/cdd.2009.161](https://doi.org/10.1038/cdd.2009.161)
 29. Khan MA, Alanazi F, Ahmed HA, Al-Mohanna FH, Assiri AM, Broering DC. FOXP3 + regulatory T cell ameliorates microvasculature in the rejection of mouse orthotopic tracheal transplants. *Clin Immunol.* 2017;174:84-98. doi:[10.1016/J.CLIM.2016.11.011](https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2016.11.011)
 30. Doulabi H, Masoumi E, Rastin M, Foolady Azarnaminy A, Esmaeili S-A, Mahmoudi M. The role of Th22 cells, from tissue repair to cancer progression. *Cytokine.* 2022;149:155749. doi:[10.1016/J.CYTO.2021.155749](https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2021.155749)

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Tan ZH, Liu L, Dharmadhikari S, et al. Partial decellularization eliminates immunogenicity in tracheal allografts. *Bioeng Transl Med.* 2023;8(5):e10525. doi:[10.1002/btm2.10525](https://doi.org/10.1002/btm2.10525)