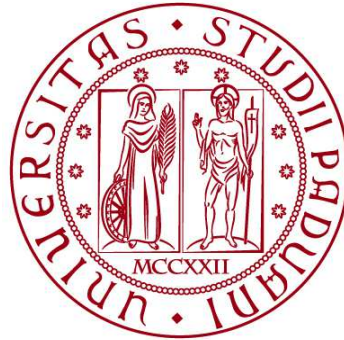


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**Sviluppo di Scaffold Bio-Ingegnerizzati
per la Ricostruzione dell'Esófago:
uno Studio in Vitro**

**Tutor: Prof.ssa Elena Stocco
Dipartimento di Neuroscienze**

**Co-tutor: Prof.ssa Silvia Barbon
Dipartimento di Neuroscienze**

Laureando: Mattia Nardo

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

ABSTRACT	1
1. STATO DELL'ARTE.....	2
1.1. ANATOMIA DELL'ESOFAGO.....	2
1.2. APPROCCI CLINICI NEL TRATTAMENTO DELLE LESIONI ESOFAGEE	2
2. SCOPO DELLA TESI.....	4
3. MATERIALI E METODI	4
3.1. RACCOLTA E CAMPIONAMENTO DI ESOFAGO UMANO	4
3.2. DECELLULARIZZAZIONE DEL TESSUTO	4
3.3. ISOLAMENTO E QUANTIFICAZIONE DEL DNA	5
3.4. INDAGINI ISTOLOGICHE	5
3.5. STUDI IMMUNOISTOCHIMICI.....	5
3.6. QUANTIFICAZIONE DEI COMPONENTI DELLA MATRICE EXTRACELLULARE	6
3.7. ANALISI ULTRASTRUTTURALE MEDIANTE MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE	6
3.8. ANALISI DI SPETTROMETRIA DI MASSA	6
3.8.1. <i>PREPARAZIONE CAMPIONE</i>	6
3.8.2. <i>IDENTIFICAZIONE PROTEINE</i>	6
3.8.3. <i>DATA PROCESSING</i>	7
3.9. PROPRIETÀ MECCANICHE.....	7
3.10. STUDI DI CITOTOSSICITÀ	7
3.11. ANALISI STATISTICHE.....	8
4. RISULTATI	8
4.1. DECELLULARIZZAZIONE DI ESOFAGO UMANO	8
4.2. VALUTAZIONE ISTOLOGICA.....	9
4.3. VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHIMICA	10
4.4. ANALISI QUANTITATIVA DEI COMPONENTI DELLA MATRICE EXTRACELLULARE	12
4.5. CARATTERIZZAZIONE DELLA COMPONENTE COLLAGENICA	12
4.6. ANALISI PROTEOMICA DEL SECRETOMA DEL TESSUTO DECELLULARIZZATO.....	13
4.7. COMPORTAMENTO MECCANICO	14
4.8. VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ.....	16
5. DISCUSSIONE	16
6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	18
BIBLIOGRAFIA	19
APPENDICE	20

ABSTRACT

La ricostruzione dell'esofago mediante allotrapianti bio-ingegnerizzati che riproducono le proprietà peculiari della matrice extracellulare rappresenta una strategia promettente per superare le limitazioni degli attuali approcci chirurgici volti a trattare le patologie esofagee. In questo studio è stata indagata la preparazione di alloinnesti bio-ingegnerizzati derivati da esofago umano. Campioni di tessuto sono stati decellularizzati confrontando 3 metodi detergenti-enzimatici. Dopo la decellularizzazione, la quantificazione del DNA residuo e le analisi istologiche hanno mostrato che tutti i protocolli rimuovono efficacemente le cellule, il materiale genetico e le fibre muscolari, preservando le componenti di collagene/elastina della matrice. La quantificazione dei glicosamminoglicani ha verificato che questa componente della matrice è stata preservata (70-98%) nei tessuti decellularizzati rispetto a quelli nativi, mentre la quantificazione dell'idrossiprolina ha confermato la conservazione del collagene (2-6 µg/mg di tessuto). L'indagine immunohistochimica ha rilevato l'espressione di marker specifici di matrice (collagene IV, laminina) e l'eliminazione di antigeni immunogenici (HLA-DR). L'analisi proteomica ha evidenziato la conservazione di proteine strutturali, proteine della membrana basale e proteine per l'interazione cellula-matrice. Il test di citotossicità ha mostrato l'assenza di residui/contaminanti dannosi, suggerendo la bio-sicurezza degli *scaffold* esofagei. Nel complesso, gli alloinnesti indagati possiedono delle caratteristiche promettenti per un loro possibile utilizzo nella ricostruzione dell'esofago.

Parole chiave: esofago umano; decellularizzazione; matrice extracellulare; alloinnesti; ingegneria tissutale.

1. STATO DELL'ARTE

1.1. Anatomia dell'esofago

L'esofago è un condotto lungo circa 25/35 cm e largo circa 2-3 cm nell'individuo adulto. Esso rappresenta il primo tratto del segmento gastrointestinale, la cui funzione è quella di indirizzare il bolo alimentare verso lo stomaco attraverso dei movimenti involontari del dotto, detti peristaltici. La sua anatomia è complessa e presenta una vasta vascolarizzazione e innervazione. Istologicamente si suddivide in 3 strati principali, partendo dal lume, troviamo la mucosa, la sottomucosa e la muscularis propriae. La complessità anatomica dell'esofago si esplica nella sua principale funzione; infatti, i movimenti peristaltici richiedono la presenza della muscolatura liscia e di un'adeguata innervazione per poter essere efficaci. Oltre a questo, l'esofago deve possedere una certa elasticità per poter permettere al bolo di scivolare adeguatamente. Specificatamente, mucosa e sottomucosa consentono al condotto di allargarsi e far scorrere il bolo grazie alla loro elasticità e alla secrezione di muco. Nello specifico, la mucosa presenta 3 strati; dal lume verso l'esterno si riconoscono un epitelio pavimentoso pluristratificato non cheratinizzato, la tonaca propria e un sottile strato muscolare, detto muscularis mucosae. Collocata nel lato basale della mucosa, la lamina propria si ancora ad essa attraverso gli emidesmosomi, la separa dal connettivo sottostante e si solleva andando a formare delle pliche nel lume. La sottomucosa si caratterizza per la presenza di tessuto connettivo lasso, riccamente vascolarizzato e innervato, la cui struttura è composta principalmente da elastina, collagene I e IV, che rappresentano lo scheletro portante dell'intero esofago. Inoltre, sono qui allocate le ghiandole tubulo-acinose ramificate responsabili della secrezione del muco nel lume. La muscularis propriae, contenente due strati muscolari, conferisce al dotto una sufficiente resistenza meccanica imprimendo un'adeguata spinta sul bolo durante il suo passaggio. I due strati muscolari, che decorrono lungo tutta l'estensione della struttura, sono distinguibili in base all'orientazione delle loro fibrocellule. Lo strato interno è circolare mentre lo strato esterno è longitudinale. Inoltre, in relazione alla tipologia di fibre muscolari, nel primo terzo, dopo la faringe, si riconoscono fibre striate; nell'ultimo terzo, collocato prima dello stomaco, sono presenti fibre lisce; nella sezione centrale sono presenti fibre di carattere misto.

1.2. Approcci clinici nel trattamento delle lesioni esofagee

Ad oggi, sono vari gli approcci adottati per il trattamento di condizioni cliniche complesse a carico del tratto esofageo, tra cui il cancro, l'atresia e altri problemi gravemente invalidanti come la stenosi. L'esofagectomia prevede una parziale o totale rimozione del tratto esofageo utilizzando, in sostituzione, la diretta congiunzione con lo stomaco. In alternativa è possibile usare porzioni di colon e, più raramente, di digiuno. Questa tecnica costituisce l'approccio ricostruttivo classico, tuttavia risente di varie complicazioni associate alla doppia chirurgia

dove, in un a prima fase avviene la rimozione esofagea e, in una seconda, avviene l'esportazione e l'innesto di una porzione gastro-intestinale sana (e.g., elevato rischio di infezione, alterazioni del normale afflusso di sangue al graft, completa insensibilità del tratto sostitutivo). Attualmente, la terapia più efficace nel prevenire le criticità descritte è l'impianto di sostituti tissutali ingegnerizzati (TE). Nella sostituzione di piccole aree di tessuto, l'impianto di patch ha dato ottimi risultati; diversamente, è ancora lontana la possibilità di non incorrere in complicazioni a lungo termine con la rimozione circonferenziale completa e a tutto spessore di un tratto esofageo, soprattutto se di lunghezza superiore ai 5 cm. A partire dall'inizio del XX secolo sono stati sviluppati tre distinti approcci nell'allestimento di scaffold esofagei TE, distinti per i differenti materiali utilizzati. Il primo approccio, si basa sull'impiego di costrutti non-assorbibili a base di silicone e collagene. In seguito, verso l'inizio degli anni 90', sono stati creati degli scaffold polimerici assorbibili, costituiti principalmente da polimeri sintetici e collagene. Infine, nei primi anni del 2000, sono stati realizzati scaffold di origine naturale, le matrici decellularizzate (DM) [1]. Ognuna di queste metodologie è purtroppo ancora associata a criticità nel lungo termine, riguardanti soprattutto la comparsa di infiammazione e stenosi. L'uso di costrutti non assorbibili presenta il grande svantaggio di dover rimuovere il tubo portante in silicone dopo i primi mesi dalla chirurgia. L'impianto di scaffold assorbibili porta frequentemente alla comparsa di stenosi, associata alla differente tempistica di degradazione dello scaffold rispetto alla formazione del nuovo tessuto; inoltre, l'instabilità meccanica del graft si associa al possibile distacco anastotomico. Attualmente, l'approccio più promettente ricade nell'ultima categoria di TE, ossia nell'uso di scaffold biocompatibili ottenuti da matrice extracellulare (ECM) decellularizzata. Rispetto alle altre metodologie, le matrici decellularizzate (DM) rappresentano la frontiera dei TE sostitutivi, imitando più fedelmente le funzioni biologiche e meccaniche dell'ECM nativa, mantenendo una micro- e macro-architettura 3D associata ad un microambiente favorevole per l'adesione, la crescita, la proliferazione e l'orientamento cellulare specifico. Inoltre, la decellularizzazione consente l'allestimento di una struttura non immunogenica, in cui le cellule dal ricevente possono ripopolare con efficacia il tratto acellulare sostituito. Con riferimento all'applicazione in vivo, possiamo suddividere l'approccio clinico in due ulteriori modalità ricostruttive: l'impianto di uno scaffold acellulare direttamente nel ricevente con successiva ricolonizzazione in situ; l'impianto di uno scaffold preliminarmente ricellularizzato in vitro (possibilmente usando un bioreattore a perfusione-rotazione) con cellule (staminali, epiteliali e del muscolo liscio) prelevate dal paziente. Nel corso di precedenti studi [2] è emerso che la seconda strategia supporta molto più favorevolmente la successiva formazione di tutti e tre gli strati specifici del dotto, evitando la comparsa di stenosi, e consentendo inoltre la ricomparsa dei naturali movimenti peristaltici, propri di un esofago funzionante. Per entrambe le tipologie di impianti sarà comunque fondamentale valutare attentamente non solo la non-immunogenicità dei graft ma anche la loro

resistenza alla tensione e la capacità di allungamento, a fronte di una preservata struttura 3D.

2. SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi è volto ad una lettura critica del lavoro: “Bio-Engineered Scaffolds Derived from Decellularized Human Esophagus for Functional Organ Reconstruction” di Barbon et al. (2022) *Cells* 11(19):2945. Negli anni sono stati molti gli studi svolti su animali modello (ratto, coniglio, maiale) dedicati all’allestimento di scaffold decellularizzati biocompatibili per l’uomo. Tuttavia, ad oggi, non vi sono evidenze che ne possano confermarne l’adeguatezza. In Barbon et al. (2022), per la prima volta ci si è focalizzati sulla possibilità di ottenere scaffold decellularizzati non immunogenici di origine umana (alloinnesti); specificatamente sono stati comparati 3 metodi detergenti/enzimatici applicati su graft sia tubulari che a patch. Dopo la decellularizzazione, la qualità delle DM risultanti è stata valutata attraverso studi istologici, immunoistochimici, biochimici, di proteomica e citotossici. Inoltre, è stata eseguita la caratterizzazione biomeccanica degli scaffold, per un’ulteriore comparazione tra i tre protocolli.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Raccolta e campionamento di esofago umano

I campioni di esofago di origine umana sono stati raccolti da donatori provenienti dal programma di donazione del Corpo di Scienza della Sezione di Anatomia Umana, Dipartimento di Neuroscienze, dell’Università di Padova. Dopo l’isolamento dell’esofago dalla porzione cervicale fino a quella media toracica, il campione è stato accuratamente lavato e poi dissezionato per ottenere segmenti tubulari di 2.5 cm o patch di 2.5x2.5 cm. I campioni sono stati quindi conservati a – 80°C fino al momento dell’utilizzo. In questa fase, il campione-controllo di tessuto nativo è stato fissato in una soluzione al 10% di formalina per successive analisi.

3.2. Decellularizzazione del tessuto

I campioni di esofago sono stati manipolati in condizioni di sterilità durante tutte le procedure, sono stati poi scongelati a temperatura ambiente (RT) e puliti ulteriormente dai detriti tissutali prima di fare un lavaggio intensivo con il 3% di soluzione antibiotica in PBS, per rimuovere ogni contaminante. I progressivi lavaggi sono stati eseguiti con concentrazioni decrescenti di soluzione antibiotica, con l’ultimo lavaggio di solo PBS. I 3 protocolli detergenti/enzimatici sono stati quindi testati sui campioni di esofago umano. I tubuli esofagei (ETs) decellularizzati con i Protocolli No. 1, 2 e 3, sono stati chiamati ET1, ET2 e ET3 rispettivamente. Similmente, i patch esofagei (EPs) decellularizzati con i Protocolli No. 1, 2 e 3 sono state chiamati EP1, EP2 e EP3, rispettivamente. Come controllo, i campioni di tessuto nativo sono stati chiamati ETN (esophageal tubule, native) ed ENT

(esophageal patch, native). Il protocollo No.1 è stato ripetuto per due cicli per ottenere ET1 e per tre cicli per ottenere EP1.

La procedura sperimentale di ogni protocollo è brevemente descritta qui sotto.

Protocollo No. 1: Ogni ciclo detergente/enzimatico (DET) ha previsto: lavaggio con acqua deionizzata (dH₂O) a 4°C per 24 h; trattamento con una soluzione al 4% di sodio deossicolato (SDC) a RT per 4 h e con DNasi-I 2000 kU in 1 M di cloruro di sodio (NaCl) a RT per 3 h. Questi passaggi si sono svolti sotto agitazione. Quindi, i tessuti sono stati lavati con dH₂O overnight. Dopo la decellularizzazione le matrici sono state risciacquate in 3% di penicillina/streptomina (pen/strep)/PBS per almeno 3 giorni. Infine, i campioni sono stati sterilizzati in acido paracetico 0.1 M per 1 h a RT sotto agitazione e preservati a – 80°C fino all'utilizzo.

Protocollo No. 2, 3: I campioni sono stati immersi in dH₂O per 24 h a 4°C, incubati per 1 h con 0.05% tripsina - 0.02% EDTA a 37°C e poi trattati con 0.002% SDS (Protocollo No. 2) o Tergitol™ (Protocollo No. 3) + 0.8% idrossido d'ammonio (NH₄OH) per 72 h a 4°C sotto continua agitazione. Infine, i campioni sono stati lavati con dH₂O per 72 h e preservati a – 80°C fino all'uso.

Dopo il trattamento detergente/enzimatico, l'aspetto degli esofagi nativi/decellularizzati è stato comparato valutando sia i tubuli che i patch.

3.3. Isolamento e quantificazione del DNA

Per la valutazione del DNA totale contenuto nei campioni decellularizzati *versus* nativi, 20 mg di ogni campione sono stati trattati usando il DNasiBlood&Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germania), in accordo con le istruzioni del kit. La quantificazione è stata condotta mediante Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.4. Indagini istologiche

I campioni decellularizzati sono stati fissati in una soluzione al 10% di formalina quindi processati secondo protocolli di routine del laboratorio. Fette dello spessore di 5 µm sono state valutate mediante analisi istologiche specifiche volte a verificare l'effettiva rimozione dei nuclei cellulari (ematossilina ed eosina (H&E)) e il mantenimento della struttura della matrice (colorazione Weigert Van Gieson, per dimostrare la persistenza delle fibre elastiche; tricromica di Masson, preservazione del collagene) rispetto al tessuto controllo nativo.

3.5. Studi immunoistochimici

Analisi immunoistochimiche sono state condotte per valutare la preservazione del collagene di tipo IV, e della laminina oltre che per verificare l'assenza degli antigeni del II complesso maggiore di istocompatibilità (MHC-II) (HLA-DR), associati a immunogeneticità del campione. Dopo blocking delle perossidasi endogene, l'anticorpo primario è stato depositato sulla fetta e l'incubazione è stata condotta

per 1 h a RT. Quindi, il legame specifico con l'anticorpo primario è stato rilevato tramite l'incubazione con l'anticorpo secondario per 15 min e il polimero EnVision FLEX per 20 min. Successivamente, la 3,3'-diaminobenzidina è stata usata per evidenziare la positività della reazione. Le sezioni sono state contrastate con ematossilina. I campioni esofagei nativi sono stati anch'essi valutati come controllo.

3.6. Quantificazione dei componenti della matrice extracellulare

I Glicosamminoglicani solfati (GAG) contenuti nei tessuti esofagei nativi e decellularizzati (10 mg) sono stati quantificati usando Chondrex Inc. Glycosaminoglycans Assay Kit (DBA Italia S.r.l, Milano, Italia). In parallelo, il contenuto di collagene nei tessuti nativi e decellularizzati (5 mg) è stato indagato mediante un Hydroxyproline assay kit.

3.7. Analisi ultrastrutturale mediante microscopia elettronica a scansione

I campioni sono stati fissati con il 2% glutaraldeide in 0.1 M di soluzione fosfato; dopo un lavaggio con acqua deionizzata, sono stati tagliati in segmenti di circa 1 cm di lunghezza, crioprotetti per 2 h in una soluzione con il 25% di saccarosio e 10% di glicerolo in PBS 0.05 M (pH 7.4) e poi congelati rapidamente. Al momento delle analisi, i campioni sono stati scongelati a RT in crioprotettore e, dopo il lavaggio, il materiale è stato fissato in buffer fosfato 0.1M + 1% di tetrossido di osmio (OsO₄) (pH 7.3). Dopo il risciacquo con acqua dH₂O, i campioni sono stati disidratati e infine montati su un supporto di alluminio per essere metallizzati. Le immagini sono state registrate con un microscopio elettronico a scansione (SEM) Jeol 7401 FEG (Akishima, Tokyo, Giappone).

3.8. Analisi di spettrometria di massa

3.8.1. Preparazione campione

Le matrici esofagee decellularizzate sono state digerite seguendo il protocollo proposto da Naba et al. Brevemente, i campioni sono stati ridotti, alchilati, deglicosilati (PNGaseF; 500,000 U/mL; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) e digeriti con gli enzimi Lys-C (0.1 µg/µL; New England Biolabs) e Tripsina (0.5-0.1 µg/µL; Sequencing Grade Modified Trypsin, PROMEGA Italia Srl, Milano, Italia). Dopo la digestione i campioni sono stati purificati con SPE (SupelTM-Select HLB SPE tubes, Supelco – Merck LifeScience). I peptidi eluiti sono stati liofilizzati e conservati a – 20°C fino alle analisi.

3.8.2. Identificazione proteine

I campioni sono stati risospesi in differenti volumi di 5% CH₃CN + 0.01% soluzione di acido formico per ottenere una uguale colonna di caricamento e sono stati analizzati usando uno spettrometro di massa UHPLC-XEVO-G2-XS (Waters, Milford, MA, USA). I peptidi sono stati separati con una colonna Biobasic C18 (Milano, Italia), 150 mm x 1 mm ID, 5 µm, usando un gradiente lineare 3-45% di

CH₃CN + 0.1% TFA (fase mobile B) in H₂O + 0.1% TFA (fase mobile A) per oltre 110 min. I dati dello spettro di massa sono stati acquisiti in modo dato-dipendente in un range di massa 350-2000 m/z. I parametri strumentali sono stati fissati come di seguito: fonte, ESI (+); selezione della carica del precursore, da 2 a 4; risoluzione, 22,000 FWHM.

3.8.3. Data processing

I dati dello spettro di massa sono stati corretti per il lock-mass, picco di raccolta, convertiti in formato mzML usando il Trans Proteomic Pipeline (TPP) e processati con il Proteome Discoverer 2.2 (ThermoFisher Scientific). I parametri di ricerca sono stati così settati: database, UP000005640 UniProt proteoma di riferimento: enzima, Tripsina (max 2 missed cleavages); tassonomia, homo sapiens; precursore della tolleranza di massa, 25 ppm, frammento della tolleranza di massa, 0.08 Da. Modificazioni fisse: carbamidometil (C). Modificazioni dinamiche: ossidazione (S, T, Y). Un minimo di 2 peptidi non ridondanti, sono stati usati per l'identificazione proteica.

3.9. Proprietà meccaniche

Le proprietà meccaniche dei campioni esofagei nativi e decellularizzati sono state valutate con un test di trazione uniassiale. A causa della limitata disponibilità di materiale, i test sono stati condotti solo sui patch e non sui condotti. Brevemente, i patch esofagei nativi e decellularizzati sono stati tagliati a "osso di cane" (5 mm in lunghezza x 2 mm di larghezza), in accordo con lo standard ASTM D1708-13. Si è così analizzata la risposta del campione alla forza tensile applicata in direzione longitudinale (lungo l'asse maggiore) e in direzione circonferenziale (perpendicolare all'asse maggiore). I test uniassiali sono stati eseguiti usando due attuatori e quattro celle di carico continuando a idratare i campioni con soluzione di cloruro di sodio (NaCl) allo 0.9%. I campioni sono stati precaricati fino a 0.1 N e poi allungati fino al 300% della lunghezza iniziale (tasso di allungamento del 0.2 mm/s), per poter raggiungere la rottura del tessuto e misurare il carico di rottura (UTS) e il failure strain (FS). Le curve di sforzo sono state ottenute per ogni campione, dove (a) lo stress σ (MPa) è stato definito come la forza di trazione misurata sulle celle di carico (Newton) diviso l'area della sezione trasversale iniziale dei campioni, e (b) lo sforzo ϵ (%) è stato definito come il rapporto tra lo spostamento del grip e la lunghezza del calibro. I moduli elastici E1 e E2 sono stati calcolati come la pendenza delle curve di sforzo tra l'1 e il 10% di deformazione e tra l'80 e il 90% di deformazione, rispettivamente. Infine, la durezza (I) è stata definita come la forza richiesta (per unità di volume) per portare il materiale al cedimento.

3.10. Studi di citotossicità

Le cellule della linea HM1-SV40 sono state coltivate in un medium di proliferazione contenente Alfa-Modified Eagle Medium (α -MEM) Without Nucleosides

(ThermoFisher Scientific), 16.5% di siero bovino fetale (FBS) (ThermoFisher Scientific), l'1% di glutammina e l'1% di soluzione penicillina/streptomicina (100 mg/mL). Le cellule sono state mantenute a 37°C, al 5% di CO₂ e 95% di umidità per 3-4 giorni ai fini dell'espansione in vitro; successivamente, sono state seminate ad una densità di 10.000 cells/cm² in piastre multiwell da 24 pozzetti e fatte aderire per 24 h prima di effettuare i test di citotossicità. Per verificare il rilascio di residui potenzialmente tossici da parte delle matrici esofagee dopo ciascun protocollo, sono stati allestiti i media condizionati. Brevemente, le matrici esofagee decellularizzate sono state incubate in un medium di proliferazione per le cellule HM1-SV40 (100 mg di tessuto per mL) per 72 h a 37°C, 5% CO₂ e 95% umidità. La citocompatibilità delle matrici acellulari è stata valutata trattando le cellule HM1-SV40 con i media condizionati, ottenuti da ogni protocollo, per 72 h. In parallelo, cellule non trattate e cellule incubate in condizioni citotossiche (50% dimetilsolfossido, DMSO) sono considerate come controlli negativi e positivi, rispettivamente. Alla fine del periodo di incubazione di 72 h, vitalità cellulare, proliferazione e citotossicità sono state valutate con il saggio MTT, che misura l'attività metabolica cellulare. I risultati sono stati espressi come percentuale della vitalità cellulare dei campioni trattati rispetto il controllo negativo non trattato (100% vitale).

3.11. Analisi statistiche

Tutti i grafici e le analisi statistiche sono stati eseguiti usando il Software GraphPad Prism 7. I dati sono stati espressi come medie \pm Deviazione Standard. Per il confronto tra gruppi sperimentali sono stati usati il test t di Student (per i dati parametrici) e il test di Mann-Whitney (per i dati non parametrici). Il test One-way ANOVA con il test post hoc di Bonferroni (per i dati parametrici) e il test Kruskal-Wallis con il test post hoc di Dunn (per i dati non parametrici) sono stati eseguiti per confronti multipli. Un p-value < 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

4. RISULTATI

4.1. Decellularizzazione di esofago umano

Dopo la decellularizzazione, tutti i campioni sembravano conservare una certa integrità rispetto ai tessuti nativi. Non sono state osservate rotture e danni del tessuto in seguito ai trattamenti detergente-enzimatici. I tubuli esofagei sono rimasti manipolabili e hanno mantenuto la forma tubulare nativa. Preliminarmente, all'osservazione macroscopica, tubuli e patch decellularizzati hanno acquisito un aspetto traslucido e bianco rispetto ai tessuti nativi di controllo (Figura 1A, B). ET1 e EP1 sembravano mantenere un colore più rosato dello strato muscolare, suggerendo una parziale persistenza delle miofibrille. ET2, ET3, EP2 ed EP3 hanno invece mostrato un colore bianco sia negli strati mucosi che muscolari. Come atteso, la consistenza del tessuto sia dei campioni tubolari che dei patch, sembrava diminuire dopo la decellularizzazione in confronto al controllo nativo.

Tuttavia, tutti i campioni hanno mantenuto una buona manipolabilità, ad eccezione di ET3 ed EP3 che tendevano a collassare.

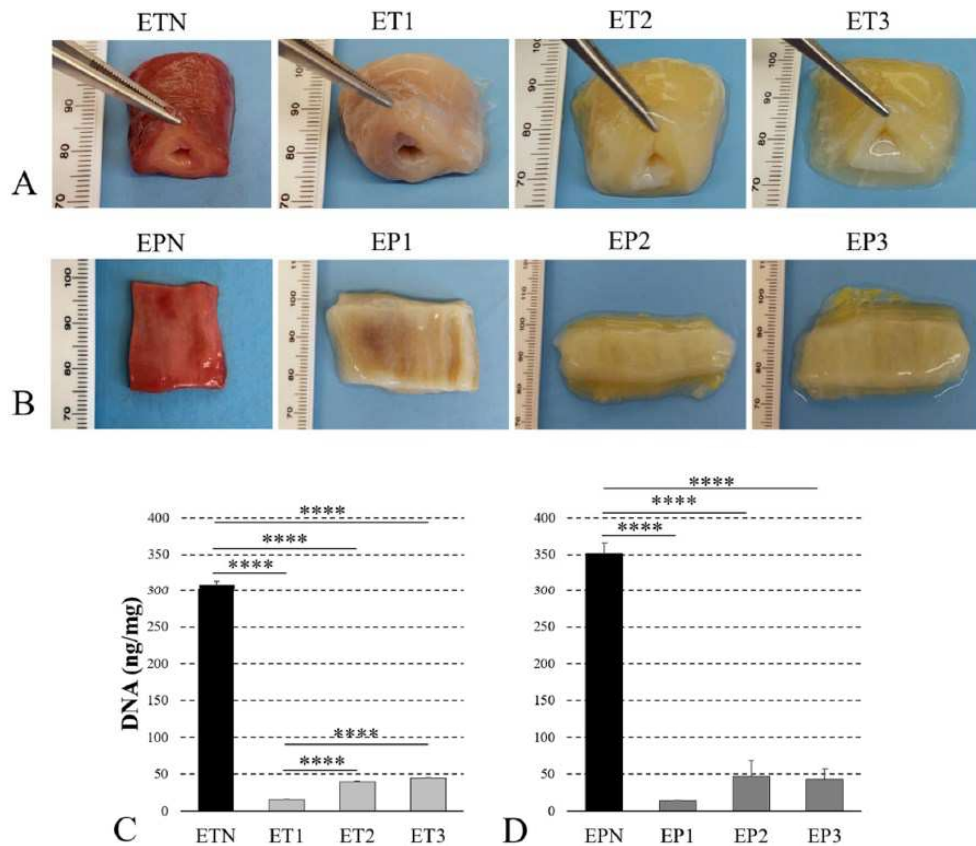


Figura 1. Efficacia di decellularizzazione. Aspetto grossolano (A, B) dei tubuli esofagei (ET) e dei patch (EP) prima (ETN, EPN) e dopo la decellularizzazione con i protocolli No. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) e 3 (ET3, EP3). Quantificazione del DNA residuo (C, D) in campioni decellularizzati rispetto a quelli nativi (**** $p < 0.0001$).

La quantificazione del materiale immunogenico residuo ha mostrato una diminuzione significativa nel contenuto di DNA in tutti gli scaffold decellularizzati rispetto alle controparti native, arrivando sotto al valore soglia di 50 ng/mg di tessuto precedentemente indicata come threshold per considerare efficiente la decellularizzazione stessa (Figura 1C, D). Sia per i tubuli che per i patch, il Protocollo No. 1 ha portato a una significativa riduzione dei livelli di DNA rispetto ai Protocolli No. 2 e 3.

4.2. Valutazione istologica

L'efficienza del protocollo di decellularizzazione nel garantire la rimozione delle cellule tessuto-specifiche e il mantenimento della struttura del tessuto è stata valutata mediante la colorazione H&E la quale ha confermato l'assenza di nuclei (elementi puntiformi, viola) in tutti i campioni decellularizzati, nonché la conservazione della colorazione eosinofila rosa tipica del collagene. Le fibre muscolari sono state rimosse mediante tutti i protocolli, sebbene ET1 ed EP1 mostrassero una certa persistenza di miofibrille (Figura 2A, D). Nel complesso,

potendo distinguere i diversi strati della matrice esofagea, è stata confermata la preservazione dell'architettura generale del tessuto. La colorazione di Weigert Van Gieson ha evidenziato la persistenza di fibre elastiche di colore nero nella lamina propria, tra la muscularis mucosae e la muscularis propriae, e all'interno della parete dei vasi sanguigni (Figura 2B, E). La colorazione tricromica di Masson ha rivelato il mantenimento di fibre di collagene di colore verde nell'ECM esofagea acellulare, con un colore molto più debole nei campioni ET3 ed EP3 (Figura 2C, F).

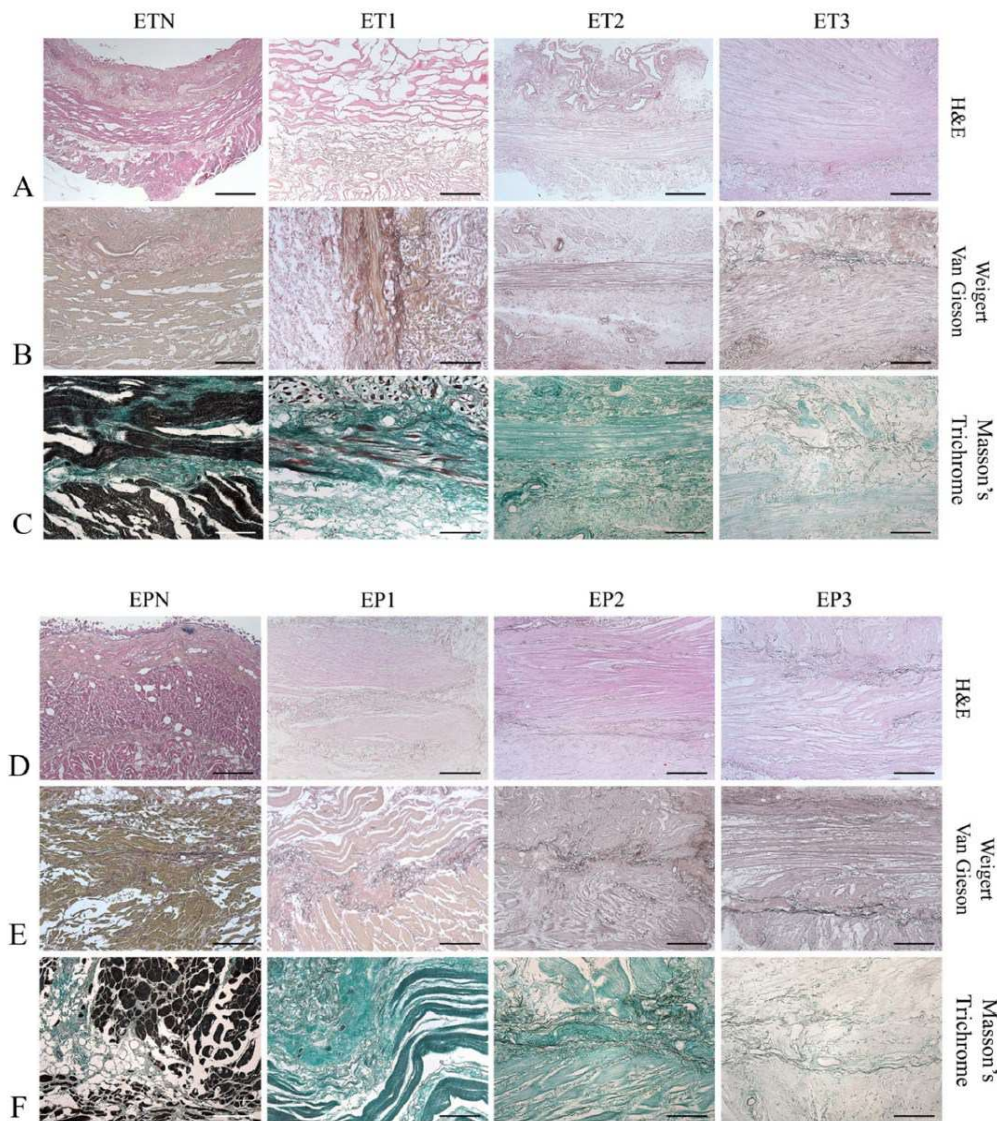


Figura 2. Struttura microscopica dell'esofago decellularizzato. Valutazione istologica dei tubuli esofagei (ET) e dei patch (EP) prima (ETN, EPN) e dopo la decellularizzazione con i protocolli No. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) e 3 (ET3, EP3). Scala: 800 μ m ((A,D) ETN, EPN); 400 μ m (A,B,D,E); 200 μ m (C,F).

4.3. Valutazione immunoistochimica

L'esame immunoistochimico ha confermato la preservazione di diversi marcatori specifici dell'ECM negli scaffold decellularizzati (Figura 3). L'espressione di

laminina è stata rilevata nella sottomucosa, nella lamina propria e nella parete dei vasi sanguigni (Figura 3B, E). Il collagene di tipo IV è stato individuato principalmente negli strati muscolari circostanti le fibre muscolari e intorno ai vasi sanguigni (Figura 3A, D). Il recettore HLA-DR è stato rilevato solo nei campioni nativi, ETN ed EPN, dimostrando così la bassa immunogenicità dei prodotti di decellularizzazione (Figura 3C, F).

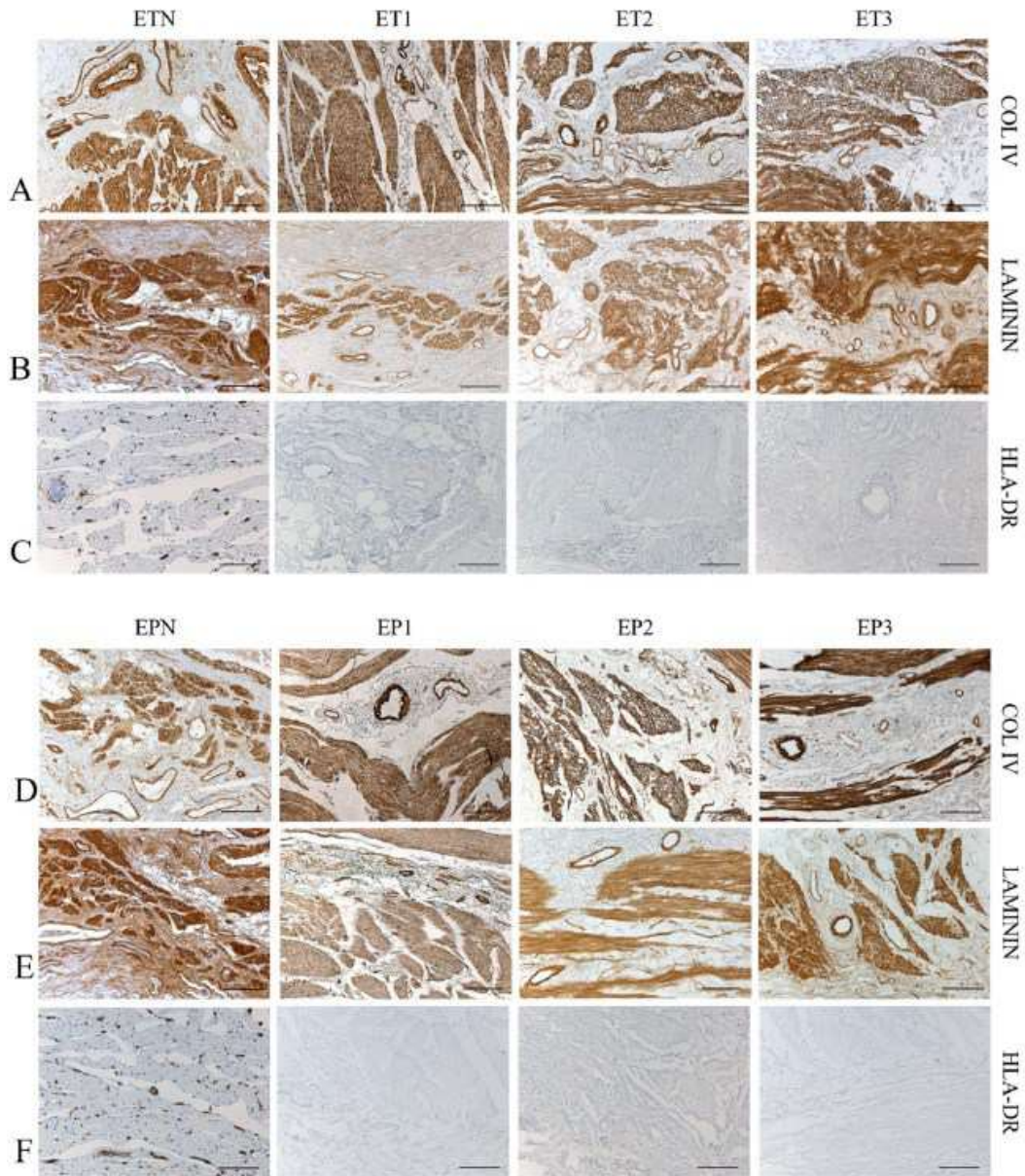


Figura 3. *Preservazione dei marcatori tessuto-specifici. Analisi immunoistochimica per la localizzazione di marcatori specifici dell'ECM e degli antigeni MHC-II (HLA-DR) all'interno dei tubuli esofagei (ET) e dei patch (EP) prima (ETN, EPN) e dopo la decellularizzazione con i protocolli No. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) e 3 (ET3, EP3). Scala: 100 μ m (A-F).*

4.4. Analisi quantitativa dei componenti della matrice extracellulare

La quantità di GAG e idrossiprolina, nei campioni nativi e decellularizzati, è stata misurata tramite un saggio biochimico (Figura 4). I dati raccolti hanno mostrato alcune differenze tra i protocolli, essendo i GAG significativamente diminuiti nei campioni ET1 ed EP1 rispetto ai tessuti nativi (pur mantenendone circa il 70-80%); diversamente si sono ben preservati negli scaffold ET2, ET3, EP2 ed EP3 (Figura 4A, B). L'idrossiprolina si è preservata maggiormente con i protocolli No. 2 e 3, piuttosto che col No. 1. In particolare, una quantità significativamente più alta di idrossiprolina è stata trovata in ET2 e ET3 contro ET1 e in EP2 rispetto EP1 (Figura 4C, D).

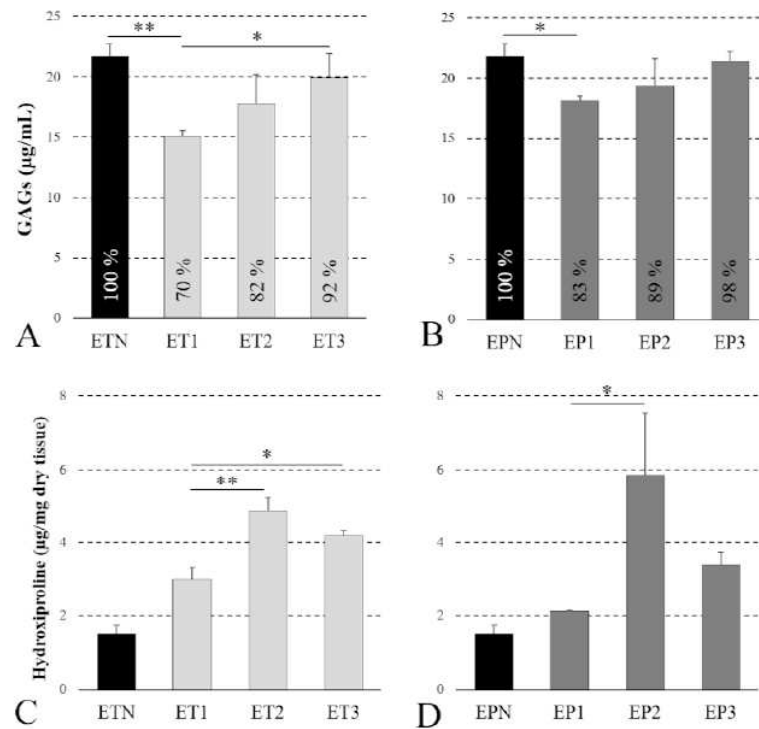


Figura 4. Preservazione di GAG e collagene. Quantificazione dei GAG residui (A,B) e dell'idrossiprolina (C,D) nei tubuli (ET) e nei patch (EP) prima (ETN, EPN) e dopo la decellularizzazione con i protocolli No. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) e 3 (ET3, EP3) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.5. Caratterizzazione della componente collagenica

Con riferimento al collagene, l'analisi al SEM ha confermato il mantenimento dell'ultrastruttura dopo la decellularizzazione sia dei tubuli (figura 5A) che dei patch (figura 5E), rispetto ai campioni nativi. Sono stati rilevati elementi cellulari negli esofagi nativi ma non nelle matrici decellularizzate (frecche bianche nelle figure 5A, E). Il collagene conserva il tipico aspetto fibrillare.

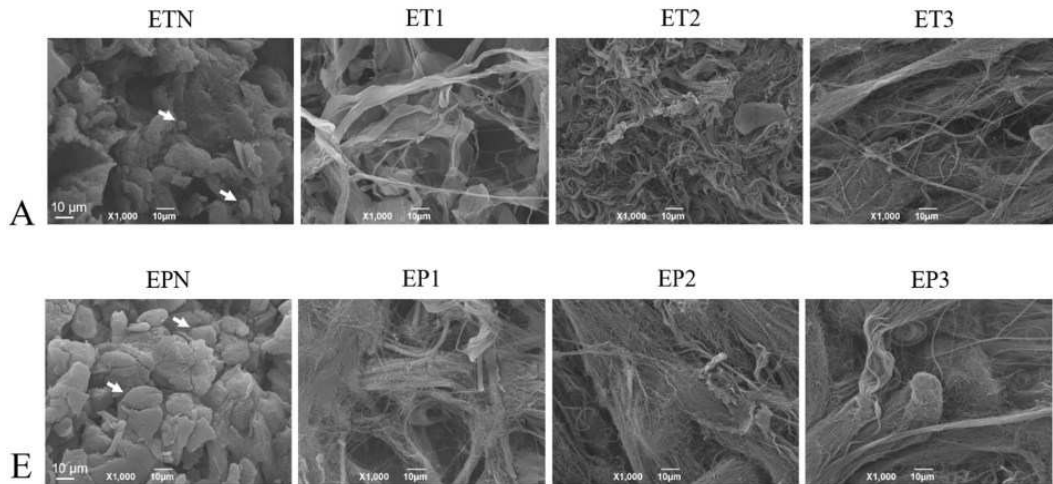


Figura 5. Caratterizzazione della componente collagenica. Indagine sul collagene nei tubuli (A) e nei patch (E) prima (ETN, EPN) e dopo la decellularizzazione con i Protocolli No. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) e 3 (ET3, EP3). L'ultrastruttura del collagene è stata analizzata utilizzando il SEM. Le frecce bianche indicano le cellule all'interno degli scaffold ETN ed EPN (A,E). Scala: 10 µm (A,E).

4.6. Analisi proteomica del secretoma del tessuto decellularizzato

La conservazione delle proteine tessuto-specifiche dopo la decellularizzazione è stata valutata mediante analisi di spettrometria di massa. Dopo l'elaborazione dati LC-MS/MS sono state ottenute un totale di 218 proteine, che sono state scelte e stratificate in cinque categorie principali: collagene, proteoglicani, glicoproteine, proteine del citoscheletro e regolatori. Le proteine totali rilevate all'interno di tubuli e patch decellularizzati sono presentate nella Figura 6, con l'indicazione di espressione positiva (verde) e negativa (rossa). Questa classificazione è stata scelta al fine di evidenziare gli impatti dei diversi protocolli di decellularizzazione sulle componenti dell'ECM a diversa solubilità (collagene, proteoglicani e glicoproteine), sulle proteine secrete (regolatorie) e sugli eventuali contaminanti (proteine del citoscheletro). È stato calcolato il valore assoluto delle proteine per ciascun campione decellularizzato. I collagene (collagene della lamina basale, collagene a ponte cellula-matrice, collagene non fibrillari) sono risultati essere le proteine più abbondanti. Tutti i collagene rilevati avevano una distribuzione simile in tutti i campioni decellularizzati. Le proteine del citoscheletro sono state anch'esse preservate in ET1, ET3, EP2 ed EP3. In parallelo, i campioni ET2 ed EP1 hanno mostrato di conservare, rispettivamente, il più basso ($n = 4$) e il numero più alto ($n = 37$) di proteine del citoscheletro dopo il trattamento di decellularizzazione. Analogamente ai collagene, tutti i protocolli di decellularizzazione sembravano preservare in modo comparabile i proteoglicani. Per quanto riguarda le glicoproteine, sono stati osservati numeri più alti nei campioni EP1, ET3 ed EP3 rispetto agli scaffold ET1, ET2 ed EP2. Infine, le proteine regolatorie risultavano conservate in EP1 ed EP2, mentre non sono state rilevate negli altri scaffold acellulari.

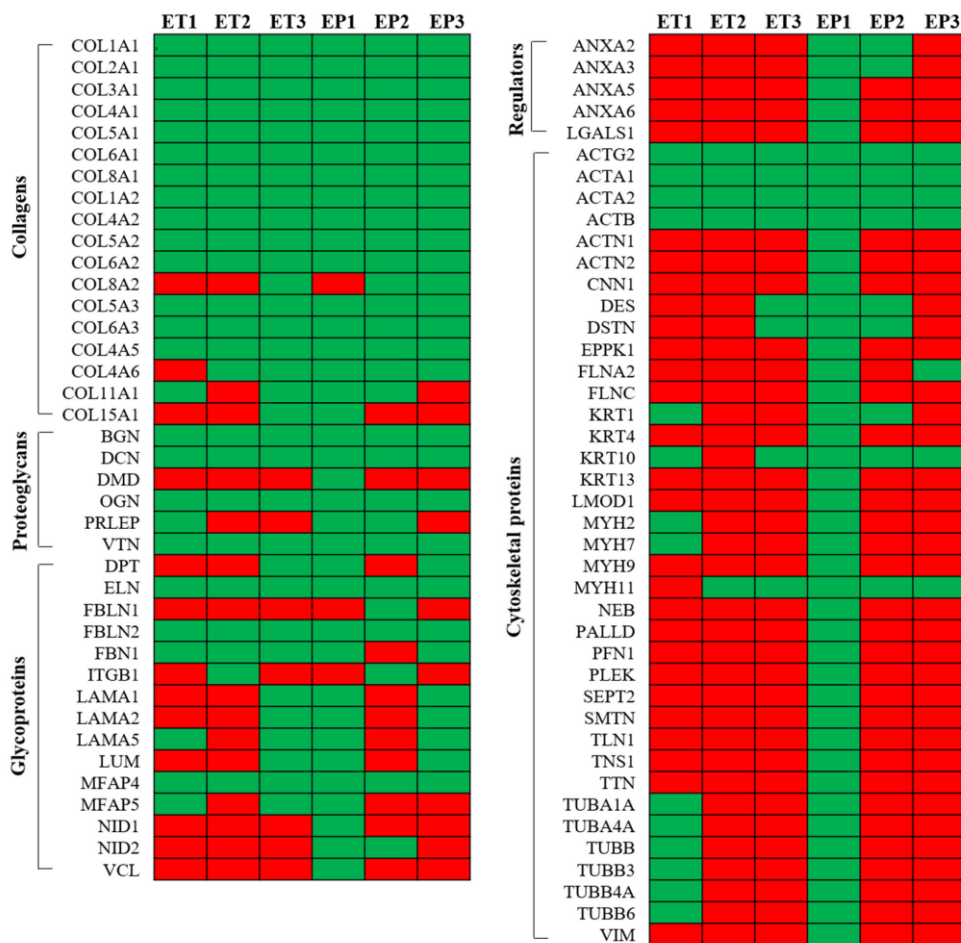


Figura 6. Studio proteomico. Panoramica delle principali proteine rilevate nei tubuli (ET) e patch (EP) decellularizzati con i protocolli No. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) e 3 (ET3, EP3). (Verde: espressione proteica positiva; rosso: espressione proteica negativa).

4.7. Comportamento meccanico

Dopo aver misurato il FS, che rappresenta il massimo allungamento del campione, non sono state riscontrate differenze tra tessuti nativi e decellularizzati per nessuna delle due direzioni, longitudinale e circonferenziale (Figura 7B). Per l'UTS si è registrata una significativa diminuzione di valore nei decellularizzati rispetto ai nativi sia in senso longitudinale che circonferenziale (Figura 7C). Inoltre, è stata osservata una significativa riduzione dell'UTS per EP2 rispetto a EP1 lungo la direzione circonferenziale. L'I è risultata significativamente influenzata da tutti e tre i metodi di decellularizzazione in campioni allungati in direzione longitudinale (Figura 7D). Al contrario, nel gruppo sperimentale con allungamento circonferenziale, si è osservata una sua significativa riduzione in EP2 ed EP3 rispetto a EPN. Infine, dopo la decellularizzazione è stata registrata anche una chiara riduzione dei moduli E1 ed E2 di Young con tutti e tre i metodi, con una differenza poco significativa tra il campione EP1 o EP2 e il tessuto nativo quando i campioni sono stati allungati in direzione longitudinale (Figura 7E, F).

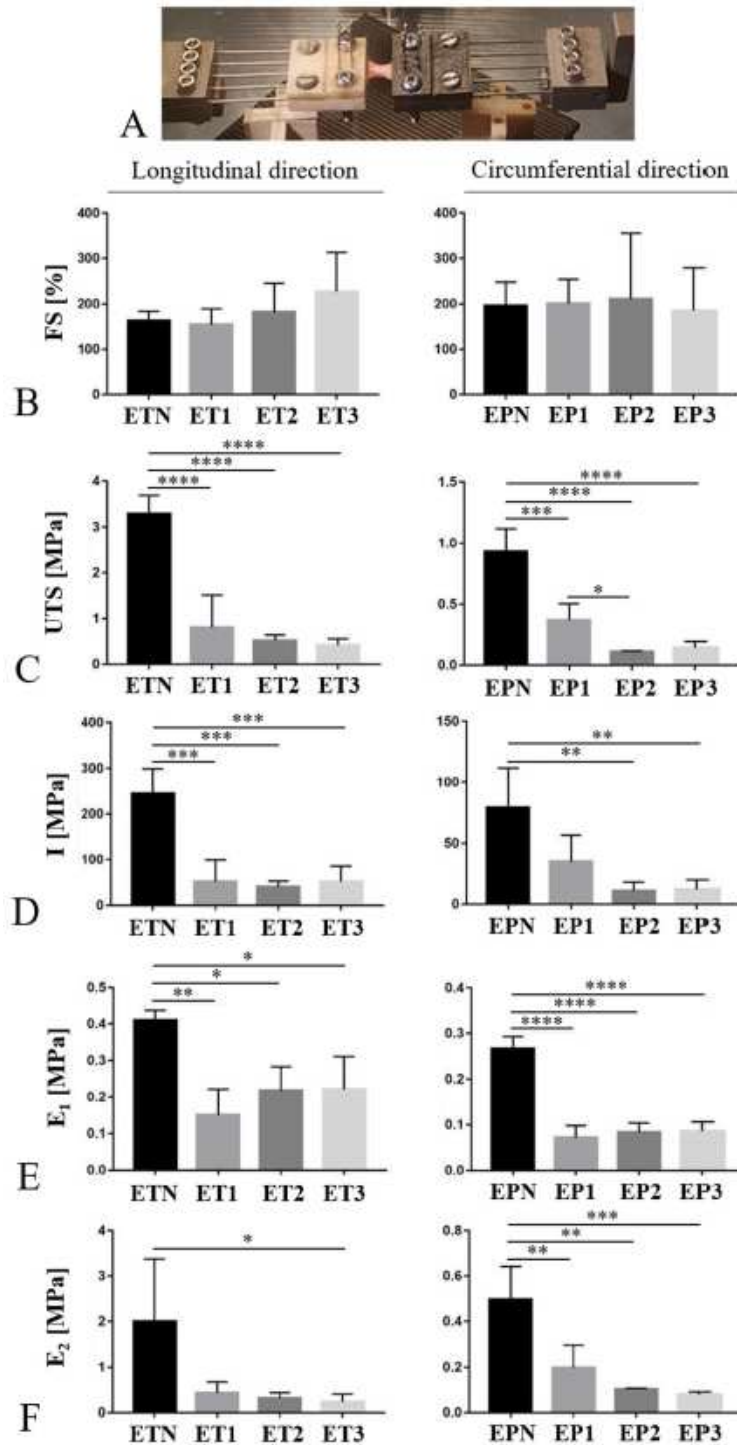


Figura 7. Biomeccanica degli esofagi decellularizzati. Proprietà meccaniche dei patch prima (EPN) e dopo la decellularizzazione con i protocolli No. 1 (EP1), 2 (EP2) e 3 (EP3). La forza di trazione è stata applicata utilizzando un apparato personalizzato (A) lungo entrambe le direzioni, longitudinale e circonferenziale, per misurare la FS (B), la UTS (C) e la I (D). I moduli di Young E₁ (E) ed E₂ (F) sono stati calcolati come la pendenza delle curve di stress-deformazione a una deformazione dell'1-10% e dell'80-90%, rispettivamente (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

4.8. Valutazione della citotossicità

Dopo 72 h di esposizione ai terreni di coltura precedentemente condizionati con i tessuti decellularizzati, le cellule HM1-SV40 sembravano essere vitali e proliferare, raggiungendo circa il 90% di confluenza sulla superficie di crescita. Il test MTT ha rivelato che, rispetto a colture non trattate, le cellule hanno conservato il 93,7%, il 95,4% e il 78,3% di vitalità se trattate con terreno condizionato con matrici esofagee decellularizzate tramite protocolli No. 1, 2 e 3, rispettivamente (Figura 8). Sono state rilevate differenze significative tra il controllo citotossico e tutti gli altri campioni ($p < 0,0001$), confermando che le colture cellulari hanno risposto in modo appropriato rispetto al controllo positivo. Una significativa diminuzione della vitalità cellulare ($p < 0,05$) è risultata essere causata dal mezzo condizionato con i tessuti esofagei trattati con Tergitol™ rispetto al controllo non trattato. Tuttavia, si manteneva più del 70% di vitalità cellulare, in linea con il valore soglia di riferimento (Figura 8).

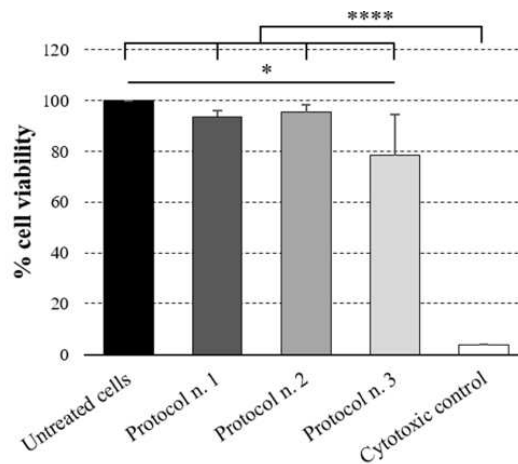


Figura 8. Studio della citocompatibilità. Test di citotossicità sulla linea cellulare HM1-SV40 incubata per 72 h con i mezzi di coltura condizionati con le matrici esofagee decellularizzate attraverso i Protocolli No. 1, 2 e 3. Per ciascun gruppo sperimentale, la percentuale di vitalità cellulare dopo il periodo di incubazione è stata definita attraverso il confronto con il controllo non trattato (vitalità al 100%) (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$).

5. DISCUSSIONE

La ricostruzione funzionale dell'esofago rappresenta ancora oggi una sfida importante in ambito chirurgico. Un approccio promettente deriva dall'allestimento di scaffold biologici ottenuti da matrici acellulari esofagee. Questi tipi di graft si distinguono idealmente per conservare l'ECM, offrendo il vantaggio di ricreare fedelmente la macro- e microarchitettura tridimensionale dell'organo bersaglio [3]. Nei precedenti lavori, l'esofago umano non era mai stato studiato nell'ottica della ricostruzione esofagea; il seguente studio rappresenta dunque un punto di inizio per la ricerca, in quanto gli alloinnesti possono garantire migliore biocompatibilità, composizione biomolecolare, proprietà biomeccaniche e capacità di biointegrazione rispetto alle loro controparti animali (xenoinnesti),

minimizzando anche i rischi di infezione. In questo lavoro sono stati confrontati tra loro graft esofagei con due morfologie: patch e segmenti tubolari. I campioni donati sono stati congelati per prevenirne il deterioramento e questo si traduce in una prima lisi cellulare. Il congelamento/scongelo non aumenta significativamente la perdita di proteine dell'ECM, e non danneggia severamente la struttura tridimensionale dello scaffold [4]. Successivamente, sono stati confrontati i 3 metodi di decellularizzazione condotti mediante un approccio detergente-enzimatico. L'efficacia di tutti i protocolli è stata preliminarmente convalidata tramite colorazione H&E, la quale non ha evidenziato materiale nucleare residuo in alcuno dei campioni decellularizzati. In parallelo, l'analisi di quantificazione del DNA ha dimostrato che SDC e DNasi I (protocollo No. 1) hanno rimosso con maggior successo gli acidi nucleici. Contestualmente, le indagini istologiche hanno confermato l'adeguata conservazione delle fibre elastiche e dei collagene da parte di tutti e tre i protocolli, ed una parziale conservazione della componente muscolare da parte del protocollo No. 1. Le sezioni istologiche hanno inoltre confermato il mantenimento degli elementi vascolari. La non immunogenicità delle DM è stata comprovata analizzando l'immunolocalizzazione dell'antigene HLA-DR: le analisi ne hanno dimostrato la completa perdita dopo trattamento con ogni protocollo, suggerendo dunque un elevato tasso di biocompatibilità dei campioni [6]. Mediante il saggio biochimico volto alla quantificazione dei GAG, si è potuto riscontrare una migliore conservazione di questi utilizzando i protocolli No. 2 e 3, rispetto al No. 1, risultato verosimilmente associato all'uso del SDC [5]. Con il protocollo No. 1 si è tuttavia osservata solo una moderata diminuzione dei GAG stessi, indicando che i campioni ET1 e EP1 possono ancora beneficiarne ai fini del ripopolamento dello scaffold. I dati raccolti sono in contrasto con quelli di precedenti lavori in cui si osservava una maggiore conservazione dei GAG a seguito dell'utilizzo di tripsina o SDC [8]. Tale aspetto dovrà essere certamente approfondito negli studi futuri. Il contenuto di collagene presente negli scaffold è stato determinato tramite quantificazione biochimica dell'idrossiprolina e, analogamente all'analisi dei GAG, maggiori quantità sono state riscontrate nei campioni decellularizzati con i protocolli No. 2 e 3 (il contenuto di idrossiprolina rilevato è stato normalizzato al peso specifico del campione). La proteomica degli scaffold mostra il mantenimento dei collagene propri della membrana basale e delle proteine che modulano l'interazione matrice-cellula. Le glicoproteine che costituiscono le fibre elastiche sono state preservate da tutti i protocolli, mentre quelle associate alla membrana basale sono risultate più conservate dai protocolli No. 1 e 3. I proteoglicani sono risultati ancora in parte presenti dopo la decellularizzazione. Le proteine del citoscheletro sono state rilevate in quantità più elevata negli scaffold trattati con il protocollo No. 1, suggerendo la presenza di detriti cellulari. Questo protocollo seguito dal protocollo No. 2, garantisce una migliore conservazione di alcuni fattori regolatori implicati nella modulazione delle interazioni cellula-matrice. L'indagine ultrastrutturale dei campioni decellularizzati, rispetto al controllo nativo, è stata

eseguita utilizzando il SEM. La struttura del collagene dopo la decellularizzazione ha mostrato fibre disposte in fasci sottili, con un orientamento lasco e ondulato, e separati l'uno dall'altro da spazi irregolari; come atteso, le cellule non erano più visibili. Lo studio biomeccanico degli scaffold acellulari, di fondamentale importanza per stabilire la corretta conservazione dell'integrità funzionale dei tessuti, ha dimostrato che tutti i metodi di decellularizzazione valutati hanno portato a una diminuzione della resistenza meccanica rispetto alla controparte nativa. L'uso della tripsina è uno dei possibili fattori da considerare in relazione ad una eventuale diminuzione delle prestazioni meccaniche dei tessuti decellularizzati. A causa della sua forte attività proteolitica, la durata del trattamento è di fondamentale importanza per ridurre al minimo gli effetti negativi sulla struttura dell'ECM e sul comportamento meccanico dei graft derivati [7]. In questo studio, i campioni sono stati incubati in tripsina per un periodo limitato di 1 h (anziché 15-24 h), quindi è improbabile che essa abbia contribuito a influenzare significativamente i moduli di Young più dei trattamenti a base di solo detergente SDC. Infine, sono stati svolti i test di citotossicità che hanno comprovato l'atossicità di tutti gli scaffold; in particolare, i risultati migliori sono stati ottenuti con i protocolli No. 1 e 2. Ulteriori valutazioni in vivo dovranno essere condotte al fine di confermare, attraverso l'impianto sottocutaneo degli scaffold in ratto/topo, la biocompatibilità delle matrici decellularizzate.

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Questo primo lavoro di decellularizzazione di campioni esofagei di origine umana ha dato luogo a dei risultati promettenti per il futuro allestimento di alloinnesti esofagei da usare in ambito clinico. I tre protocolli comparati hanno dato luogo a risultati diversi sotto i vari aspetti considerati. Brevemente, la manipolabilità tissutale è risultata minore con il protocollo No. 3; la rimozione del DNA è stata più efficace con il protocollo No. 1; la conservazione dei GAG e idrossiprolina è stata maggiore con i protocolli No. 2 e 3; la citocompatibilità è risultata più elevata con i protocolli No.1 e 2. Nessuno dei protocolli indagati ha mostrato una superiorità netta rispetto agli altri. In tale scenario, un primo aspetto che ritengo necessario approfondire attraverso studi futuri, riguarda la valutazione attenta delle tempistiche di incubazione con tripsina, oltre che la concentrazione più idonea da utilizzare (qui, 1 h allo 0.05%, protocolli No. 2 e 3) [7]. Tali aspetti sono infatti di fondamentale importanza per preservare l'elasticità degli scaffold, in modo da consentire ai riceventi una migliore prospettiva di recupero funzionale degli impianti nel lungo periodo. Inoltre, rispetto ad altri enzimi come le nucleasi, la tripsina rappresenta sicuramente un'alternativa potenzialmente efficace ed economica. Con riferimento ad un lavoro precedente di Barbon et al. (2022) [3] anche la combinazione della tripsina con SDS + TergitolTM potrebbe associarsi ad outcome interessanti, come dimostrato per il muscolo diaframma. Certamente, la biosicurezza di scaffold allestiti mediante l'utilizzo di solo TergitolTM come detergente rimane un aspetto interessante da approfondire.

BIBLIOGRAFIA










1. Luc, G.; Durand, M.; Collet, D.; Guillemot, F.; Bordenave, L. Esophageal tissue engineering. *Expert Rev. Med. Devices* **2014**, *11*, 225–241. [[CrossRef](#)]
2. Totonelli, G.; Maghsoudlou, P.; Fishman, J.M.; Orlando, G.; Ansari, T.; Sibbons, P.; Birchall, M.A.; Pierro, A.; Eatonz, S.; De Coppi, P. Esophageal tissue engineering: A new approach for esophageal replacement. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 6900–6907. [[CrossRef](#)]
3. Barbon, S.; Stocco, E.; Contran, M.; Facchin, F.; Boscolo-Berto, R.; Todros, S.; Sandrin, D.; Romanato, F.; Pavan, P.; Macchi, V.; et al. Preclinical Development of Bioengineered Allografts Derived from Decellularized Human Diaphragm. *Biomedicines* **2022**, *10*, 739. [[CrossRef](#)]
4. Crapo, P.M.; Gilbert, T.W.; Badylak, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3233–3243. [[CrossRef](#)]
5. Nayakawde, N.B.; Methe, K.; Banerjee, D.; Berg, M.; Premaratne, G.U.; Olausson, M. In Vitro Regeneration of Decellularized Pig Esophagus Using Human Amniotic Stem Cells. *Biores. Open Access* **2020**, *9*, 22–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ozdemir, B.H.; Aksoy, P.K.; Haberal, A.N.; Demirhan, B.; Haberal, M. Relationship of HLA-DR expression to rejection and mononuclear cell infiltration in renal allograft biopsies. *Ren. Fail.* **2004**, *26*, 247–251. [[PubMed](#)]
7. Lin, C.H.; Kao, Y.C.; Ma, H.; Tsay, R.Y. An investigation on the correlation between the mechanical property change and the alterations in composition and microstructure of a porcine vascular tissue underwent trypsin-based decellularization treatment. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2018**, *86*, 199–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Di Liddo, R.; Aguiari, P.; Barbon, S.; Bertalot, T.; Mandoli, A.; Tasso, A.; Schrenk, S.; Iop, L.; Gandaglia, A.; Parnigotto, P.P.; et al. Nanopatterned acellular valve conduits drive the commitment of blood-derived multipotent cells. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 5041–5055. [[CrossRef](#)]

APPENDICE

Barbon, S.; Biccari, A.; Stocco, E.; Capovilla, G.; D'Angelo, E.; Todesco, M.; Sandrin, D.; Bagno, A.; Romanato, F.; Macchi, V.; et al. Bio-Engineered Scaffolds Derived from Decellularized Human Esophagus for Functional Organ Reconstruction. *Cells* **2022**, *11*(19), 2945. <https://doi.org/10.3390/cells11192945>

Article

Bio-Engineered Scaffolds Derived from Decellularized Human Esophagus for Functional Organ Reconstruction

Silvia Barbon ^{1,2,3,†} , Andrea Biccari ^{2,4,†}, Elena Stocco ^{1,2,3}, Giovanni Capovilla ⁴, Edoardo D'Angelo ⁴ , Martina Todesco ^{2,5} , Deborah Sandrin ^{2,6}, Andrea Bagno ^{2,5} , Filippo Romanato ^{2,6} , Veronica Macchi ^{1,2} , Raffaele De Caro ^{1,2,3} , Marco Agostini ^{2,4,*} , Stefano Merigliano ^{2,4}, Michele Valmasoni ^{2,4,‡} , and Andrea Porzionato ^{1,2,3,‡}

- ¹ Section of Human Anatomy, Department of Neuroscience, University of Padova, 35121 Padova, Italy
² L.i.f.e.L.a.b. Program, Consorzio per la Ricerca Sanitaria, 35128 Padova, Italy
³ Foundation for Biology and Regenerative Medicine, Tissue Engineering and Signaling—TES, Onlus, 35136 Padova, Italy
⁴ Department of Surgical Oncological and Gastroenterological Sciences, University of Padova, 35128 Padova, Italy
⁵ Department of Industrial Engineering, University of Padova, 35131 Padova, Italy
⁶ Department of Physics and Astronomy “G. Galilei”, University of Padova, 35131 Padova, Italy
* Correspondence: m.agostini@unipd.it; Tel.: +39-049-96-40-160
† These authors contributed equally to this work.
‡ Co-last author.



Citation: Barbon, S.; Biccari, A.; Stocco, E.; Capovilla, G.; D'Angelo, E.; Todesco, M.; Sandrin, D.; Bagno, A.; Romanato, F.; Macchi, V.; et al. Bio-Engineered Scaffolds Derived from Decellularized Human Esophagus for Functional Organ Reconstruction. *Cells* **2022**, *11*, 2945. <https://doi.org/10.3390/cells11192945>

Academic Editor: Wayne Carver

Received: 18 August 2022

Accepted: 15 September 2022

Published: 20 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Esophageal reconstruction through bio-engineered allografts that highly resemble the peculiar properties of the tissue extracellular matrix (ECM) is a prospective strategy to overcome the limitations of current surgical approaches. In this work, human esophagus was decellularized for the first time in the literature by comparing three detergent-enzymatic protocols. After decellularization, residual DNA quantification and histological analyses showed that all protocols efficiently removed cells, DNA (<50 ng/mg of tissue) and muscle fibers, preserving collagen/elastin components. The glycosaminoglycan fraction was maintained (70–98%) in the decellularized versus native tissues, while immunohistochemistry showed unchanged expression of specific ECM markers (collagen IV, laminin). The proteomic signature of acellular esophagi corroborated the retention of structural collagens, basement membrane and matrix–cell interaction proteins. Conversely, decellularization led to the loss of HLA-DR expression, producing non-immunogenic allografts. According to hydroxyproline quantification, matrix collagen was preserved (2–6 µg/mg of tissue) after decellularization, while Second-Harmonic Generation imaging highlighted a decrease in collagen intensity. Based on uniaxial tensile tests, decellularization affected tissue stiffness, but sample integrity/manipulability was still maintained. Finally, the cytotoxicity test revealed that no harmful remnants/contaminants were present on acellular esophageal matrices, suggesting allograft biosafety. Despite the different outcomes showed by the three decellularization methods (regarding, for example, tissue manipulability, DNA removal, and glycosaminoglycans/hydroxyproline contents) the ultimate validation should be provided by future repopulation tests and in vivo orthotopic implant of esophageal scaffolds.

Keywords: human esophagus; decellularization; extracellular matrix; allograft; tissue engineering

1. Introduction

Gastric or colonic transpositions and, more rarely, jejunal grafts constitute the mainstay of reconstructive treatment after esophageal resection for benign disorders (including caustic burns and atresia) or cancer. However, these reconstructions are burdened by a high rate of postoperative complications and mortality and, in the long term, a reduced quality of life due to reflux, delayed emptying, dumping syndrome and strictures. Moreover, in particularly complicated cases, after the failure of the reconstructive techniques or

unsuitability of the organs for reconstruction, clinicians could face a therapeutic dead-end where no reconstructive strategies are available, and patients require life-long enteral feeding through jejunostomy. In this context, the development of tissue-engineered (TE) substitutes, allowing esophageal replacement to be performed without sacrificing other organs, is desirable.

The use of decellularized scaffolds might be the best option to achieve this goal, as decellularized extracellular matrix (ECM) can preserve organs' architecture and guide cellular migration, anchorage and 3D organization [1–5]. In recent years, the development of tissue-specific decellularized matrices has rapidly expanded and successful clinical applications have been achieved to regenerate children's airways [6], for cardiac valves replacement [7] and human dermal reconstruction [8].

The esophagus poses unique challenges in the successful creation of a TE graft, as it is multi-layered and has a complex vascular network and innervation [9]; therefore, the transplantation of appropriate cell linings is crucial to achieve the regeneration of all functional compartments [10,11].

At present, several TE esophageal substitutes realized using decellularized ECM have been successfully used in clinical practice as patches to repair small defects [12–14] or to repair mucosal lesions [15,16]. The achievement of full-thickness circumferential grafting is currently substantially limited by inflammation, fibrosis and stricture formation [12–14,17].

Circumferential decellularized-ECM scaffolds have been developed in small animal and porcine models [5,10,18]; however, to the best of our knowledge, no data are available on the development of an ECM scaffold from the decellularization of a human esophagus from cadaveric donors. We hypothesized that a human-derived esophageal scaffold could retain the complex extracellular matrix components, and the capacity to modulate recellularizations, while reducing immunogenicity and thus related inflammation [19–21]. The harvesting of esophageal tissue for future clinical use could be integrated in existing organ donation programs. Based on these considerations, the aim of this work was to test and compare three detergent-enzymatic methods for the decellularization of human esophagus. Specifically, selected protocols were chosen based on previous experience of our research group on the successful decellularization of gastroenteric (i.e., colorectal) [22] and muscular [23,24] tissues. After decellularization, the quality of the resulting acellular matrix was assessed via the immunohistological, biochemical, proteomic and biomechanical characterization of scaffold structure and composition.

2. Materials and Methods

Reagents and consumables were mainly purchased from Merck Life Science (Darmstadt, Germany), unless otherwise specified.

2.1. Collection and Sampling of Human Esophagus

Human esophageal samples were collected from cadavers, provided by Body Donation Program of the Section of Human Anatomy, University of Padova [25–28], according to European, Italian and regional guidelines [29,30]. After esophagus excision from the cervical to the middle thoracic portion, the sample was cleaned from the surrounding tissue debris (i.e., adipose tissue). Esophagus was then dissected to obtain 2.5 cm tubular segments or 2.5×2.5 cm² patches, and specimens were stored at -80 °C until further processing. At the moment of esophagus sampling, the control specimens of native tissue were fixed with 10% formalin or snap-frozen at -80 °C for subsequent analyses.

2.2. Tissue Decellularization

In order to avoid contamination by microorganisms, esophageal samples were manipulated under sterile conditions during all the procedures, and all decellularization solutions were sterile-filtered. Tubular segments and patches were thawed at room temperature (RT) and further cleaned from surrounding tissue debris before performing extensive washes with 3% antibiotic solution in phosphate-buffered saline (PBS), in order to remove any con-

taminants. Progressive washes were then carried out with antibiotic solution in decreasing concentrations, with the last wash in PBS only, to eliminate any residual antibiotic.

Three detergent-enzymatic protocols were tested for human esophagus decellularization, as detailed in Table 1. Esophageal tubules (ETs) decellularized with Protocols Nos. 1 [22], 2 and 3 were named ET1, ET2 and ET3, respectively. Similarly, esophageal patches (EPs) decellularized with Protocols Nos. 1, 2 and 3 were named EP1, EP2 and EP3, respectively. As controls, non-treated samples named ETN (esophageal tubule, native) and EPN (esophageal patch, native) were considered. Protocol No. 1 was repeated for 2 cycles to obtain ET1 and for 3 cycles to obtain EP1.

Table 1. Decellularization methods. Detergent-enzymatic protocols tested on human esophageal tubules and patches. Agitation speed was 100 oscillations/minute.

Protocol No.	1	2	3
Method	dH ₂ O (overnight at 4 °C)	dH ₂ O (24 h at 4 °C)	dH ₂ O (24 h at 4 °C)
	4% SDC (4 h at RT, under agitation)	0.05% Trypsin + 0.02% EDTA in PBS (1 h at 37 °C)	0.05% Trypsin + 0.02% EDTA in PBS (1 h at 37 °C)
Method	2000 kU DNase I in 1 M NaCl (3 h at RT, under agitation)	0.002% SDS + 0.8% NH ₄ OH in PBS (72 h at 4 °C, under agitation)	2% Tergitol™ + 0.8% NH ₄ OH in PBS (72 h at 4 °C, under agitation)
	dH ₂ O (overnight at 4 °C) After the last cycle: PBS 1X + 3% Pen/strep (72 h at 4 °C, under agitation)	dH ₂ O (72 h at 4 °C)	dH ₂ O (72 h at 4 °C)
Method	Peracetic acid 0.1 M (1 h at RT, under agitation)		

Abbreviations: dH₂O, deionized water; DNase I, Deoxyribonuclease I; EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid; NaCl, sodium chloride; NH₄OH, ammonium hydroxide; PBS, phosphate-buffered saline; Pen/strep, penicillin/streptomycin; SDC, sodium deoxycholate; SDS: Sodium dodecyl sulphate.

The experimental procedures for each protocol are briefly described below.

Protocol No. 1: Each detergent-enzymatic treatment (DET) cycle consisted of a first wash in deionized water (dH₂O) at 4 °C for 24 h, followed by sample treatment with 4% sodium deoxycholate (SDC) at RT for 4 h and with 2000 kU DNase-I in 1 M sodium chloride (NaCl) at RT for 3 h. These steps were performed under agitation, at a speed of 100 oscillations/minute. Then, tissues were washed in dH₂O overnight. After decellularization, matrices were rinsed in 3 % penicillin/streptomycin (pen/strep)/PBS for at least 3 days. Finally, samples were sterilized in peracetic acid at 0.1 M for 1 h at RT under agitation and preserved at −80 °C until use.

Protocols Nos. 2, 3: Esophageal samples were washed with dH₂O for 24 h at 4 °C, incubated for 1 h with 0.05% trypsin-0.02% EDTA at 37 °C and then treated with 0.002% SDS (Protocol No. 2) or 2% Tergitol™ (Protocol No. 3) + 0.8% ammonium hydroxide (NH₄OH) for 72 h at 4 °C under continuous agitation (speed: 100 oscillations/minute). Finally, samples were washed with dH₂O for 72 h and preserved at −80 °C until use.

After the detergent-enzymatic treatments, the appearances of the decellularized and native esophagi were compared by assessing tubule/patch weight, whereas tissue integrity was evaluated by measuring the main dimensions of samples; the length, as the largest horizontal dimension, and the width of esophageal specimens were calculated using macroscopic images elaborated with Fiji software (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.3. DNA Isolation and Quantification

To assess total DNA content in the native samples compared with decellularized matrices, 20 mg of each specimen was treated using a DNeasyBlood&Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA samples were then quantified using Nanodrop 2000 at the 260/280 nm ratio (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.4. Histological Investigations

After the decellularization process, treated samples were fixed with 10% formalin, paraffin-embedded, cut into 5 μm thick sections and investigated using histological analyses according to routine protocols in order to verify the effective removal of cell nuclei and the maintenance of ECM structure and composition in comparison with native cellular tissue. Before staining, sections were de-waxed and rehydrated with a series of ethanol (Arco Scientifica S.r.l., Padua, Italy) solutions (99%, 95%, 70%) and distilled water. Subsequently, hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed to verify the effective removal of cell nuclei and muscle fibers, and Weigert Van Gieson staining was carried out to demonstrate the persistence of elastic fibers, while Masson's trichrome staining detected preserved collagen, confirming the absence of muscle fibers.

2.5. Immunohistochemical Study

The immunolocalization of Collagen IV and Laminin within the decellularized samples was performed to assess the adequate preservation of tissue-specific ECM proteins in comparison with the native control. At the same time, the non-immunogenicity of the acellular scaffolds was verified via the investigation of MHC class II (HLA-DR) antigens. Immunohistochemical reactions were carried out using Dako Autostainer/Autostainer Plus (Dako, Milan, Italy) with the following antibodies diluted in PBS: anti-Collagen IV (monoclonal mouse anti-COL4A3; sc-52317; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) (1:100); anti-Laminin (polyclonal rabbit anti-LAM; L9393; Merck Life Science) (1:200); and anti-HLA-DR (monoclonal mouse anti-HLA-DR antigens; M0746; Dako) (1:50). Except for Laminin, epitope retrieval was performed with 10 mM sodium citrate buffer, pH 6.0 (for HLA-DR) or pH 9.0 (for Collagen IV), at 90 °C for 10 min (min). Sections were then incubated with peroxidase-blocking serum (EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent; Dako) for 5 min in order to avoid unspecific binding before incubation for 1 h at RT with the above primary antibodies. The specific binding of the primary antibodies was revealed by means of incubation with the secondary antibodies (EnVision FLEX Mouse-Linker and EnVision FLEX Rabbit-Linker; Dako) for 15 min and EnVision FLEX/HRP polymer for 20 min. Subsequently, 3,3'-diaminobenzidine (EnVision FLEX Substrate Buffer + DAB + Chromogen; Dako) was used in order to highlight the positivity of the reaction. Finally, the sections were counterstained with hematoxylin. Native diaphragmatic samples were used as reference for marker expression, whereas negative controls were prepared by incubating sections without primary antibodies.

2.6. ECM Component Quantification

Sulphated glycosaminoglycan (GAG) content into native and decellularized esophageal tissues (10 mg) were quantified by using Chondrex Inc. Glycosaminoglycans Assay Kit (DBA Italia S.r.l, Milan, Italy) according to the manufacturer's instructions. In parallel, to quantify the collagen component in native and decellularized tissues (5 mg), a Hydroxyproline assay kit was used following the manufacturer's instructions.

2.7. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Samples were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate; following washing with deionized water, they were cut into segments of approximately 1 cm in length, cryoprotected in 25% sucrose and 10% glycerol in 0.05 MPBS (pH 7.4) for 2 h and then fast frozen. At the time of analysis, samples were placed back into the cryoprotectant at RT and allowed to thaw. After washing, the material was fixed in 1% OsO₄/0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) and washed again. After rinsing with deionized water, specimens were dehydrated in a graded ethanol-water series to 100% ethanol, critical-point-dried using CO₂ and finally mounted on aluminum stubs using sticky carbon taps. Samples were mounted and coated with a thin layer of Au/Pd (approximately 2 nm thick) using a Gatan ion beam coater. Images were recorded with a Jeol 7401 FEG scanning electron microscope (Akishima, Tokyo, Japan).

2.8. Second-Harmonic Generation Microscopy

Second-Harmonic Generation (SHG) imaging was performed on decellularized esophageal tubules and patches in comparison with the native tissues using a custom developed multiphoton microscope, previously described by Filippi et al. [31]. In brief, an incident wavelength of 800 nm was adopted to detect the collagen's SHG signal at 400 nm and the AutoF signal at 525 nm on two different photodetectors (GaAsP PMT with a 395/25 nm bandpass filter and GaAsP PMT with a 525/40 nm bandpass filter, respectively). The images were acquired at a fixed magnification through the Olympus 25× water immersion objective with 1.05 numerical aperture (1024 × 1024 pixels), averaged over 70 consecutive frames, with a pixel dwell time of 0.14 μs and a pixel width of 0.8 μm. For quantitative measurements, the RAW uncompressed images were analyzed using Image-J software, version 1.8.0. Coherency (C) was calculated for collagen and elastin to verify the local dominant orientation of the images using OrientationJ, an ImageJ plugin [32]. The parameter is bounded between 0 and 1, indicating the absence (isotropy) and the presence (anisotropy) of dominant orientation, respectively. A graphic representation of coherency that shows the organization and distribution of the fibers is given via Fast Fourier Transform (FFT) analysis. The transform-based texture analysis techniques convert the image into a new form using the spatial frequency properties of the pixel intensity variations, allowing one to extract textural characteristics from the image. Indeed, highly oriented fiber in a single direction shows an elliptic shape; differently, a circular shape represents fiber spread in all directions [33,34].

2.9. Mass Spectrometry Analysis

2.9.1. Sample Preparation

Decellularized esophageal matrices (range of 2–5 mg) were digested following the protocol proposed by Naba et al. [35]. Briefly, samples were reduced, alkylated, deglycosylated (PNGaseF; 500,000 U/mL; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and digested with Lys-C (0.1 μg/μL; New England Biolabs) and Trypsin (0.5–0.1 μg/μL; Sequencing Grade Modified Trypsin, PROMEGA Italia Srl, Milan, Italy) enzymes. After digestion, samples were purified with SPE (SupelTM-Select HLB SPE tubes, Supelco – Merck LifeScience). Eluted peptides were finally dried under vacuum and stored at −20 °C until analysis.

2.9.2. Protein Identification

Samples were resuspended in different volumes of 5% CH₃CN + 0.01% formic acid solution to obtain equal column loading and were analyzed using a UHPLC-XEVO-G2-XS (Waters, Milford, MA, USA) mass spectrometer. Peptides were separated with a Biobasic (Milan, Italy) C18 column, 150 mm × 1 mm ID, 5 μm, using a 3–45% linear gradient of CH₃CN + 0.1% TFA (mobile phase B) in H₂O + 0.1% TFA (mobile phase A) over 110 min. Mass spec data were acquired in data-dependent mode in the 350–2000 m/z mass range. The instrumental parameters were set as follows: source, ESI (+); precursor charge selection, from 2 to 4; resolution, 22,000 FWHM.

2.9.3. Data Processing

Mass spec data were lock-mass corrected, peak picked, converted into mzML format using Trans Proteomic Pipeline (TPP) and processed with Proteome Discoverer 2.2 (ThermoFisher Scientific). The search parameters were set as follows: database, UP000005640 UniProt reference proteome: enzyme, Trypsin (max 2 missed cleavages); taxonomy, *homo sapiens*; precursor mass tolerance, 25 ppm, fragment mass tolerance, 0.08 Da. Fixed modifications: carbamidomethyl (C). Dynamic modifications: oxidation (M, P, K); deamidation (N, Q), and phosphorylation (S, T, Y). A minimum of 2 non-redundant peptides were used for protein identification.

2.10. Mechanical Properties

The mechanical properties of native and decellularized esophageal samples were evaluated with a uniaxial tensile test. Due to limited material availability, tests were performed on native and decellularized human esophagus patches, not on tubules. Esophageal patches were cut into dog-bone-shaped specimens with a gauge length of 5 mm and a 2 mm width, according to the ASTM D1708-13 standard concerning small-size tissues [36]. This allowed us to analyze sample response to the tensile force applied in both the longitudinal (along the main axis) and circumferential (perpendicular to the main axis) directions. Native and decellularized esophagi underwent uniaxial tensile loading tests using a custom-made apparatus (IRS, Padova, Italy) equipped with four linear actuators and four loading cells (50 N). Uniaxial tests were performed using two actuators and two cells at RT and by continuously hydrating samples with 0.9% sodium chloride (NaCl) solution. Samples were first preloaded up to 0.1 N and then elongated (elongation rate of 0.2 mm/s) up to 300% of the initial length, in order to reach tissue rupture for measuring the Ultimate Tensile Strength (UTS) and the Failure Strain (FS). Stress–strain curves were obtained for each specimen, where (a) engineering stress σ (MPa) was defined as the tensile force measured by the loading cells (Newton) divided by the original cross-sectional area of the sample, and (b) strain ε (%) was defined as the ratio between the grip displacement and the gauge length. Elastic modules E_1 and E_2 were calculated as the slope of the stress–strain curves between 1 and 10% of deformation and between 80 and 90% of deformation, respectively. Finally, the toughness (I) was defined as the energy required (per unit of volume) to bring the material to failure.

2.11. Cytotoxicity Study

2.11.1. HM1SV40 Cell Cultures

The immortalized human bone marrow cell line HM1-SV40 [37] was cultured in proliferation medium containing Alfa-Modified Eagle Medium (α -MEM) Without Nucleosides (ThermoFisher Scientific), 16.5% fetal bovine serum (FBS) (ThermoFisher Scientific), 1% glutamine and 1% penicillin/streptomycin solution (100 mg/mL). Cells were kept at 37 °C, 5% CO₂ and 95% humidity for 3–4 days for in vitro expansion; then, they were seeded at a density of 10,000 cells/cm² into 24-well plates and let adhere for 24 h before performing the cytotoxicity test.

2.11.2. Preparation of Conditioned Culture Media

The release of any leachable remnants by esophageal matrices after the decellularization treatments was verified with the cytotoxicity extract test [24,38]. For Protocols n. Nos. 2 and 3, which did not include a final sterilization step, decellularized esophagi were sterilized with 2% antibiotic/antimycotic solution in PBS for 72 h at RT under agitation (100 oscillations/minute) and subsequent extensive washing in PBS for another 72 h.

Esophageal tissues decellularized through Protocol No. 1, No. 2 and No. 3 were then incubated in HM1-SV40 cell proliferation medium (100 milligrams of tissue per milliliter) for 72 h at 37 °C, 5% CO₂ and 95% humidity. Conditioned media were then used to culture HM1-SV40 cells seeded on 24-well plates as previously described.

2.11.3. Cell Viability Assay

The cytocompatibility of acellular esophageal matrices was assessed by treating HM1-SV40 cells with conditioned media for 72 h. In parallel, untreated cultures and cells incubated under cytotoxic conditions (50% Dimethyl sulfoxide, DMSO) were considered as negative and positive controls, respectively. At the end of the 72 h incubation period, cell viability, proliferation and cytotoxicity under different culture conditions were assessed using the MTT assay, which measures cellular metabolic activity. In brief, cells were incubated for 4 h in basal medium (α -MEM) supplemented with 0.5 mg/mL (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). After that, the incubation buffer was removed, and the violet MTT-formazan product was extracted with acidified

isopropyl alcohol (0.04 M HCl in isopropyl alcohol) (Carlo Erba, Milan, Italy). After 15 min of extraction at RT under gentle stirring, the optical density of the formazan solutions was read at 570 nm by analyzing samples with a VICTOR3™ Microplate auto reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Results were expressed as percentage of cell viability in treated samples versus the untreated negative control (100% viability).

2.12. Statistical Analysis

All graphs and statistical analysis were performed using GraphPad Prism Software 7. Data were expressed as means \pm SEMs. For the comparison of paired experimental groups, two-sided Student's *t*-tests (for the parametric dataset) and Mann–Whitney test (for the non-parametric dataset) were used. One-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test (for the parametric dataset) and Kruskal–Wallis test with Dunn's post hoc test (for the non-parametric dataset) were performed for multiple comparisons. A *p*-value < 0.05 was considered statistically significant (* *p* < 0.05 , ** *p* < 0.01 , *** *p* < 0.001 , **** *p* < 0.0001).

3. Results

3.1. Decellularization of Human Esophagus

After decellularization, all the esophageal samples seemed to preserve a certain volume and integrity in comparison with the native tissues (Table 2). No tissue ruptures or damage were observed following the detergent-enzymatic treatments. The esophageal tubules remained patent and retained the overall shape of the native esophagus.

Table 2. Quantitative measures of sample appearances. Weight, external diameter and length of esophageal tubules (ETs) and patches (EPs) before (ETN, EPN) and after decellularization with Protocols Nos. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) and 3 (ET3, EP3).

Sample	Weight (g)	Width (cm)	Length (cm)
ETN	4.27 \pm 0.12	1.8 \pm 0.01	2.1 \pm 0.14
ET1	4.73 \pm 0.24	2.4 \pm 0.05	2.1 \pm 0.05
ET2	4.81 \pm 0.11	1.9 \pm 0.01	2.4 \pm 0.14
ET3	4.95 \pm 0.09	2.0 \pm 0.03	2.0 \pm 0.07
EPN	2.06 \pm 0.09	2.0 \pm 0.04	2.4 \pm 0.06
EP1	2.45 \pm 0.52	1.9 \pm 0.01	2.9 \pm 0.02
EP2	2.53 \pm 0.34	2.1 \pm 0.12	4.5 \pm 0.10
EP3	2.69 \pm 0.20	2.3 \pm 0.12	4.1 \pm 0.23

According to preliminary macroscopic evaluation, the treated tubules and patches turned translucent and white in comparison with the native specimens, likely due to the loss of the cellular and myofibrillar components (Figure 1A,B). In particular, samples ET1 and EP1 appeared to retain a more pinkish color of the muscle layer, suggesting some persistence of myofibrils. On the other hand, samples ET2, ET3, EP2 and EP3 showed a white color in both mucosal and muscular layers. As expected, the tissue consistency of both tubular samples and patches seemed to decrease after decellularization in comparison with the native control; however, all samples maintained good manipulability, except for ET3 and EP3, which tended to collapse during handling.

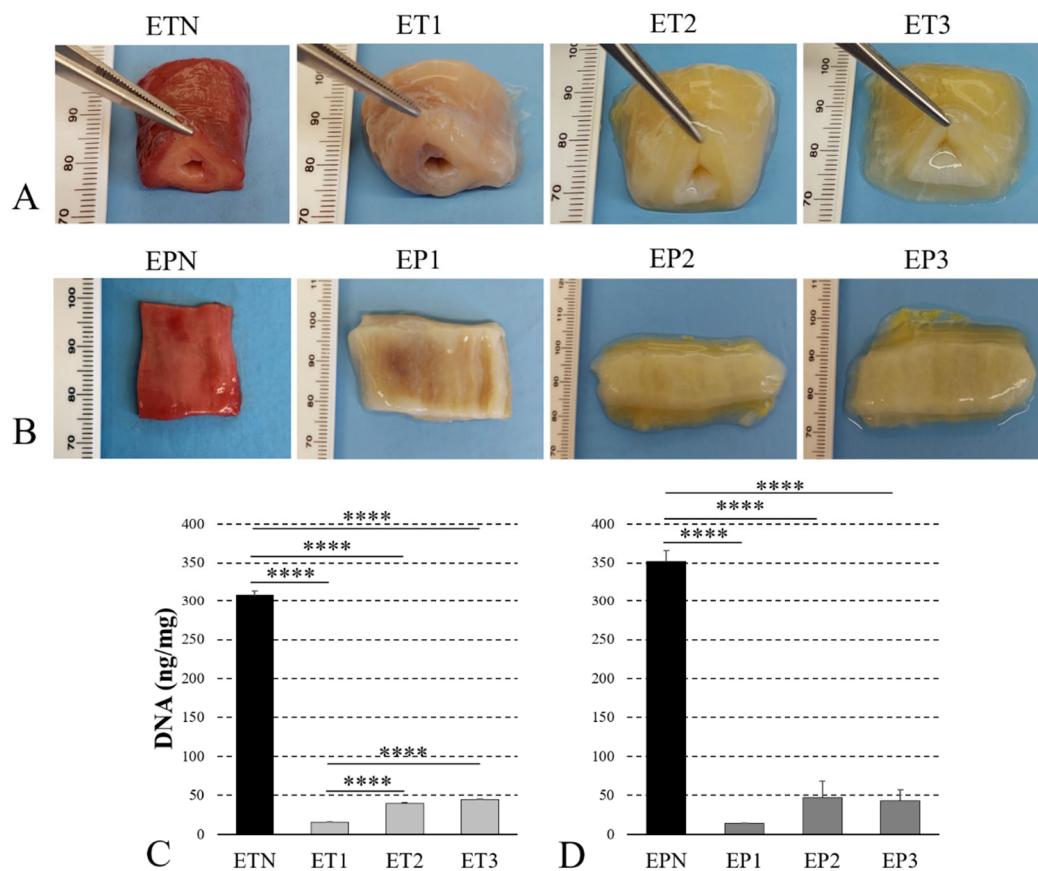


Figure 1. Decellularization efficacy. Gross appearance (**A,B**) of esophageal tubules (ETs) and patches (EPs) before (ETN, EPN) and after decellularization with Protocols Nos. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) and 3 (ET3, EP3). Quantification of residual DNA (**C,D**) into decellularized versus native samples (**** $p < 0.0001$).

The quantification of residual immunogenic material showed a significant decrease in the DNA content into all the decellularized scaffolds in comparison with the native counterparts, getting under the threshold of 50 ng/mg of tissue previously indicated to consider efficient sample decellularization [39] (Figure 1C,D). In both tubules and patches, Protocol No. 1 led to a significantly lower level of residual DNA in comparison with Protocols Nos. 2 and 3.

3.2. Histological Evaluation

The efficient removal of cells and the maintenance of the native structure was assessed using H&E staining, which showed the absence of violet nuclear content in all decellularized esophageal samples, as well as the preservation of the pink eosinophilic staining typical of collagen in acellular scaffolds. Muscle fibers were correctly removed via all protocols, although ET1 and EP1 samples showed a certain persistence of myofibrils within some areas of the tissue slices (Figure 2A,D).

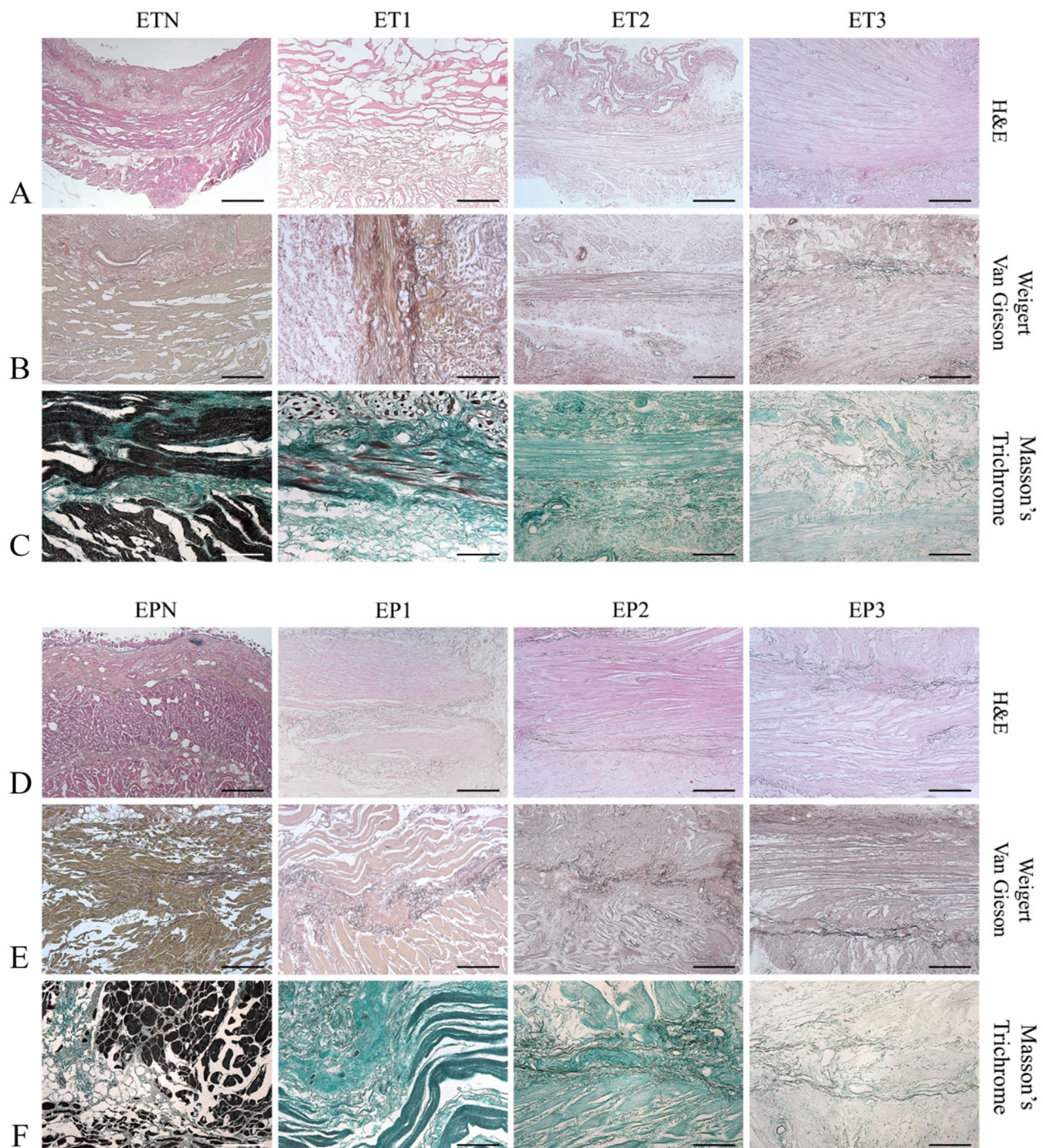


Figure 2. Microscopic structure of decellularized esophagi. Histological evaluation of esophageal tubules (ETs) and patches (EPs) before (ETN, EPN) and after decellularization with Protocols Nos. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) and 3 (ET3, EP3). Scale bars: 800 μm ((A,D) ETN, EPN); 400 μm (A,B,D,E); 200 μm (C,F).

Overall, the general architecture was maintained after decellularization, and the different layers of the esophageal matrix could be distinguished. Weigert van Gieson staining highlighted the persistence of black-colored elastic fibers in the lamina propria, between the muscularis mucosa and the muscularis externa, and within the wall of the blood vessels (Figure 2B,E). Masson's Trichrome staining revealed the maintenance of green-colored collagen fibers in the acellular esophageal ECM, with a much weaker color observed for samples ET3 and EP3 (Figure 2C,F).

3.3. Immunohistochemical Study

Besides histological evaluation, immunohistochemistry confirmed the retention of different ECM-specific markers in decellularized tissue scaffolds (Figure 3). The expression of laminin was detected in the submucosa and lamina propria, as well as in the blood-vessel wall (Figure 3B,E).

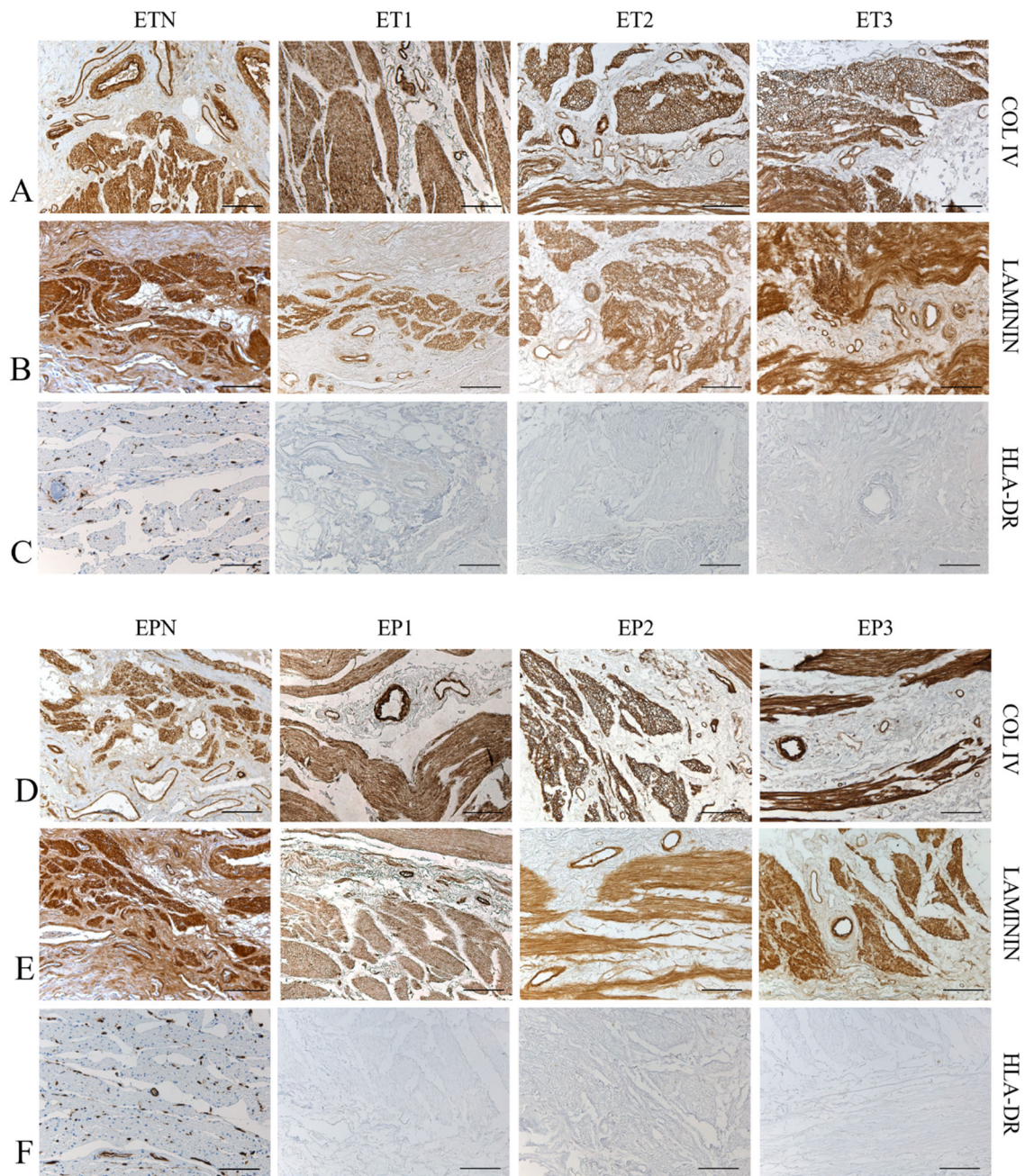


Figure 3. Preservation of tissue-specific markers. Immunohistochemistry for the localization of specific ECM markers and MHC II antigens within esophageal tubules (ETs) and patches (EPs) before (ETN, EPN) and after decellularization with Protocols Nos. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) and 3 (ET3, EP3). Scale bar: 100 μ m (A–F).

Additionally, Collagen type IV was mainly localized in the muscular layers, surrounding muscle fibers, and around the blood vessels (Figure 3A,D). Interestingly, Major histocompatibility complex (MHC) II cell surface receptor (HLA-DR) was detected only in

the native samples, ETN and EPN, as it was no longer expressed after decellularization, thus proving the low immunogenicity of the esophageal grafts (Figure 3C,F).

3.4. Quantitative Analysis of ECM Components

Starting from both native and decellularized specimens, the amount of GAGs and hydroxyproline was estimated via a biochemical assay to verify the preservation of these ECM components after detergent-enzymatic treatments (Figure 4).

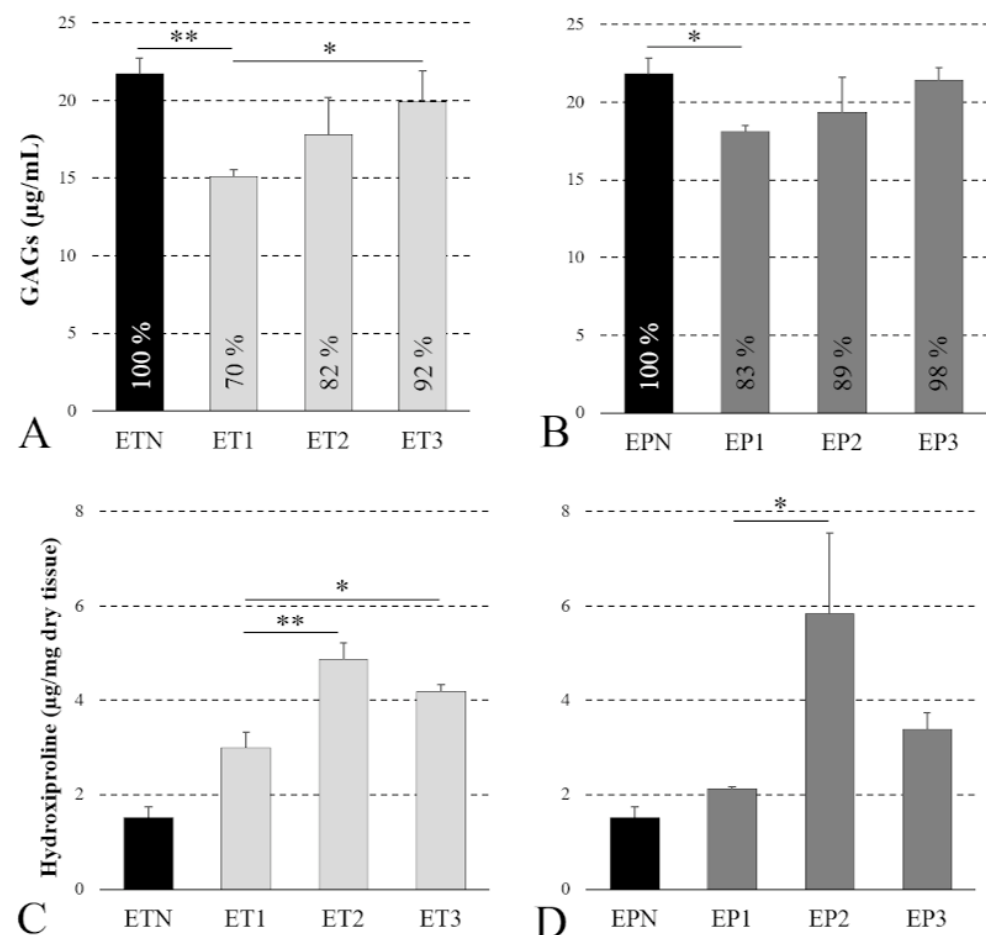


Figure 4. GAG and collagen preservation. Quantification of residual GAGs (A,B) and hydroxyproline (C,D) into esophageal tubules (ETs) and patches (EPs) before (ETN, EPN) and after decellularization with Protocols Nos. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) and 3 (ET3, EP3) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Some differences among protocols were detected with these analyses, being GAGs significantly decreased in samples ET1 and EP1 compared with the native tissues, whereas they were found to be well preserved in scaffolds ET2, ET3, EP2 and EP3 (i.e., no significant differences compared with native samples) (Figure 4A,B). However, no massive depletion of GAGs was caused by Protocol No. 1, with samples ET1 and EP1 still retaining more than the 70–80% of native GAG content. Similarly, a better preservation of hydroxyproline was achieved with Protocols Nos. 2 and 3, rather than Protocol No.1. In particular, a significantly higher hydroxyproline amount was found in esophageal tubules ET2 and ET3 versus ET1 and in esophageal patches EP2 versus EP1 (Figure 4C,D).

3.5. Characterization of the ECM Collagen Component

Collagens were among the most abundant and well-characterized components of the decellularized esophageal scaffolds. The SEM analysis confirmed ultrastructure maintenance after the decellularization of both tubules (Figures 5A and S2A) and patches

(Figures 5E and S2B) in comparison with native samples. Cellular elements were detected in native esophagi (white arrows in Figures 5A,E and S2) but not in decellularized matrices, with sample ET2 presenting crimped collagen fibers.

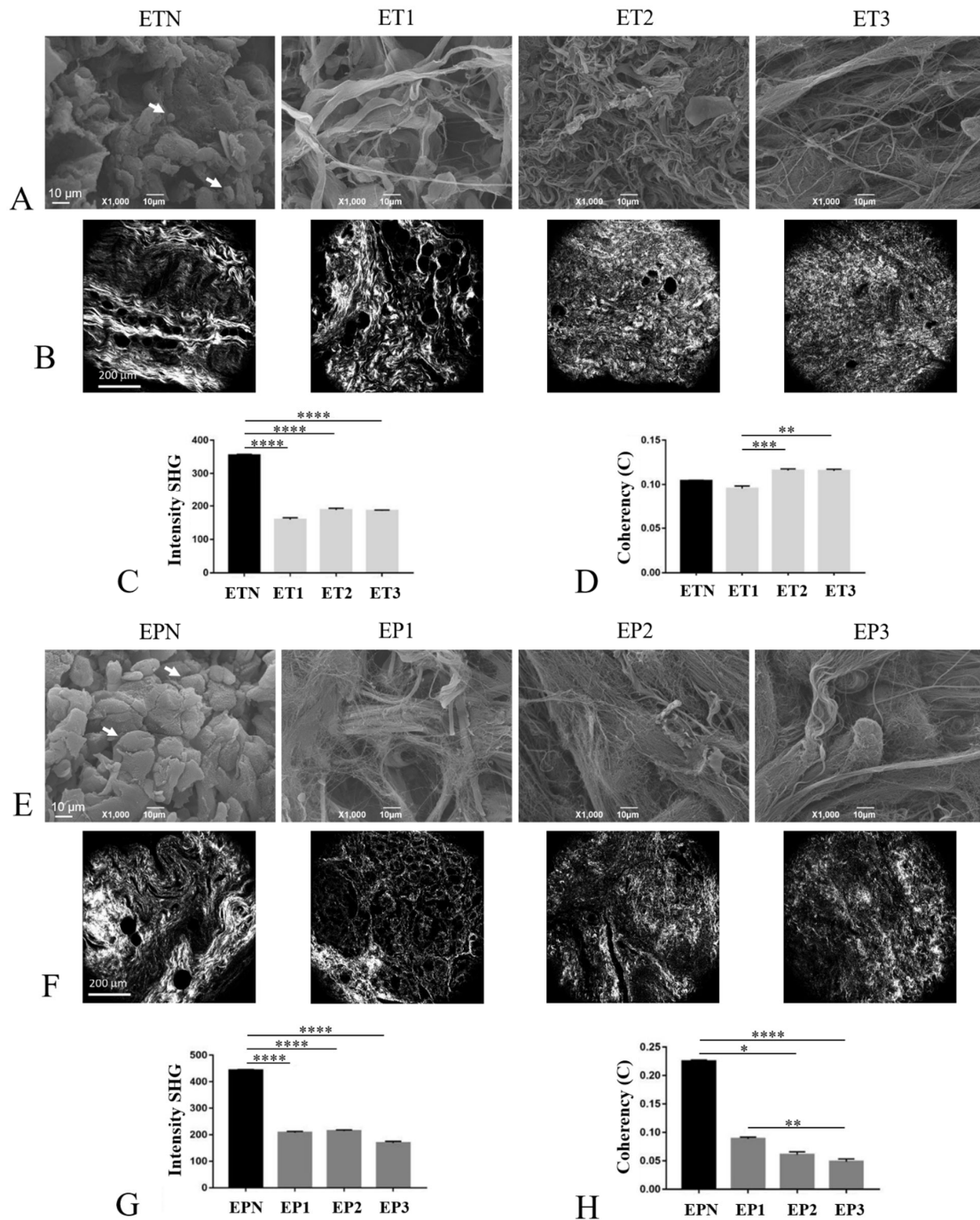


Figure 5. Characterization of collagen component. Collagen investigation in esophageal tubules (A–D) and patches (E–H) before (ETN, EPN) and after decellularization with Protocols Nos. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) and 3 (ET3, EP3). The collagen ultrastructure was analyzed using SEM, and the white arrows show the cells within the ETN and EPN scaffolds (A,E). SHG microscopy allowed us to localize specific collagen signals (B,F), measure signal intensity (C,G) and calculate coherency values for fiber orientation (D,H). Scale bars: 10 μm (A,E); 200 μm (B,F) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

The investigation using SHG microscopy allowed us to characterize the composition of Collagen I and II, which give very strong signals [40] in both ET (Figure 5B) and EP (Figure 5F) samples versus the native tissues. The semi-quantitative analysis of collagen expression was coupled to the analysis of fiber spatial orientation, which is a crucial factor for the determination of the mechanical properties of a tissue. Specifically, the intensity of SHG is associated with the presence or absence of Collagen I and II, while the coherency parameter (C) permits to estimate the local orientation of the collagen fibers. The analysis demonstrated a significant decrease in SHG intensity in decellularized ET and EP samples compared with ETN and EPN, respectively ($p < 0.0001$) (Figure 5C,G). Furthermore, in esophageal tubules, collagen fibers showed to be orientated in every direction, with low values of C. No significant differences were detected between decellularized and native tubular samples, with both being characterized by an isotropic behavior (spherical shape for FFT; Figure 5D and Supplementary Figure S1A). Among decellularized ETs, the coherency values were similar for ET2 and ET3 samples, whereas a significant decrease in C parameters was detected for ET1 compared with ET2 ($p < 0.001$) and ET3 ($p < 0.01$). Considering esophageal patches, in EPN samples, collagen fibers tended to be predominately orientated in one direction, with an anisotropic behavior (ellipsoidal shape for FFT; Figures 5H and S1B), while the decellularized samples were characterized by fibers orientated in every direction, with an isotropic behavior (spherical shape for FFT; Figure S1B). A statistically significant decrease in C values was detected in EP3 compared with EP1 ($p < 0.01$).

3.6. Proteomic Analysis of Decellularized Tissue Secretome

The preservation of tissue-specific proteins after decellularization was evaluated using mass spectrometry analysis. A total of 218 proteins were obtained after LC-MS/MS data processing, which were chosen and stratified in five main categories: collagens, proteoglycans, glycoproteins, cytoskeletal proteins and regulators. The total proteins detected within decellularized tubules and patches are presented in Figure 6, with the indication of positive (green) and negative (red) expression. This classification was chosen in order to highlight the impacts of the different decellularization protocols on ECM components having different solubility (collagens, proteoglycans and glycoproteins), on secreted proteins (regulators) and on possible contaminants (cytoskeletal proteins). The absolute value of proteins for each decellularized sample was calculated. Collagens resulted to be the most abundant proteins and included fibril-forming collagens (*COL1*, *COL2*, *COL3*, *COL5*, *COL11* and *COL15*), basal lamina collagens (*COL4*), cell–matrix bridging collagens (*COL6*) and non-fibrillar collagens (*COL8*). All detected collagens had similar distribution in all decellularized samples. The second class of main detected proteins was cytoskeletal proteins (*ACTG2*, *ACTA1*, *ACTA2*, *ACTB*, *ACTN1*, *ACTN2*, *CNN1*, *DES*, *DSTN*, *EPPK1*, *FLNA2*, *FLNC*, *KRT1*, *KRT4*, *KRT10*, *KRT13*, *LMOD1*, *MYH2*, *MYH7*, *MYH9*, *MYH11*, *NEB*, *PALLD*, *PFN1*, *PLEK*, *SEPT2*, *SMTN*, *TLN1*, *TNS1*, *TTN*, *TUBA1A*, *TUBA4A*, *TUBB*, *TUBB3*, *TUBB4A*, *TUBB6* and *VIM*), which were similarly maintained in ET1, ET3, EP2 and EP3. In parallel, ET2 and EP1 samples showed to retain, respectively, the lowest ($n = 4$) and the highest ($n = 37$) numbers of cytoskeletal proteins after decellularization treatment. Similar to collagens, all the decellularization protocols seemed to comparably preserve proteoglycans (*BGN*, *DCN*, *DMD*, *OGN*, *PRLEP* and *VTN*). Regarding glycoprotein (*DPT*, *ELN*, *FBLN1*, *FBLN2*, *FBN1*, *ITGB1*, *LAMA1*, *LAMA2*, *LAMA5*, *LUM*, *MFPA4*, *MFPA5*, *NID1*, *NID2* and *VCL*) stratification, higher numbers were observed in EP1, ET3 and EP3 samples compared with ET1, ET2 and EP2 scaffolds. Lastly, after decellularization, regulators (*ANXA2*, *ANXA3*, *ANXA5*, *ANXA6* and *LGALS1*) were found to be still retained in EP1 and EP2 samples, while they were not detected in the remaining acellular scaffolds.

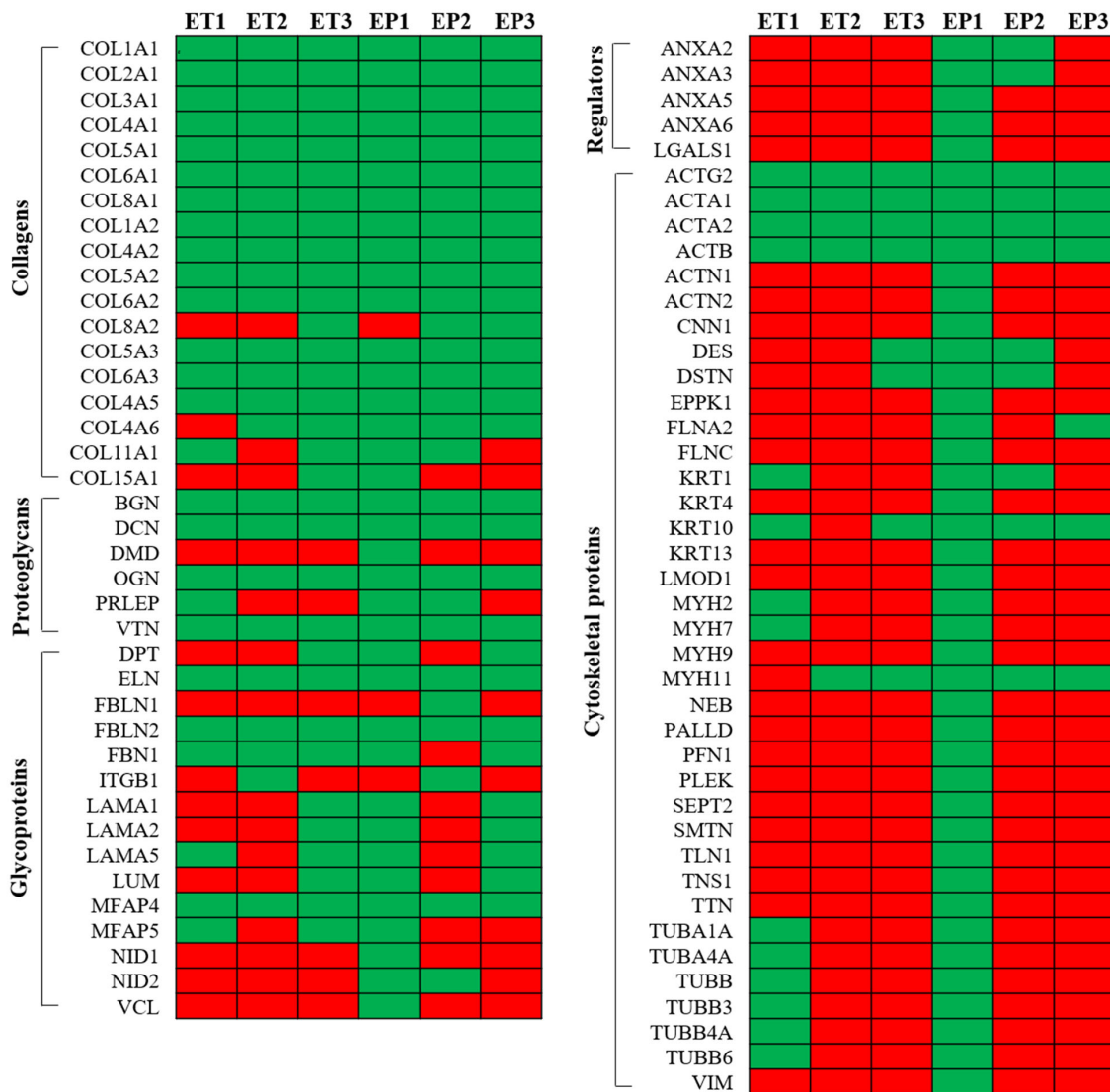


Figure 6. Proteomic study. Overview of the main detected proteins in esophageal tubules (ETs) and patches (EPs) decellularized with Protocols Nos. 1 (ET1, EP1), 2 (ET2, EP2) and 3 (ET3, EP3). (Green: positive protein expression; red: negative protein expression).

3.7. Mechanical Behavior

The gross appearance of esophageal samples during the mechanical test is shown in Figure 7A. After measuring the FS, which represents the maximum elongation of the sample, no differences were found between native and decellularized tissues for neither the longitudinal nor circumferential direction (Figure 7B). Regarding the maximum resistance of the sample before rupture (UTS), a significant decrease was registered in decellularized esophagi compared with the native tissues both in the longitudinal and circumferential directions of analysis (Figure 7C). Furthermore, a significant UTS reduction was observed for EP2 as compared with EP1 tested along the circumferential direction (Figure 7C). Tissue toughness (I) resulted to be significantly affected by all the three decellularization methods in samples elongated in the longitudinal direction (Figure 7D). Conversely, in the experimental group that was circumferentially elongated, a significant toughness reduction was observed for the EP2 and EP3 samples in comparison with EPN (Figure 7D). Finally, a clear reduction in Young’s modules E_1 and E_2 was also registered after decellularization with all the three methods (Figure 7E,F), although no significant differences were calculated

between the EP1 or EP2 sample and the native tissue when samples were elongated in the longitudinal direction.

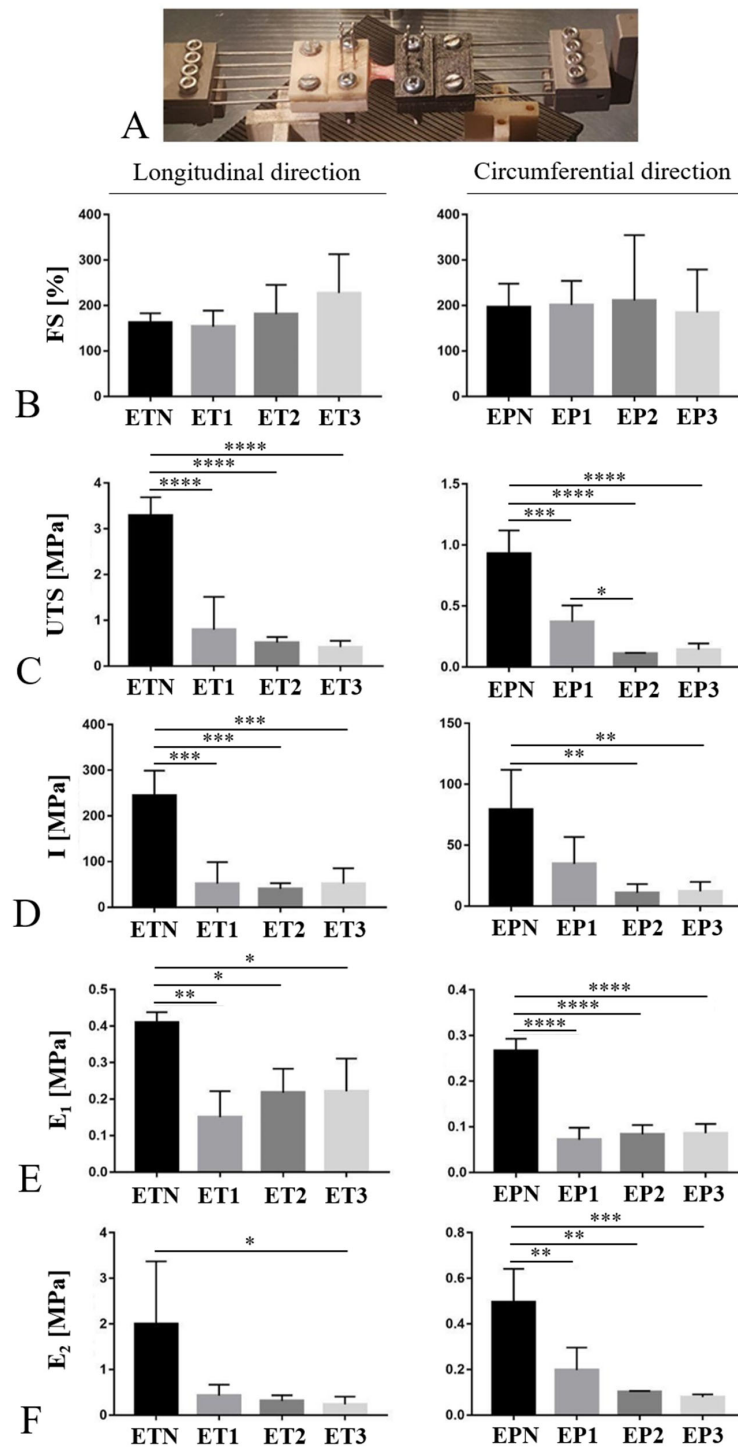


Figure 7. Biomechanics of decellularized esophagi. Mechanical properties of esophageal patches before (EPN) and after decellularization with Protocols Nos. 1 (EP1), 2 (EP2) and 3 (EP3). The tensile force was applied using a custom-made apparatus (A) along both longitudinal and circumferential directions to measure Failure Strain (FS) (B), Ultimate Tensile Strength (UTS) (C) and toughness (I) (D). Young’s modules E₁ (E) and E₂ (F) were also calculated as the slope of the stress–strain curves at a deformation of 1–10% and 80–90%, respectively (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3.8. Cytotoxicity Study

After the 72 h exposure period to culture media conditioned with decellularized esophageal samples, HM1-SV40 cells appeared to be viable and proliferating, reaching about 90% confluence on the growth surface. The MTT assay revealed that, compared with untreated cultures, cells preserved 93.7%, 95.4% and 78.3% viability when treated with medium conditioned with esophageal matrices decellularized through Protocols No. 1, No. 2 and No. 3, respectively (Figure 8). Significant differences were detected between the cytotoxic control and all other samples ($p < 0.0001$), confirming that cell cultures responded appropriately in comparison with the positive control. A significant decrease in cell viability ($p < 0.05$) was found to be caused by medium conditioned with esophageal tissues treated with Tergitol™ with respect to the untreated control. However, more than 70% cell viability was still preserved, in line with the set threshold value which defines a non-toxic device [41] (Figure 8).

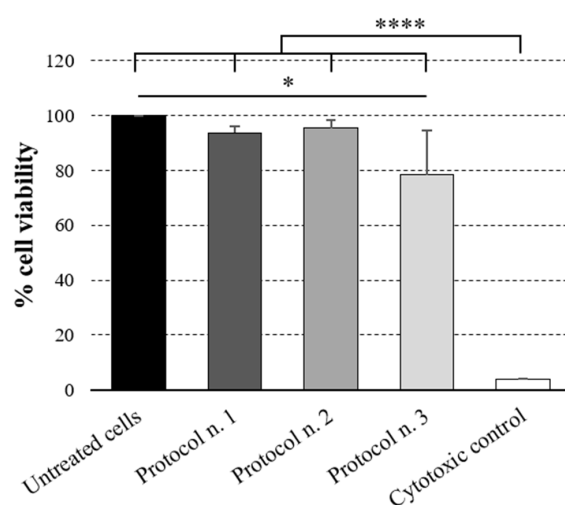


Figure 8. Cytocompatibility study. Cytotoxicity test on HM1-SV40 cell line incubated for 72 h with culture media conditioned with esophageal matrices decellularized through Protocols Nos. 1, 2 and 3. For each experimental group, the percentage of cell viability after the incubation period was defined in comparison with the untreated cell cultures (100% viability) (* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$).

4. Discussion

Acellular scaffolds prepared via decellularization methods are a promising tool in TE to drive the development of off-the-shelf tissue replacements for future-generation therapies of organ repair/reconstruction. These scaffolds are based on the preservation of tissue ECM, which offers the advantage of faithfully recreating the three-dimensional macro- and microarchitecture of the target organ [42–44], also guiding cell adhesion, migration, proliferation and organization in vivo [1].

The functional reconstruction of a defective esophagus still represents a challenge for modern gastroenterological surgery, with TE being a promising approach to face currently unmet clinical needs. Specifically, biological scaffolds based on acellular matrices seem to be the most suitable option to obtain biocompatible tissue substitutes for full-thickness esophageal repair [17]. Esophageal acellular matrices have been obtained by means of different processing methodologies and from a diversity of species, including rat [5,45–51], rabbit [52–54], sheep [55], goat [56] and pig [10,18,57–66]. To the best of the authors' knowledge, human esophagus has not been investigated so far to prepare decellularized biocompatible matrices for esophageal reconstruction. This represents a significant research gap when considering that human acellular matrix grafts—derived from the same species of the recipient patient—may ensure better biocompatibility, biomolecular composition, biomechanical properties and bio-integration abilities than their animal counterparts, also minimizing risks of infection [24,44]. Based on that, the present work compared

three different protocols for human esophagus decellularization and performed a detailed characterization of the resulting acellular matrices. We decided to work with esophageal scaffolds with two different gross morphologies, i.e., patches and tubular segments, in order to produce implantable devices that can serve, respectively, for the repair of wall defects or for the circumferential replacement of esophageal tracts. Esophageal samples were harvested from donated bodies who were normally frozen to prevent cadaver tissue deterioration (i.e., morphological alterations and damage due to drying, autolysis and putrefaction). The freezing/thawing of tissues is considered a physical decellularization method, which results in cell lysis without significantly disrupting the ultrastructure of the original specimen [39]. Thus, using frozen esophageal samples is known to help with the process of cell/nuclear DNA removal. In this work, the decellularization methods consisted of detergent-enzymatic treatments based on the use of different detergents, namely, sodium deoxycholate (SDC) (Protocol No. 1), sodium dodecyl sulphate (SDS) (Protocol No. 2) and Tergitol™ (Protocol No. 3). Regarding enzymes, DNase I was used in Protocol No. 1 to completely remove nuclear genetic material after cell lysis [39], whereas Protocols No. 2 and No. 3 took advantage of trypsin, which digests membrane proteins, leading to cell death, and—in combination with EDTA—also contributes to breaking the cell adhesion to the matrix [67]. Given its specific proteolytic activity, trypsin was applied by reducing the processing time and together with a chelating agent, so that undesired degradation effects on ECM components (i.e., collagen, elastin, GAGs) were prevented [68]. Regarding enzymes for decellularization, being nucleases very expensive reagents, the possibility to effectively produce acellular esophageal matrices without using them may represent an important advantage in terms of procedure costs.

SDC- and DNase-based protocols have already been reported to be effective for the decellularization of rat [5], rabbit [53] and pig [10] esophagi, whereas a trypsin-based method including Triton X-100 detergent has allowed skeletal muscle acellular matrix to be successfully produced [23]. However, since Triton X-100 cannot be used for the preparation of implantable materials anymore due to cytotoxicity concerns, two alternative detergents were tested as possible substitutes. Esophagus decellularization aimed to eliminate all cellular and nuclear antigens while minimizing any adverse effects on the structural composition, organization and integrity of the remaining ECM. The efficacy of all the tested protocols was substantiated via H&E, showing no visible nuclear material in none of the decellularized samples. In parallel, the DNA quantification analysis proved that SDC and DNase I more successfully removed immunogenic nucleic acids, although the other two methods also showed to lower the DNA content below the maximum limit for decellularized scaffolds. The non-immunogenicity of esophageal tubules and patches after decellularization was also corroborated by the immunolocalization of HLA-DR, which is a major histocompatibility complex (MHC) II cell surface receptor associated with poor graft integration and rejection events [69]. Differently from native esophagus, which showed positive conservation, acellular grafts completely lost this antigen, suggesting high biocompatibility rates in case of *in vivo* implant. The validation of decellularization protocols implies the need to prove that the native-tissue microarchitecture has been preserved. Indeed, eliminating cellular/nuclear antigens and preserving ECM composition is a fine balance, which needs to be considered for the development of biocompatible scaffolds with ideal biomolecular and mechanical cues. Herein, a good maintenance of elastic and collagen fibers in all decellularized esophagi was demonstrated via histological investigations, whereas the muscular component was removed by employing all the processes, with slightly more preservation in samples treated using Protocol No. 1. Importantly, histological sections confirmed that the vascular elements were retained after detergent-enzymatic treatments, which is necessary for tissue nutrition and material exchange in the perspective of *in vivo* implants [70]. Within the ECM, the role of GAGs is to bind growth factors and cytokines, as well as to retain water molecules in tissue. In this work, the biochemical assay for GAG quantification revealed that a better preservation of this component was assured using Protocols Nos. 2 and 3, rather than Protocol No. 1, in line with other studies

reporting the depletion of GAGs after esophagus decellularization using an SDC-based protocol [62]. However, only a moderate decrease in the GAG amount was registered in comparison with previous studies, suggesting that ET1 and EP1 samples can still take advantage of the functional role of GAGs in case of scaffold repopulation. In parallel, these results are in contrast with those of several works describing the extraction of GAG following trypsin- or SDS-based procedures [71]. Together with GAGs, the collagen content was determined via hydroxyproline biochemical quantification, since hydroxyproline is present almost exclusively in collagen. Similarly, in this case, higher amounts of hydroxyproline were detected after decellularization with Protocols No. 2 and 3, although all acellular scaffolds showed an increase in hydroxyproline content after decellularization, which could be explained by the fact that cells and possibly some proteoglycans no longer contributed to tissue weight [56]. Specifically, the detected hydroxyproline content was normalized to the specific sample weight; in native tissue, for the same weight, there are both cellular components and structural proteins, while in decellularized ones there are no cellular components. So, the apparent increase in hydroxyproline was probably due to the loss of cells and soluble proteins in decellularized tissues in comparison with the native counterparts [72].

Remarkably, the preservation of ECM components after treatment with trypsin-based methods can be attributed to the limited time of incubation in the proteolytic enzyme solution. Besides hydroxyproline quantification, Collagen IV, together with laminin, was still localized within the esophageal matrices after decellularization, representing fundamental structural components that endow the acellular scaffold with mechanical strength and affinity for cells [73]. The successful outcome of decellularized tissues upon implantation is ascribed to the molecular signals provided by the remaining ECM components, which can crosstalk with cells *in vivo* as they repopulate the graft. The proteomic signature of esophageal acellular matrix also demonstrates the retention of structural collagens, besides basement membrane and matrix–cell interaction proteins. In accordance with a previous characterization of pig esophageal ECM [61], we observed that acellular tubules and patches were mainly made of fibrillar collagens, including types I, III and V, which define the physical characteristics of the tissue. Glycoproteins, which constitute elastic fibers (elastin, fibrillin, microfibrillar-associated proteins), seemed to be well maintained through all protocols, while those forming the basement membrane (laminin, fibulin, nidogen) were more preserved using Protocols No. 1 and No. 3. Proteoglycans, which play a role in matrix assembly (biglycan, decorin) and structural regulation (osteoglycin), as well as cell adhesion (vitronectin), were found not to be depleted due to decellularization. Cytoskeleton proteins are known to be fundamental for the structural/functional organization of the cell, so their persistence in acellular matrices may be a sign of incomplete cell removal. Comparing the three decellularization methods, this class of proteins was mainly detected within esophageal tissues treated with Protocol No. 1, suggesting the presence of cell remnants. On the other hand, Protocol No. 1, followed by Protocol No. 2, ensured a better preservation of some regulator factors that are implicated in the modulation of cell–matrix interactions (annexin, galectin).

Since the cell behavior in the ECM (i.e., adhesion, migration, proliferation gene expression) is believed to be influenced not only by the tissue-specific proteome but also by the surface morphology of the scaffolds [74,75], an in-depth ultrastructural investigation of native and acellular esophagi was performed using SEM. The superficial collagen structure after decellularization consisted of fine, loosely arranged, undulating collagen bundles that were separated from each other by irregular spaces, while intact cells were no more visible. As a further characterization of the collagenous component within native and acellular esophageal specimens, the SHG signal collected from collagen allowed us to obtain a semi-quantitative evaluation of its fibrillar structure [34]. The current literature about esophagus decellularization has never reported this type of analysis on the acellular matrix; still, it was shown to provide useful insights in decellularization–recellularization studies to discriminate between the collagen/elastin of the scaffolds and the original cells

or the recellularizing tissue [76]. The SHG imaging of decellularized versus native tissues was previously found to detect a significant decrease in signal intensity from collagen fibers of native samples after decellularization. This signal reduction was associated with structural damage to collagen due to detergent-enzymatic treatment [77,78]. This study appears to be in line with these data, highlighting that all the tested protocols caused a decrease in collagen signal intensity compared with the untreated esophagi. On the other hand, collagen fiber orientation seemed to be less affected by the decellularization process in tubular samples rather than patches, suggesting that the gross morphology of the scaffold may influence tissue response to treatment. However, the alterations in collagen fiber orientation following decellularization treatment have already been reported in the literature for porcine corneas [79]. Moreover, trypsin/EDTA treatment has been found to disorganize the collagen fiber orientation in decellularized bovine bone [80].

After structural characterization, the biomechanical investigation of acellular scaffolds is of pivotal importance to establish the correct preservation of tissue functional integrity. In this study, all the tested decellularization methods led to a decrease in mechanical resistance and toughness in comparison with the native counterpart. Collected evidence on the biomechanical properties of esophageal tissue after decellularization appears to be controversial, since some authors have reported a reduction in scaffold stiffness [18,47], while others have confirmed the preservation of adequate mechanical performance [54,56]. In this study, the loss of tissue mechanical performance may have been ascribed to the fact that the esophageal samples were frozen before processing. In fact, controversial evidence has been reported in the literature about the loss of sample stiffness after freezing/thawing, with several studies detecting little or no mechanical changes in frozen versus fresh ligaments, tendons, menisci, and arterial and ocular tissues [81]. Based on that, the residual biomechanical properties of the acellular esophageal scaffolds obtained in this work are to be challenged with scaffold repopulation tests.

Another consideration about the effect of the different decellularization methods on tissue mechanical properties regards the use of trypsin for the enzymatic dissociation of cell–matrix interactions. When using trypsin, treatment duration is of key importance to minimize adverse effects on ECM structure and mechanical behavior, as it has been reported in the literature that a prolonged incubation up to 15–24 h affects matrix stiffness and biomechanics [82,83]. In this study, samples were maintained in trypsin for a limited time (1 h), so it is likely that it helped not to affect Young's modulus more than treatments based on detergent (SDC) alone.

Besides their mechanical, physical and chemical properties, medical devices such as engineered allografts must undergo rigorous testing to assess their biocompatibility and bio-safety properties before they can be implanted in vivo [84]. In this regard, in vitro cytotoxicity tests represent the primary crucial step to predict the behavior of an implantable scaffold for possible clinical application. Herein, cytocompatibility tests performed on the HM1-SV40 cell line supported the atoxicity of all the acellular esophageal matrices, with better results having been obtained with decellularization Protocols No. 1 and No. 2. These encouraging results need to be corroborated with in vivo studies assessing the biocompatibility of the decellularized esophagi after the subcutaneous implant into rat/mouse models.

5. Conclusions

The failure of esophageal structure and function often requires complex reconstructive surgery with discussible long-term outcomes; hence, new and better therapeutic approaches strongly rely on advances in tissue engineering. In this work, non-cytotoxic esophageal allografts were obtained using three different protocols that gently removed cells and genetic material to preserve the ECM structure and the micro- and macro-architecture of the native tissue, also retaining crucial biological cues, as detected via a proteomic study.

The three decellularization protocols provided different outcomes in terms of (a) tissue manipulability (more affected by Protocol No. 3), (b) DNA removal (better achieved via Protocol No. 1), (c) GAG and hydroxyproline preservation (better assured by Protocols

Nos. 2 and 3) and (d) collagen fiber orientation (less affected by Protocols Nos. 2 and 3 for ET samples and by Protocol No. 1 for EP specimens). The proteomic signature of acellular esophagi also showed some differential expression among experimental groups, suggesting that different biological signals can be provided by the decellularized matrices according to the protocol used. Overall, the *in vitro* results did not show the clear superiority of one protocol over the others, suggesting that the proper decellularization method may be chosen according to the different therapeutic and regenerative demands, so that personalized scaffolds may be produced to better satisfy patients' needs. Most importantly, further studies investigating *in vivo* matrix biocompatibility, scaffold repopulation and orthotopic implant into esophageal damage/pathology models should corroborate the quality of the different acellular esophageal grafts, eventually underlying more distinct differences among the methods.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11192945/s1>, Figure S1: Collagen fiber orientation; Figure S2: Surface ultrastructure of native and decellularized esophagi.

Author Contributions: Conceptualization, S.B., A.B. (Andrea Biccari), M.A., M.V. and A.P.; methodology, S.B., A.B. (Andrea Biccari), E.S., G.C., E.D., M.T. and D.S.; formal analysis, S.B., A.B. (Andrea Biccari), E.S., M.T., D.S., A.B. (Andrea Bagno) and F.R.; investigation, S.B., A.B. (Andrea Biccari), E.S., G.C., E.D., M.T. and D.S.; data curation, S.B., A.B. (Andrea Biccari), E.S., M.T., D.S., A.B. (Andrea Bagno), F.R., M.V. and A.P.; writing—original draft preparation, S.B., A.B. (Andrea Biccari), M.V. and A.P.; writing—review and editing, A.B. (Andrea Bagno), F.R., V.M., R.D.C., M.A. and S.M.; supervision, V.M., R.D.C., M.A., S.M., M.V. and A.P.; project administration, R.D.C., M.A., S.M., M.V. and A.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research study was funded by 'Consorzio per la Ricerca Sanitaria' (CORIS) of the Veneto Region, Italy (L.i.f.e.L.a.b. Program), grant number DGR1017 (17 July 2018).

Acknowledgments: The authors would like to thank 'Consorzio per la Ricerca Sanitaria' (CORIS) of the Veneto Region, Italy (L.i.f.e.L.a.b. Program), for financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ACTA1	Actin, Alpha, Skeletal Muscle 1
ACTA2	Actin, Alpha-2, Smooth Muscle, Aorta
ACTB	Actin, Beta
ACTG2	Actin, Gamma-2, Smooth Muscle, Enteric
ACTN1	Actinin, Alpha-1
ACTN2	Actinin, Alpha-2
ANXA2	Annexin A2
ANXA3	Annexin A3
ANXA5	Annexin A5
ANXA6	Annexin A6
BGN	Biglycan
CNN1	Calponin 1
COL1A1	Collagen, Type I, Alpha-1
COL1A2	Collagen, Type I, Alpha-2
COL2A1	Collagen, Type II, Alpha-1
COL3A1	Collagen, Type III, Alpha-1
COL4A1	Collagen, Type IV, Alpha-1
COL4A2	Collagen, Type IV, Alpha-2
COL4A5	Collagen, Type IV, Alpha-5
COL4A2	Collagen, Type IV, Alpha-6
COL5A1	Collagen, Type V, Alpha-1
COL5A2	Collagen, Type V, Alpha-2
COL5A3	Collagen, Type V, Alpha-3

COL6A1	Collagen, Type VI, Alpha-1
COL6A2	Collagen, Type VI, Alpha-2
COL6A3	Collagen, Type VI, Alpha-3
COL8A1	Collagen, Type VIII, Alpha-1
COL8A2	Collagen, Type VIII, Alpha-2
COL11A1	Collagen, Type XI, Alpha-1
COL15A1	Collagen, Type XV, Alpha-1
DCN	Decorin
DES	Desmin
DPT	Dermatopontin
DSTN	Destrin
DMD	Dystrophin
ELN	Elastin
EPPK1	Epiplakin 1
FBN1	Fibrillin 1
FBLN1	Fibulin 1
FBLN2	Fibulin 2
FLNA2	Filamin
FLNC	Filamin C
ITGB1	Integrin, Beta-1
KRT1	Keratin 1, Type II
KRT10	Keratin 10, Type I
KRT13	Keratin 13, Type I
KRT4	Keratin 4, Type II
LAMA1	Laminin, Alpha-1
LAMA2	Laminin, Alpha-2
LAMA5	Laminin, Alpha-5
LGALS1	Lectin, Galactoside-Binding, Soluble, 1
LMOD1	Leiomodin 1
LUM	Lumican
MFAP4	Microfibrillar-Associated Protein 4
MFAP5	Microfibrillar-Associated Protein 5
MYH11	Myosin, Heavy Chain 11, Smooth Muscle
MYH2	Myosin, Heavy Chain 2, Skeletal Muscle, Adult
MYH7	Myosin, Heavy Chain 7, Cardiac Muscle, Beta
MYH9	Myosin, Heavy Chain 9, Nonmuscle
NEB	Nebulin
NID1	Nidogen 1
NID2	Nidogen 2
OGN	Osteoglycin
PALLD	Palladin, Cytoskeletal-Associated Protein
PFN1	Profilin 1
PLEK	Pleckstrin
PRLEP	Prolargin
SEPT2	Septin 2
SMTN	Smoothelin
TLN1	Talin 1
TNS1	Tensin 1
TTN	Titin
TUBA1A	Tubulin, Alpha-1a
TUBA4A	Tubulin, Alpha-4a
TUBB	Tubulin, Beta
TUBB3	Tubulin, Beta-3
TUBB4A	Tubulin, Beta-4a
TUBB6	Tubulin, Beta-6
VCL	Vinculin
VIM	Vimentin
VTN	Vitronectin

References

1. Luc, G.; Durand, M.; Collet, D.; Guillemot, F.; Bordenave, L. Esophageal tissue engineering. *Expert Rev. Med. Devices* **2014**, *11*, 225–241. [[CrossRef](#)]
2. Tan, J.Y.; Chua, C.K.; Leong, K.F.; Chian, K.S.; Leong, W.S.; Tan, L.P. Esophageal tissue engineering: An in-depth review on scaffold design. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 1–15. [[CrossRef](#)]
3. Totonelli, G.; Maghsoudlou, P.; Fishman, J.M.; Orlando, G.; Ansari, T.; Sibbons, P.; Birchall, M.A.; Pierro, A.; Eatonz, S.; De Coppi, P. Esophageal tissue engineering: A new approach for esophageal replacement. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 6900–6907. [[CrossRef](#)]
4. Kuppan, P.; Sethuraman, S.; Krishnan, U.M. Tissue engineering interventions for esophageal disorders—Promises and challenges. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 1481–1492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Urbani, L.; Camilli, C.; Phylactopoulos, D.E.; Crowley, C.; Natarajan, D.; Scottoni, F.; Maghsoudlou, P.; McCann, C.J.; Pellegata, A.F.; Urciuolo, A.; et al. Multi-stage bioengineering of a layered oesophagus with in vitro expanded muscle and epithelial adult progenitors. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4286. [[CrossRef](#)]
6. Elliott, M.J.; De Coppi, P.; Spegiorin, S.; Roebuck, D.; Butler, C.R.; Samuel, E.; Crowley, C.; McLaren, C.; Fierens, A.; Vondrys, D.; et al. Stem-cell-based; tissue engineered tracheal replacement in a child: A 2-year follow-up study. *Lancet* **2012**, *380*, 994–1000. [[CrossRef](#)]
7. Cheung, D.Y.; Duan, B.; Butcher, J.T. Current progress in tissue engineering of heart valves: Multiscale problems; multiscale solutions. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2015**, *15*, 1155–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Gabriel, A.; Maxwell, G.P. AlloDerm RTU Integration and Clinical Outcomes When Used for Reconstructive Breast Surgery. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open* **2018**, *6*, e1744. [[CrossRef](#)]
9. Kuo, B.; Urma, D. Esophagus—Anatomy and development. *GI Motil. Online* **2006**. [[CrossRef](#)]
10. Totonelli, G.; Maghsoudlou, P.; Georgiades, F.; Garriboli, M.; Koshy, K.; Turmaine, M.; Ashworth, M.; Sebire, N.J.; Pierro, A.; Eaton, S.; et al. Detergent enzymatic treatment for the development of a natural acellular matrix for oesophageal regeneration. *Pediatr. Surg. Int.* **2013**, *29*, 87–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Saxena, A.K. Esophagus tissue engineering: Designing and crafting the components for the “hybrid construct” approach. *Eur. J. Pediatr. Surg.* **2014**, *24*, 246–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Badylak, S.; Meurling, S.; Chen, M.; Spievack, A.; Simmons-Byrd, A. Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model. *J. Pediatr. Surg.* **2000**, *35*, 1097–1103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Urita, Y.; Komuro, H.; Chen, G.; Shinya, M.; Kaneko, S.; Kaneko, M.; Ushida, T. Regeneration of the esophagus using gastric acellular matrix: An experimental study in a rat model. *Pediatr. Surg. Int.* **2007**, *23*, 21–26. [[CrossRef](#)]
14. Lopes, M.F.; Cabrita, A.; Ilharco, J.; Pessa, P.; Paiva-Carvalho, J.; Pires, A.; Patrício, J. Esophageal replacement in rat using porcine intestinal submucosa as a patch or a tube-shaped graft. *Dis. Esophagus* **2006**, *19*, 254–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ohki, T.; Yamato, M.; Ota, M.; Takagi, R.; Murakami, D.; Kondo, M.; Sasaki, R.; Namiki, H.; Okano, T.; Yamamoto, M. Prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection using tissue-engineered cell sheets. *Gastroenterology* **2012**, *143*, 582–588.e2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Badylak, S.F.; Vorp, D.A.; Spievack, A.R.; Simmons-Byrd, A.; Hanke, J.; Freytes, D.O.; Thapa, A.; Gilbert, T.W.; Nieponice, A. Esophageal reconstruction with ECM and muscle tissue in a dog model. *J. Surg. Res.* **2005**, *128*, 87–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Arakelian, L.; Kanai, N.; Dua, K.; Durand, M.; Cattani, P.; Ohki, T. Esophageal tissue engineering: From bench to bedside. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2018**, *1434*, 156–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Luc, G.; Charles, G.; Gronnier, C.; Cabau, M.; Kalisky, C.; Meulle, M.; Bareille, R.; Roques, S.; Couraud, L.; Rannou, J.; et al. Decellularized and matured esophageal scaffold for circumferential esophagus replacement: Proof of concept in a pig model. *Biomaterials* **2018**, *175*, 1–18. [[CrossRef](#)]
19. Spradling, A.; Drummond-Barbosa, D.; Kai, T. Stem cells find their niche. *Nature* **2001**, *414*, 98–104. [[CrossRef](#)]
20. Derda, R.; Li, L.; Orner, B.P.; Lewis, R.L.; Thomson, J.A.; Kiessling, L.L. Defined substrates for human embryonic stem cell growth identified from surface arrays. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 347–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Martin, M.J.; Muotri, A.; Gage, F.; Varki, A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 228–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Piccoli, M.; D’Angelo, E.; Crotti, S.; Sensi, F.; Urbani, L.; Maghin, E.; Burns, A.; De Coppi, P.; Fassan, M.; Rugge, M.; et al. Decellularized colorectal cancer matrix as bioactive microenvironment for in vitro 3D cancer research. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 5937–5948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Porzionato, A.; Sfriso, M.M.; Pontini, A.; Macchi, V.; Petrelli, L.; Pavan, P.G.; Natali, A.N.; Bassetto, F.; Vindigni, V.; De Caro, R. Decellularized Human Skeletal Muscle as Biologic Scaffold for Reconstructive Surgery. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 14808–14831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Barbon, S.; Stocco, E.; Contran, M.; Facchin, F.; Boscolo-Berto, R.; Todros, S.; Sandrin, D.; Romanato, F.; Pavan, P.; Macchi, V.; et al. Preclinical Development of Bioengineered Allografts Derived from Decellularized Human Diaphragm. *Biomedicines* **2022**, *10*, 739. [[CrossRef](#)]
25. De Caro, R.; Macchi, V.; Porzionato, A. Promotion of body donation and use of cadavers in anatomical education at the University of Padova. *Anat. Sci. Educ.* **2009**, *2*, 91–92. [[CrossRef](#)]

26. Macchi, V.; Porzionato, A.; Stecco, C.; Tiengo, C.; Parenti, A.; Cestroni, A.; De Caro, R. Body parts removed during surgery: A useful training source. *Anat. Sci. Educ.* **2011**, *4*, 151–156. [[CrossRef](#)]
27. Porzionato, A.; Macchi, V.; Stecco, C.; Mazzi, A.; Rambaldo, A.; Sarasin, G.; Parenti, A.; Scipioni, A.; De Caro, R. Quality management of Body Donation Program at the University of Padova. *Anat. Sci. Educ.* **2012**, *5*, 264–272. [[CrossRef](#)]
28. Porzionato, A.; Macchi, V.; Stecco, C.; De Caro, R. The body donation program of the University of Padua: Organizing an anatomical biobank for medical education. In *New Insights on Biobanks*; Caenazzo, L., Ed.; CLEUP: Padova, Italy, 2013; pp. 155–171. ISBN 9788867871216.
29. Riederer, B.M.; Bolt, S.; Brenner, E.; Bueno-López, J.L.; Circulescu, A.R.M.; Davies, D.C.; De Caro, R.; Gerrits, P.O.; McHanwell, S.; Pais, D.; et al. The legal and ethical framework governing Body Donation in Europe—1st update on current practice. *Eur. J. Anat.* **2012**, *16*, 1–21.
30. Boscolo-Berto, R.; Porzionato, A.; Stecco, C.; Macchi, V.; De Caro, R. Body donation in Italy: Lights and shadows of law No. 10/2020. *Clin. Anat.* **2020**, *33*, 950–959. [[CrossRef](#)]
31. Filippi, A.; Dal Sasso, E.; Iop, L.; Armani, A.; Gintoli, M.; Sandri, M.; Gerosa, G.; Romanato, F.; Borile, G. Multimodal label-free ex vivo imaging using a dual-wavelength microscope with axial chromatic aberration compensation. *J. Biomed. Opt.* **2018**, *23*, 1–9.
32. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wu, S.; Li, H.; Yang, H.; Zhang, X.; Li, Z.; Xu, S. Quantitative analysis on collagen morphology in aging skin based on multiphoton microscopy. *J. Biomed. Opt.* **2011**, *16*, 040502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Borile, G.; Sandrin, D.; Filippi, A.; Anderson, K.I.; Romanato, F. Label-Free Multiphoton Microscopy: Much More Than Fancy Images. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2657. [[CrossRef](#)]
35. Naba, A.; Clauser, K.R.; Hynes, R.O. Enrichment of Extracellular Matrix Proteins from Tissues and Digestion into Peptides for Mass Spectrometry Analysis. *J. Vis. Exp.* **2015**, *101*, e53057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Todesco, M.; Zardin, C.; Iop, L.; Palmosi, T.; Capaldo, P.; Romanato, F.; Gerosa, G.; Bagno, A. Hybrid membranes for the production of blood contacting surfaces: Physicochemical; structural and biomechanical characterization. *Biomater. Res.* **2021**, *25*, 26. [[CrossRef](#)]
37. De Angeli, S.; Di Liddo, R.; Buoro, S.; Toniolo, L.; Conconi, M.T.; Belloni, A.S.; Parnigotto, P.P.; Nussdorfer, G.G. New immortalized human stromal cell lines enhancing in vitro expansion of cord blood hematopoietic stem cells. *Int. J. Mol. Med.* **2004**, *13*, 363–371. [[CrossRef](#)]
38. Barbon, S.; Stocco, E.; Dalzoppo, D.; Todros, S.; Canale, A.; Boscolo-Berto, R.; Pavan, P.; Macchi, V.; Grandi, C.; De Caro, R.; et al. Halogen-Mediated Partial Oxidation of Polyvinyl Alcohol for Tissue Engineering Purposes. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Crapo, P.M.; Gilbert, T.W.; Badylak, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3233–3243. [[CrossRef](#)]
40. Ranjit, S.; Dvornikov, A.; Stakic, M.; Hong, S.H.; Levi, M.; Evans, R.M.; Gratton, E. Imaging Fibrosis and Separating Collagens using Second Harmonic Generation and Phasor Approach to Fluorescence Lifetime Imaging. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13378. [[CrossRef](#)]
41. ISO 10993-5 2009; Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2009. Available online: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-5:en> (accessed on 23 March 2022).
42. Stocco, E.; Barbon, S.; Dalzoppo, D.; Lora, S.; Sartore, L.; Folini, M.; Parnigotto, P.P.; Grandi, C. Tailored PVA/ECM scaffolds for cartilage regeneration. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 762189. [[CrossRef](#)]
43. Stocco, E.; Barbon, S.; Radossi, P.; Rajendran, S.; Dalzoppo, D.; Bortolami, M.; Bagno, A.; Grandi, F.; Gamba, P.G.; Parnigotto, P.P.; et al. Autologous chondrocytes as a novel source for neo-chondrogenesis in haemophiliacs. *Cell Tissue Res.* **2016**, *366*, 51–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Grandi, F.; Stocco, E.; Barbon, S.; Rambaldo, A.; Contran, M.; Fascetti Leon, F.; Gamba, P.; Parnigotto, P.P.; Macchi, V.; De Caro, R.; et al. Composite Scaffolds Based on Intestinal Extracellular Matrices and Oxidized Polyvinyl Alcohol: A Preliminary Study for a New Regenerative Approach in Short Bowel Syndrome. *Biomed. Res. Int.* **2018**, *2018*, 7824757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ozeki, M.; Narita, Y.; Kagami, H.; Ohmiya, N.; Itoh, A.; Hirooka, Y.; Niwa, Y.; Ueda, M.; Goto, H. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *79*, 771–778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Barnes, C.A.; Brison, J.; Michel, R.; Brown, B.N.; Castner, D.G.; Badylak, S.F.; Ratner, B.D. The surface molecular functionality of decellularized extracellular matrices. *Biomaterials* **2011**, *32*, 137–143. [[CrossRef](#)]
47. Mallis, P.; Chachlaki, P.; Katsimpoulas, M.; Stavropoulos-Giokas, C.; Michalopoulos, E. Optimization of Decellularization Procedure in Rat Esophagus for Possible Development of a Tissue Engineered Construct. *Bioengineering* **2018**, *6*, 3. [[CrossRef](#)]
48. Saleh, T.; Ahmed, E.; Yu, L.; Kwak, H.H.; Kang, B.J.; Park, K.M.; Choi, K.Y.; Kim, B.M.; Kang, K.S.; Woo, H.M. Characterization of silver nanoparticle-modified decellularized rat esophagus for esophageal tissue engineering: Structural properties and biocompatibility. *J. Biosci. Bioeng.* **2019**, *128*, 613–621. [[CrossRef](#)]
49. Melkonyan, K.; Nakokhov, R.; Rusinova, T.; Yutskevich, Y.; Bykov, I.; Redko, A.; Alekseenko, S. Serum cytokine profile during subcutaneous implantation of the decellularized esophagus matrix in rats. *J. Biomater. Appl.* **2020**, *35*, 446–455. [[CrossRef](#)]

50. Eftekhazadeh, S.; Akbarzadeh, A.; Sabetkish, N.; Rostami, M.; Zabolian, A.H.; Hashemi, J.; Tavangar, S.M.; Kajbafzadeh, A.M. Esophagus tissue engineering: From decellularization to in vivo recellularization in two sites. *Cell Tissue Bank* **2022**, *23*, 301–312. [[CrossRef](#)]
51. Saldin, L.T.; Klimakz, M.; Hill, R.C.; Cramer, M.C.; Huleihelx, L.; Li, X.; Quidgley-Martin, M.; Cardenas, D.; Keane, T.J.; Londono, R.; et al. The effect of normal; metaplastic; and neoplastic esophageal extracellular matrix upon macrophage activation. *J. Immunol. Regen. Med.* **2021**, *13*, 100037. [[CrossRef](#)]
52. Hagen, C.K.; Maghsoudlou, P.; Totonelli, G.; Diemoz, P.C.; Endrizzi, M.; Rigon, L.; Menk, R.H.; Arfelli, F.; Dreossi, D.; Brun, E.; et al. High contrast microstructural visualization of natural acellular matrices by means of phase-based X-ray tomography. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18156. [[CrossRef](#)]
53. Urbani, L.; Maghsoudlou, P.; Milan, A.; Menikou, M.; Hagen, C.K.; Totonelli, G.; Camilli, C.; Eaton, S.; Burns, A.; Olivo, A.; et al. Long-term cryopreservation of decellularised oesophagi for tissue engineering clinical application. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0179341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hou, N.; Xu, X.; Lv, D.; Lu, Y.; Li, J.; Cui, P.; Ma, R.; Luo, X.; Tang, Y.; Zheng, Y. Tissue-engineered esophagus: Recellular esophageal extracellular matrix based on perfusion-decellularized technique and mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater.* **2021**, *16*, 055017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ackbar, R.; Ainoedhofer, H.; Gugatschka, M.; Saxena, A.K. Decellularized ovine esophageal mucosa for esophageal tissue engineering. *Technol. Health Care* **2012**, *20*, 215–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Goyal, R.P.; Gangwar, A.K.; Khangembam, S.D.; Yadav, V.K.; Kumar, R.; Verma, R.K.; Kumar, N. Decellularization of caprine esophagus using fruit pericarp extract of *Sapindus mukorossi*. *Cell Tissue Bank* **2022**, *23*, 79–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Keane, T.J.; Londono, R.; Carey, R.M.; Carruthers, C.A.; Reing, J.E.; Dearth, C.L.; D’Amore, A.; Medberry, C.J.; Badylak, S.F. Preparation and characterization of a biologic scaffold from esophageal mucosa. *Biomaterials* **2013**, *34*, 6729–6737. [[CrossRef](#)]
58. Arakelian, L.; Caille, C.; Faivre, L.; Corté, L.; Bruneval, P.; Shamdani, S.; Flageollet, C.; Albanese, P.; Domet, T.; Jarraya, M.; et al. A clinical-grade acellular matrix for esophageal replacement. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2019**, *13*, 2191–2203. [[CrossRef](#)]
59. Marzaro, M.; Algeri, M.; Tomao, L.; Tedesco, S.; Caldaro, T.; Balassone, V.; Contini, A.C.; Guerra, L.; Federici D’Abriola, G.; Francalanci, P.; et al. Successful muscle regeneration by a homologous microperforated scaffold seeded with autologous mesenchymal stromal cells in a porcine esophageal substitution model. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2020**, *13*. [[CrossRef](#)]
60. Nam, H.; Jeong, H.J.; Jo, Y.; Lee, J.Y.; Ha, D.H.; Kim, J.H.; Chung, J.H.; Cho, Y.S.; Cho, D.W.; Lee, S.J.; et al. Multi-layered Free-form 3D Cell-printed Tubular Construct with Decellularized Inner and Outer Esophageal Tissue-derived Bioinks. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 7255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Naranjo, J.D.; Saldin, L.T.; Sobieski, E.; Quijano, L.M.; Hill, R.C.; Chan, P.G.; Torres, C.; Dziki, J.L.; Cramer, M.C.; Lee, Y.C.; et al. Esophageal extracellular matrix hydrogel mitigates metaplastic change in a dog model of Barrett’s esophagus. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaba4526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Nayakawde, N.B.; Methe, K.; Banerjee, D.; Berg, M.; Premaratne, G.U.; Olausson, M. In Vitro Regeneration of Decellularized Pig Esophagus Using Human Amniotic Stem Cells. *Biores. Open Access* **2020**, *9*, 22–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Chaitin, H.; Lu, M.L.; Wallace, M.B.; Kang, Y. Development of a Decellularized Porcine Esophageal Matrix for Potential Applications in Cancer Modeling. *Cells* **2021**, *10*, 1055. [[CrossRef](#)]
64. Ha, D.H.; Chae, S.; Lee, J.Y.; Kim, J.Y.; Yoon, J.; Sen, T.; Lee, S.W.; Kim, H.J.; Cho, J.H.; Cho, D.W. Therapeutic effect of decellularized extracellular matrix-based hydrogel for radiation esophagitis by 3D printed esophageal stent. *Biomaterials* **2021**, *266*, 120477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Levenson, G.; Berger, A.; Demma, J.; Perrod, G.; Domet, T.; Arakelian, L.; Bruneval, P.; Broudin, C.; Jarraya, M.; Setterblad, N.; et al. Circumferential esophageal replacement by a decellularized esophageal matrix in a porcine model. *Surgery* **2022**, *171*, 384–392. [[PubMed](#)]
66. Sitthisang, S.; Leong, M.F.; Chian, K.S. Perfusion decellularization of porcine esophagus: Study of two processing factors affecting the folded mucosal structure of the esophageal scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2021**, *109*, 745–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Mendibil, U.; Ruiz-Hernandez, R.; Retegi-Carrion, S.; Garcia-Urquia, N.; Olalde-Graells, B.; Abarrategi, A. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Das, P.; Singh, Y.P.; Mandal, B.B.; Nandi, S.K. Tissue-derived decellularized extracellular matrices toward cartilage repair and regeneration. *Methods Cell. Biol.* **2020**, *157*, 185–221.
69. Ozdemir, B.H.; Aksoy, P.K.; Haberal, A.N.; Demirhan, B.; Haberal, M. Relationship of HLA-DR expression to rejection and mononuclear cell infiltration in renal allograft biopsies. *Ren. Fail.* **2004**, *26*, 247–251. [[PubMed](#)]
70. Sarker, M.D.; Naghieh, S.; Sharma, N.K.; Chen, X. 3D biofabrication of vascular networks for tissue regeneration: A report on recent advances. *J. Pharm. Anal.* **2018**, *8*, 277–296. [[PubMed](#)]
71. Di Liddo, R.; Aguiari, P.; Barbon, S.; Bertalot, T.; Mandoli, A.; Tasso, A.; Schrenk, S.; Iop, L.; Gandaglia, A.; Parnigotto, P.P.; et al. Nanopatterned acellular valve conduits drive the commitment of blood-derived multipotent cells. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 5041–5055. [[CrossRef](#)]
72. Zouhair, S.; Dal Sasso, E.; Tuladhar, S.R.; Fidalgo, C.; Vedovelli, L.; Filippi, A.; Borile, G.; Bagnò, A.; Marchesan, M.; De Rossi, G.; et al. A comprehensive comparison of bovine and porcine decellularized pericardium: New insights for surgical applications. *Biomolecules* **2020**, *10*, 371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

73. Boso, D.; Maghin, E.; Carraro, E.; Giagante, M.; Pavan, P.; Piccoli, M. Extracellular Matrix-Derived Hydrogels as Biomaterial for Different Skeletal Muscle Tissue Replacements. *Materials* **2020**, *13*, 2483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Maurer, T.; Stoffel, M.H.; Belyaev, Y.; Stiefel, N.G.; Vidondo, B.; Küker, S.; Mogel, H.; Schäfer, B.; Balmer, J. Structural characterization of four different naturally occurring porcine collagen membranes suitable for medical applications. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0205027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Stocco, E.; Barbon, S.; Lamanna, A.; De Rose, E.; Zamuner, A.; Sandrin, D.; Marsotto, M.; Auditore, A.; Messina, G.M.L.; Licciardello, A.; et al. Bioactivated Oxidized Polyvinyl Alcohol towards Next-Generation Nerve Conduits Development. *Polymers* **2021**, *13*, 3372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Merna, N.; Robertson, C.; La, A.; George, S.C. Optical imaging predicts mechanical properties during decellularization of cardiac tissue. *Tissue Eng. Part C Methods* **2013**, *19*, 802–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Faulk, D.M.; Carruthers, C.A.; Warner, H.J.; Kramer, C.R.; Reing, J.E.; Zhang, L.; D'Amore, A.; Badylak, S.F. The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 183–193. [[CrossRef](#)]
78. Hwang, J.; San, B.H.; Turner, N.J.; White, L.J.; Faulk, D.M.; Badylak, S.F.; Li, Y.; Yu, S.M. Molecular assessment of collagen denaturation in decellularized tissues using a collagen hybridizing peptide. *Acta Biomater.* **2017**, *53*, 268–278. [[CrossRef](#)]
79. González-Andrades, M.; Carriel, V.; Rivera-Izquierdo, M.; Garzón, I.; González-Andrades, E.; Medialdeac, S.; Alaminos, M.; Campos, A. Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas with Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences. *Transl. Vis. Sci. Technol.* **2015**, *4*, 13. [[CrossRef](#)]
80. Emami, A.; Talaie-Khozani, T.; Vojdani, Z.; Zarei Fard, N. Comparative assessment of the efficiency of various decellularization agents for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2021**, *109*, 19–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Abass, A.; Eliasy, A.; Geraghty, B.; Elabd, M.; Hassan, A.; Elsheikh, A. Effect of freezing and thawing on the biomechanical characteristics of porcine ocular tissues. *J. Biomech.* **2019**, *87*, 93–99. [[CrossRef](#)]
82. Lin, C.H.; Kao, Y.C.; Ma, H.; Tsay, R.Y. An investigation on the correlation between the mechanical property change and the alterations in composition and microstructure of a porcine vascular tissue underwent trypsin-based decellularization treatment. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2018**, *86*, 199–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Grauss, R.W.; Hazekamp, M.G.; Oppenhuizen, F.; van Munsteren, C.J.; Gittenberger-de Groot, A.C.; DeRuiter, M.C. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: Matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.* **2005**, *27*, 566–571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Li, W.; Zhou, J.; Xu, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed. Rep.* **2015**, *3*, 617–620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]