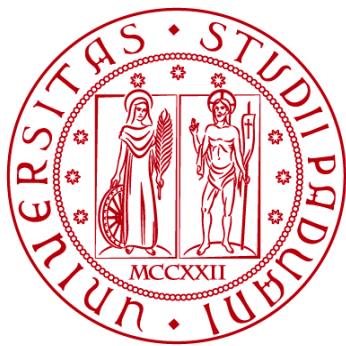


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**Validazione *in vitro* e *in vivo* di scaffold compositi formati da
matrice extracellulare intestinale e polivinil alcol ossidato
per un nuovo approccio rigenerativo nella
sindrome dell'intestino corto**

Tutor: Prof. Andrea Porzionato
Dipartimento di Neuroscienze

Co-tutor: Dott.ssa Elena Stocco
Dipartimento di Neuroscienze
Co-tutor: Dott.ssa Silvia Barbon
Dipartimento di Neuroscienze

Laureanda: Erica Dal Zovo

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

<i>Abstract</i>	2
1. Introduzione	3
1.1 L'intestino tenue	3
1.2 La patologia: sindrome dell'intestino corto	3
1.2.1 Adattamento spontaneo	3
1.2.2 La gestione del paziente con SBS	4
1.3 Ingegneria tessutale	5
1.3.1 Polivinil alcol ossidato	5
1.3.2 Matrice extracellulare	6
2.1 Preparazione degli scaffold	8
2.1.1 Prelievo e decellularizzazione della matrice extracellulare intestinale	8
2.1.2 Analisi istologiche	8
2.1.3 Preparazione della matrice extracellulare intestinale	8
2.1.4 Preparazione del polimero e allestimento degli scaffold	9
2.1.5 Caratterizzazione morfologica ed ultrastrutturale degli scaffold	9
2.2 Valutazione delle proprietà biologiche degli scaffold <i>in vitro</i>	10
2.3 Comportamento degli scaffold <i>in vivo</i>	10
2.3.1 Chirurgia: impianto ed espianto degli scaffold	10
2.3.2 Analisi istologiche ed immunologiche	10
3. Risultati	12
3.1 Preparazione e caratterizzazione delle matrici extracellulari	12
3.2 Scaffold compositi	13
3.2.1 Valutazione dell'interazione scaffold/cellule	13
3.2.2 Valutazione degli scaffold dopo impianto <i>in vivo</i>	14
4. Discussione e conclusione	18
Bibliografia	20
Appendice	20

Abstract

La sindrome dell'intestino corto in età pediatrica è una condizione severa rara che si associa a malassorbimento e nei casi più gravi porta ad insufficienza intestinale. Attualmente, non esistono degli approcci chirurgici/ricostruttivi efficaci, ed il trapianto di intestino non è una strategia facilmente percorribile; in tale contesto, l'ingegneria tissutale si propone come uno strumento utile per poter identificare dei device d'avanguardia. Lo scopo di questo studio è stato quello di allestire e comparare (istologia, microscopia elettronica a scansione, test in vitro) due scaffold compositi costituiti da polivinil alcol ossidato (OxPVA) e matrice intestinale acellulare, intera o omogeneizzata. In seguito, i device sono stati impiantati nell'omento di ratti Sprague Dawley per 4 settimane per poi essere analizzati sia tramite istologia che immunoistochimica. Gli studi in vitro hanno mostrato l'efficienza della decellularizzazione e la capacità degli scaffold compositi di promuovere l'adesione e la proliferazione cellulare. Analisi sugli espianti hanno mostrato la presenza, attorno ai supporti, di uno strato tissutale organizzato dove si potevano riconoscere componenti connettivali, muscolari lisce ed epiteliali. Entrambi i supporti sono promettenti, tuttavia ulteriori analisi sono necessarie per una più specifica caratterizzazione degli stessi, oltre che del potenziale intrinseco in vivo.

1. Introduzione

1.1 L'intestino tenue

L'intestino tenue è un organo dell'apparato digerente coinvolto nei processi digestivi e di assorbimento degli alimenti. Esso può essere suddiviso in tre segmenti (duodeno, digiuno e ileo) formati da quattro tonache: *la tonaca mucosa*, che comprende un epitelio di rivestimento, una lamina propria che costituisce lo stroma dei villi (formata da tessuto connettivo (TC) lasso) e contiene le ghiandole intestinali, e la muscularis mucosae; *la tonaca sottomucosa* formata da TC denso e dal plesso nervoso della sottomucosa; *la tonaca muscolare*, formata da tessuto muscolare liscio organizzato in due o più strati e dal plesso nervoso mientericico; *la tonaca sierosa*, che si presenta come uno strato sottile di TC lasso che si continua con il mesentere. Nel lume dell'intestino si osservano delle pliche permanenti costituite da mucosa e sottomucosa e rivestite da villi, che sono composti da cellule assorbenti (enterociti) e cellule caliciformi mucipare. Tra i villi si trovano le cripte intestinali, il cui epitelio è formato da enterociti, cellule mucipare caliciformi, cellule di Paneth, cellule enteroendocrine, cellule M e cellule staminali pluripotenti.

1.2 La patologia: sindrome dell'intestino corto

La sindrome dell'intestino corto o *Short Bowel Syndrome* (SBS) in età pediatrica è definita come una condizione di malassorbimento e dismotilità intestinali la quale discende da rare malformazioni congenite (i.e. atresia intestinale, malrotazione e volvolo intestinale, gastroschisi ed onfalocele, morbo di Hirschsprung) o patologie acquisite (i.e. enterocolite necrotico-emorragica del prematuro, enterite da radiazioni, infarto mesenterico, neoplasie e traumi) che comportano come conseguenza la resezione chirurgica più o meno estesa dell'intestino tenue (dal 50% al 75%) sino, nei casi più gravi, ad insufficienza intestinale.

La SBS colpisce 24,5 bambini per 100.000 nati vivi. La resezione si associa ad una perdita importante della mucosa intestinale la quale, essendo preposta all'assorbimento dei nutrienti introdotti con il cibo, risulta insufficiente a svolgere tale funzione. Conseguenza diretta sono il malassorbimento con diarrea, la carenza di elettroliti, la disidratazione e l'instaurarsi di uno stato di malnutrizione. L'impatto e la severità della patologia dipendono sia dall'estensione del tratto coinvolto che dal sito della resezione (Goulet *et al.*, 2019; Boroni *et al.*, 2022).

1.2.1 Adattamento spontaneo

Nelle successive 24-48 h alla resezione si registra uno spontaneo processo di adattamento dell'intestino rimanente, atto ad aumentare la superficie della mucosa e la capacità di assorbimento; questo processo si protrae per 6-24 mesi. L'adattamento comprende sia cambiamenti strutturali che funzionali dell'intestino tenue: si registrano infatti un'aumentata espressione di proteine trasportatrici coinvolte nell'assorbimento di elettroliti, nutrienti ed acqua; una più veloce espressione, da parte degli enterociti, di enzimi digestivi e trasportatori di amminoacidi; una decelerazione del transito di cibo così da promuovere un contatto

prolungato con la mucosa intestinale, l'allungamento e la dilatazione dell'intestino e un'ipertrofia del muscolo liscio. In modelli animali si è inoltre osservata un'angiogenesi locale, responsabile di una maggiore ossigenazione tissutale; un'aumentata velocità di proliferazione delle cellule costituenti le cripte; una maggiore profondità delle cripte stesse oltre che dell'altezza dei villi. Queste modificazioni aumentano l'efficienza del tratto residuo di intestino, ottimizzando l'assorbimento dei nutrienti utili alla crescita del bambino; tuttavia, in alcuni pazienti possono portare a conseguenze che ricadono in un contesto di patologia. In particolare, la dilatazione dell'intestino può comportare dismotilità intestinale con stasi del materiale ingerito, ne conseguente sovra-crescita batterica a sua volta responsabile di infiammazione della mucosa ed alterato assorbimento, sensibilizzazione e allergie, colestasi e traslocazione batterica con l'instaurarsi di infezioni a carattere sistematico (Goulet *et al.*, 2019; Boroni *et al.*, 2022).

1.2.2 La gestione del paziente con SBS

Il trattamento della SBS tende alla promozione dell'adattamento spontaneo stimolando il tratto gastrointestinale con un'alimentazione per via orale ed enterale. La nutrizione per via orale presenta molti vantaggi, tra cui il mantenimento della capacità di suzione e deglutizione oltre che l'interesse psicologico verso il cibo, scoraggiando l'instaurarsi di eventuali disturbi alimentari. Inoltre, è di particolare rilievo l'allattamento al seno poiché il latte materno contiene numerosi fattori che supportano lo sviluppo del microbiota intestinale e del sistema immunitario del neonato. Fino a che la nutrizione orale e/o enterale non è sufficiente per sostenere la crescita corretta del bambino, è necessaria una nutrizione parenterale (PN) di supporto. L'alimentazione dovrebbe essere gradualmente aumentata in base alla tolleranza, valutata monitorando feci, vomito, irritabilità intestinale e distensione addominale/intestinale. Purtroppo, i pazienti affetti dal SBS possono incorrere nel rischio di malassorbimento di alcuni nutrienti anche molto tempo dopo aver smesso la PN, che deve essere necessariamente ripresa (Goulet *et al.*, 2019).

Gli approcci chirurgici alla SBS prevedono "l'allungamento intestinale" e, nei casi più gravi, il trapianto di intestino. L'allungamento intestinale è una chirurgia ricostruttiva che consente l'aumento del tratto intestinale riducendone la dilatazione (e l'eventuale eccessiva crescita batterica). Due sono le tecniche più utilizzate: la procedura secondo Bianchi e l'enteroplastica seriale trasversa. La procedura secondo Bianchi (detta anche LILT, *Longitudinal Intestinal Lengthening and Tailoring*) riduce il lume intestinale dell'intestino dilatato per raddoppiarne il tratto, a seguito di una incisione longitudinale a formare due segmenti, uno dei quali viene rimosso e unito al termine dell'altro. L'enteroplastica seriale trasversa (o STEP, *Serial Transverse Enteroplasty Procedure*), attraverso dei tagli, porta l'intestino ad assumere una forma a zig-zag con conseguente "allungamento", seppure a discapito del diametro del lume che risulta ridotto. La probabilità di non necessitare più della nutrizione parenterale dopo questi interventi chirurgici varia dal 54,9 al 71,5% per la LILT e dal 47,9 al 58,1% per la STEP.

Il trapianto intestinale è unicamente indicato come trattamento salvavita per i pazienti con un’insufficienza intestinale irreversibile che sviluppano complicanze letali come gravi episodi settici, perdita dell’accesso venoso per la NP, sbilanciamento di fluidi ed elettroliti e malattie epatiche allo stadio terminale. Infatti, la sopravvivenza a questo tipo di chirurgia è del 77% dopo un anno dall’impianto, del 58% dopo 5 anni. Nel 40% dei casi è comunque richiesta NP o la somministrazione di fluidi per via endovenosa.

1.3 Ingegneria tissutale

Ad oggi, nessuna delle opzioni chirurgiche descritte è del tutto scevra da criticità, sia nel breve che nel lungo periodo; purtroppo, ad esse si associano complicanze capaci di influire significativamente sulla qualità di vita dei pazienti. Al fine di colmare tali limiti, nuove strategie emergenti possono essere individuate in una nuova disciplina, l’ingegneria tissutale, che si propone l’allestimento di graft tissutali funzionalmente attivi capaci di sostituire il tratto intestinale compromesso da resezione. L’ingegneria tissutale è stata definita nel 1993 da R. Langer e J. P. Vacanti come una scienza multidisciplinare che sviluppa sostituti biologici in grado di ripristinare, mantenere o aumentare le funzioni di un tessuto. Questo nuovo tessuto può essere creato grazie al connubio di tre elementi: cellule, scaffold e fattori di crescita.

Le *cellule* sono l’elemento attivo nei processi di recupero delle funzionalità di un tessuto, poiché il loro ruolo è quello di aderire, proliferare e secernere matrice extracellulare (ECM). Le cellule impiegate nel campo dell’ingegneria tissutale possono essere classificate in diversi modi. Sulla base dell’origine, si distinguono cellule autologhe (proprie del paziente) o allogeniche (proprie di un altro individuo della stessa specie). In base al potenziale di differenziazione, si possono riconoscere cellule staminali o differenziate.

I *fattori di crescita* sono proteine che svolgono un ruolo chiave nei processi di proliferazione/differenziamento cellulare; di fatto “istruiscono” il comportamento cellulare sul supporto. Tra i metodi di produzione si includono la purificazione dai tessuti o l’ingegneria genetica. Tipicamente, vengono selezionati per l’utilizzo in base al tipo di tessuto che si intende allestire, mimando l’ambiente fisiologico.

Gli *scaffold* sono delle strutture-impalcatura tridimensionali la cui funzione è quella di fornire alle cellule un temporaneo sostegno meccanico-strutturale mimando le caratteristiche del sito di impianto. Essi devono presentare caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità, in quanto nel tempo dovranno promuovere la rigenerazione di nuovo tessuto lasciando spazio a questo stesso. I materiali utilizzati nell’ingegneria tissutale possono essere suddivisi in due grandi categorie: naturali e sintetici (Parveen, Krishnakumar and Sahoo, 2006).

1.3.1 Polivinil alcol ossidato

In questo lavoro si è scelto di utilizzare uno scaffold composito formato da un nuovo polimero sintetico detto polivinil alcol ossidato all’1% (OxPVA) e ECM

intestinale. Il PVA è già ampliamente utilizzato in ambito clinico grazie alla sua biocompatibilità e atossicità. Tuttavia, in tale forma, esso non è adatto per applicazioni di ingegneria tissutale in quanto non degrada dopo cross-linking. Per superare questa criticità, si è fatto ricorso ad una modifica chimica del polimero detta ossidazione. L'ossidazione del PVA, ottenuta in presenza di permanganato di potassio ($KMnO_4$) in ambiente acido per acido perclorico ($HClO_4$) introduce nuovi gruppi funzionali nel backbone della molecola (gruppi carbonilici), in sostituzione ad una certa percentuale (1%) dei gruppi ossidrilici presenti.

L'ossidazione permette la biodegradazione dell'OxPVA dopo crosslinking, ne modula le proprietà meccaniche e consente la sua funzionalizzazione a seguito di interazioni deboli o covalenti tra i gruppi amminici di proteine o peptidi e i gruppi carbonilici del polimero (Stocco *et al.*, 2017).

1.3.2 Matrice extracellulare

La matrice extracellulare è costituita da un pool di proteine strutturali e funzionali secrete dalle cellule di tutti i tessuti e riarrangiate in un'ultrastruttura 3D tessuto-specifica. Oltre alle funzioni meccaniche e strutturali dell'ECM, essa svolge un ruolo fondamentale nell'interazione con le cellule tessuto residenti essendo coinvolta in un'intensa attività di signalling mediata da vari componenti molecolari solubili e insolubili propri dell'ECM stessa. Pertanto, l'ECM non è solo un prodotto dell'attività cellulare, ma è anche un regolatore dell'attività cellulare stessa ed è quindi cruciale per la normale funzione fisiologica dei tessuti e degli organi.

La preparazione di bioscaffold costituiti da ECM per applicazioni di ingegneria tissutale e medicina rigenerativa avviene attraverso strategie di decellularizzazione del tessuto o dell'organo d'interesse. Il processo di decellularizzazione produce uno scaffold non immunogenico, costituito esclusivamente da molecole strutturali e funzionali proprie dell'ECM (Hussey, Keane and Badylak, 2017).

Con particolare riferimento all'intestino, l'ECM che lo costituisce è una struttura complessa dove le proteine stesse danno origine a compartimenti specifici quali la lamina basale (LB) e la matrice interstiziale (IM). Il matrisoma dell'ECM intestinale è costituito oltre 300 proteine, ciascuna con caratteristiche biochimiche peculiari e responsabili di funzioni biologiche specifiche. Il collagene ha una funzione strutturale, conferisce resistenza alla trazione e limita l'allungamento dell'organo; le glicoproteine (laminine, elastina, fibronectina) sono coinvolte nell'assemblaggio ECM e nell'interazione cellula-ECM mediante i recettori cellulari come le integrine. I proteoglicani (perlecano e decorina) e i glicosaminoglicani (hyaluronan) trattengono l'acqua nel tessuto, conferendo idratazione e intrappolando i fattori di crescita che influenzano il comportamento cellulare. L'ECM è una struttura dinamica in continuo rimodellamento grazie all'attività di enzimi specifici. Durante questo rimodellamento, l'ECM rilascia fattori di crescita che influenzano e regolano la funzione cellulare oltre alla deposizione di ECM stessa. Il crosstalk cellula-ECM è fondamentale per l'omeostasi fisiologica dell'intestino; tuttavia, non

c'è ancora una piena comprensione dei meccanismi alla base di questa (Pompili *et al.*, 2021).

2. Materiali e metodi

2.1 Preparazione degli scaffold

Gli esperimenti presentati in seguito sono stati eseguiti su scaffold compositi OxPVA all'1% e ECM intestinale acellulare sia integra (*whole intestinal wall* (wW)/OxPVA) che omogenizzata (*homogenized intestinal wall* (hW)/OxPVA), mentre per il controllo è stato usato uno scaffold di solo OxPVA.

2.1.1 Prelievo e decellularizzazione della matrice extracellulare intestinale

La ECM intestinale è stata ottenuta da ratti adulti Sprague Dawley (di peso 250-350 grammi) soppressi tramite eutanasia. L'incisione della cute è stata effettuata dal processo xifoideo alla sinfisi pubica del ratto e successivamente si è eviscerato l'intestino, prelevando il tratto dal ligamento di Treitz al cieco. L'intestino è stato quindi lavato con una soluzione di tampone fosfato salino (PBS) contenente penicillina e streptomicina al 2%. A seguire la decellularizzazione è stata eseguita sfruttando il metodo detergente-enzimatico: i campioni sono stati immersi in acqua distillata per 72 h a 4°C, cambiando l'acqua ogni 2 h, successivamente messi in una soluzione 4% sodio deossicolato per 4 h a temperatura ambiente (RT) e poi posti in una soluzione 1 M di NaCl con 2000 KU di DNasi I per 2 h a RT. Questa procedura è stata svolta per 2 volte consecutive.

2.1.2 Analisi istologiche

Per valutare la bontà della procedura di decellularizzazione sono state svolte analisi istologiche (colorazione con ematossilina ed eosina (H&E)) e di fluorescenza (staining con DAPI).

La colorazione con H&E è una colorazione bicromica che, dopo fissazione del campione in una soluzione di formalina al 10% e processazione dello stesso fino all'inclusione in paraffina, mostra al microscopio ottico DNA e componenti acide in blu/viola (ematossilina); strutture citoplasmatiche, collagene e componenti basiche in rosa (eosina).

Il DAPI è un composto organico fluorescente utilizzato per marcare il nucleo delle cellule in quanto si lega a regioni del DNA ricche in sequenze A-T. I campioni, prima di essere colorati ed osservati tramite microscopia a fluorescenza, sono stati immersi in isopentano freddo, congelati in fumi di azoto liquido e mantenuti a -80°C per 24 h, tagliati tramite criostato in fette di 4 µm di spessore poi fissate con acetone.

2.1.3 Preparazione della matrice extracellulare intestinale

Una volta confermata l'adeguatezza del protocollo di decellularizzazione, l'ECM intestinale è stata quindi utilizzata per la preparazione degli stati bioattivi degli scaffold wW/OxPVA e hW/OxPVA.

La matrice usata intera viene ottenuta aprendo longitudinalmente l'intestino tenue precedentemente tamponato con una garza sterile e tagliando dei campioni lunghi

1 cm tramite bisturi. Successivamente i campioni sono stati congelati a -20°C per renderli maggiormente manipolabili.

La matrice omogenizzata viene ottenuta da 1 g di tessuto decellularizzato immerso in 15 mL di una soluzione di acido acetico al 10%, all'interno di un tubo Falcon da 50 mL. Il sistema, posto in un bagno di ghiaccio per mantenere la temperatura a 0°C, è tritato con l'omogenizzatore Ultra-Turrax secondo un protocollo che prevede 8 tritazioni di 20 secondi ciascuna, con intervalli di 5 minuti tra un ciclo e l'altro. Successivamente 3,5 mL della sospensione sono stati prelevati e posti in una piastra Petri dal diametro di 60 mm, congelati a -20°C per una notte e poi liofilizzati.

2.1.4 Preparazione del polimero e allestimento degli scaffold

L'OxPVA all'1% è stato preparato sospendendo 1 g di polvere di PVA in 20 mL di acqua MilliQ, all'interno di una provetta in vetro pyrex con tappo a vite. Il sistema è stato scaldato a 100°C per 48 h con costante agitazione fino a che il polimero non è risultato totalmente sciolto. Il processo di ossidazione parziale è stato svolto utilizzando 5 mL di una soluzione acquosa di KMnO₄ (2,9 mg/mL) e 0,3 mL di HClO₄ al 70%. La reazione è stata condotta per un'ora a 30°C, fino a che la soluzione non è risultata limpida.

Gli *scaffold* compositi sono stati preparati versando 3,5 mL di OxPVA in una piastra Petri dal diametro di 60 mm e poi adagiando sopra la ECM intera (con i villi rivolti verso l'alto) od omogenizzata. Successivamente, l'integrazione delle componenti sintetica e biologica è avvenuta mediante *crosslinking* fisico (*freeze-thawing* (FT)) dove i campioni sono stati congelati (-20 °C) e scongelati (-2,5°C) per 7 volte. Gli scaffold sono stati conservati a -20°C fino all'utilizzo. Un punch sterile con diametro pari a 7mm è stato quindi utilizzato per ottenere gli *scaffold* discoidali utili alle analisi descritte in seguito.

Scaffold di controllo, costituiti da solo OxPVA, sono stati preparati in modo analogo senza l'accoppiamento con lo strato di matrice.

2.1.5 Caratterizzazione morfologica ed ultrastrutturale degli scaffold

Gli scaffold sono stati caratterizzati attraverso approcci di istologia e di microscopia elettronica a scansione (SEM). L'analisi istologica mediante H&E è stata condotta come descritto in precedenza; la preparazione dei campioni per l'analisi ultrastrutturale al SEM ha previsto le seguenti fasi: fissazione in soluzione di glutaraldeide (25%) in tampone cacodilato per 2 giorni a RT; disidratazione con scala ascendente di alcoli; critical point drying (o essiccazione al punto critico, è il metodo più avanzato per la disidratazione e la preservazione della morfologia del campione biologico), coating o metallizzazione dei campioni con particelle d'oro al fine di renderli conduttori.

2.2 Valutazione delle proprietà biologiche degli scaffold *in vitro*

Per valutare l’interazione scaffold/cellule, i tre tipi di scaffold (wW/OxPVA, hW/OxPVA e OxPVA) sono stati seminati con cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo. Secondo protocolli di routine, le cellule erano state precedentemente scongelate ed espanso in medium di coltura contenente αMEM (alpha-modified Eagle’s medium without nucleosides), siero fetale bovino 15% e soluzione antibiotica 1%.

Gli scaffold, dopo essere stati disinfezati tramite 4 lavaggi di 2 h in PBS con soluzione antibiotica 2%, sono stati incubati per una notte in terreno basale e successivamente seminati con 20.000 cellule/cm². Come controllo sono state seminate delle cellule in una piastra da 48 pozetti.

A 7 giorni dalla semina è stata valutata la proliferazione delle cellule sugli scaffold attraverso saggio con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Il saggio MTT sfrutta l’attività metabolica delle cellule come misura della loro vitalità. Il sale di tetrazolo, giallo, viene ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali di cellule vitali a cristalli viola di formazano, insolubili. I cristalli sono stati estratti mediante l’impiego del solvente organico propan-2-olo acido (0,04 M HCl in propan-2-olo) e successivamente analizzati allo spettrofotometro con lettura dell’assorbanza a 570nm. Il valore di assorbanza sarà direttamente proporzionale alla vitalità cellulare.

2.3 Comportamento degli scaffold *in vivo*

2.3.1 Chirurgia: impianto ed espianto degli scaffold

I tre tipi di scaffold (wW/OxPVA, hW/OxPVA e OxPVA) sono stati impiantati in 5 ratti Sprague Dawley ciascuno, per un totale di 15 animali. L’impianto è stato eseguito previa anestesia gassosa con isofluorano e ossigeno quindi, dopo aver praticato un’incisione dal processo xifoideo alla sinfisi pubica, gli scaffold sono stati suturati all’omento e la parete addominale è stata poi richiusa tramite punti riassorbibili. Dopo l’operazione ai ratti è stato fornito un anti-infiammatorio (Rimadyl) e un antibiotico (Baytril).

L’espianto è stato eseguito dopo 4 settimane dalla chirurgia previa eutanasia.

2.3.2 Analisi istologiche ed immunologiche

Subito dopo l’isolamento, gli espianti sono stati fissati con una soluzione di formalina al 10% in PBS e processati come descritto in precedenza, prima di procedere con l’analisi istopatologica mediante approcci di istologia ed immunoistochimica.

L’istologia ha previsto una colorazione con H&E. L’analisi immunoistochimica è una tecnica ampiamente utilizzata per l’identificazione e la localizzazione istologica di antigeni e di costituenti cellulari *in situ* come proteine, carboidrati e lipidi mediante l’impiego di anticorpi.

La caratterizzazione immunologica è stata effettuata con Dako AutoStainer/AutoStainer Plus (Dako) con i seguenti anticorpi diluiti in EnVisionTM FLEX: a) Rabbit Anti-Human CD3 (1:1000) (Dako); b) Rabbit Anti-Mouse F4/80 (1:800) (Santa Cruz); c) Rabbit Anti-Human Ki-67 (1:200) (Spring Bioscience, UCS Diagnostic, Roma, Italia); d) Rabbit Anti-Desmina (1:400) (AnaSpec, San Jose, California, USA), Mouse Monoclonal; e) Anti-aSMA (1:500) (Sigma, Missouri, USA); f) Mouse Anti-Human MNF116 (1:200) (Dako). Dopo smascheramento degli epitopi, le sezioni sono state incubate per 5 min con Peroxidase-blocking Serum (EnVisionTM FLEX Peroxidase-Blocking Reagent; Dako) al fine di rimuovere i legami aspecifici e per 30 min con l'anticorpo primario. Le sezioni trattate con Anti-aSMA, Anti-Desmina, Anti-Ki-67 e Anti-MNF116 sono state quindi incubate con i corrispettivi anticorpi secondari per 15 min (EnVisionTM FLEX Mouse-Linker ed EnVisionTM FLEX Rabbit-Linker; Dako). Per tutti i protocolli è stato utilizzato il polimero EnVisionTM FLEX/HRP per 20 min e 3,3'-diaminobenzidina (EnVisionTM FLEX Substrate Buffer, + DAB + Chromogen; Dako) al fine di mettere in evidenza la positività della reazione. Tutte le sezioni sono state infine contro-colorate con ematossina (EnVisionTM FLEX Hematoxylin, Dako) per 5 min al fine di marcare i nuclei cellulari, de-idratate con una scala discendente di alcoli, xylene e montati. Tutti gli step sono stati effettuati a RT.

2.4 Analisi statistica

I risultati sono espressi come media ± Deviazione Standard (SD). I dati sono stati elaborati utilizzando SPSS v. 19,0 software (SPSS Inc., USA). L'analisi statistica per valutare le differenze tra i gruppi è stata effettuata in due fasi: prima, i dati sono stati confrontati con il test non-parametrico di Kruskal-Wallis; se sono state trovate differenze significative, i gruppi sono stati confrontati individualmente utilizzando il test U di Mann-Whitney; $p < 0,05$ è stato considerato significativo.

3. Risultati

3.1 Preparazione e caratterizzazione delle matrici extracellulari

Durante la decellularizzazione, il tessuto intestinale ha subito un progressivo sbiancamento, fino a risultare traslucido (Figura 1b); è stata notata inoltre una perdita non trascurabile delle proprietà meccaniche, in quanto il lume intestinale tendeva a collassare verso l'interno.

Garantire l'efficacia della decellularizzazione è di fondamentale importanza: rimuovere la componente immunogenica dall'ECM evita l'insorgere di reazioni immunitarie severe come il rigetto, riconducibili al riconoscimento da parte dell'ospite di cellule/materiale non-self. Comparando le analisi istologiche e di fluorescenza effettuate sull'intestino decellularizzato versus il nativo (Figura 1c-f), è stata riscontrata un'adeguata rimozione degli elementi cellulari (Figura 1f) e il mantenimento dell'organizzazione del tessuto (Figura 1d): come mostrato dalla colorazione con H&E sono ancora riconoscibili villi e ghiandole, oltre a residui di tunica sierosa e inserzioni del mesentere.

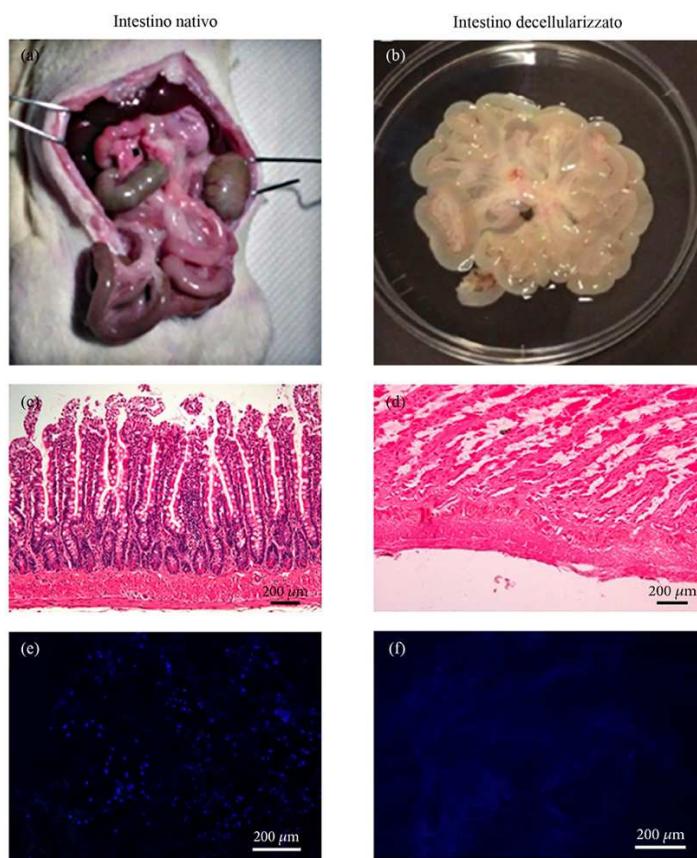


Figura 1: Aspetto macroscopico intestino tenue nativo (a) e decellularizzato (b). Colorazione con ematossilina ed eosina dell'intestino nativo (c) e decellularizzato (d). Colorazione nucleare con DAPI dell'intestino nativo (e) e decellularizzato (f).

3.2 Scaffold compositi

La Figura 2 confronta gli scaffold OxPVA, wW/OxPVA e hW/OxPVA prima dell’impianto. Macroscopicamente l’aspetto dei campioni è pressoché sovrapponibile. In particolare, gli scaffold compositi mostrano un accoppiamento stabile ECM/OxPVA, garantito da un adeguato processo di crosslinking.

Grazie alle analisi istologiche è stato osservato che la struttura tridimensionale della matrice intestinale è rimasta parzialmente preservata nello scaffold wW/OxPVA (Figura 2e), mentre, come atteso, nello scaffold hW/OxPVA, si mostra come un pool proteico disorganizzato e più sottile (Figura 2f). In tutti i supporti, lo strato di OxPVA presenta un profilo regolare (Figure 2d, e, f).

Le analisi al SEM confermano le precedenti osservazioni, mostrando sia per wW/OxPVA che per hW/OxPVA un aspetto spugnoso, idoneo a promuovere adesione e proliferazione cellulare. Lo scaffold di controllo (OxPVA) presenta una certa rugosità superficiale solo ad alto ingrandimento.

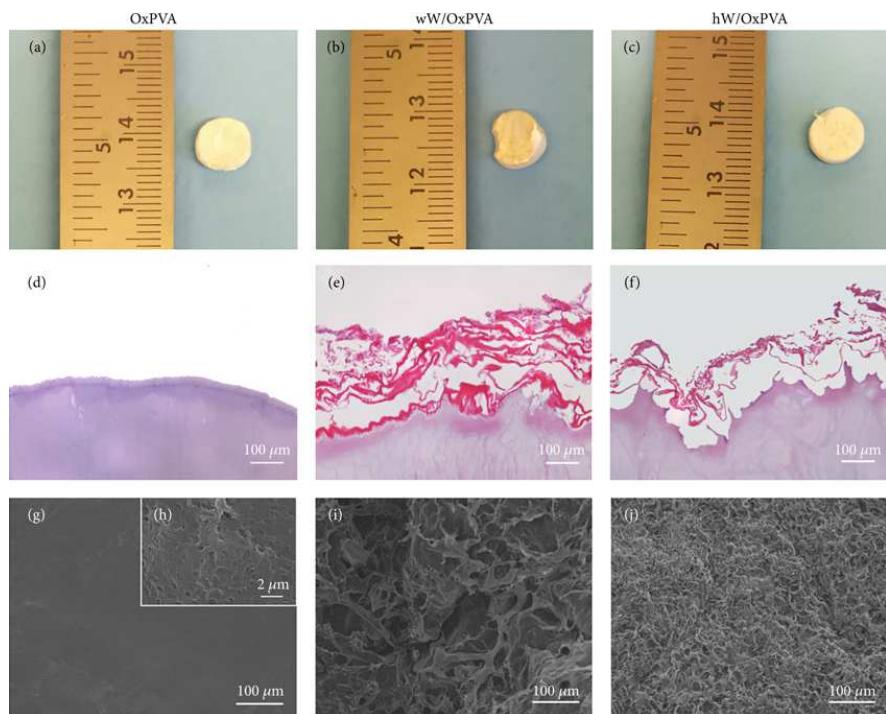


Figura 2: Aspetto macroscopico degli scaffold (a–c). Analisi istologiche (d–f) e con SEM (g–j) degli scaffold compositi (wW/OxPVA e hW/OxPVA) e del controllo (OxPVA).

3.2.1 Valutazione dell’interazione scaffold/cellule

Osservando il comportamento delle cellule sui supporti a 7 giorni dalla semina, è stata notata una proliferazione maggiore sugli scaffold compositi rispetto ai supporti di OxPVA (Figura 3). Il polimero sintetico, tal quale, non induce adesione cellulare.

Comparando tra loro gli scaffold compositi, wW/OxPVA mostra una bioattività significativamente maggiore rispetto a hW/OxPVA (p value > 0,01).

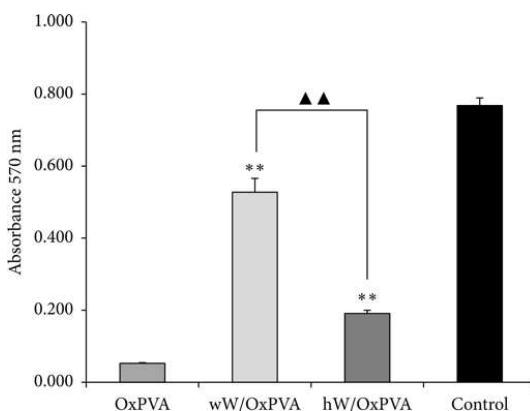


Figura 3: Saggio MTT su OxPVA, wW/OxPVA e hW/OxPVA dopo 7 giorni dalla semina (**p value < 0,01 wW/OxPVA e hW/OxPVA contro OxPVA; ▲▲p value > 0,01 wW/OxPVA contro hW/OxPVA).

3.2.2 Valutazione degli scaffold dopo impianto *in vivo*

Il microambiente peritoneale è importante nell’ingegneria tissutale dell’intestino tenue, quindi gli scaffold semplici (OxPVA) e compositi (wW/OxPVA, hW/OxPVA) sono stati suturati all’omento.

Dopo la chirurgia, nessun animale ha mostrato l’insorgenza di complicanze dovute all’intervento stesso. Al momento dell’espianto, tutti gli scaffold erano riconoscibili e non si sono osservate reazioni infiammatorie severe, suggerendone la biocompatibilità e l’adeguatezza del protocollo di decellularizzazione.

L’istoarchitettura dei campioni espintati è stata valutata tramite colorazione con H&E. Nelle sezioni è stata riscontrata la presenza dell’OxPVA dopo 4 settimane dall’impianto, con parziali note di riassorbimento delle porzioni superficiali: gli aspetti di degradazione prevalente si sono identificati negli impianti costituiti da wW/OxPVA (Figura 4).

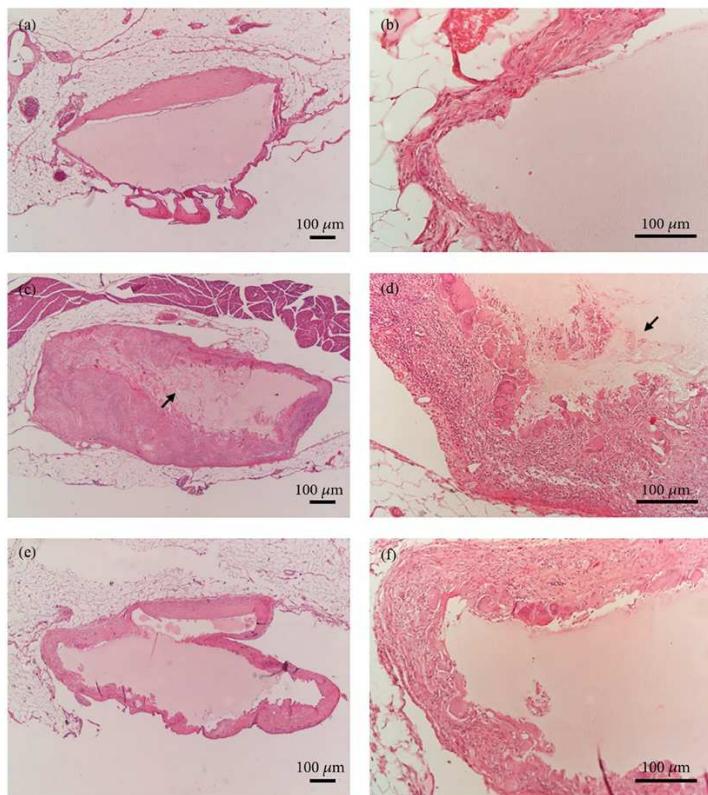


Figura 4: Caratterizzazione istologica degli espianti con ematossilina ed eosina. OxPVA (a, b), wW/OxPVA (c, d), hW/OxPVA (e, f). Le frecce nere indicano le zone di degradazione dell’OxPVA nello scaffold. wW/OxPVA.

Per indagare l’acquisizione di caratteristiche simil-intestinali (i.e., simil-muscolari e simil-epiteliali) da parte dei supporti impiantati, sono state eseguite reazioni immunoistochimiche specifiche. Gli scaffold wW/OxPVA e hW/OxPVA hanno mostrato una positività per desmina e α -SMA, suggerendo la presenza di miofibroblasti e/o cellule muscolari lisce; mentre, nel tessuto attorno al supporto di OxPVA la positività è risultata molto blanda o assente. Inoltre, le analisi istologiche hanno evidenziato la presenza di cellule adiacenti allo strato di OxPVA in entrambi gli scaffold wW/OxPVA e hW/OxPVA. Tali cellule hanno una forma cubica o cilindrica, con nuclei disposti sul versante basale, riferibili a cellule epiteliali anche in ragione della reattività immunoistochimica, negativa per desmina, α -SMA, CD3 e F4/80 ma parzialmente positiva per la citocheratina (Figura 5). Sono anche state osservate delle invaginazioni nello strato epiteliale di varie dimensioni assomiglianti a delle cripte; tuttavia, ma non sono state identificate cellule specializzate (cellule di Paneth, cellule enteroendocrine, cellule mucipare caliciformi) né strutture riconducibili a villi.

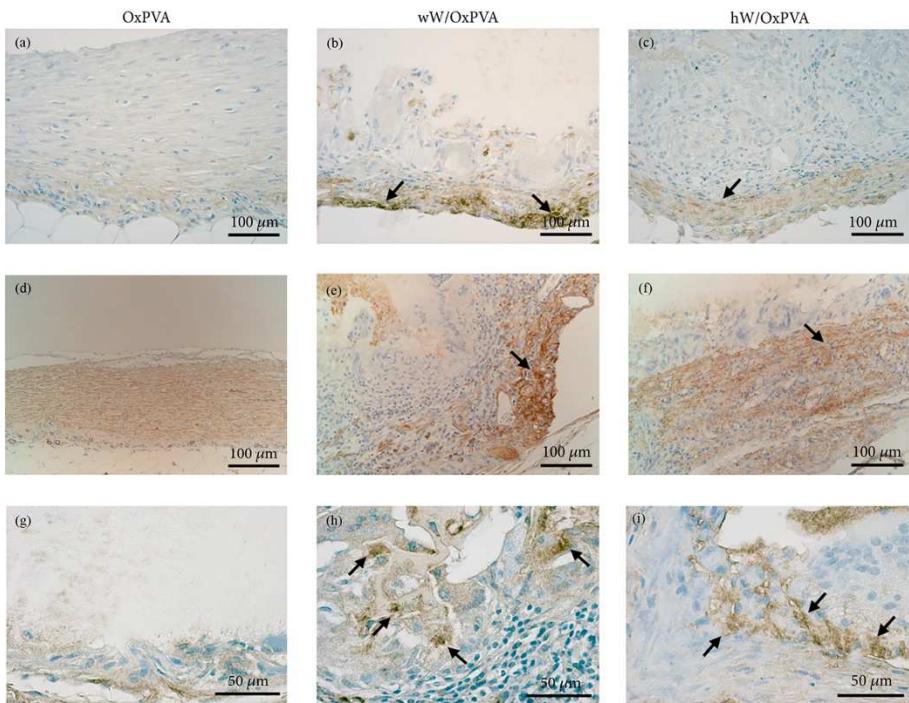


Figura 5: Caratterizzazione immunoistochimica degli espianti. Localizzazione delle cellule positive a desmina (a - c), α -SMA (d - f), citokeratina (g - j) in OxPVA, wW/OxPVA e hW/OxPVA dopo 12 settimane dall’impianto.

La valutazione della reazione infiammatoria innescata dall’impianto è stata analizzata mediante marcatura immunoistochimica delle cellule linfo-monocitarie. Considerando gli scaffold wW/OxPVA e hW/OxPVA, linfociti ($CD3^+$) e macrofagi ($F4/80^+$) sono stati prevalentemente identificati in periferia; nessuna positività negli strati adiacenti al polimero. Pressoché nulla l’infiltrazione di elementi linfo-monocitari nel tessuto intorno agli scaffold di OxPVA.

Negli strati più esterni rispetto agli impianti in wW/OxPVA e hW/OxPVA e nel tessuto connettivo attorno a OxPVA sono state osservate strutture vascolari con un epitelio organizzato ed evidenze di angiogenesi locale.

Lo stimolo induttivo degli scaffold impiantati sulla proliferazione cellulare è stato studiato tramite localizzazione immunoistochimica dell’antigene nucleare Ki-67. L’analisi ha evidenziato elevata crescita cellulare a carico delle popolazioni linfoцитarie-macrafagiche. Si apprezza inoltre moderata proliferazione cellulare a carico degli elementi connettivali e miofibroblastici. A carico della componente epiteliale, la popolazione Ki-67+, seppur presente, è minoritaria (Figura 6).

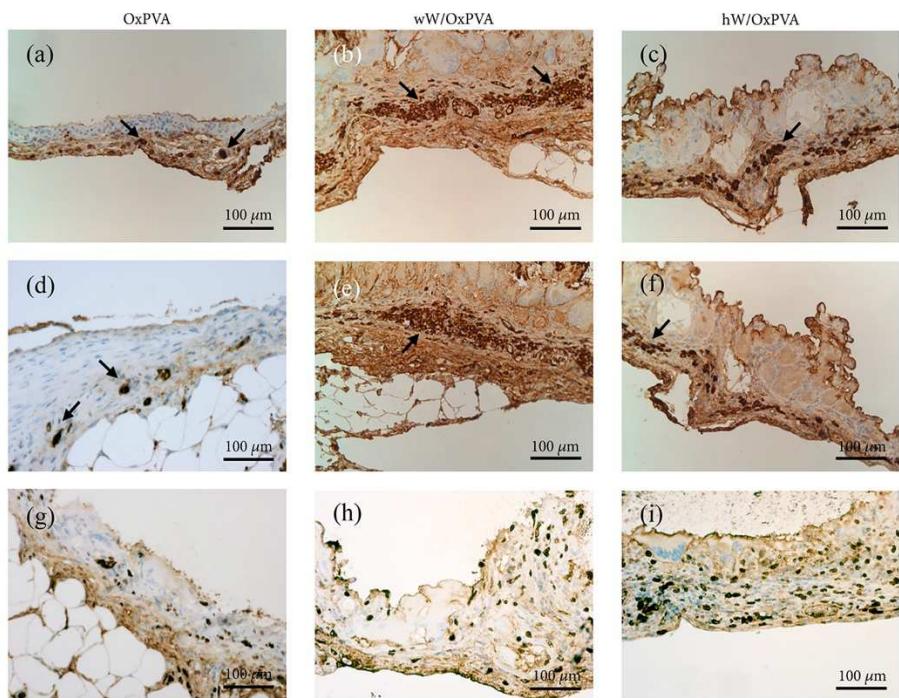


Figura 6: Caratterizzazione immunoistochimica degli espianti. Localizzazione delle cellule positive a CD3 (a - c), F4/80 (d - f), Ki-67 (g - j) in OxPVA, wW/OxPVA e hW/OxPVA.

4. Discussione e conclusione

L’obiettivo di questo lavoro era quella di confrontare due scaffold compositi (wW/OxPVA e hW/OxPVA) con lo scopo di individuare le premesse utili per l’allestimento di un sostituto tissutale intestinale ingegnerizzato come alternativa agli approcci attuali nel trattamento della SBS.

Come comprovato dalla colorazione con H&E e marcatura nucleare con DAPI, la procedura di decellularizzazione si è dimostrata efficace portando all’ottenimento di un tessuto acellulare; ciò è fondamentale al fine di garantire la non-immunogenicità dei campioni. Istologia e fluorescenza sono tuttavia delle metodiche di carattere qualitativo; in prospettiva, esse potrebbero essere ulteriormente supportate da un’indagine quale la quantificazione del DNA, al fine di verificare l’assenza di materiale genetico residuo.

In relazione alla durata del processo di allestimento degli scaffold, sarebbe utile sperimentare una strategia di stoccaggio dei device per predisporre dei dispositivi “on-the-bench” prontamente disponibili.

Sono state fatte delle indagini *in vitro* per testare le proprietà biologiche degli scaffold seminando Ad-MSC su di essi. La matrice intestinale acellulare è risultata necessaria per garantire il ripopolamento del device; lo scaffold di controllo composto solo da OxPVA non ha mostrato caratteristiche di bioattività *in vitro*. Inoltre, la struttura tridimensionale dell’ECM “intera” si è rivelata fondamentale per promuovere adesione e proliferazione cellulare; la colonizzazione dei supporti si è dimostrata significativamente maggiore negli scaffold wW/OxPVA rispetto ai supporti hW/OxPVA.

Nell’ambito dello studio di caratterizzazione dei device, potrebbe essere interessante studiarne il profilo di biodegradazione sia *in vitro* (analogamente a (Jwo *et al.*, 2013)) che *in vivo*. Ciò consentirebbe una previsione più precisa del comportamento degli scaffold in relazione alla percentuale di degradazione. In particolare, valutare il livello di degradazione in un microambiente simile a quello presente nell’omento, aiuterebbe il ricercatore ad acquisire una maggiore consapevolezza in merito al tempo di riassorbimento del polimero stesso valutando se questo sia sufficiente a favorire una crescita cellulare adeguata.

Gli scaffold sono stati ulteriormente testati *in vivo* attraverso l’impianto nell’omento di ratto. Le analisi confermano i test *in vitro*, dimostrando come gli scaffold con ECM siano più idonei alla formazione di un epitelio simile a quello intestinale, oltre che alla ricellularizzazione e alla promozione dell’angiogenesi locale.

In letteratura, la maggior parte degli studi che considera strategie di rigenerazione intestinale propone l’impiego scaffold tubulari; diversamente in questo articolo è stato utilizzato uno scaffold a forma discoidale. Anche Wulkersdorfer e colleghi hanno utilizzato un supporto con tali caratteristiche costituito da acido poliglicolico/Matrigel quindi seminato con unità organoidi (un aggregato di cellule mesenchimali ed epiteliali estratte da intestino nativo). A quattro settimane dalla chirurgia (impianto sottocute in ratti) gli autori hanno osservato una crescita della

mucosa con un'architettura complessa (Wulkersdorfer *et al.*, 2011). Questi dati suggeriscono che gli scaffold a forma discoidale possono essere altrettanto adatti nel rispondere all'obiettivo dello studio.

In conclusione, lo studio ha dimostrato la validità degli scaffold wW/OxPVA e hW/OxPVA; in particolar modo, la matrice decellularizzata (in entrambe le forme, intera e liofilizzata) si è distinta per una bioattività intrineseca, seppur maggiore nel caso in cui sia preservata l'istoarchitettura dell'intestino. Ricerche future potrebbero essere volte allo studio di tali scaffold compositi dopo caricamento con molecole bioattive (EGF, IGF-I, GLP-2, HGF e transferrina) utili a supportare il processo di rigenerazione. La funzionalizzazione potrebbe sfruttare le caratteristiche chimiche dell'OxPVA il quale, in virtù della presenza di gruppi carbonilici, potrebbe agire come un interessante drug-delivery system.

Bibliografia

Boroni, G. *et al.* (2022) ‘Autologous Intestinal Reconstruction Surgery in Short Bowel Syndrome: Which, When, and Why’, *Frontiers in Nutrition*, 9, p. 861093. doi.org/10.3389/fnut.2022.861093.

Goulet, O. *et al.* (2019) ‘Short Bowel Syndrome as the Leading Cause of Intestinal Failure in Early Life: Some Insights into the Management’, *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*, 22(4), p. 303. doi.org/10.5223/pghn.2019.22.4.303.

Hussey, G.S., Keane, T.J. and Badylak, S.F. (2017) ‘The extracellular matrix of the gastrointestinal tract: a regenerative medicine platform’, *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 14(9), pp. 540–552. doi.org/10.1038/nrgastro.2017.76.

Jwo, S.-C. *et al.* (2013) ‘Tubular scaffolds of gelatin and poly(ϵ -caprolactone)-block-poly(γ -glutamic acid) blending hydrogel for the proliferation of the primary intestinal smooth muscle cells of rats’, *Biomedical Materials*, 8(6), p. 065002. doi.org/10.1088/1748-6041/8/6/065002.

Parveen, S., Krishnakumar, K. and Sahoo, S. (2006) ‘New era in health care: tissue engineering’, *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine*, 1(1), pp. 8–24.

Pompili, S. *et al.* (2021) ‘The Charming World of the Extracellular Matrix: A Dynamic and Protective Network of the Intestinal Wall’, *Frontiers in Medicine*, 8, p. 610189. doi.org/10.3389/fmed.2021.610189.

Stocco, E. *et al.* (2017) ‘Partially oxidized polyvinyl alcohol as a promising material for tissue engineering’, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(7), pp. 2060–2070. doi.org/10.1002/term.2101.

Wulkersdorfer, B. *et al.* (2011) ‘Growth Factors Adsorbed on Polyglycolic Acid Mesh Augment Growth of Bioengineered Intestinal Neomucosa’, *Journal of Surgical Research*, 169(2), pp. 169–178. doi.org/10.1016/j.jss.2009.11.719.

Mescher (2020) ‘Junqueira-Istologia, Testo e Atlante’, *Piccin Nuova Libraria S.p.A.*, pp. 298-320

Appendice

Grandi, F. *et al.* (2018) ‘Composite Scaffolds Based on Intestinal Extracellular Matrices and Oxidized Polyvinyl Alcohol: A Preliminary Study for a New Regenerative Approach in Short Bowel Syndrome’, *BioMed Research International*, 2018, p. 7824757. https://doi.org/10.1155/2018/7824757.

Research Article

Composite Scaffolds Based on Intestinal Extracellular Matrices and Oxidized Polyvinyl Alcohol: A Preliminary Study for a New Regenerative Approach in Short Bowel Syndrome

Francesca Grandi,¹ Elena Stocco ,^{2,3} Silvia Barbon ,^{3,4} Anna Rambaldo,² Martina Contran,² Francesco Fascetti Leon,¹ Piergiorgio Gamba,¹ Pier Paolo Parnigotto,³ Veronica Macchi,² Raffaele De Caro,² and Andrea Porzionato 

¹Department of Women's and Children's Health, Pediatric Surgery, University of Padua, Via Giustiniani 3, 35121 Padua, Italy

²Section of Human Anatomy, Department of Neurosciences, University of Padua, Via Gabelli 65, 35121 Padua, Italy

³Foundation for Biology and Regenerative Medicine, Tissue Engineering and Signaling (TES) ONLUS, Via De Sanctis 10, Caselle di Selvazzano Dentro, 35030 Padua, Italy

⁴Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padua, Via Marzolo 5, 35131 Padua, Italy

Correspondence should be addressed to Andrea Porzionato; andrea.porzionato@unipd.it

Received 30 November 2017; Accepted 17 April 2018; Published 27 May 2018

Academic Editor: Ming-Fa Hsieh

Copyright © 2018 Francesca Grandi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Pediatric Short Bowel Syndrome is a rare malabsorption disease occurring because of massive surgical resections of the small intestine. To date, the issues related to current strategies including intestinal transplantation prompted the attention towards tissue engineering (TE). This work aimed to develop and compare two composite scaffolds for intestinal TE consisting of a novel hydrogel, that is, oxidized polyvinyl alcohol (OxPVA), cross-linked with decellularized intestinal wall as a whole (wW/OxPVA) or homogenized (hW/OxPVA). A characterization of the supports was performed by histology and Scanning Electron Microscopy and their interaction with adipose mesenchymal stem cells occurred by MTT assay. Finally, the scaffolds were implanted in the omentum of Sprague Dawley rats for 4 weeks prior to being processed by histology and immunohistochemistry (CD3; F4/80; Ki-67; desmin; α -SMA; MNF116). *In vitro* studies proved the effectiveness of the decellularization, highlighting the features of the matrices; moreover, both supports promoted cell adhesion/proliferation even if the wW/OxPVA ones were more effective ($p < 0.01$). Analysis of explants showed a continuous and relatively organized tissue wall around the supports with a connective appearance, such as myofibroblastic features, smooth muscle, and epithelial cells. Both scaffolds, albeit with some difference, were promising; nevertheless, further analysis will be necessary.

1. Introduction

Pediatric Short Bowel Syndrome (SBS) is a rare malabsorption condition with high morbidity and mortality rates in children [1–4]. It may be congenital [5–8], but more often it is the consequence of massive surgical resections of the small intestine [9, 10] ascribable to midgut volvulus, necrotizing enterocolitis, vascular thrombosis, mesenteric tumor, or abdominal trauma [11–13]. The loss of over 50%–75% of normal small bowel length results in a significantly decreased functional absorptive area of the intestine, which determines

a broad diversity of metabolic and physiologic disturbances (i.e., weight loss, dehydration, and vitamin deficiencies) [11, 14–18]. To date, most patients are initially managed with total parental nutrition; nevertheless, over time, they may incur in high risk of catheter-related septicemia and parental nutrition-associated liver disease [18–20]. Other methods to treat SBS include surgical procedures such as longitudinal intestinal lengthening and tapering (LILT) or serial transverse enteroplasty (STEP) up to heterotopic small bowel transplantation but all of them have carried significant limitations and risks [21]. Thus, new treatment strategies

should be searched and to this purpose the field of tissue engineering (TE) may be promising [22, 23].

As the severity of malabsorption depends on the residual bowel length, creating new bowel to increase intestinal length is a challenge that must be addressed. In 1997, Choi and Vacanti [24] first reported the development of a Tissue Engineered Small Intestine (TESI). It was manufactured employing multicellular aggregates derived from rat intestine and containing both mucosal and mesenchymal elements (i.e., organoid units (OUs)) which were seeded onto a porous synthetic biodegradable polymer scaffold made of polyglycolic acid (PGA). Since that moment, many other authors investigated the efficiency of the interaction between the intestinal OUs and the scaffolds. Supports, in the form of discs [25], or tubes were made of (a) PGA [25, 26], (b) copolymer [poly(lactic-co-glycolic acid)] (PLGA) [27], and (c) PGA coated with poly-L-lactic acid (PLLA) and Collagen Type I [11, 14, 16, 28–38]. Following seeding with intestinal OUs (thirty minutes up to an hour and a half later), the tubular scaffolds were implanted in the *omentum*. Interestingly, Lloyd and Colleagues [27] also described the lumen injection with the OUs after 4 weeks from the implantation. Thus, after a variable period (3 or 6 weeks), the neo-formed cyst-like structures were opened longitudinally and anastomized to jejunum [14, 28, 29, 31, 32, 39, 40] or to the large intestine [40] and the outcome was analyzed at different end-points up to 56 weeks [29] considering neomucosa growth and its architecture.

Despite the encouraging results with the use of OUs, difficult clinical scenarios could arise; in fact, a substantial quantity of healthy intestine is required to obtain an adequate number of OUs to be seeded onto the biodegradable polymer [17, 35]. Moreover, to date, the materials selection for TESI is restricted to PGA, PLGA, and PGA coated with poly-L-lactic acid (PLLA) and Collagen Type I. Interestingly, Boomer and Colleagues [41] investigated, in a preliminary study, the possibility of using other polymers (poly(ϵ -caprolactone) (PCL), poly(d-lactic acid-co-glycolic acid) (PDLGA), and polyurethane (PU)) but the formation of intestinal tissue was not considered, as the work aimed at a characterization of different scaffold materials to identify which one best suited TESI production from an histological, mechanical, and biodegradative point of view. The use of supports based on collagen rather than decellularized intestinal extracellular matrix (ECM) was analyzed [42–44] but, to our knowledge, the combination with a synthetic biomaterial was never reported in literature.

To overcome the limitations in the panorama of TESI, the aim of this study was to preliminarily investigate the potentiality of a novel composite scaffold for TESI without resorting to OUs. In particular, we manufactured a support that combines the biological features of intestinal ECM (considered as whole or homogenized/lyophilized) with the mechanical properties of a novel biocompatible and resorbable hydrogel developed by our research group, that is, 1% oxidized polyvinyl alcohol (OxPVA). OxPVA derived from oxidation of polyvinyl alcohol (PVA) by potassium permanganate in diluted perchloric acid [45]. Oxidation allows reengineering the polymer, improving its

degradation and drug-release properties after cross-linking by freeze-thawing. To date, we experienced the suitability of OxPVA-derived hydrogels for the manufacture of cartilage scaffolds as well as for their drug-delivery properties. OxPVA scaffolds were loaded with a model protein (i.e., bovine serum albumin (BSA)) or bioactive growth factors (i.e., tumor necrosis factor- β [45]; transactivator transduction domain-ciliary neurotrophic factor [46]). Intrinsic properties of the scaffolds vary along with the oxidation degree; hence, modulating the stoichiometry of the oxidative reaction, it is possible to obtain PVA-derived polymers that can be used to prepare scaffolds with different biodegradative and bioactive properties in accordance with the tissue to be regenerated. This peculiar characteristic gives to OxPVA the ability to mimic different types of tissues, being extremely interesting for tissue engineering purposes.

2. Materials and Methods

2.1. Scaffolds Preparation. Two different composite scaffolds were prepared. Those were based on 1% OxPVA combined with decellularized intestinal mucosa as a whole (wW/OxPVA) or homogenized (hW/OxPVA). Scaffolds of OxPVA were used as control.

2.1.1. Sampling and Decellularization of Intestinal Extracellular Matrix. All animal procedures were approved by the ethical committee of Padua University, in agreement with the guidelines of the Italian Department of Health.

Adult Sprague Dawley rats, weighing approximately 250–350 g, were euthanized by carbon dioxide asphyxiation. After shaving the abdomen, a middle incision extending from the xiphoid process to the symphysis *pubis* was performed. Afterwards, the small intestine was eviscerated, dissolving the adhesions to the large intestine, and the stretch ranging from the ligament of Treitz to the *caecum* was taken. After washing carefully with PBS supplemented with a 2% solution of penicillin and streptomycin, decellularization occurred according to the detergent-enzymatic method by [47]. Briefly, samples were soaked in distilled water for 72 h at 4°C, changing the aqueous solution every 2 h, 4% sodium deoxycholate for 4 h at room temperature (RT), and 2,000 KU (Kunitz Units) DNase-I in 1 M NaCl for 2 h at RT. The procedure was repeated for 2 times and the effectiveness of the procedure was evaluated through histological analysis.

2.1.2. Histological Analysis. Specimens of decellularized small intestine were soaked in cold isopentane, frozen in liquid nitrogen fumes, and maintained at –80°C for 24 h. Thereafter ice-included fragments were sliced in 4 μ m slices using a cryomicrotome (Leica CM 1850 UV). The slices were fixed with acetone and mounted with VECTASHIELD mounting medium for fluorescence with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). In parallel, decellularized samples were fixed in 10% formalin solution in neutral PBS, paraffin-embedded, and stained also with hematoxylin and eosin according to routine protocols.

2.1.3. Preparation of Intestinal Matrices. The decellularized small intestine was carefully dried using a sterile gauze to remove excess water. To obtain wW, the tissue was carefully laid down into a culture plate and then opened longitudinally, turning the *lumen* outwards. Thereafter, 1 cm long samples were cut using a surgical blade and frozen at -20°C to make them more manageable. In parallel, hW was also prepared as previously described [48]. Briefly, a preweighted quantity of decellularized ECM (1 gr) was soaked with 15 mL of 10% acetic acid solution (2.5 M) in deionized water (dH₂O) and homogenized at 0°C using Ultra-Turrax homogenizer (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Germany) 8 times/20 sec with intervals of 5 min. Then, a volume of 3.5 mL of the obtained suspension was poured into moulds (Petri dishes, diameter: 60 mm) and frozen at -20°C overnight before lyophilizing.

2.1.4. Polymer Preparation and Manufacture of the Composite Scaffold. Scaffolds were prepared combining wW and hW, respectively, with a polymeric solution of OxPVA, which was obtained according to a controlled chemical oxidation [45]. Thus, composite scaffolds were prepared, pouring a volume of 3.5 mL of OxPVA into a P60 culture plate and setting down carefully the wW and hW, respectively, prepared as previously described; the wW was laid with the villi facing out. Thereafter, the hydrogel and the ECMs were physically cross-linked according to a freezing-thawing (FT) process, which allowed embedding the matrix upon the scaffold and obtaining the cryogel. The FT process consisted of 7 cycles of freezing at -20°C and thawing at -2.5°C. At the end of the treatment, composite scaffolds were kept at -20°C until use. Discoidal samples with a diameter of 0.7 mm were then obtained from each membrane using a punch. Scaffolds made of OxPVA were used as control.

2.1.5. Morphological Characterization of Scaffolds. After manufacture, OxPVA and composite scaffolds were investigated for their morphology through H&E staining. In parallel, the superficial ultrastructure of the supports was analyzed by a Scanning Electron Microscope (SEM). Samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 24 h and dehydrated using a graded ethanol series. Afterwards, critical point drying and gold sputtering occurred prior to observing supports using a SEM (Stereoscan-205 S; Cambridge Instruments, Pine Brook, NJ, USA).

2.2. In Vitro Assessment of the Biological Properties of Scaffolds

2.2.1. Cell Cultures. Primary human adipose mesenchymal stem cells (Ad-MSCs) were purchased from tebu-bio SAS (France, Europe) and they were thawed and expanded according to the manufacturer's instructions. The proliferative medium consisted of αMEM (alpha-modified Eagle's medium without nucleosides), 15% fetal bovine serum (FBS), and 1% antibiotic solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The culture medium was refreshed every 2 days. Cell cultures were observed daily by optical microscope DM/IL (Leica), and pictures were taken using a Nikon Digital Sight Ds-SMCc camera (Nikon Corporation).

2.2.2. Ad-MSCs Culture on Scaffolds. Scaffolds were disinfected by 4 washes of 2 h each in PBS supplemented with 2% antibiotic solution; thereafter, they were incubated overnight at 37°C in basal medium. Subsequently, Ad-MSCs at 80% of confluence were detached from the culture plate by treatment with Trypsin/EDTA, centrifuged at 1500 rpm for 5 min, and resuspended in complete proliferation medium. Each support was seeded with 20,000 cells/cm² in complete proliferative medium. In parallel, cells were also seeded in a 48-well plate as positive control.

2.2.3. Evaluation of Ad-MSCs Behavior on Scaffolds. At 7 days from seeding, the proliferative activity of cells on OxPVA, wW/OxPVA, and hW/OxPVA scaffolds was evaluated using (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyl tetrazolium bromide (MTT) (0.5 mg/mL) for 4 h. The resulting precipitates of formazan were dissolved by 2-propanol acid (0.04 M HCl in 2-propanol). Microplate autoreader EL 13 was used to measure the optical density of the solution at 570 nm. Results were expressed as number of cells grown on seeded surface.

2.3. In Vivo Behavior of Scaffolds

2.3.1. Surgery: Implant and Explant of Scaffolds. Fifteen Sprague Dawley rats were randomly divided into 3 experimental groups: OxPVA, n = 5; wW/OxPVA, n = 5; and hW/OxPVA, n = 5. After anaesthesia with isoflurane/oxygen, their abdomen was carefully shaved and a middle incision extending from the xiphoid process to the symphysis pubis was performed. The scaffolds (one for each animal) were allocated with transfected sutures (monofilament, PDS 4/0) in the *omentum* and the abdominal wall was then synthesized by layers through stitches in resorbable filament (Novosyn 4/0 and Monosyn 4/0). Soon after surgery, the rats were given anti-inflammatory Rimadyl (0.5 mg/kg) and antibiotic Baytril (5 mg/kg) therapy for 5 days and were allowed to recover in the cage. Four weeks after surgery, rats were euthanized by overdose of gaseous CO₂. The supports were identified, carefully removed, and treated for further macroscopic evaluations and histological/immunohistochemical analysis.

2.3.2. Histological and Immunohistochemical Analysis. Ex-implanted scaffolds were fixed with a solution of 10% formalin in neutral PBS and paraffin-embedded. Thereafter, serial sections of 5 μm in thickness were cut, dewaxed, and rehydrated according to routine protocols before staining with haematoxylin and eosin (H&E). In parallel, immunological characterization was also performed with Dako Autostainer/Autostainer Plus (Dako). The following antibodies diluted in EnVision™ FLEX were used: anti-CD3 (polyclonal rabbit anti-human CD3, A 0452; Dako, Milan, Italy) diluted 1:1000; rabbit anti-mouse anti-F4/80 (sc-26643-R; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluted 1:800; monoclonal rabbit anti-human Ki-67 (M3060; Spring Bioscience, UCS Diagnostic, Rome, Italy) diluted 1:200; polyclonal rabbit anti-desmin (29593; AnaSpec, San Jose, California, USA) diluted 1:400; mouse monoclonal anti-α-SMA (A2547; Sigma, Missouri, USA) diluted 1:500; and monoclonal

mouse anti-human cytokeratin clone MNF116 (M0821; Dako) diluted 1:200. After antigen unmasking, the sections were incubated with peroxidase-blocking serum (EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent; Dako) for 5 min in order to remove the nonspecific binding and then for 30 min with the primary antibody. Sections treated with anti- α -SMA, anti-desmin, anti-Ki-67, and anti-MNF116 antibodies were then incubated with the secondary antibodies for 15 min (EnVision FLEX Mouse-Linker and EnVision FLEX Rabbit-Linker; Dako). For all protocols, EnVision FLEX/HRP polymer was used for 20 min and 3,3'-diaminobenzidine (EnVision FLEX Substrate Buffer + DAB + Chromogen; Dako) was used in order to highlight the positivity of the reaction. All sections were finally counter-colored with hematoxylin (EnVision FLEX, Hematoxylin, Dako) for 5 min in order to mark cell nuclei, dehydrated with a descending alcohol scale, xylene, and mounted. All the steps were performed at RT.

2.4. Statistical Analysis. Statistical analyses were performed by the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test. Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. Statistical calculations were carried out by Prism 3.0.3 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results and Discussion

3.1. Preparation and Characterization of the Matrices. In TE, the use of decellularized matrices gained special attention owing to their clinical success in tissue reconstruction and their advantage of preserving the native architecture of the tissue along with the ECM [49, 50]. Indeed, the identification of the adequate decellularization protocol is a challenge, as many methods do not allow maintaining both the mechanical properties and inherent biofactors [42, 51]. Recently, we used biological matrices derived from homogenization and lyophilization of decellularized tissues, and we stressed the potentiality of these innovative biomaterials, which take advantage of ECM macromolecules more than their macro- and microarchitecture [48, 52]. Thus, in the present work, we decided to evaluate ECM eventual efficacy also in intestine TE by comparing two scaffold types derived from decellularized intestinal wall (whole and homogenized).

Decellularization process produced progressive whitening of the intestine, which at the end of the process appeared translucent and partially transparent, although maintaining its anatomic recognizability (Figure 1), also in accordance with previous literature on the matter [43]. A certain loss of mechanical properties was obviously found, with tendency of the intestinal lumen to collapse; notwithstanding, cautious manipulation of the bowel was still possible.

Decellularized segments of small intestine were histologically analyzed in comparison with native tissue (Figure 1). Our decellularization protocol guaranteed good removal of cell materials, with quite good preservation of the three-dimensional architecture of the extracellular matrix. DAPI staining demonstrated the total absence of nuclei in the decellularized tissue, confirming the efficacy of the treatment

in completely removing the immunogenic cellular components. Profiles of villi and intestinal glands were still clearly recognizable, although in the absence of epithelial layer. Residues of the serosal layer and mesenteric insertion were partially identifiable on the outer side. Thus, our results were not in complete agreement with Patil and colleagues [42] who preferred the actions of DMSO together with Triton X-100, claiming that intraluminal decellularization of the small intestine by sodium deoxycholate/DNase does not give satisfactory results.

3.2. Composite Scaffolds. Following the production of decellularized intestinal ECMs (wW and hW) and OxPVA, composite bioscaffolds were prepared by physical cross-linking through FT process. Very few studies about the fabrication of synthetic polymer/ECM composites with high resilience and large strain have been reported in the literature [53]. Nevertheless, in the conditions considered, the presence of a sustain platform is a prerequisite as both the wW and the hW were not consistent enough to maintain their shape. Moreover, the bioscaffold must be firm enough to be enveloped by the *omentum* without folding and altering its structure [11]. Hybrid composites containing synthetic polymers with high mechanical strength and naturally derived components, which create a biomimetic environment, are actually one of the most promising biomaterials [53].

As previously discussed, the ECM was considered in two variants: whole and homogenized. This allowed comparing the biological role of the protein matrix (hW) and the involvement of the structural architecture (wW). The composite scaffolds obtained by cross-linking are shown in Figure 2. According to histological analysis, the three-dimensional architecture of intestinal wall was partially preserved in the composite wW/OxPVA scaffolds; as regards the decellularized/homogenized intestinal wall, it appeared like a thin protein coating in the hW/OxPVA scaffolds. The ECM showed different thickness in the two composite supports, with wW being thicker than hW. In all samples, the OxPVA layer was clearly recognizable, with regular profile. In parallel, ultrastructural analysis by SEM confirmed the data from histology. Both wW/OxPVA and hW/OxPVA surfaces showed a spongy appearance with thinner texture in wW/OxPVA. OxPVA appeared like a surface characterized by a certain rugosity, which was appreciable only at high magnification.

3.2.1. Interaction between Composite Scaffolds and Ad-MSC Cultures. The ultimate goal of the present study involved the implantation of the composite scaffolds as such without a preseeded cellular component. Nevertheless, to preliminarily evaluate their biological properties, cell culture assays with AD-MSCs were performed.

Despite TESI progress, limitations remain in the use of autologous intestinal cells. Namely, (a) a large number of OUs are required to generate even a modest amount of neomucosa [25] and in patients with diseased or damaged bowel isolating OUs may be extremely difficult or even impossible; (b) the donor tissue is difficult to expand [54]. These drawbacks

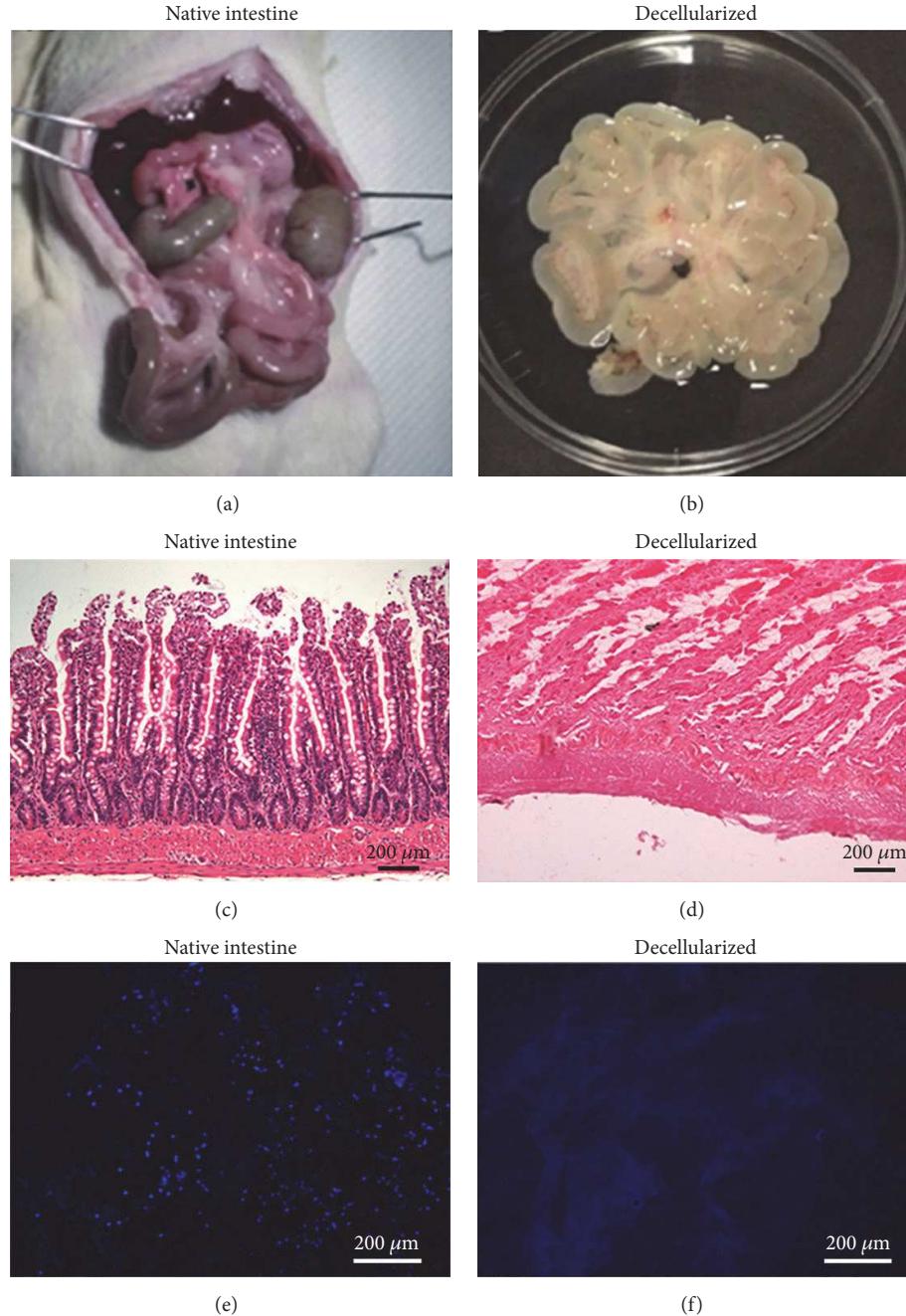


FIGURE 1: Native and decellularized rat small intestine. Gross appearance ((a) and (b)), hematoxylin/eosin ((c) and (d)), and DAPI staining ((e) and (f)) of small intestine before ((a), (c), and (e)) and after ((b), (d), and (f)) decellularization. Scale bar: 200 μ m.

prompted the research towards an alternative cell source. At present, intestinal stem cells are considered the only valid option because of their ability to differentiate in all types of intestinal cells. Nevertheless, the isolation of pure stem cells from intestinal crypts is also difficult because of the lack of specific stem cells markers [55]. Hence, in the present work, we focused on mesenchymal stem cells, in particular Ad-MSCs, which are currently considered an interesting cell source for tissue engineering of epithelium [56], endothelium [57–59], and smooth muscle, particularly

for pediatric applications [60, 61]. In Figure 3(a), the fibroblastoid appearance of Ad-MSCs is shown. At 7 days from seeding, proliferating cells on both composite scaffolds were significantly more numerous compared to OxPVA supports ($p < 0.01$) (Figure 3(b)). This is consistent with previous works by our group showing low cellular adhesion properties for this material [45], probably due to excessive hydrophilicity of the support, as well as inadequate porosity. In addition, the proliferation assay showed that although the macromolecular component of hW was able to support cell adhesion and

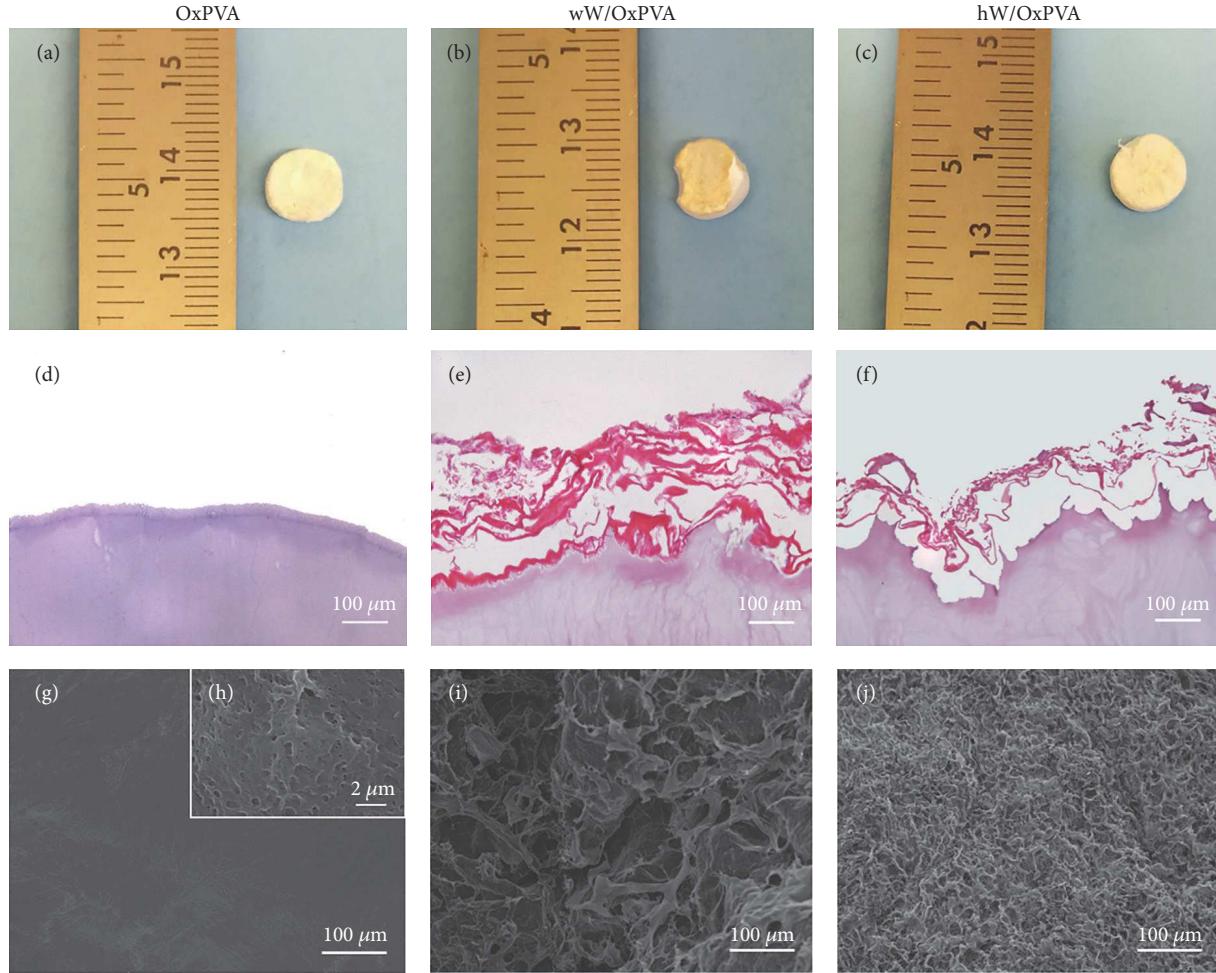


FIGURE 2: Macroscopic, microscopic, and ultrastructural appearance of scaffolds. Gross appearance ((a)–(c)), hematoxylin/eosin staining ((d)–(f)), and SEM micrographs ((g)–(j)) of OxPVA and composite scaffolds (wW/OxPVA; hW/OxPVA). Scale bar: 100 μm ; scale bar in upper right insert (h): 2 μm .

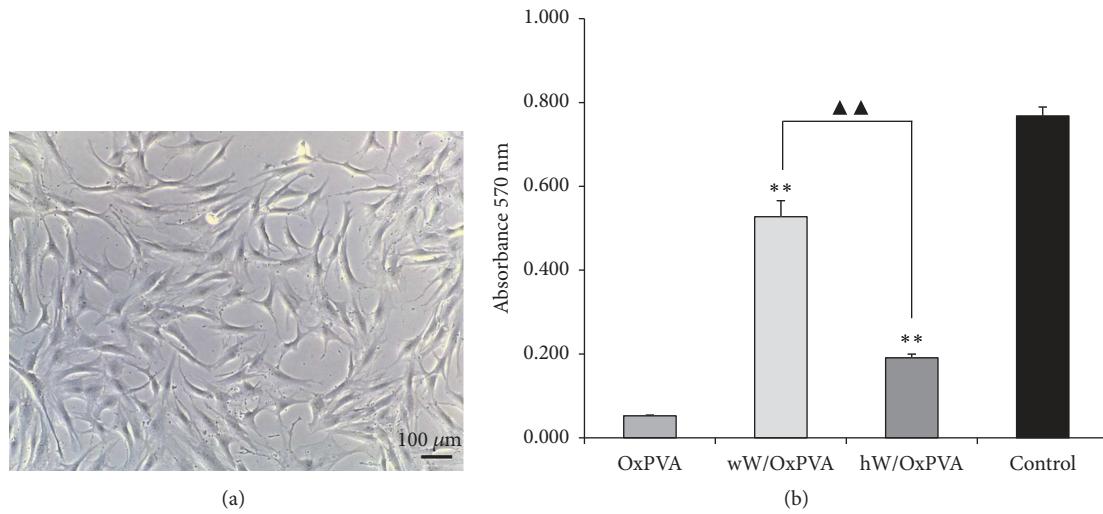


FIGURE 3: Ad-MSCs-scaffolds interaction. (a) Human Ad-MSCs at optical microscope (scale bar: 100 μm). (b) Evaluation by MTT assay of cell proliferation on OxPVA, wW/OxPVA, and hW/OxPVA at 7 days from seeding (** $p < 0.01$, wW/OxPVA and hW/OxPVA versus OxPVA; ▲▲ $p < 0.01$, wW/OxPVA versus hW/OxPVA).

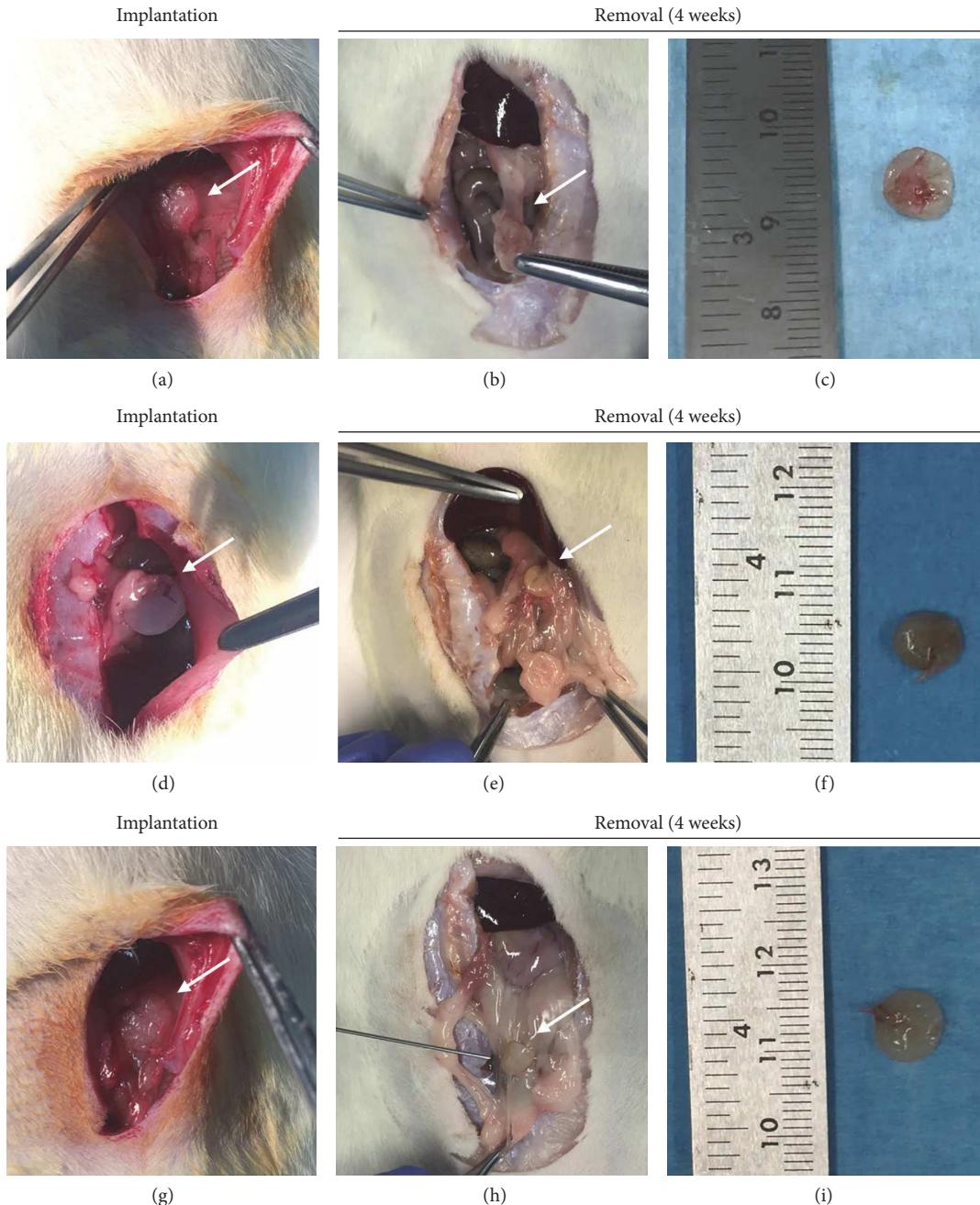


FIGURE 4: *In vivo* behavior of scaffolds. Implantation and removal of OxPVA (control) ((a)–(c)), wW/OxPVA ((d)–(f)), and hW/OxPVA ((g)–(i)) from the omentum of Sprague Dawley rats.

proliferation, the wW showed significantly better results in terms of adhesion and proliferation ($p < 0.01$). It was possible to state that matrix architecture is a further stimulus, in addition to that of the specific protein components, to recreate a microenvironment suitable for the vitality and proliferation of Ad-MSCs.

3.2.2. Evaluation of In Vivo Behavior of Scaffolds. Many studies suggest that artificial matrices alone may provide instructive cues for retrieving stem cells from the surrounding tissues; hence, we decided to also implant native OxPVA

for comparison. In our experimental protocol, OxPVA, wW/OxPVA, and hW/OxPVA scaffolds were not placed in direct continuity with the bowel but sutured in the omental context as the peritoneal microenvironment is known to play an important role in the tissue engineering of small intestine [41].

After surgery, no animal showed surgical site infections or was euthanized because of complications. At the time of explantation (week 4), all scaffolds were still recognizable and no inflammatory reaction was observed (Figure 4). Four weeks is a shared end-point by many

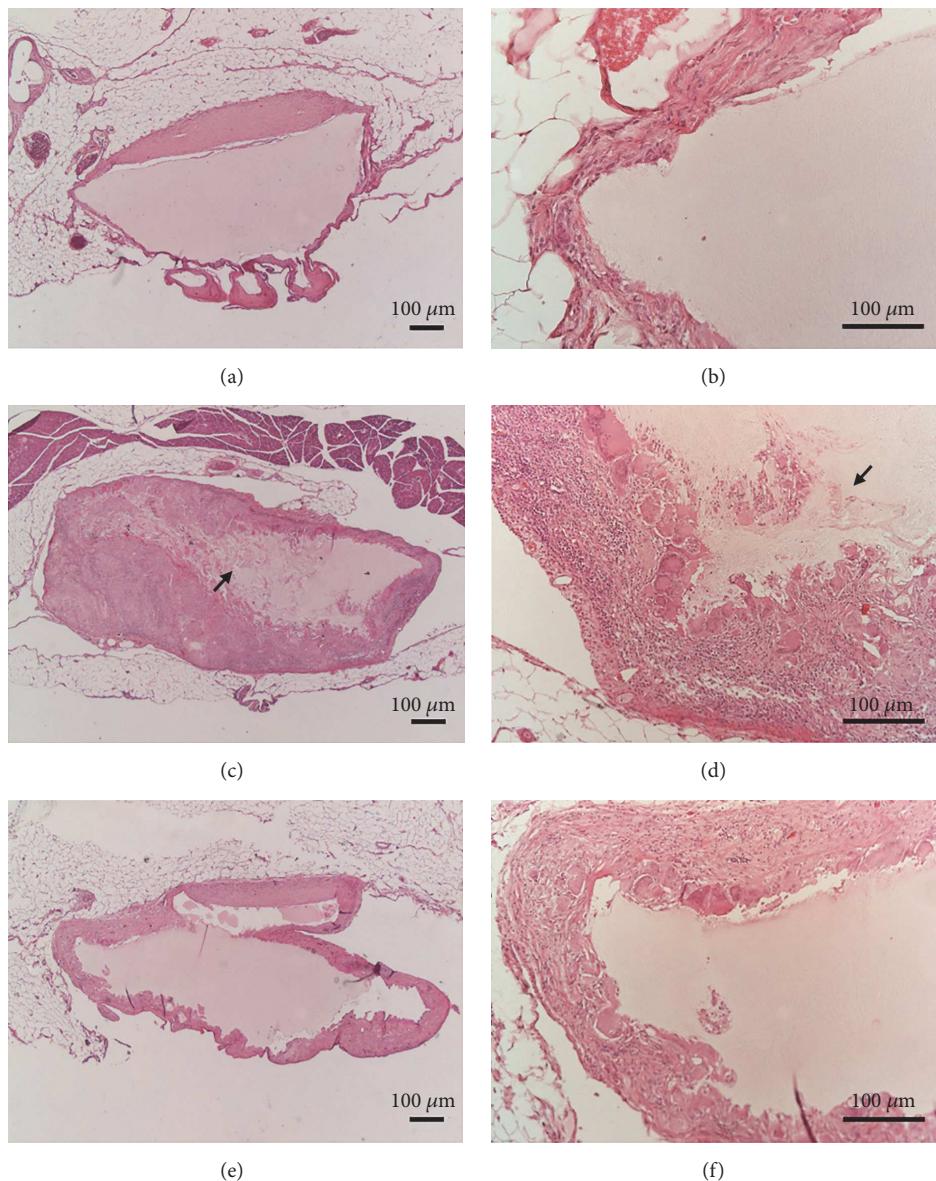


FIGURE 5: Histological characterization of explants. Hematoxylin/eosin staining of OxPVA ((a) and (b)), wW/OxPVA ((c) and (d)), and hW/OxPVA ((g)–(i)) supports. Degradation features are more evident in the wW/OxPVA support than in hW/OxPVA and OxPVA scaffolds. The peripheral areas of wW/OxPVA scaffold in which the polymer appears less dense and continuous are indicated in (c) and (d) by the black arrows. Note also the reduction in scaffold size (wW/OxPVA) (scale bars: 100 μm).

authors to observe the first development stages of the TESI [11, 16, 25–27, 34–36]. After this period, OxPVA was still present and recognizable in each type of scaffold. Partial reabsorption aspects were identifiable in the most superficial portions as confirmed by microscopic examination; the degradation aspects were more evident in the wW/OxPVA scaffolds than in hW/OxPVA and OxPVA ones (Figure 5).

Ideally, the degradation rate of scaffolds should be slow enough to sustain the proliferation and differentiation of cells eventually seeded or migrated towards the support while promoting the production of new ECM without restricting the eventual formation of new tissue [41]. Interestingly, the

obtained results seemed to confirm a proper degradation rate by OxPVA (Figure 5).

According to the literature, most authors worked with tubular-like scaffolds resembling the natural gross appearance of the small intestine to develop a TESI. Otherwise, similarly to our research study, Wulkersdorfer et al. [25] manufactured disc-shaped supports (PGA/Matrigel seeded with OUs), observing a neomucosal growth with a certain complex architecture and endothelial cells after 4 weeks into the subcutaneous tissue of Lewis rats; these data suggest the potential adequacy of the discoidal scaffold to address the aim of the work. In all the samples, inflammatory reactions were not present, assessing the biocompatibility of the biomaterial

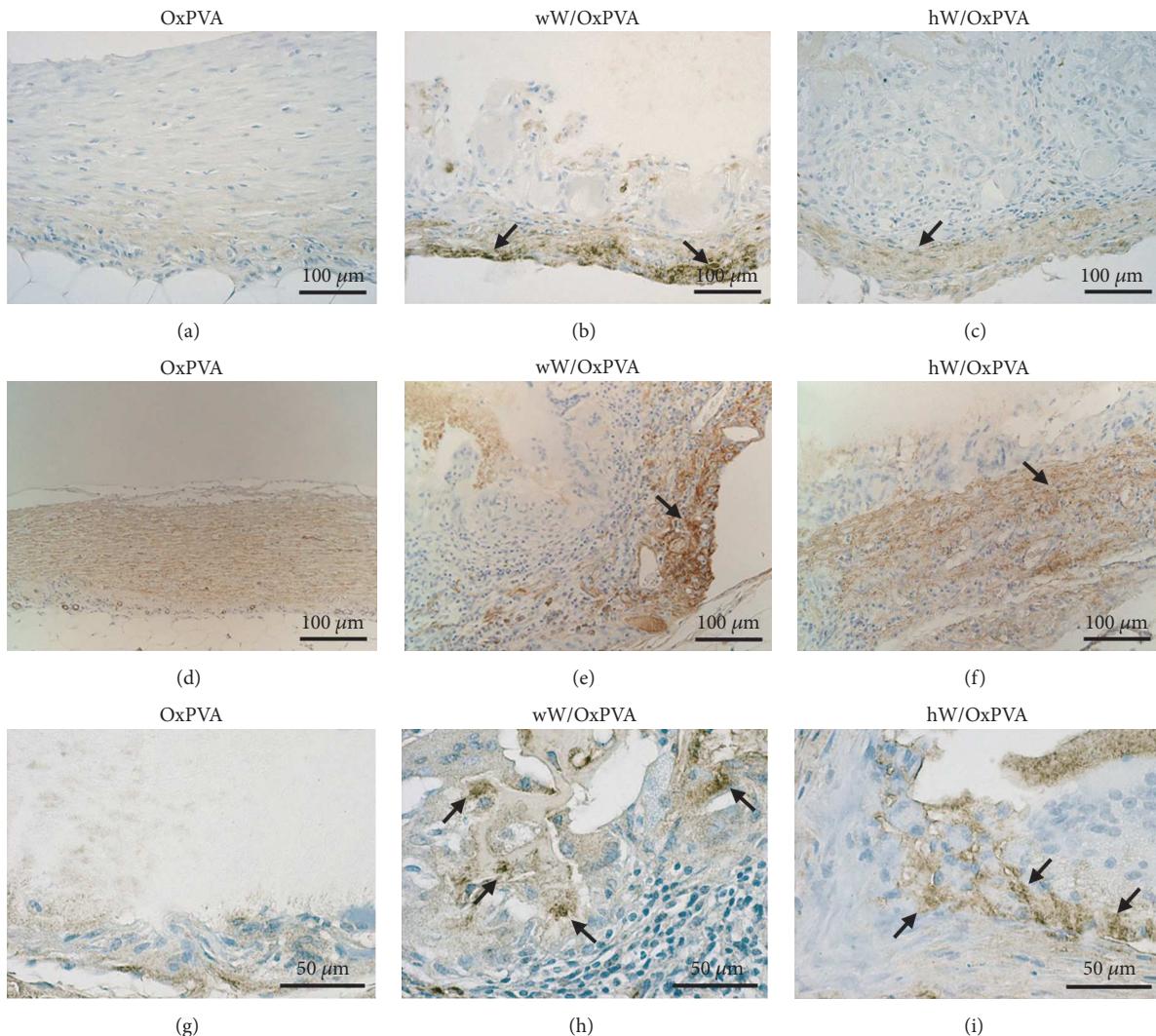


FIGURE 6: Immunohistochemical characterization of explants. Localization of cells positive to desmin ((a)–(c)), α -SMA ((d)–(f)), and MNF116 ((g)–(i)) in OxPVA, wW/OxPVA, and hW/OxPVA samples at 12 weeks from surgery. Moderate anti-desmin and anti- α -SMA immunoreaction (black arrows) is recognizable in the outer layers of the tissue surrounding the wW/OxPVA and hW/OxPVA scaffolds, indicating myofibroblastic and/or smooth muscle cell differentiation. Conversely, such positive staining is absent (desmin) or scant (α -SMA) in tissues around OxPVA. Partial positivity for the pan-cytokeratin marker MNF-116 is shown in cells in the inner layer of the tissue surrounding the wW/OxPVA and hW/OxPVA scaffolds (black arrows) (scale bar: ((a)–(f)) 100 μ m; ((g)–(i)) 20 μ m).

as well as the suitability of the decellularization protocol for the composite scaffolds. Each scaffold type was surrounded by a continuous and relatively well-organized tissue that showed higher thickness in the wW/OxPVA; the outer layer had a connective-like appearance.

In hW/OxPVA and wW/OxPVA, immunohistochemical analyses gave partial positivity for desmin and α -SMA, indicating myofibroblastic and/or smooth muscle cell differentiation; conversely, these immunoreactions were very faint or negative in the tissue surrounding native OxPVA (Figure 6).

Cubic or cylindrical cells, with basal nuclei, disposed in layers or glandular-like patterns were appreciable on the inner side adjacent to the OxPVA, in both the wW/OxPVA and hW/OxPVA. The epithelial nature of these cells was

confirmed by immunohistochemical analyses, which were negative for desmin, α -SMA (Figure 6), CD3, and F4/80 (Figure 7), and partially positive for pan-cytokeratin marker MNF116 (Figure 6). In some fields, the invaginations of the epithelial layer, of various depth and extent, acquired a clear crypt-like appearance, although differentiation in specialized (muciparous, enteroendocrine, and Paneth) cells was not found. Villous-like structures were not clearly recognizable. Epithelial components were not observed in the tissue surrounding the native OxPVA.

Considering the experimental works of other authors in the development of TESI models, at 4 weeks from implantation, Sala et al. [16] described a TESI with a desmin and an α -SMA-positive muscularis; moreover, intestinal subepithelial myofibroblasts negative for desmin and positively

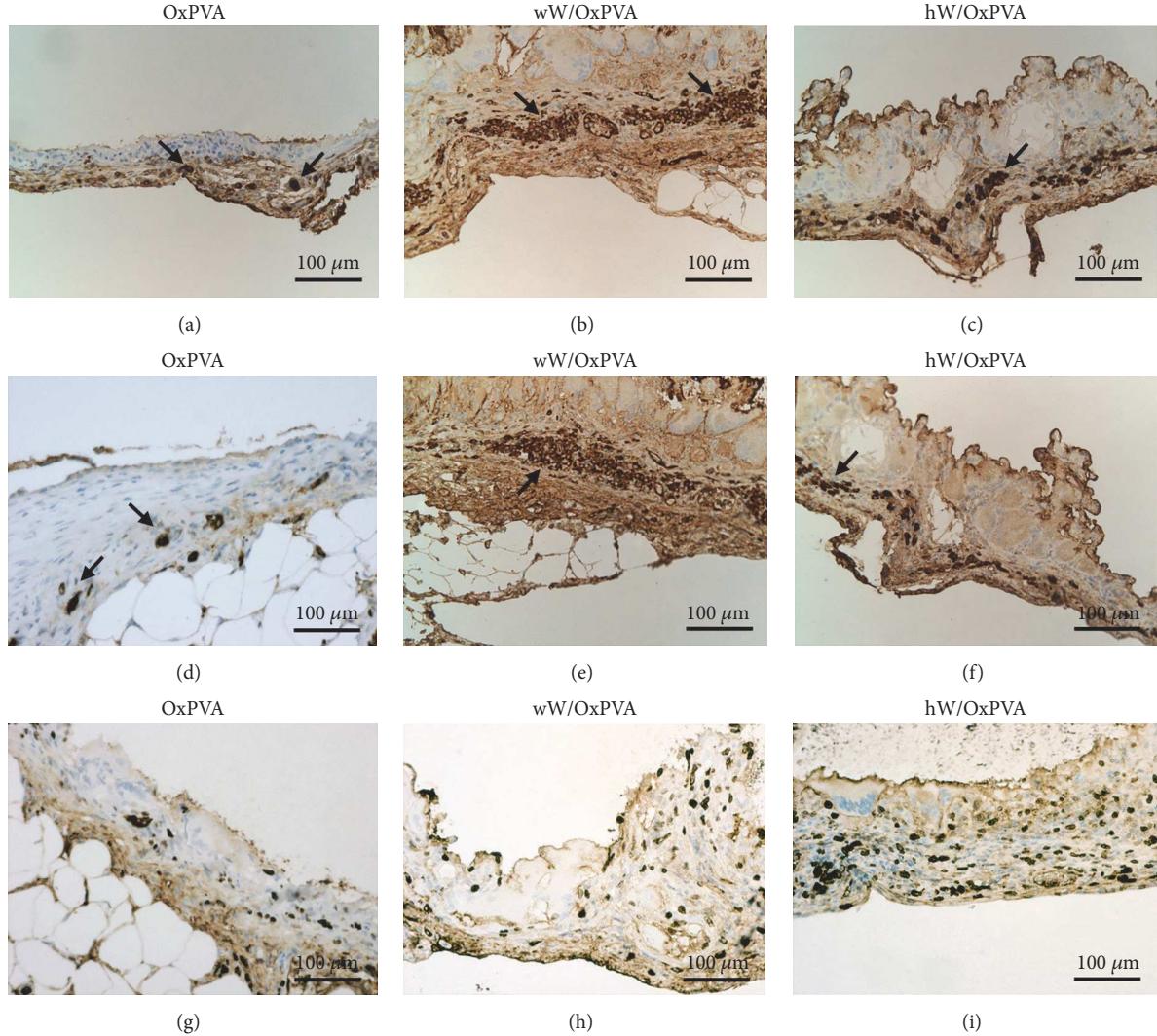


FIGURE 7: Immunohistochemical characterization of explants. Localization of cells positive to CD3 ((a)–(c)), F4/80 ((d)–(f)), and Ki-67 ((g)–(i)). Immunoreactive lymphocytes (CD3) and macrophages (F4/80) are detectable in the external layer of tissue around wW/OxPVA and hW/OxPVA, as shown by the black arrows. Conversely, there are no inflammatory elements in the inner layer. Cell proliferation rate (Ki-67 positive cells) is higher in the tissue surrounding wW/OxPVA and hW/OxPVA scaffolds than OxPVA ones (scale bar: 100 μ m).

stained for SMA were identified just below the base of the crypt epithelium. Similar findings were highlighted also by Levin et al. [11]. With respect to our study, Sala et al. [16] and Levin et al. [11] worked with tubular scaffolds made of PGA coated with PLLA and Collagen Type I, which were seeded with OUs before the implant in *omentum*; conversely, the end-point and the implantation site were the same.

Lymphocytes ($CD3^+$ cells) and macrophages ($F4/80^+$ cells) were mainly found in the outer layer of the tissue surrounding wW/OxPVA and hW/OxPVA, whereas the inner epithelial layer did not show any inflammatory element. The connective tissue surrounding OxPVA also showed rare $CD3^+$ or $F4/80^+$ cells (Figure 7).

Vascular structures with organized endothelium were also detectable in the outer layer of the tissue surrounding wW/OxPVA and hW/OxPVA and in the connective tissue

surrounding OxPVA, consistently with local neoangiogenesis.

The inductive stimuli of scaffolds on cell proliferation were also evaluated by immunohistochemical localization of the Ki-67 nuclear antigen. Apart from local proliferation of lymphomonocytic cells, moderate cell proliferation was found in the epithelial and myofibroblastic/smooth muscle cells surrounding wW/OxPVA and hW/OxPVA; lower proliferation rate was appreciable in the connective tissue surrounding native OxPVA (Figure 7). Moreover, Torashima et al. [36] evaluated the presence of Ki-67 positive elements to quantify epithelial proliferation after 4 weeks of implantation in the *omentum* of a PGA-based scaffold seeded with OUs.

One of the most important findings of this preliminary study concerns the potentials of the hybrid scaffolds manufactured combining a novel synthetic biodegradable biomaterial, that is, oxidized polyvinyl alcohol, with the small

intestine-derived ECMs. Beyond confirming the versatility of the polymer for tissue engineering applications, the *in vitro* and *in vivo* data suggested the interesting role exerted by the lyophilized ECM. Even if the importance of the tissue-architecture's maintenance is a matter of fact, the discovery of an alternative approach in using ECMs is particularly interesting. By virtue of the complexity of proteins and growth factors by which matrices are made of, their biologic activity is more adequate than that of scaffolds prepared using natural polymers alone. Hence, to be able to exploit this peculiarity is an important achievement.

4. Conclusions

As assessed by the histological and immunohistochemical analysis performed on explanted samples, both wW/OxPVA and hW/OxPVA scaffolds did not induce the differentiation of muciparous, enteroendocrine, and Paneth cells; moreover, villous-like structures were also not yet recognizable. Further research will consider the manufacture of tubular biohybrid scaffolds, prolonged end-points, and a direct anastomosis with the small intestine in order to increase the differentiation of the structural elements of the intestinal mucosa. Thus, the aim will be to optimize the manufactured scaffolds, obtaining a tissue substitute resembling the complex histological features of the small intestine. Hence, varying the discoidal scaffold shape into a tubular one, as well as adjusting the experimental conditions, may be helpful in the development of an adequate tissue-engineered platform supporting a more complex tissue regeneration, in accordance with the characteristic histological features of the small intestine.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Authors' Contributions

Francesca Grandi and Elena Stocco contributed equally to this work.

Acknowledgments

The authors acknowledge Associazione Puzzle Onlus Padova and Fondazione T.E.S. Onlus for financial support and the Italian Society of Human Anatomy and Histology, to which the data were preliminarily presented as a poster contribution for the 71st National Congress, Taormina, 20–22 September 2017.

References

- [1] G. G. Belchior, M. C. Sogayar, and T. C. Grikscheit, "Stem cells and biopharmaceuticals: Vital roles in the growth of tissue-engineered small intestine," *Seminars in Pediatric Surgery*, vol. 23, no. 3, pp. 141–149, 2014.
- [2] B. Bielawska and J. P. Allard, "Parenteral nutrition and intestinal failure," *Nutrients*, vol. 9, no. 5, article no. 466, 2017 (English).
- [3] T. Capriati, V. Nobili, L. Stronati et al., "Enteral nutrition in pediatric intestinal failure: does initial feeding impact on intestinal adaptation?" *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, vol. 11, no. 8, pp. 741–748, 2017 (English).
- [4] E. A. Sparks, F. A. Khan, J. G. Fisher et al., "Necrotizing enterocolitis is associated with earlier achievement of enteral autonomy in children with short bowel syndrome," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 51, no. 1, pp. 92–95, 2016 (English).
- [5] C. S. Van Der Werf, T. D. Wabbersen, N. Hsiao et al., "CLMP is required for intestinal development, and loss-of-function mutations cause congenital short-bowel syndrome," *Gastroenterology*, vol. 142, no. 3, pp. 453–462, 2012 (English).
- [6] C. S. van der Werf, D. Halim, J. B. G. M. Verheij, M. M. Alves, and R. M. W. Hofstra, "Congenital Short Bowel Syndrome: From clinical and genetic diagnosis to the molecular mechanisms involved in intestinal elongation," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1852, no. 11, pp. 2352–2361, 2015 (English).
- [7] M. Hasosah, D. A. Lemberg, E. Skarsgard, and R. Schreiber, "Congenital short bowel syndrome: A case report and review of the literature," *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*, vol. 22, no. 1, pp. 71–74, 2008 (English).
- [8] M. M. Alves, D. Halim, R. Maroofian et al., "Genetic screening of Congenital Short Bowel Syndrome patients confirms CLMP as the major gene involved in the recessive form of this disorder," *European Journal of Human Genetics*, vol. 24, no. 11, pp. 1627–1629, 2016 (English).
- [9] B. W. Warner, J. A. Vanderhoof, and J. D. Reyes, "What's new in the management of short gut syndrome in children," *Journal of the American College of Surgeons*, vol. 190, no. 6, pp. 725–736, 2000 (English).
- [10] O. Mayer and J. A. Kerner, "Management of short bowel syndrome in postoperative very low birth weight infants," *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, vol. 22, no. 1, pp. 49–56, 2017 (English).
- [11] D. E. Levin, F. G. Sala, E. R. Barthel et al., "A "Living Bioreactor" for the Production of Tissue-Engineered Small Intestine," in *Organ Regeneration*, J. Basu and J. W. Ludlow, Eds., vol. 1001 of *Methods in Molecular Biology*, pp. 299–309, Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2013.
- [12] O. Goulet, F. Ruemmele, F. Lacaille, and V. Colomb, "Irreversible intestinal failure," *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 38, no. 3, pp. 250–269, 2004 (English).
- [13] J. Gonzalez-Hernandez, P. Prajapati, G. Ogola, N. Channabasappa, B. Drews, and H. G. Piper, "Predicting time to full enteral nutrition in children after significant bowel resection," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 52, no. 5, pp. 764–767, 2017 (English).
- [14] T. C. Grikscheit, A. Siddique, E. R. Ochoa et al., "Tissue-engineered small intestine improves recovery after massive small bowel resection," *Annals of Surgery*, vol. 240, no. 5, pp. 748–754, 2004 (English).
- [15] A. U. Spencer, A. Neaga, B. West et al., "Pediatric short bowel syndrome: redefining predictors of success," *Annals of Surgery*, vol. 242, no. 3, pp. 409–412, 2005 (English).
- [16] F. G. Sala, J. A. Matthews, A. L. Speer, Y. Torashima, E. R. Barthel, and T. C. Grikscheit, "A multicellular approach forms a significant amount of tissue-engineered small intestine in the mouse," *Tissue Engineering Part: A*, vol. 17, no. 13-14, pp. 1841–1850, 2011 (English).
- [17] B. P. Cromeens, Y. Liu, J. Stathopoulos, Y. Wang, J. Johnson, and G. E. Besner, "Production of tissue-engineered intestine from

- expanded enteroids,” *Journal of Surgical Research*, vol. 204, no. 1, pp. 164–175, 2016 (English).
- [18] S. J. D. O’Keefe, “Nutritional issues in the short bowel syndrome - total parenteral nutrition, enteral nutrition and the role of transplantation,” *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, vol. 82, pp. 75–90, 2015 (English).
- [19] B. Peyret, S. Collardeau, S. Touzet et al., “Prevalence of liver complications in children receiving long-term parenteral nutrition,” *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 65, no. 6, pp. 743–749, 2011 (English).
- [20] Y. Avitzur and G. Courtney-Martin, “Enteral approaches in malabsorption,” *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 30, no. 2, pp. 295–307, 2016 (English).
- [21] Y. A. Ching, K. Gura, B. Modi, and T. Jaksic, “Pediatric intestinal failure: Nutrition, pharmacologic, and surgical approaches,” *Nutrition in Clinical Practice*, vol. 22, no. 6, pp. 653–663, 2007 (English).
- [22] J. D. Rouch and J. C. Dunn, “New Insights and Interventions for Short Bowel Syndrome,” *Current Pediatrics Reports*, vol. 5, no. 1, pp. 1–5, 2017 (English).
- [23] C. N. Grant, S. G. Mojica, F. G. Sala et al., “Human and mouse tissue-engineered small intestine both demonstrate digestive and absorptive function,” *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 308, no. 8, pp. G664–G677, 2015 (English).
- [24] R. S. Choi and J. P. Vacanti, “Preliminary studies of tissue-engineered intestine using isolated epithelial organoid units on tubular synthetic biodegradable scaffolds,” *Transplantation Proceedings*, vol. 29, no. 1-2, pp. 848–851, 1997 (English).
- [25] B. Wulkersdorfer, K. K. Kao, V. G. Agopian, J. C. Dunn, B. M. Wu, and M. Stelzner, “Growth factors adsorbed on polyglycolic acid mesh augment growth of bioengineered intestinal neomucosa,” *Journal of Surgical Research*, vol. 169, no. 2, pp. 169–178, 2011 (English).
- [26] E. R. Barthel, A. L. Speer, D. E. Levin et al., “Tissue Engineering of the Intestine in a Murine Model,” *Journal of Visualized Experiments*, vol. 70, p. 4279, 2012.
- [27] D. A. J. Lloyd, T. Ansari, S. Shurey et al., “Prolonged Maintenance of Neointestine Using Subcutaneously Implanted Tubular Scaffolds in a Rat Model,” *Transplantation Proceedings*, vol. 38, no. 9, pp. 3097–3099, 2006 (English).
- [28] S. Kaihara, S. Kim, M. Benvenuto et al., “End-to-end anastomosis between tissue-engineered intestine and native small bowel,” *Tissue Engineering Part A*, vol. 5, no. 4, pp. 339–346, 1999 (English).
- [29] A. Perez, T. C. Grikscheit, R. S. Blumberg, S. W. Ashley, J. P. Vacanti, and E. E. Whang, “Tissue-engineered small intestine: Ontogeny of the immune system,” *Transplantation*, vol. 74, no. 5, pp. 619–623, 2002 (English).
- [30] J. Gardner-Thorpe, T. C. Grikscheit, H. Ito et al., “Angiogenesis in Tissue-Engineered Small Intestine,” *Tissue Engineering Part A*, vol. 9, no. 6, pp. 1255–1261, 2003 (English).
- [31] A. Ramsanahie, M. S. Duxbury, T. C. Grikscheit et al., “Effect of GLP-2 on mucosal morphology and SGLT1 expression in tissue-engineered neointestine,” *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 285, no. 6, pp. G1345–G1352, 2003 (English).
- [32] A. Tavakkolizadeh, U. V. Berger, A. E. Stephen et al., “Tissue-engineered neomucosa: Morphology, enterocyte dynamics, and SGLT1 expression topography,” *Transplantation*, vol. 75, no. 2, pp. 181–185, 2003 (English).
- [33] M. S. Duxbury, T. C. Grikscheit, J. Gardner-Thorpe et al., “Lymphangiogenesis in tissue-engineered small intestine,” *Transplantation*, vol. 77, no. 8, pp. 1162–1166, 2004 (English).
- [34] J. A. Matthews, F. G. Sala, A. L. Speer, D. Warburton, and T. C. Grikscheit, “VEGF optimizes the formation of tissue-engineered small intestine,” *Journal of Regenerative Medicine*, vol. 6, no. 5, pp. 559–567, 2011 (English).
- [35] R. G. Spurrier, A. L. Speer, C. N. Grant, D. E. Levin, and T. C. Grikscheit, “Vitrification preserves murine and human donor cells for generation of tissue-engineered intestine,” *Journal of Surgical Research*, vol. 190, no. 2, pp. 399–406, 2014 (English).
- [36] Y. Torashima, D. E. Levin, E. R. Barthel et al., “Fgf10 overexpression enhances the formation of tissue-engineered small intestine,” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 10, no. 2, pp. 132–139, 2016.
- [37] F. G. Sala, S. M. Kunisaki, E. R. Ochoa, J. Vacanti, and T. C. Grikscheit, “Tissue-Engineered Small Intestine and Stomach Form from Autologous Tissue in a Preclinical Large Animal Model,” *Journal of Surgical Research*, vol. 156, no. 2, pp. 205–212, 2009 (English).
- [38] S. S. Kim, S. Kaihara, M. S. Benvenuto et al., “Regenerative signals for intestinal epithelial organoid units transplanted on biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering of small intestine,” *Transplantation*, vol. 67, no. 2, pp. 227–233, 1999 (English).
- [39] S. Kaihara, S. S. Kim, B.-S. Kim, D. Mooney, K. Tanaka, and J. P. Vacanti, “Long-term follow-up of tissue-engineered intestine after anastomosis to native small bowel,” *Transplantation*, vol. 69, no. 9, pp. 1927–1932, 2000 (English).
- [40] T. C. Grikscheit, E. R. Ochoa, A. Ramsanahie et al., “Tissue-Engineered Large Intestine Resembles Native Colon with Appropriate in Vitro Physiology and Architecture,” *Annals of Surgery*, vol. 238, no. 1, pp. 35–41, 2003 (English).
- [41] L. Boomer, Y. Liu, N. Mahler et al., “Scaffolding for challenging environments: materials selection for tissue engineered intestine,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 102, no. 11, pp. 3795–3802, 2014 (English).
- [42] P. B. Patil, P. B. Chougule, V. K. Kumar et al., “Recellularization of acellular human small intestine using bone marrow stem cells,” *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 2, no. 4, pp. 307–315, 2013.
- [43] P. Maghsoudlou, G. Totonelli, S. P. Loukogeorgakis, S. Eaton, and P. De Coppi, “A decellularization methodology for the production of a natural acellular intestinal matrix,” *Journal of Visualized Experiments*, no. 80, 2013 (English).
- [44] S. R. Finkbeiner, J. J. Freeman, M. M. Wieck et al., “Generation of tissue-engineered small intestine using embryonic stem cell-derived human intestinal organoids,” *Biology Open*, vol. 4, no. 11, pp. 1462–1472, 2015 (English).
- [45] E. Stocco, S. Barbon, F. Grandi et al., “Partially oxidized polyvinyl alcohol as a promising material for tissue engineering,” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 11, no. 7, pp. 2060–2070, 2017 (English).
- [46] S. Barbon, E. Stocco, A. Negro et al., “In vitro assessment of TAT - Ciliary Neurotrophic Factor therapeutic potential for peripheral nerve regeneration,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 309, pp. 121–128, 2016 (English).
- [47] E. Meezan, J. T. Hjelle, K. Brendel, and E. C. Carlson, “A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues,” *Life Sciences*, vol. 17, no. 11, pp. 1721–1732, 1975 (English).

- [48] E. Stocco, S. Barbon, D. Dalzoppo et al., “Tailored PVA/ECM Scaffolds for Cartilage Regeneration,” *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 762189, 12 pages, 2014 (English).
- [49] K. N. Bitar and E. Zakhem, “Bioengineering the gut: future prospects of regenerative medicine, Review Article,” *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 13, p. 543, 2016.
- [50] S. K. Gupta, N. C. Mishra, and A. Dhasmana, “Decellularization methods for scaffold fabrication,” *Methods in Molecular Biology*, 2017 (English).
- [51] A. Gilpin and Y. Yang, “Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications,” *BioMed Research International*, vol. 2017, Article ID 9831534, 13 pages, 2017 (English).
- [52] E. Stocco, S. Barbon, P. Radossi et al., “Autologous chondrocytes as a novel source for neo-chondrogenesis in haemophiliacs,” *Cell and Tissue Research*, vol. 366, no. 1, pp. 51–61, 2016 (English).
- [53] L. Da, M. Gong, A. Chen et al., “Composite elastomeric polyurethane scaffolds incorporating small intestinal submucosa for soft tissue engineering,” *Acta Biomaterialia*, vol. 59, pp. 45–57, 2017 (English).
- [54] M. K. Fuller, D. M. Faulk, N. Sundaram, N. F. Shroyer, S. J. Henning, and M. A. Helmreich, “Intestinal crypts reproducibly expand in culture,” *Journal of Surgical Research*, vol. 178, no. 1, pp. 48–54, 2012 (English).
- [55] T. Reya and H. Clevers, “Wnt signalling in stem cells and cancer,” *Nature*, vol. 434, no. 7035, pp. 843–850, 2005 (English).
- [56] M. Brzoska, H. Geiger, S. Gauer, and P. Baer, “Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 330, no. 1, pp. 142–150, 2005 (English).
- [57] Y. Cao, Z. Sun, L. Liao, Y. Meng, Q. Han, and R. C. Zhao, “Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 332, no. 2, pp. 370–379, 2005 (English).
- [58] L. J. Fischer, S. McIlhenny, T. Tulenko et al., “Endothelial Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells: Effects of Endothelial Cell Growth Supplement and Shear Force,” *Journal of Surgical Research*, vol. 152, no. 1, pp. 157–166, 2009 (English).
- [59] M. M. Bekhite, A. Finkensieper, J. Rebhan et al., “Hypoxia, leptin, and vascular endothelial growth factor stimulate vascular endothelial cell differentiation of human adipose tissue-derived stem cells,” *Stem Cells and Development*, vol. 23, no. 4, pp. 333–351, 2014.
- [60] N. W. Marion and J. J. Mao, “Mesenchymal stem cells and tissue engineering,” *Methods in Enzymology*, vol. 420, pp. 339–361, 2006 (English).
- [61] A. de Mel, T. Yap, G. Cittadella et al., “A potential platform for developing 3D tubular scaffolds for paediatric organ development,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 26, no. 3, p. 141, 2015 (English).