

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta tese será disponibilizado
somente a partir de 14/05/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Aplicação de Ferramentas de Engenharia de Tecidos na Biofabricação de Intestino Delgado: Desafios da Medicina Regenerativa

Rafael Factor Carandina

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), para a obtenção de título de Doutor em Biotecnologia.

**BOTUCATU – SP
2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Aplicação de Ferramentas de Engenharia de Tecidos na
Biofabricação de Intestino Delgado: Desafios da Medicina
Regenerativa**

Rafael Factor Carandina

Orientador: Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), para a obtenção de título de Doutor em Biotecnologia.

**BOTUCATU – SP
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Carandina, Rafael Factor.

Aplicação de ferramentas de engenharia de tecidos na biofabricação de intestino delgado : desafios da medicina regenerativa / Rafael Factor Carandina. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Willian Fernando Zambussi
Capes: 90194000

1. Medicina regenerativa. 2. Engenharia tecidual. 3. Intestino delgado. 4. Transplante.

Palavras-chave: Medicina regenerativa; engenharia de tecidos; intestino delgado; scaffold; transplante.

Dedicatória

Dedico este trabalho, assim como todas as minhas conquistas, àqueles que são a razão da minha vida: **Noelei Aparecido Angelucci Carandina e Maria Luiza Factor Carandina.**

Agradecimentos

Não sei definir o que é Deus, mas de alguma forma me sinto grato a Ele.

Agradeço aos meus pais, Maria Luiza Factor Carandina e Noelei Aparecido Angelucci Carandina, pelo apoio em minhas escolhas e pela enorme paciência comigo. Espero ainda conseguir retribuir tudo o que fazem por mim.

Aos meus cachorros, Clarinha, Francisco, Julie e Olívia pela felicidade que me trazem, pelo amor incondicional, por serem parte da família e pela alegria que me recebem quando volto para casa.

À Babi, que apesar de não estar mais presente, estará para sempre em meu coração.

À CAPES, pelo financiamento de bolsa durante o doutoramento e pela bolsa de estudos PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior).

À *Wake Forest Institute for Regenerative Medicine* (WFIRM), por me receberem de braços abertos durante toda a estadia nos Estados Unidos e fazerem da Carolina do Norte a minha segunda casa.

Ao professor Khalil Bitar, por ser tão amigável, solícito e por toda ajuda na minha jornada nas pesquisas na WFIRM.

Ao professor Anthony Atala, por me receber tão bem na WFIRM, mesmo com toda sua agenda extremamente cheia.

Ao professor Willian Fernando Zambuzzi, por toda ajuda e apoio neste projeto, e pela sua amizade.

Aos professores Dr. João Pessoa Araújo Júnior e Dr. Robson Francisco Carvalho; e à Camila Malossi Dantas, por serem tão solícitos e por toda ajuda que me deram nos experimentos referentes à Biologia Molecular presentes neste estudo.

À Claudete e ao Thiago, técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/UNESP), pelo preparo das amostras e por me ensinarem a usar o Microscópio Eletrônico de Transmissão.

À professora Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, pelo apoio dado às Lâminas de histologia.

A bibliotecária Rosangela Aparecida Lobo pela elaboração da ficha catalográfica desta tese.

A todas as pessoas difíceis com quem tive que conviver durante todos os anos da pós-graduação, pois me fizeram perceber o tipo de pessoa que não quero me tornar.

Grato também a todos que me fizeram compreender que é preciso desenvolver em nós mesmos as qualidades de pessoas as quais admiramos.

Por fim, sou grato por ter percebido que títulos e dinheiro não me realizam em minha plenitude, e que a maior conquista que posso ter na vida é estar em paz.

*“Você tem de saber responder a esta pergunta:
Se você morresse agora, como se sentiria a respeito da sua vida?”*

“O maior desafio da vida é descobrir quem você é. O segundo maior desafio é você ser feliz com o que descobriu.”

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Nota Explicativa

A forma de apresentação desta Tese segue uma sugestão da coordenação do programa de pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB-UNESP), com o objetivo de facilitar a publicação em revistas científicas. Assim, fica dividida em dois artigos:

1. **Artigo 1:** Dos transplantes intestinais convencionais à Engenharia de Tecidos: estado da arte.
2. **Artigo 2:** Avaliação e caracterização de *scaffolds* de matriz extracelular para aplicações na Engenharia de Tecidos do trato gastrointestinal

O **Artigo 3**, referente à pesquisa feita na *Wake Forest Institute for Regenerative Medicine (WFIRM)*, não pode ser parte desta tese por normas contratuais de confidencialidade com a própria universidade nos Estados Unidos. O contrato é regido pela interpretação de acordo com as leis da Carolina do Norte, e qualquer reivindicação ou disputa decorrente dos termos ou desempenho do contrato será submetida à jurisdição dos tribunais estaduais ou federais da Carolina do Norte (**Anexo 4**).

Portanto, o artigo referente à pesquisa lá realizada será publicado diretamente em uma revista científica, com agradecimentos à CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos do PDSE (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior).

Lista de figuras

Figura 1	30
Figura 2	31
Figura 3	33
Figura 4	34
Figura 5	36
Figura 6.....	37

Lista de tabelas

Tabela 1.....	32
Tabela 2.....	32
Tabela 3.....	35
Tabela 4.....	36

Sumário

Artigo 1 - Dos transplantes intestinais convencionais à Engenharia de Tecidos: estado da arte

Resumo	12
Abstract	13
1 Introdução	14
1.1 Complicações	16
1.2 Nutrição	16
1.3 Qualidade de vida	16
1.4 Custos	16
1.5 Engenharia de Tecidos	17
2 Referências	18

Artigo 2 - Avaliação e caracterização de *scaffolds* de matriz extracelular para aplicações na Engenharia de Tecidos do trato gastrointestinal

Resumo	22
Abstract	24
1 Introdução	25
2 Material e Métodos	26
2.1 Animais e coleta das amostras	26
2.2 Tratamentos para descelularização e análise histológica	26
2.3 Análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	26
2.4 Extração e quantificação de DNA e RNA residuais	27
2.5 Análise de integridade de DNA e RNA residuais	27
2.6 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)	27
2.7 Caracterização biomecânica	28
2.8 Avaliação de toxicidade residual	28
2.9 Avaliação de biocompatibilidade	29
3 Resultados	29
3.1 Tratamentos para descelularização e análise histológica	29
3.2 Análise ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	31

3.3 Extração e quantificação de DNA e RNA residuais	32
3.4 Análise de integridade de DNA e RNA residuais	33
3.5 PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)	34
3.6 Caracterização biomecânica	35
3.7 Avaliação de toxicidade residual	35
3.8 Avaliação de biocompatibilidade	36
4 Discussão	38
5 Conclusão	39
6 Referências	40

Anexos

Anexo 1	42
Anexo 2	46
Anexo 3	49
Anexo 4	50

Artigo 1

Dos transplantes intestinais convencionais à Engenharia de Tecidos: estado da arte

RESUMO

O intestino delgado é responsável pela realização de múltiplas funções, incluindo motilidade, digestão e absorção de alimentos e nutrientes. Nos distúrbios gastrointestinais, algumas dessas funções são prejudicadas ou perdidas. A ressecção do segmento doente é uma abordagem comum, no entanto, pacientes sofrem de complicações e de baixa qualidade de vida. Substituições funcionais são, portanto, necessárias para restaurar, reparar ou substituir partes danificadas do intestino. A Engenharia de Tecidos e a Medicina Regenerativa fornecem uma abordagem alternativa para reconstruir diferentes segmentos do trato gastrointestinal. Os desafios são grandes e a área é extremamente promissora.

Palavras-Chave: Engenharia de Tecidos; Síndrome do Intestino Curto; Transplante de Intestino

From conventional intestinal transplants to Tissue Engineering: state of the art

ABSTRACT

The small intestine is responsible for performing multiple functions including motility, digestion and absorption of food and nutrients. In gastrointestinal disorders, some of these functions are impaired or lost. Resection of the diseased segment is a common approach; however, patients suffer from complications and poor quality of life. Functional replacements are therefore necessary to restore, repair or replace damaged parts of the gut. Tissue Engineering and Regenerative Medicine provide an alternative approach to reconstruct different segments of the gastrointestinal tract. There are many challenges and the research field is extremely promising.

Keywords: Tissue Engineering; Short Bowel Syndrome; Intestinal Transplants

Introdução

O intestino delgado constitui um tubo anatômico que se inicia na junção gastroduodenal (piloro) e termina na junção ileocecólica, onde desemboca o intestino grosso. Sua função inclui completar a digestão, a absorção e a secreção. De acordo com os anatomistas Dangelo & Fattini¹, três partes o compõem: o duodeno, mais curto e quase todo retroperitoneal, portanto imóvel, na sua maior parte; o jejuno e o íleo. Estas duas últimas partes são longas, convolutas e peritonizadas, estando presas à parede posterior do abdome pelo mesentério.

O trato gastrointestinal é suscetível a múltiplos distúrbios, sejam congênitos², tais como gastroquises, enterocolite necrosante e onfacoles; ou adquiridos tardiamente, devido a ressecções amplas do intestino delgado e/ou parte do intestino grosso por causa de enfermidades como a Doença de Chrön, eventos vasculares tromboembólicos e desordens de motilidade³. Como consequências, estas insuficiências intestinais podem causar a Síndrome do Intestino Curto (SIC), condição em que os pacientes são incapazes de manter a nutrição adequada e a hidratação através da ingestão oral normal⁴, necessitando, portanto, de Nutrição Parenteral. A incidência de insuficiência intestinal irreversível causada pela SIC tem sido estimada em 2-5 casos/milhão de habitantes⁵

A introdução da Nutrição Parenteral para os pacientes com SIC surgiu na década de 1970, permitindo maiores cuidados e a sobrevida destes pacientes⁶, mas muitos ainda não resistem as complicações da terapia devido a infecções por cateteres implantados, tromboes venosas, Síndrome da Realimentação e a doenças hepáticas⁷.

Paralelamente, várias técnicas cirúrgicas foram descritas para aumentar a capacidade absorptiva ou alongamento do intestino residual^{8,9,10} ou proporcionar a diminuição do tempo de trânsito intestinal^{11,12}. No entanto, existem limitações para seu emprego efetivo, com taxas variáveis de sucesso. Após o desenvolvimento de inúmeras pesquisas experimentais direcionadas para o tratamento da SIC, o transplante de intestino delgado surgiu como uma alternativa atraente.

A história dos transplantes intestinais começou em 1901, quando Alexis Carrel descreveu a viabilidade técnica da cirurgia¹³. Anos mais tarde, em 1959, Lillehei et al¹⁴ descreveram a técnica do transplante intestinal em cães. Já em 1971, Monchik & Russell¹⁵ desenvolveram o modelo experimental do transplante intestinal heterotópico em ratos e, posteriormente, em 1974, este modelo foi desenvolvido em porcos por Hay et al¹⁶. Apenas em 1984, o modelo ortotópico de transplante intestinal foi realizado, descrito por Deltz & Thiede¹⁷, os quais usaram ratos como modelo experimental.

A rejeição do enxerto intestinal ocorria precocemente após o transplante, bem como a reação do enxerto transplantado contra o receptor, ocasionado pela migração dos linfócitos oriundos do enxerto para o receptor após a revascularização. Este fenômeno foi demonstrado em ratos por Price et al¹⁸ em 1993.

As primeiras tentativas de transplantes intestinais em humanos foram realizadas nas décadas de 1960 e 1970 com a utilização de drogas imunossupressoras como as globulinas antilinfocitárias, azatioprina e corticoides^{19,20,21}. Entretanto, os resultados catastróficos decorrentes de complicações técnicas, sepses ou rejeição do enxerto transplantado fizeram diminuir o entusiasmo por esta modalidade de transplante.

A introdução da ciclosporina como droga imunossupressora no final da década de 1970 despertou novamente o interesse nas pesquisas nesta modalidade de transplante²². Estudos experimentais demonstraram a eficácia desta droga na prevenção da rejeição²³, posteriormente utilizada em transplantes intestinais em humanos^{24,25}. Em 1990, novos progressos ocorreram quando Grant et al²⁶ relataram a sobrevida de um paciente submetido ao transplante combinado de fígado e intestino delgado, tendo utilizado a ciclosporina como base da imunossupressão.

Apesar do controle inicial da rejeição com ciclosporina, a proposição do transplante intestinal como padrão ouro no tratamento da SIC não foi largamente aceita, tendo em vista a alta mortalidade decorrente da rejeição. Paralelamente à evolução das pesquisas sobre novas drogas imunossupressoras, a década de 90 foi marcada por inúmeros estudos direcionados para a indução de tolerância ao enxerto por meio da imunomodulação da resposta imune do receptor. A melhor forma para se atingir sobrevidas prolongadas dos enxertos transplantados seria a indução de tolerância específica aos tecidos do doador, circundando a necessidade de imunossupressão inespecífica em longo prazo e preservando a imunidade do receptor.

Entre as numerosas pesquisas para indução de tolerância aos enxertos, um método que na ocasião foi aceito envolveu a infusão de células derivadas do receptor, especialmente as da medula óssea, associada a vários protocolos de manipulação imunológica²⁷. Neste período, várias publicações apresentaram os resultados preliminares com este método, com melhora significativa na sobrevida de enxertos de fígado²⁷ e rins²⁸.

A indução da tolerância aos enxertos transplantados e a profilaxia da rejeição aguda ainda é dependente do uso de drogas imunossupressoras inespecíficas, com seus efeitos deletérios sobre a qualidade de vida dos pacientes. Com as drogas imunossupressoras atualmente disponíveis e dos novos protocolos de indução, as sobrevidas observadas após as várias modalidades de transplantes intestinais são atualmente comparáveis, até o primeiro ano,

aos de outros órgãos como fígado, rim e pâncreas²⁹. Houve um aumento na sobrevivência dos enxertos e dos receptores para 80% a 90% no primeiro ano após o transplante, com diminuição significativa dos episódios de rejeição celular aguda grave nos primeiros meses de pós-operatório, como consequência dos protocolos de indução atualmente utilizados²⁹.

1.1 Complicações

A rejeição do enxerto transplantado ainda é a complicação primária mais frequente³⁰, além das complicações infecciosas decorrentes da imunossupressão. Apesar dos avanços dos agentes farmacológicos, incluindo antibióticos, antivirais, antifúngicos, a sepse se mantém como a causa de óbito no pós-operatório, desencadeando períodos de internações prolongadas e de custo elevado às instituições financiadoras³¹.

1.2 Nutrição

Apesar do transplante intestinal/multivisceral proporcionar autonomia nutricional aos pacientes, várias etapas de reabilitação intestinal são necessárias após o transplante para atingir este objetivo, havendo a necessidade na manutenção dos transplantados em regimes de nutrição parenteral após o procedimento por períodos variados, até sua transição a alimentação enteral³².

A alimentação parenteral por períodos prolongados após o transplante pode ser necessária naqueles pacientes que apresentam complicações, principalmente nos pacientes pediátricos⁷.

1.3 Qualidade de Vida

Os índices que avaliam a qualidade de vida após o transplante intestinal melhoram em todas as subáreas, incluindo ansiedade, depressão, aspecto físico, estresse e relacionamento familiar naqueles pacientes com enxertos funcionais quando comparados com os pacientes mantidos em nutrição parenteral³³.

1.4 Custos

O custo na nutrição parenteral varia de \$75.000,00 a \$150.000,00 por ano nos EUA³⁴, excluindo-se os custos dos profissionais envolvidos, suporte, equipamentos e materiais de suporte, podendo aumentar na vigência das complicações da nutrição parenteral (internações, infecções por cateter).

O custo do transplante varia de \$200.000,00 a \$400.000,00, podendo atingir valores como \$1.000.000,00 nas complicações³⁴. Tendo em vista as internações frequentes durante o primeiro ano após o transplante, o procedimento não é custo-efetivo quando comparado à nutrição parenteral. Entretanto, após o segundo ou terceiro ano após o transplante, os valores da Nutrição Parenteral se tornam equiparáveis ao do transplante intestinal.

1.5 Engenharia de Tecidos

A Engenharia de Tecidos tem sido descrita, desde 1987, como:

(...) “a aplicação dos princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para a compreensão fundamental das relações de estrutura e função no tecido normal e patológico e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função”³⁵ (...)

Além das inúmeras modalidades terapêuticas para o tratamento da Síndrome do Intestino Curto, a Engenharia de Tecidos aplicada ao trato gastrointestinal vem sendo estudada com intuito de, um dia, beneficiar os pacientes com SIC, proporcionando uma substituição e/ou aumento do intestino com morfologia e função semelhante ao órgão nativo.

A produção de um material biocompatível para a fabricação de um arcabouço tubular e que sirva como um suporte mecânico para o cultivo das células é o primeiro desafio para a produção de um intestino em laboratório e sua substituição viável no paciente receptor. Para tanto, tem sido usado materiais sintéticos, tais como o ácido poliglicólico³⁶; naturais, como o colágeno³⁷ e a quitosana³⁸; e matrizes extracelulares, obtidas por meio de técnicas de descelularização³⁹.

O segundo desafio é a formação da mucosa intestinal. O cultivo de unidades organoides intestinais tem sido amplamente difundido^{40,41}, com resultados bem-sucedidos na formação do epitélio intestinal⁴². Por outro lado, o isolamento e a expansão destes grupos celulares ainda requerem estudos para melhoramento dos protocolos e pesquisas adicionais devem ser feitas para a verificação das funções absorptivas. Ademais, é importante ressaltar que a ausência do epitélio no tecido bioengenheirado leva o órgão à estenose⁴³.

Ainda assim, o intestino não é fisiologicamente funcional sem uma das suas principais unidades funcionais: a musculatura lisa. O requisito principal (quarto desafio) para a regeneração bem-sucedida da camada muscular do intestino é a o alinhamento exato do músculo liso nativo, o qual é dividido em duas camadas: a circular interna e a longitudinal

externa. A contração da camada muscular longitudinal externa leva ao encurtamento do intestino e a contração da camada muscular circular interna leva ao estreitamento do lúmen⁴⁴. Outrossim, a manutenção do fenótipo contrátil destas células *in vitro* é mais um dos obstáculos a ser vencido.

Não obstante, proporcionar a inervação adequada é essencial para a execução da função muscular, constituindo, assim, o sexto desafio: a integração neuromuscular. Apesar dos estudos neste campo ainda serem extremamente recentes, um deles, por exemplo, mostra o uso da terapia celular usando injeção de células progenitoras neurais e células intersticiais de Cajal para restabelecer a função de disfunções neuromusculares do piloro⁴⁵.

O intestino, bem como todo o trato gastrointestinal, apesar de ser um órgão tubular e oco, é extremamente complexo e, portanto, é importante ter em mente todos os diferentes tipos celulares que o compõem, além do alinhamento celular específico em cada camada tecidual. O desafio final é manter todos os fenótipos celulares para substituir ou regenerar a função adequada do órgão como um todo, incluindo o peristaltismo, a absorção e a secreção.

Embora o *crossstalk* entre os diversos tipos celulares do intestino não seja ainda muito bem compreendido, dois estudos^{46,47} mostram que a secreção de BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*) pelas células da musculatura lisa induz a diferenciação neural das células do Sistema Nervoso Entérico. Estas pesquisas abrem mais um caminho para o desenvolvimento de segmentos de intestino em laboratório, além de terem um alto potencial para o uso de fatores solúveis na terapia celular de doenças neuroentéricas.

Os desafios da Engenharia de Tecidos do trato gastrointestinal ainda são grandes, mas a área é extremamente promissora. Há necessidade de uma melhor compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvidos com o desenvolvimento de tecido bioengenheirado *in vitro*, a fim de recapitular processos originais e funcionais do tecido.

2 Referências

1. Dangelo, José Geraldo; Fattini, C. A. *Anatomia humana Sistêmica e Segmentar*. (Atheneu, 2007).
2. Morris, G., Kennedy, A. & Cochran, W. Small Bowel Congenital Anomalies: a Review and Update. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **18**, (2016).
3. Troppmann, Christoph; Gruessner, R. Intestinal transplantation. in *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*. (ed. Holzheimer, RG; Mannick, J.) (2001).
4. O’Keefe, S. J. D. *et al.* Short bowel syndrome and intestinal failure: Consensus definitions and overview. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 6–10 (2006).

5. Bakonyi Neto, A. *et al.* Demographic of short gut syndrome: Increasing demand is not followed by referral of potential candidates for small bowel transplantation. *Transplant. Proc.* **36**, 259–260 (2004).
6. Langnas, A. N. Advances in Small-Intestine Transplantation. *Transplantation* **77**, S75–S78 (2004).
7. Hartl, W. H., Jauch, K. W., Parhofer, K. & Rittler, P. Complications and monitoring - Guidelines on Parenteral Nutrition, Chapter 11. *Ger. Med. Sci.* **7**, 1–12 (2009).
8. Saday, C. & Mir, E. A surgical model to increase the intestinal absorptive surface: Intestinal lengthening and growing neomucosa in the same approach. *J. Surg. Res.* **62**, 184–191 (1996).
9. A., B. Longitudinal intestinal lengthening and tailoring: Results in 20 children. *J. R. Soc. Med.* **90**, 429–432 (1997).
10. Bianchi, A. Intestinal loop lengthening-A technique for increasing small intestinal length. *J. Pediatr. Surg.* **15**, 145–151 (1980).
11. Blanco-Benavides, R. & Niño, J. Construction of a new intestinal valve. *Dis. Colon Rectum* **37**, 606–609 (1994).
12. Zurita, M., Raurich, J. M., Ramirez, A., Gil, J. & Darder, J. A new neovalve type in short bowel syndrome surgery. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **96**, 110–118 (2004).
13. Carrel, A. The transplantation of organs: A preliminary communication. *J. Am. Med. Assoc.* **XLV**, 1645–1646 (1905).
14. Lillehei, R. C., Goott, B. & Miller, F. a. The physiological response of the small bowel of the dog to ischemia including prolonged in vitro preservation of the bowel with successful replacement and survival. *Ann. Surg.* **150**, 543–560 (1959).
15. Monchik, G. J. & Russell, P. S. Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery* **70**, 693–702 (1971).
16. Hay, JM; Fragniez, P. Resultats de l'allotransplantation orthotopique de l'intestin grele chez le porc. *Ann. Chir.* **28**, 1063–1067 (1974).
17. Deltz, E;Thiede, A. *Experimental transplantation of small-intestine: Microsurgical techniques and their applicability in research.* Olszewski WL (ed) *Handbook of Microsurgery* **2**, (1984).
18. Price, B. A. *et al.* The effect of rejection and graft-versus-host disease on small intestinal microflora and bacterial translocation after rat small bowel transplantation. *Transplantation* **56**, 1072–1076 (1993).
19. Alican, F. *et al.* Intestinal transplantation: laboratory experience and report of a clinical case. *Am J Surg* **121**, 150–9 (1971).
20. Lillehei, R. C. *et al.* Transplantation of stomach, intestine, and pancreas: experimental and clinical observations. *Surgery* **62**, 721–741 (1967).
21. Okumura, M. *et al.* [Transplantation of the small intestine. Case report]. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao. Paulo.* **24**, 39–54 (1969).
22. Borel, J. F., Feurer, C., Magnée, C. & Stähelin, H. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* **32**, 1017–1025 (1977).
23. Deltz, E. [Immune reactions after allogeneic small bowel transplantation. Graft rejection and graft versus host reaction in the rat model]. *Fortschr. Med.* **102**, 760–762 (1984).
24. Cohen, Z. *et al.* Small intestinal transplantation using cyclosporine. Report of a case. *Transplantation* **42**, 613–621 (1986).
25. Goulet, O. J. *et al.* Small intestinal transplantation in a child using cyclosporine. *Transplant. Proc.* **20**, 288–296 (1988).
26. Grant, D. *et al.* Successful small-bowel/liver transplantation. *Lancet (London, England)* **335**, 181–184 (1990).

27. Ricordi, C. *et al.* High-dose donor bone marrow infusions to enhance allograft survival: the effect of timing. *Transplantation* **63**, 7–11 (1997).
28. Rao, A. S. *et al.* Perioperative Donor Bone Marrow Infusion in Recipients of Organ Allografts. *Transplant. Proc.* **29**, 2192–2193 (1997).
29. International Small Bowel Transplant Registry - XI Small Bowel Transplant Symposium. in (2009).
30. Tzakis, A. G. *et al.* Clinical intestinal transplantation: focus on complications. *Transplant. Proc.* **24**, 1238–1240 (1992).
31. Wu, G. *et al.* Graft-versus-host disease after intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation* **91**, 219–224 (2011).
32. Mercer, D. F., Iverson, A. K. & Culwell, K. A. Nutrition and small bowel transplantation. *Nutr. Clin. Pract.* **29**, 615–620 (2014).
33. DiMartini, A. *et al.* Quality of life after small intestinal transplantation and among home parenteral nutrition patients. *JPEN. J. Parenter. Enteral Nutr.* **22**, 357–362 (1998).
34. Sudan, D. Cost and quality of life after intestinal transplantation. *Gastroenterology* **130**, 158–162 (2006).
35. Meyer, U. The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective. *Fundam. Tissue Eng. Regen. Med.* 5–12 (2009). doi:10.1007/978-3-540-77755-7
36. Boomer, L. *et al.* Scaffolding for challenging environments: materials selection for tissue engineered intestine. *J. Biomed. Mater. Res. A* **102**, 3795–3802 (2014).
37. Wang, Y. *et al.* A microengineered collagen scaffold for generating a polarized crypt-villus architecture of human small intestinal epithelium. *Biomaterials* **128**, 44–55 (2017).
38. Zakhem, E., Raghavan, S., Gilmont, R. R. & Bitar, K. N. Chitosan-based scaffolds for the support of smooth muscle constructs in intestinal tissue engineering. *Biomaterials* **33**, 4810–4817 (2012).
39. Totonelli, G. *et al.* A rat decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration. *Biomaterials* **33**, 3401–3410 (2012).
40. Dedhia, P. H., Bertaux-Skeirik, N., Zavros, Y. & Spence, J. R. Organoid Models of Human Gastrointestinal Development and Disease. *Gastroenterology* **150**, 1098–1112 (2016).
41. Meneses, A. *et al.* Intestinal Organoids—Current and Future Applications. *Vet. Sci.* **3**, 31 (2016).
42. Spurrier, R. G. & Grikscheit, T. C. Tissue engineering the small intestine. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 354–358 (2013).
43. Ohki, T. *et al.* Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* **55**, 1704–1710 (2006).
44. Guyton, A. & Hall, J. *Guyton & Hall - Tratado de Fisiologia Médica.* (2017).
45. Dadhich, P., Zakhem, E., Koch, K. & Bitar, K. N. Therapy Using Co-Injection of Neural-Progenitor Cells and Interstitial Cells of Cajal to Reinstiate Function in an Ex Vivo Model of Neuromuscular Dysfunction of the Pylorus. (2018). doi:10.1016/s0016-5085(18)30605-x
46. Yan, W., Chen, Z.-Y., Chen, J.-Q. & Chen, H.-M. BMP2 promotes the differentiation of neural stem cells into dopaminergic neurons in vitro via miR-145-mediated upregulation of Nurr1 expression. *Am. J. Transl. Res.* **8**, 3689–3699 (2016).
47. Rego, S. L., Raghavan, S., Zakhem, E. & Bitar, K. N. Enteric neural differentiation in innervated, physiologically functional, smooth muscle constructs is modulated by bone

morphogenic protein 2 secreted by sphincteric smooth muscle cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2015).