

Uxue Albizu Unchalo

**Desarrollo de un dispositivo *ex vivo* alternativo para el análisis
de la función intestinal**

**Trabajo de fin de grado
Dirigido por la Dra. Ximena Terra Barbadora**

Grado en Ingeniería Biomédica



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2023

Índice

Agradecimientos	2
Resumen	2
1 Introducción.....	3
2 Memoria	4
2.1 Revisión sobre los métodos actuales	5
2.1.1 Saco Evertido	6
2.1.2 <i>Ussing Chamber</i>	7
2.1.3 Sistema <i>InTESTine</i> TM	10
2.1.4 Modelos de microfluidos <i>Gut-On-Chip</i>	11
2.1.5 Resumen ventajas y desventajas.....	13
2.2 Método alternativo	15
2.3 Propuesta de diseños.....	18
2.3.1 Prototipo 1	20
2.3.2 Prototipo 2	21
2.3.3 Prototipo 3	23
2.3.4 Estudio de materiales.....	24
2.3.5 Métodos de testaje	32
2.4 Estudio de patentabilidad.....	37
3 Conclusión	44
4 Referencias	48

Agradecimientos

Este proyecto de grado ha sido llevado a cabo con la colaboración y asistencia de varias personas.

En primer lugar, deseo expresar mi gratitud a mi tutora académica, Ximena Terra Barbadora, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto junto a ella. Ha proporcionado los recursos y herramientas necesarios para la elaboración de este informe. Quiero destacar su paciencia y dedicación al abordar todas mis preguntas y brindar apoyo en todos los aspectos para asegurar que el proyecto y el aprendizaje asociado sean lo más fructíferos posible. También, quiero agradecer a Adrià Vilalta por su contribución de ideas y su orientación en las etapas iniciales del desarrollo del tema y la estructura del informe.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia y amigos por su esfuerzo y apoyo inquebrantable, tanto en los momentos buenos como en los difíciles, a lo largo de estos años de universidad. Siempre estuvieron allí para impulsarme a no rendirme nunca.

Resumen

Este estudio propone una aproximación más eficiente para analizar la permeabilidad intestinal mediante el empleo de dispositivos fabricados mediante impresión 3D. Se revisan los métodos actualmente en uso, evaluando sus ventajas y limitaciones. El sistema *Ap-to-Bas* (*AtB*) se presenta como una opción prometedora para investigar las propiedades intestinales. Se propone el diseño de un dispositivo para impresora en 3D para el análisis de la permeabilidad intestinal, con diferentes prototipos que varían en el sistema de sujeción del tejido. Se abordan las consideraciones y restricciones que podrían implicar el uso de estos prototipos. También se examinan las limitaciones relacionadas con la impresión 3D, como la selección adecuada de impresora y material, así como los costos y tiempos de manufactura. Se describen diversos materiales disponibles para la impresión 3D, haciendo hincapié en diversos tipos de termoplásticos y polímeros. Además, se mencionan varios métodos utilizados para evaluar la permeabilidad del tejido intestinal, como la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (*TEER*) y el uso de marcadores, junto con técnicas para evaluar la viabilidad del tejido. Por último, se investiga la posibilidad de patentar dicho dispositivo.

1 Introducción

El intestino desempeña un papel de vital importancia en la regulación de la fisiología sistémica, participando en la digestión y absorción de alimentos, el transporte de iones, nutrientes y agua, el metabolismo, la excreción y la secreción de hormonas. Asimismo, alberga una amplia comunidad microbiana que desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis con las células epiteliales intestinales, neuronales o inmunitarias y participar en el metabolismo de fármacos, entre otros aspectos [1]. La luz intestinal se separa del cuerpo mediante una barrera epitelial muy compleja ya que está compuesta por múltiples tipos de células con funciones especializadas junto con una gran comunidad de microbios que forman la conocida microbiota intestinal [9].

La integridad del intestino se puede evaluar *in vivo* midiendo la presencia de moléculas como azúcares o dextrano en orina o en sangre (después de la ingesta). Este método de análisis puede determinar las diferencias generales de la permeabilidad entre el intestino delgado y el grueso, pero este método no tiene estandarización y tampoco aporta información detallada como ubicaciones concretas del intestino que pueden estar alteradas. Al no ser un método preciso, puede dar lugar a resultados de permeabilidad alterados por diferentes factores; es por ello por lo que se han creado métodos más exactos para su análisis [5]. En este sentido, los métodos *ex vivo* permiten determinar las características de cada tramo intestinal, sin embargo, son métodos de alto coste económico y limitados sobre todo por la viabilidad del tejido *ex vivo*.

El objetivo de este estudio será proponer la posibilidad de crear un método más óptimo y eficiente para el estudio de la permeabilidad intestinal. Para ello, se realizará un análisis previo de los diferentes métodos existentes actualmente centrándonos en los métodos de análisis *ex vivo*. El análisis de dichos métodos nos proporcionará la información sobre los diferentes desafíos a los que se enfrentan en este tipo de estudios destacando así la necesidad de crear métodos alternativos.

Esta revisión se centrará en el estudio de un posible método alternativo que tratará sobre el desarrollo del diseño de un dispositivo de impresión 3D para realizar el análisis de la permeabilidad y resistencia del tejido intestinal. Junto con la propuesta de estos diseños se realizará el análisis de materiales más adecuados para su desarrollo. Además, se tratará también los métodos de testeo de permeabilidad y de viabilidad del tejido junto con la posibilidad de patentabilidad del dispositivo.

2 Memoria

La barrera intestinal es una estructura compleja que no solo regula la entrada de contenidos luminales en la circulación sistémica, sino que también está involucrada en la homeostasis inmunológica, microbiana y metabólica.

El sistema gastrointestinal inferior engloba el intestino delgado y el intestino grueso, que se conocen como el intestino. Este último posee un sistema en capas formado por microbiota intestinal, moco y células epiteliales. El revestimiento mucoso del tracto gastrointestinal (GI) constituye uno de los sistemas de tejidos más amplios que mantiene una constante interacción con el entorno externo. Establece una barrera física y funcional crucial que separa el ambiente interno del organismo de elementos potencialmente nocivos y tóxicos. Además de regular selectivamente el paso de los contenidos luminales hacia la circulación sanguínea, el revestimiento mucoso del GI también controla las respuestas inmunitarias adaptativas. La barrera física formada por la mucosa GI es selectivamente permeable, permitiendo la absorción de nutrientes y agua, mientras impide la transferencia de bacterias y sus productos hacia el organismo. Sin embargo, esta barrera puede ser interrumpida debido a lesiones en la mucosa, cambios en las moléculas celulares o respuestas inmunitarias desreguladas asociadas con enfermedades autoinmunitarias.

La anatomía de la barrera intestinal está compuesta en términos generales por tres capas interactivas (Figura 1). La primera capa es la capa luminal, donde los microbios comensales desempeñan un papel clave. Estos microbios buenos ocupan espacio y evitan que los microorganismos dañinos se establezcan y causen problemas. Esta capa actúa como una especie de línea de defensa inicial.

La segunda capa está compuesta por agua no agitada, glicocáliz (una capa protectora de carbohidratos) y moco. El moco secretado mezcla componentes antibacterianos que son producidos por las células de Paneth y los enterocitos. Estos componentes trabajan juntos para crear un ambiente equilibrado y protector que ayuda a mantener a raya a los microbios dañinos. Además, los enterocitos secretan mucina, que recubre la superficie de las células y sirve como una especie de escudo protector. También interactúa con los microbios para ayudar a desencadenar respuestas inmunológicas.

La tercera capa es el epitelio, una capa de células especializadas que forman una barrera física. Estas células están unidas por complejos de unión que regulan la permeabilidad y la función de la barrera. En esta capa, las células de Paneth producen compuestos antimicrobianos que ayudan a combatir los microbios dañinos. Además, debajo del epitelio, en una región llamada lámina propia, hay células inmunológicas que se encargan de defender contra posibles amenazas.

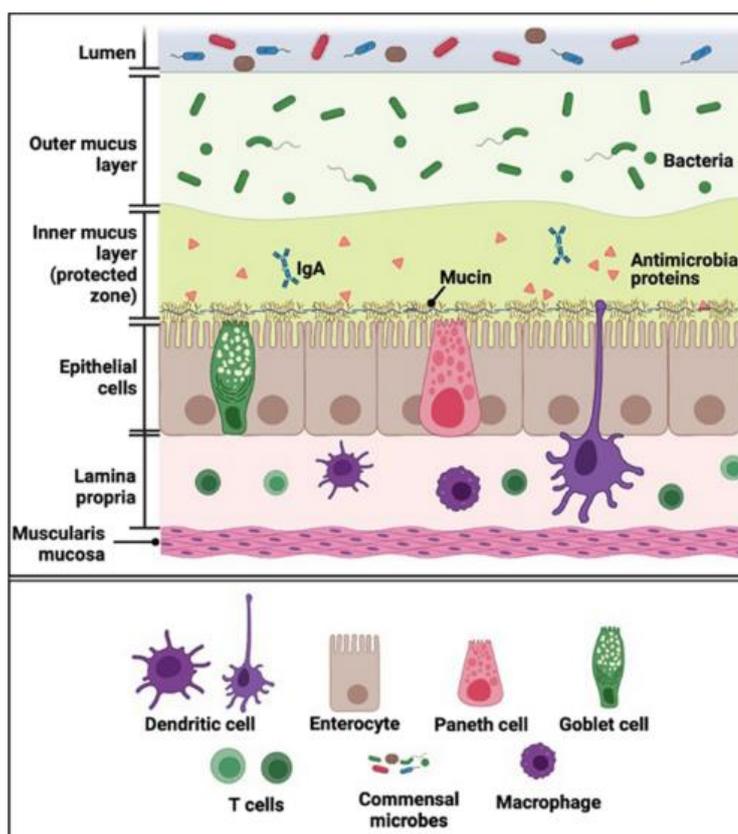


Figura 1 Las tres capas interactivas de la barrera intestinal y su composición.[2]

Si esta barrera se debilita debido a un desequilibrio en la microbiota (disbiosis) o daños en las células, los microbios dañinos pueden acercarse más a las células epiteliales y causar problemas. Las respuestas inflamatorias también pueden ser desencadenadas por daños o infecciones. Cambios en la composición de la microbiota pueden afectar negativamente la barrera, lo que podría tener consecuencias para nuestra salud general [2].

2.1 Revisión sobre los métodos actuales

En el ámbito de la investigación biomédica y el desarrollo de tratamientos para enfermedades intestinales, se utilizan una variedad de técnicas y métodos para analizar el tejido intestinal, tanto sobre tejido aislado, órganos y/o células que no implican el uso de organismos vivos (análisis *in vitro*) como en tejido vivo que ha sido creado de manera artificial en el laboratorio o donado por organismos vivos y analizado fuera del organismo (análisis *ex vivo*) [3]. La principal diferencia entre ambos es que el tejido usado en el análisis *ex vivo* está compuesto de múltiples tipos de células, en cambio, en el análisis *in vitro* al utilizar un cultivo de células es más difícil de simular este gran conjunto de células. A pesar de esta diferencia, ambas metodologías son fundamentales para examinar en detalle la morfología, función y composición del tejido intestinal.

Por otro lado, actualmente, aunque aún no hay muchas publicaciones sobre esta técnica, existe otro método innovador conocido como *in silico* que se trata de un método de simulación en el cual se recogen datos y se almacenan en un ordenador para crear modelos

computacionales que permiten simular cambios en el entorno y en las condiciones del órgano para analizar qué efectos pueden tener sobre él [3]. Este último método junto con las actualmente tan vanguardistas técnicas como lo son las "ómicas" pueden aportar una información valiosa para comprender mejor el funcionamiento del intestino. La información obtenida por estas técnicas junto con un algoritmo puede predecir resultados y estados futuros en áreas específicas como la estructura y función del microbioma intestinal [1]. Es por ello por lo que los avances de la bioinformática y la integración de ellos en este ámbito proporcionan un futuro prometedor ya que permitirá a los investigadores tener acceso a una amplia variedad de datos que ayudarán a una mayor comprensión sobre el funcionamiento y la composición del intestino.

Como se ha mencionado anteriormente, en los últimos años, para estudiar los procesos intestinales en entornos de laboratorio se han desarrollado una amplia variedad de modelos que han sido útiles para comprender la complejidad del funcionamiento intestinal. Estos modelos tienen como objetivo analizar la fisiología intestinal, la función de barrera, la absorción de fármacos y las interacciones huésped-microbio/célula-célula, tanto en condiciones sanas como en situaciones de enfermedad. Sin embargo, la interpretación de estos descubrimientos en el entorno *in vivo* del cuerpo humano ha presentado varios desafíos. Principalmente esto se debe a que estos enfoques no consiguen replicar completamente el complejo entorno que compone el sistema intestinal vivo [4]. Además, a diferencia de otros tejidos, el tejido intestinal plantea un desafío adicional debido a la necesidad de tener en cuenta su polaridad. Para el análisis del tejido intestinal, es fundamental poder orientar el tejido de manera que la superficie apical quede expuesta a los compuestos o agresiones a estudiar.

En esta revisión, se hace hincapié en los modelos *ex vivo* y se recopilan los conocimientos más recientes acerca de la configuración, ventajas y limitaciones de los modelos más utilizados. Este enfoque busca mejorar nuestra comprensión de la complejidad de los procesos intestinales y sus implicaciones clínicas para posteriormente exponer la necesidad de crear métodos alternativos tratando de suplir las deficiencias e inconvenientes de los ya existentes. A continuación, se presenta un resumen de los sistemas *ex vivo* convencionales y de aquellos más recientemente desarrollados.

2.1.1 Saco Evertido

El modelo del saco evertido del intestino fue desarrollado con el objetivo de estudiar la absorción de fármacos y sus mecanismos cinéticos. Este modelo se utiliza principalmente para investigar el metabolismo y absorción de fármacos, así como para evaluar otros parámetros farmacocinéticos, como la resistencia a múltiples fármacos y las interacciones entre fármacos en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal [4].

Los experimentos con saco evertido del intestino utilizan un segmento de tejido intestinal de diferentes animales, siendo la rata la fuente animal más comúnmente utilizada. Para preparar el saco evertido del intestino, se segmenta una parte del intestino (duodeno, yeyuno, íleon o colon) y se invierten para que la superficie interna de intestino quede expuesta en el exterior permitiendo así el acceso directo al epitelio interno del tejido y facilitando el estudio del proceso de absorción y el metabolismo. Una vez invertido, las piezas de intestino se lavan con una solución fisiológica para eliminar contenidos intestinales

y crear un ambiente adecuado. El tejido invertido se fija sobre una varilla de vidrio para posteriormente llenar el saco con una solución de Krebs, se sella y se coloca en una probeta de incubación con medio oxigenado a 37°C [4].

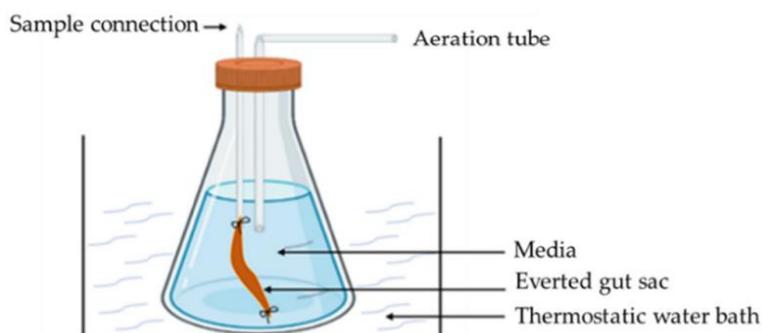


Figura 2 representación del sistema de saco evertido [4]

En comparación con el método de análisis *in vitro* como lo son las líneas celulares, el saco evertido ofrece una herramienta económica y relativamente sencilla para estudiar los mecanismos relacionados con la absorción y cinética de fármacos en diferentes regiones del intestino [4].

Aunque este modelo simula de manera precisa las condiciones del tracto gastrointestinal y proporciona información valiosa acerca de los procesos intestinales, la viabilidad del tejido representa uno de los principales obstáculos. Se recomienda que el tejido se mantenga viable en condiciones fisiológicas por un período de aproximadamente 2 horas. Además, este sistema es altamente sensible, ya que está influenciado por diversos factores como la edad, el género y la especie del animal, la ubicación específica del intestino utilizado, así como otros factores fisiológicos como el pH y la temperatura. Es importante destacar que este modelo no es adecuado para replicar el intestino humano, lo que restringe su aplicabilidad en el estudio de la fisiología y las enfermedades humanas. Hasta la fecha, no se ha realizado investigación microbiológica utilizando este sistema [4].

2.1.2 Ussing Chamber

La *Ussing Chamber* se ha convertido en un modelo de análisis *ex vivo* importante en la actualidad. Este dispositivo es una herramienta valiosa para medir la integridad intestinal ya que se usa en investigación fisiológica para estudiar la permeabilidad del tejido intestinal utilizando sondas fluorescentes y aportando mediciones electrofisiológicas [5].

Actualmente, existen diferentes diseños disponibles en el mercado, pero todos ellos están conformados por los mismos componentes. En la figura 3 se observa un bloque calefactor Navicyte con una capacidad de seis cámaras acrílicas conectadas a un baño de agua circulante manteniendo la temperatura de las cámaras a 37 ° C [4]. Cada una de las cámaras está formada por dos compartimentos que conectan entre ellos para sujetar tejido

epitelial o monocapa de células, permitiendo aislar los lados apical y basolateral del epitelio [4]. Ambas cámaras se sujetan mediante circlips [5].

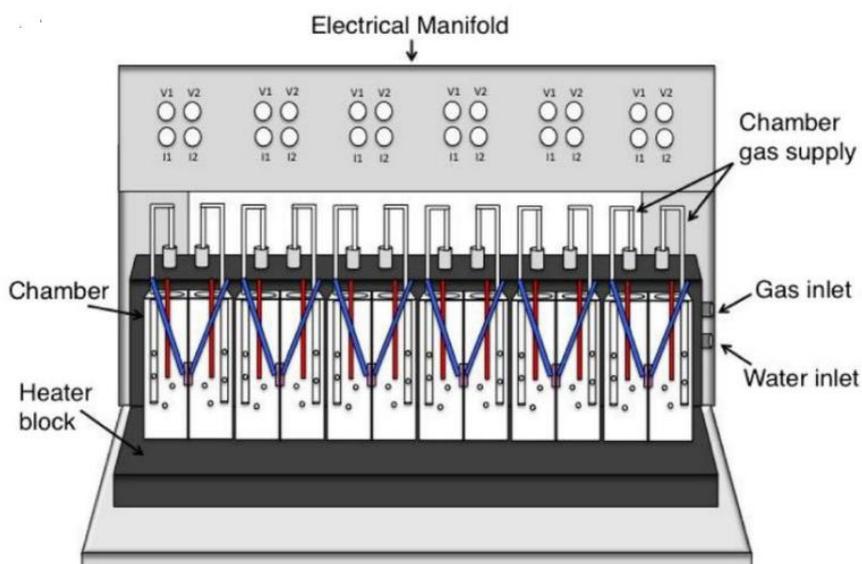


Figura 3 Diseño del sistema de cámaras de Ussing. Seis cámaras con conector eléctrico, calentador y sistema de entrada de agua y gas. [5]

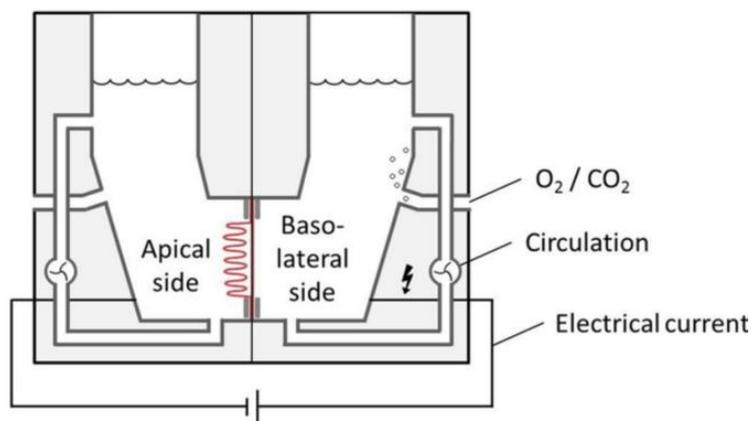


Figura 4 representación esquemática del tejido epitelial intestinal montado en la cámara de Ussing [7]

Por otro lado, para la medición de resistencia transepitelial (TEER) dispone de cuatro electrodos por cámara, dos de voltaje y dos de corriente. Con la ayuda de estos electrodos, se mide la diferencia de potencial, es decir, los voltajes y la corriente de cortocircuito [5].

$$\text{Ley de Ohm: } R \text{ (Resistencia)} = \frac{V \text{ (voltaje)}}{I \text{ (Corriente)}}$$

Todos estos datos se recopilan en un software complementario para generar diferentes diagramas y tablas. Esta medida aporta información con la cual se puede saber el estado de salud del tejido, por ejemplo, un valor bajo es indicativo de una mayor permeabilidad [5].

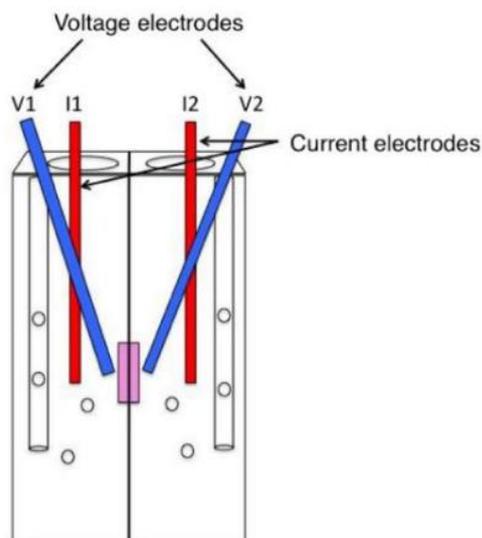


Figura 5 Diseño de cámara individual con electrodos de tensión y corriente [5]

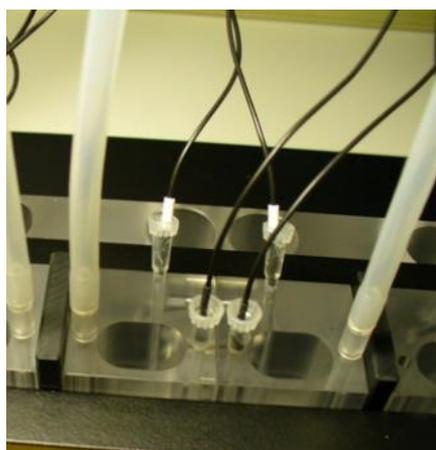


Figura 6 Imagen real de una cámara con la conexión de electrodos y entradas de gas

El uso de la cámara de *Ussing* ha sido fundamental para allanar el camino para el desarrollo de modelos actuales de transporte transepitelial. Se ha empleado ampliamente para estudiar la integridad y la permeabilidad intestinal tanto en modelos de inflamación intestinal en ratones como en biopsias colónicas humanas.

A pesar de sus ventajas, la cámara de *Ussing* también presenta algunas limitaciones. La mayor desventaja de este sistema es la corta viabilidad del tejido ya que solo tiene una viabilidad de horas y no se puede realizar estudios que requieren un largo plazo (> 5 h) [5]. Asimismo, su capacidad de análisis es baja y su manejo puede resultar complejo. A pesar de ello, la cámara de *Ussing* sigue siendo una herramienta fundamental en la investigación sobre permeabilidad, integridad y transporte intestinal en tejidos íntegros.

2.1.3 Sistema *InTESTine*[™]

InTESTine[™] es un sistema de rendimiento medio desarrollado recientemente para estudiar la translocación y absorción de compuestos biológicos, nutricionales o farmacéuticos a través de la pared intestinal de una manera fisiológicamente relevante ya que tanto para el desarrollo de productos farmacéuticos como nutricionales es de vital importancia y de gran interés poder obtener el mejor efecto posible. Para ello se utiliza tejido intestinal fresco (duodeno, yeyuno, íleon, colon) de origen humano o porcino que, al igual que en la cámara *Ussing*, se monta en un sistema de dos compartimentos para crear un lado apical y otro basolateral [4].

El tejido se monta de forma horizontal, en placas estándar de 6 o 24 pocillos, lo que permite estudiar la absorción intestinal evaluando hasta 96 muestras de tejido intestinal *ex vivo* por día. Además, esta orientación horizontal permite incubar el sistema a 37°C sobre un agitador, reduciendo la capa de agua sin remover, la evaporación y la posible formación de espuma; al mismo tiempo, permite el contacto directo del tejido epitelial con los compuestos [4]. En este sistema, la viabilidad del tejido dura alrededor de 2 h [6].



Figura 7 Sistema *InTESTine*[™] [6]

En comparación con la cámara de *Ussing*, ofrece una mayor capacidad de análisis, mayor rendimiento y es de fácil montaje y configuración ya que es una versión simplificada de la misma [4]. Por otro lado, otra de las ventajas es el material ya que está formado por vidrio desechable lo que reduce la unión no específica del compuesto de interés y el riesgo de contaminación del dispositivo montado [6].

Aunque sea posible disponer de tejido intestinal humano, mediante biopsias, su disponibilidad es muy baja. Además, según la región del intestino que se pretenda estudiar, su disponibilidad es menor. Por ejemplo, es más fácil obtener una biopsia de duodeno que de las partes más distales del intestino delgado como el íleon. El uso de tejido animal proporciona la facilidad de obtener la parte específica del intestino necesaria pero no es totalmente igual que la humana lo que dificulta la comparación de resultados y también se encuentran las cuestiones éticas [7].

El tejido porcino es altamente comparable al humano a nivel macroscópica y microscópica debido a las características omnívoras de ambos y también tienen órganos de un tamaño similar [6]. Aunque utilizar tejido intestinal porcino en sustitución del tejido humano puede ser una solución por la baja disponibilidad de este último, para su uso es importante tener en cuenta que, es necesario caracterizar adecuadamente su capacidad metabólica y de transporte para obtener una buena predicción de la situación en humanos [4]. Además, al igual que en otros sistemas de análisis *ex vivo*, la principal limitación de trabajar con tejido *ex vivo* en este sistema ya sea humano o animal, es la disponibilidad limitada de tejido y el corto plazo de viabilidad de este [6].

2.1.4 Modelos de microfluidos *Gut-On-Chip*

El modelo de *Gut-On-Chip* se ha desarrollado recientemente como una plataforma novedosa para estudiar las funciones intestinales. Este modelo tiene la capacidad de imitar la arquitectura intestinal *in vivo* supliendo así algunas de las adversidades a las que se enfrentan los científicos. Como se ha podido ver, los sistemas convencionales 2D y 3D, son métodos donde las interfaces entre tejidos son difíciles de lograr y la naturaleza estática no refleja adecuadamente el entorno intestinal vivo con un flujo constante de nutrientes y oxígeno [4]. Es por eso por lo que este sistema de microfluidos supera a los métodos actuales ya que es capaz de crear un entorno más dinámico y fisiológico, agregando microbioma intestinal e incorporando múltiples tipos de células, permitiendo así estudiar interacciones célula-célula, barrera intestinal, transporte y funciones intestinales más complejas. Este es un punto clave ya que los simbiontes microbianos contribuyen significativamente en la función de barrera intestinal, el metabolismo y la absorción de moléculas y en la producción de químicos y muchas enfermedades.

Hay muchos modelos de intestino en un chip cada uno con sus propias ventajas y limitaciones. En general, los modelos *gut-on-chip* cuentan con dos microcanales separados por una membrana semipermeable porosa, hecha de diversos materiales con diferentes tamaños de poro, en la cual se siembran células epiteliales intestinales y se les permite adherirse durante un breve periodo [4]. Los poros en la membrana facilitan el transporte de moléculas solubles entre los canales. Este sistema utiliza microfluidos para suministrar y retirar el medio, creando una mayor similitud con el microambiente intestinal *in vivo*. Se introduce un flujo de medio a través de los canales mediante jeringas o bombas peristálticas para crear un flujo constante [4]. Con el flujo, las células intestinales se diferencian espontáneamente y forman una estructura tridimensional similar a las vellosidades intestinales que se encuentran en el tejido vivo. Esta estructura recubierta por células epiteliales imita la apariencia y función de las vellosidades intestinales humanas normales, incluyendo la presencia de borde en cepillo y mucus, así como uniones estrechas. También permite la formación de una capa protectora de moco que favorece al gradiente de oxígeno. Al igual que los modelos anteriores, permite el análisis tanto en el lado apical como el basolateral para medir la función de barrera. Por otro lado, al igual que la *Ussing Chamber*, permite medir TEER [4].

Algunos modelos *gut-on-chip* ofrecen la posibilidad de crear tensión mecánica clínica, flujo de fluido intraluminal y movimientos peristálticos mediante la aplicación de vacío a cámaras laterales huecas. La posibilidad de simular este ambiente mecánicamente activo es de gran importancia para la fisiología normal de los órganos y para el desarrollo de posibles enfermedades. Además, se han desarrollado dispositivos avanzados que permiten sembrar

células endoteliales en el lado basolateral de la membrana e incluso incluir células inmunitarias en la cámara basolateral.

Estos sistemas microfluídicos *gut-on-chip* presentan diversas características útiles para el estudio de funciones intestinales, incluyendo el uso de líneas celulares, organoides e incluso tejidos intestinales intactos de pacientes por lo que es tanto un sistema de análisis *in vitro* como *ex vivo*. Con su capacidad para mantener la viabilidad del tejido durante un periodo prolongado y la posibilidad de estudiar el comportamiento en condiciones fisiopatológicas y las interacciones con nuevos fármacos, estos modelos microfluídicos se posicionan como una herramienta valiosa para la investigación de las funciones intestinales y su implicación en enfermedades. También puede usarse para la detección de drogas y para pruebas de toxicología [10].

A pesar de contar con muchas ventajas, existen varias limitaciones en su aplicación. Cuando se usa como sistema *in vitro*, basados en células u organoides, carece de diferentes tipos de células y microbiota lo que sigue siendo un desafío en este campo por la falta de representación adecuada de la arquitectura intestinal. Aunque algunos investigadores han demostrado que es factible incorporar distintos tipos de células, pero sigue siendo un proceso complejo que requiere un mayor desarrollo [4].

Cierto es que en los últimos años se ha desarrollado una innovadora tecnología conocida como bioimpresión 3D la cual tiene el potencial de producir con precisión las estructuras de los tejidos del cuerpo humano [4]. La simulación de órganos está ligado principalmente a la comunidad biomédica mientras que la microfluídica se sitúa en un campo de estudio de la ingeniería. Asimismo, la bioimpresión 3D que se está entre ambos campos. Por lo tanto, esta conexión entre ambas disciplinas es un nuevo desafío para los investigadores, y es en este punto, donde los ingenieros biomédicos desempeñan un papel fundamental [8].

Por otro lado, en cuanto a las limitaciones, a pesar de que el uso de tejido *ex vivo* evitaría esta carencia de diversidad celular, actualmente es difícil de aplicar de forma hermética y tiene una disponibilidad limitada, es por ello por lo que hasta el momento no se han desarrollado tantos modelos de intestino en un chip con tejido [9]. Además, este dispositivo es de difícil configuración y montaje, es de rendimiento bajo y el proceso es tan complejo que los usuarios necesitan formación específica para aprender las técnicas. Finalmente, tanto el material, la reproducibilidad como la robustez del modelo son otros de los inconvenientes, además, actualmente los chips son desechables o difíciles de esterilizar para reutilizarlos [9].

A pesar de las limitaciones, claro está que es un método que da una visión de futuro muy prometedora pero aun requiere mucha atención. En definitiva, aunque aún falte para que llegue este sistema al mundo de los laboratorios de investigación, su gran potencial ha quedado claro y es probable que este sea el método que dirija las investigaciones futuras sobre la función intestinal.

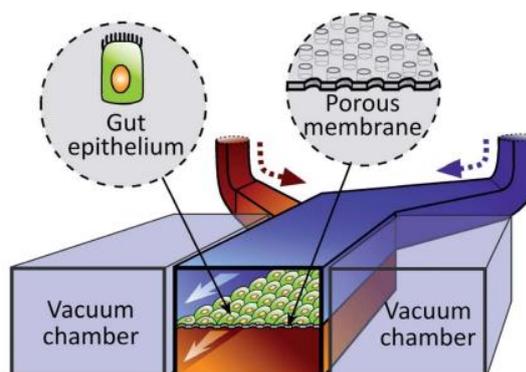


Figura 8 Esquema de Gut-On-a-Chip que muestra la membrana porosa revestida de células epiteliales intestinales y las cámaras de vacío a ambos lados [10]

2.1.5 Resumen ventajas y desventajas

En cuanto a las ventajas y desventajas generales de los métodos *ex vivos*, se encuentran los siguientes [4]:

Ventajas:

1. Arquitectura tisular: A diferencia de los cultivos celulares, al usar tejido, se conserva la estructura y organización tisular, lo que facilita el estudio de la función y permeabilidad del tejido intestinal en un contexto más cercano al ambiente *in vivo*.
2. Interacciones celulares: Se conservan las interacciones entre los diferentes tipos celulares que componen tejido intestinal, lo que proporciona una visión más completa de los procesos biológicos.
3. Función de barrera: Estos modelos permiten evaluar la integridad de la barrera intestinal y la función de transporte de iones y nutrientes

Desventajas:

1. Tiempo de viabilidad: El tejido *ex vivo* generalmente tiene una vida útil limitada, lo que reduce la duración de los experimentos.
2. Mayor costo: En comparación con los cultivos celulares pueden ser más costosos por la necesidad de tejido fresco y equipo especializado.
3. Disponibilidad de tejido limitada

Modelos	Ventajas	Desventajas
Saco Evertido	<ul style="list-style-type: none"> • Tejido intestinal intacto • Gran superficie de absorción • Presencia de mucosa intestinal • Económico 	<ul style="list-style-type: none"> • Uso Principal de tejido de rata, menor relevancia para los humanos • Laborioso • Disponibilidad tisular limitada • Viabilidad tisular (2h)
<i>Ussing Chamber</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tejido intestinal intacto • Múltiples regiones intestinales • Posibilidad para medir TEER y transporte de iones • Dos compartimentos • Adaptación a varios tamaños de tejido 	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo rendimiento • Laborioso • Complejo • Viabilidad tisular (5h) [1] • Precio alto • Conocimientos mínimos tecnológicos para manejar el software
<i>InTESTine™</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tejido intestinal intacto • Múltiples regiones intestinales • Dos compartimentos • Orientación horizontal del tejido • Cabe en placas de 6 o 24 pocillos • Mayor rendimiento y más económico que <i>Ussing Chamber</i> • Facil de usar • Hasta 96 tejidos por sistema cada día 	<ul style="list-style-type: none"> • Viabilidad tisular
<i>Gut-On-Chip</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Estrés mecánico en las células/tejido • Suministro continuo de nutrientes y eliminación de desechos • Diferenciación más rápida de las células • Aparición de estructuras similares a vellosidades • Apoyo a la formación de una capa de moco y permite el cultivo de células y microbios 	<ul style="list-style-type: none"> • Complejo • Laborioso • Bajo rendimiento • Precio alto

Tabla 1 Resumen ventajas y desventajas de métodos de análisis *ex vivo* [4]

2.2 Método alternativo

A lo largo de las últimas décadas, se han creado y aplicado diversos modelos tanto *in vitro* como *ex vivo*, pero a pesar de los avances obtenidos, aún se desconoce en gran medida una comprensión completa de la fisiología y del funcionamiento del intestino humana. Debido a todos estos factores limitantes analizados anteriormente, queda clara la necesidad de desarrollar un dispositivo que pueda suplir algunas o la totalidad de las deficiencias que presentan los métodos de análisis de tejido intestinal actuales.

Aunque métodos como *Gut-On-Chip* tenga un futuro prometedor y la integración de la ingeniería biomédica y de los avances tecnológicos como la bioinformática, bioimpresión 3D, microfluídica, biosensores, ómicas... ayudaran a los investigadores a mejorar sus capacidades y a realizar múltiples avances, las complejidades del intestino y todos los requisitos que se han observado para su completa simulación no permitirán que los investigadores reemplacen las pruebas en humanos o la necesidad de tejido animal tan fácilmente.

Como se ha podido observar, los sistemas de cultivo actuales presentan una serie de ventajas, pero también tienen varias limitaciones ya sea de bajo rendimiento, estabilidad o disponibilidad de tejidos. Los métodos de cultivo bidimensionales (2D) no resultan confiables para anticipar una serie de funciones celulares, tales como la reproducción de microentornos físicos y químicos precisos o la predicción de la absorción de fármacos [8]. Estos enfoques no logran satisfacer los principales requisitos de microambientes celulares *in vivo*. En consecuencia, están siendo reemplazados por sistemas tridimensionales (3D) que reflejan mejor las interacciones de los factores y la complejidad de los tejidos [8]. Es por ello por lo que para esta propuesta alternativa se ha optado por esta última opción.

El Grupo de investigación MoBioFood (*Molecular Biactivity of Foods*) del departamento de bioquímica y biotecnología de la Universidad Rovira y Virgili, por las razones expuestas en esta revisión, decidieron desarrollar un innovador sistema de estudio fisiológico de intestino denominado *Ap-to-Bas (AtB)*. Este enfoque que permite evaluar procesos transepiteliales, se trata de un método *ex vivo* que emplea tejido de diferentes áreas del tracto intestinal de cerdo o rata, y dispone las estructuras naturales del tejido con la idea de vectorialidad (apical-basolateral), imitando el enfoque de las cámaras *Ussing*. Esta herramienta podría tener un gran valor para investigar agentes que influyen en las secreciones enteroendocrinas en las zonas epiteliales apical y basolateral del intestino [12].

En cuanto al montaje de *AtB*, inicialmente consiste en la extracción y preparación previa del tejido extrayendo las capas musculares externas dejando la mucosa intestinal y la submucosa para realizar el experimento. Para la preparación de las muestras, el tubo intestinal se abre longitudinalmente colocando la mucosa del lado apical hacia arriba y a continuación mediante un punzón de biopsia se cortan círculos de tejido con un diámetro de 14 mm (1.54 cm^2 aproximadamente) (Figura 9-a) [12].

Para la construcción del sistema, se utilizó una porción de tubo de silicona liso con medidas de 1.5 cm de largo, 12 mm de diámetro externo y 8 mm de diámetro interno, lo

que equivale a un grosor del tubo de 2 mm. En primer lugar, se adhiere la porción circular del tejido al tubo mediante el uso de adhesivo tisular diseñado para uso animal. El pegamento se aplica en el lado plano del tubo y se presiona sobre el lado apical del tejido dejándolo secar durante 10 segundos (Figura 9-b). De esta forma se separan los lados apical y basolateral. Una vez montado, se usan insertos de cultivo celular que tienen una membrana de policarbonato en la parte inferior. Tras retirar esta membrana, el tubo de silicona junto con el tejido se coloca en el interior del inserto. Para finalizar con el montaje, el conjunto completo se coloca en uno de los 12 pocillos de una placa estándar que esta previamente cargada con 1mL de buffer KRB con D-glucosa (10 mM). Esta solución estará en contacto con el lado basolateral del tejido. Por otro lado, en el interior del tubo de silicona se añaden 400 μ L de buffer KRB con D-manitol (10 mM), en este caso estará en contacto con el lado apical del tejido (Figura 9-c). Una vez repetido el proceso para los 12 pocillos, los tejidos se preincubaron a 37 °C durante 15 minutos en una incubador humidificado [12].

Para finalizar el experimento, se emplea dextrano de fluoresceína isotiocianato (FITC) de 70 kDa para evaluar la efectividad del proceso de adhesión (permeabilidad del aislado de los lados apical y basolateral). Se añadió 0.10 mg/mL de FITC-70 kDa en la parte apical y tras una incubación de 60 minutos, se recolectaron los medios tanto apical como basolateral para posteriormente someterlos a centrifugación precipitando así los residuos. Tras este proceso, las muestras se almacenan a -20 °C para un análisis posterior [12].

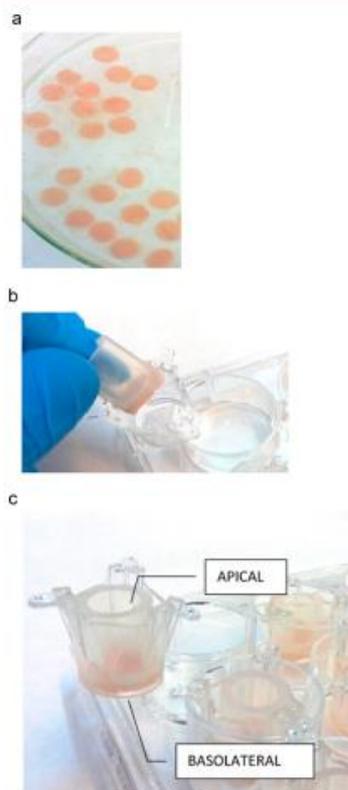


Figura 9 Imagen representativa sobre el montaje de AtB. (a) Círculos de tejido con un diámetro de 14 mm (aproximadamente 1,54 cm²) (Con su previa preparación) (b) intestino colocado en un inserto de cultivo celular sin membrana interior. (c) inserto colocado en uno de los 12 pocillos de una placa estándar [12]

Tras finalizar la incubación, la viabilidad de la mucosa y la submucosa se verifica midiendo la cantidad de lactato deshidrogenasa liberada del interior del tubo (lado apical) al pocillo (lado basolateral). A continuación, se puede ver la comparación de los resultados obtenidos con el sistema *AtB* con tejido de íleon y colon (Figura 10). Se puede observar que al inicio de la incubación los resultados en ambos tejidos son similares. Tras transcurrir 30 minutos, se observa un aumento de la cantidad de LDH y fue aumentando con el transcurso del tiempo. Para descartar posibles filtraciones por el uso de adhesivo para tejido biológico que puede dar lugar a una mala adhesión entre el tejido y el tubo, se usó dextrano de fluoresceína isotiocianato (FITC) de 70 kDa. Como se puede comprobar en la figura 11, en ambos tipos de tejido la adhesión se considera óptima ya que se encontró menos del 1% de FITC en el lado basolateral. Dado que la fuga de lactato deshidrogenasa en el lado basolateral fue menor al 0.1% (1.40 ± 0.17 nKatal), se comprobó que el tejido estaba viable [12].

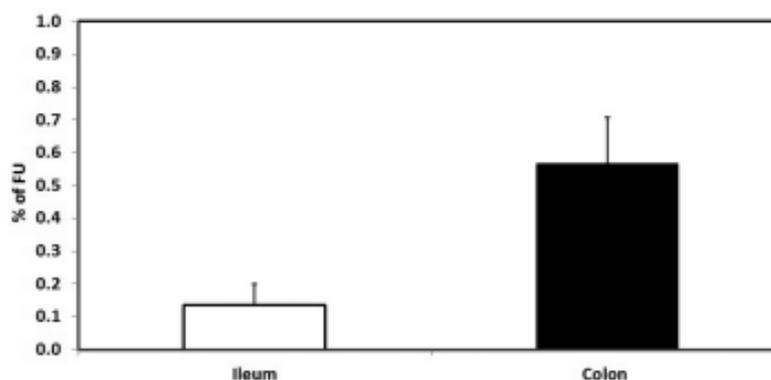


Figura 10 Resultado del sistema *AtB* con muestras de íleon y colon. Tras colocar FITC en el lado apical e incubarlo durante 60 minutos de a 37 °C se muestra el porcentaje de dextrano FITC 70 kDa en el lado basolateral [12]

A diferencia de las *Ussing*, el sistema *AtB* no tiene la posibilidad de medir *TEER*, en su lugar se procedió a medir el transporte paracelular de *Lucifer Yellow* desde el lado apical al lado basolateral del sistema. Se puede observar que la cantidad de *Lucifer Yellow* que ha cruzado la mucosa del tejido en el sistema *AtB* en comparación con los resultados obtenidos en la *Ussing* es similar (Figura 11) [12].

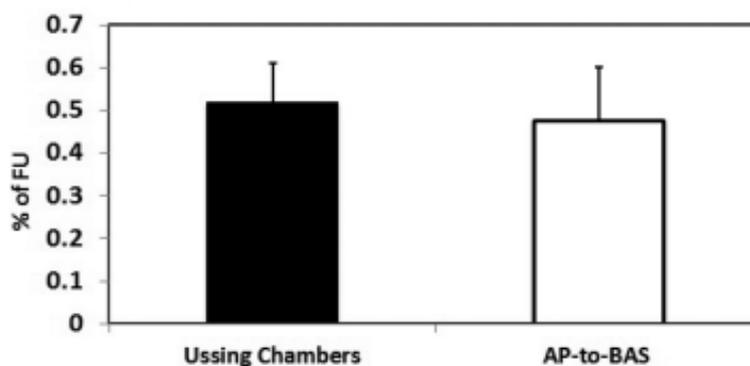


Figura 11 Proporción de *Lucifer Yellow* (LY) que atraviesa la pared del íleon en los lados basolaterales de las cámaras *Ussing* y del sistema *AtB* [12].

En resumen, se llevaron a cabo diversos experimentos para evaluar procesos enteroendocrinos y se abordaron los desafíos de estudiar células enteroendocrinas en el tracto gastrointestinal. Mediante pruebas de eficacia en la separación de lados apicales y basolaterales, así como de la integridad de la barrera intestinal se demostró la viabilidad de este sistema *ex vivo*. Se compararon los resultados con las cámaras *Ussing* (*método de referencia*) y se encontró que el sistema *AtB* mantenía las características requeridas para estudiar los procesos que ocurren a través de la pared intestinal. Se pudo comprobar que este sistema permite estudiar la secreción vectorial de enterohormonas de manera más cercana a la situación fisiológica, ya que muchas moléculas solo pueden estimular la secreción de hormonas al interactuar con el lado apical de las células enteroendocrinas [12].

Además, este sistema ofrece varias ventajas en comparación con el método estándar de las cámaras *Ussing*, que son costosas y limitadas en términos de cantidad de muestras que se pueden analizar al mismo tiempo. El sistema *AtB* permite trabajar con más muestras simultáneamente a un costo más razonable, empleando tejidos más representativos de la fisiología humana (tejido porcino) y garantizando la detección precisa de las enterohormonas [12].

Todo esto demuestra que el sistema *AtB* ofrece una solución innovadora y eficiente para el estudio de procesos enteroendocrinos en el sistema gastrointestinal usando tejido de cerdo y/o rata. Su capacidad para mantener la separación de lados y la funcionalidad transepitelial, así como para analizar la secreción de enterohormonas, lo convierte en una herramienta valiosa para investigar cómo diferentes compuestos afectan la interacción entre el intestino y el cerebro, así como para identificar nuevas formas de modular estos procesos en condiciones fisiológicas más cercanas a la realidad [12].

2.3 Propuesta de diseños

Tras la evaluación de la efectividad de este método innovador para medición de procesos transepiteliales, se planteó la idea de crear el sistema *AtB* de forma más profesional, tratando de optimizar el tiempo y el gasto económico que supone el uso de elementos que previamente no están diseñados para este sistema pero que se adaptaron para ello. Con esta idea se dio paso a crear algunos prototipos en base a la estructura inicial.

En primer lugar, se propuso la idea de crear el prototipo para evitar el uso de insertos de cultivo celular ya que los insertos a la larga suponen un coste alto ya que son desechables, su coste puede variar dependiendo de la marca, tamaño y la cantidad que se compre, pero en general rondan en un rango de 1 a 4 € por unidad. Además, para el sistema *AtB* hay que eliminar la membrana inferior y modificarlos esta forma hace irreversible la posibilidad de usarlos para su función original.

Por otro lado, se propuso la idea de crear un sistema que permitiera eliminar el paso del uso de adhesivo para tejido biológico ya que esto supone tiempo añadido para la preparación del sistema además de la posibilidad de una adhesión incorrecta que alteraría los resultados de las pruebas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la idea principal de esta revisión es hacer un pre-estudio sobre la posibilidad de crear un método alternativo para el análisis de la permeabilidad intestinal. La idea de este pre-estudio incluye el diseño de un dispositivo orientado a la posibilidad de imprimirlo en 3D y para posteriormente evaluar su viabilidad [13]. La idea de usar la impresora se debe a la accesibilidad y libertad de personalizar el diseño junto con la diversidad de materiales con las que actualmente se puede trabajar como plásticos, acero, PDMS, células... lo que puede ayudar a ajustarlo económicamente a las necesidades del usuario así como la libertad de elección de material óptimo para el tipo de análisis de interés.

La impresión en 3D tiene muchos beneficios y aplicaciones. Permite imprimir estructuras frágiles que anteriormente eran imposibles de fabricar a bajo costo. Esta técnica también ofrece resistencia, accesibilidad y precisión que la fabricación mecanizada no puede igualar. Ayuda a controlar una sobre creación de dispositivos innecesario ya que se puede usar para imprimir el producto necesario en el lugar y momento necesario reduciendo así contaminación innecesaria. Por último, el beneficio central e innovador que proporcione la llegada de esta tecnología es la personalización a bajo costo de fabricación. A diferencia de los métodos de fabricación mecanizada la necesidad de realizar un cambio en la representación del objeto en un momento en concreto solo necesitaría una modificación en el archivo de diseño y no afectaría a la línea de producción completa.

A continuación, se presenta el diseño de un dispositivo innovador. Para crear el diseño del dispositivo se utilizó un software gratuito de modelado en 3D (Tinkercad). La estructura general del dispositivo se divide en dos partes (figura 12): una pieza exterior que sirve como base para sostener el tejido y otra pieza interior que asegura la fijación y sellado del tejido sobre la pieza exterior (de forma reversible). Ambas piezas adoptan la forma de cilindros huecos, con una diferencia en el diámetro; como es de esperar, la pieza exterior tiene un diámetro mayor permitiendo encajar la otra en su interior, además, la pieza exterior incluye tres pestañas hacia el exterior que servirán como puntos de apoyo del dispositivo en los pocillos de la placa como se ha podido observar en el montaje del *AtB*.

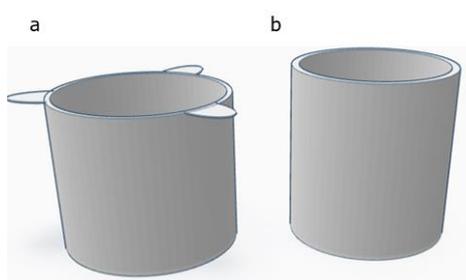


Figura 12 Diseño general del dispositivo. (a) pieza exterior (b) pieza interior, se inserta en el interior de la pieza a.

A continuación, se puede ver el esquema de funcionamiento del prototipo de forma general. Como en *AtB*, se hace la preparación previa del tejido y mediante un punzón de biopsia se cortan círculos de tejido con un diámetro de 14 mm (aproximadamente 1,54 cm²). A continuación, el tejido se coloca de forma horizontal en el interior de la pieza exterior dejando en la parte interior el lado apical y en el exterior el lado basolateral. Finalmente, al insertar la pieza interior, el tejido queda pinzado entre ambas piezas.

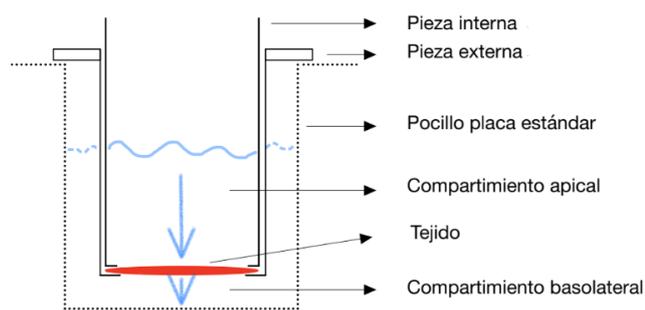


Figura 13 Esquema funcionamiento general del diseño

Se han desarrollado tres prototipos en los cuales se varía la base sobre la cual se coloca el tejido, es decir, el sistema de sujeción del tejido pinzado entre ambas piezas. El objetivo principal es determinar qué prototipo resulta más eficiente en términos de sellado del tejido evitando fugas y eliminando así la necesidad inicial de usar adhesivo para tejido biológico.

2.3.1 Prototipo 1

Como se ha discutido previamente, el diseño general consta de dos piezas y son iguales para los 3 prototipos. Cada uno presenta una pieza exterior de 16 mm de altura, un diámetro exterior de 15 mm y un diámetro interior de 13 mm, lo que resulta en un grosor del tubo de 1 mm. En cuanto a las tres pestañas de soporte, tienen una longitud de 7 mm con 3 mm de ancho y un grosor de 1 mm. Cuando el dispositivo se coloca en uno de los 12 pocillos de la placa queda espacio y margen de movimiento de desplazamiento lateral para permitir la manipulación del contenido del pocillo mediante pipetas sin necesidad de retirar el dispositivo. Con el propósito de evitar el posible movimiento de péndulo se decidió incorporar tres puntos de soporte en lugar de dos asegurando la estabilidad del dispositivo.

En lo que respecta a la pieza interior, su altura es de 20 mm, 4 mm mayor que la exterior para facilitar la posterior extracción de la pieza. Esta pieza como diámetro exterior tiene 13 mm y diámetro interior de 11 mm; nuevamente hay un 1 mm de grosor de tubo. El diámetro exterior coincide con el diámetro interior de la primera pieza, lo que permite un ajuste perfecto y sin holgura al insertar una dentro de la otra, generando una fricción entre ambas piezas que será beneficiosa a la hora de crear presión sobre el tejido sellándolo y asegurando la inmovilidad de la pieza interior.

En cuanto a el sistema de sujeción del tejido, en el primer prototipo hay una rebaba en la parte inferior de ambas piezas. La pieza exterior tiene una rebaba de 2 mm, mientras que en la pieza interior es de 1 mm ya que la combinación de la rebaba junto con el grosor del tubo cubre los 2 mm de la rebaba de la pieza exterior. Esto permite que el tejido quede pinzado durante toda la circunferencia entre ambas rebabas de 2 mm dejando expuesto un diámetro de tejido de 10 mm.

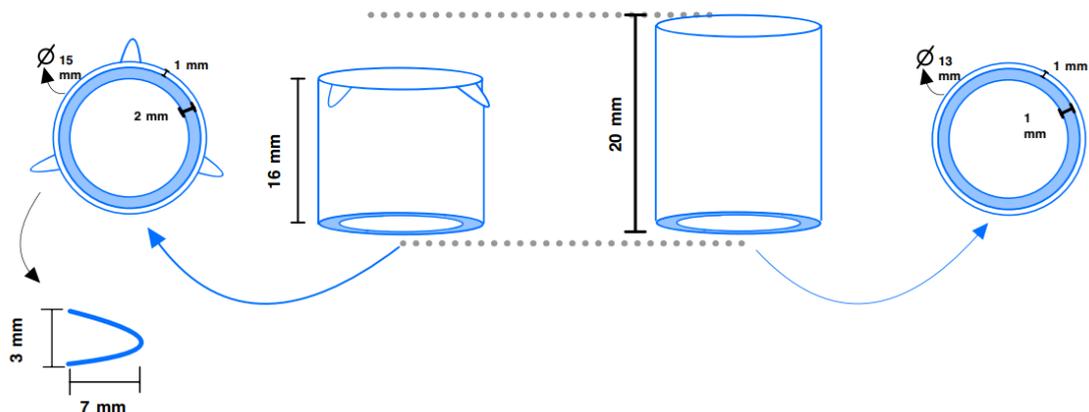


Figura 14 Plano del prototipo 1 con las medidas de cada pieza

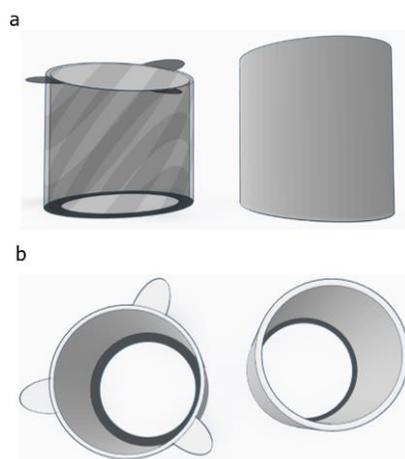


Figura 15 Diseño en 3D de las piezas que componen el prototipo 1 (a) Plano lateral. Pieza exterior en transparente para facilitar la visualización de la rebaba (b) Plano superior, con la rebaba de ambas piezas en gris oscuro

Como posibles limitaciones en este prototipo, habría que evaluar si la medida de las rebabas es suficiente para asegurar y sellar el tejido. Por otro lado, habría que comprobar cómo puede afectar el añadir fluido en el lado apical, ya que, si la fuerza que ejerce la segunda pieza sobre la primera para pinzar el tejido no es suficiente, el tejido podría combarse.

2.3.2 Prototipo 2

Este prototipo se diferencia del anterior en el sistema de sujeción del tejido, en este caso la pieza exterior tiene una rebaba de 1 mm, mientras que la pieza interior en lugar de tener rebaba, al ser un tubo de 1 mm de grosor ya cubre la rebaba de la pieza exterior. El tejido queda pinzado durante toda la circunferencia entre ambas piezas. Además, este prototipo incluye una cruz, en la base para asegurar un mejor apoyo del tejido asegurando

que no se combe a la hora de añadir liquido en el lado apical, es decir, sobre el tejido. Esta cruz está compuesta por dos barras entrecruzadas de 13 mm de largo y 1 mm de grosor.

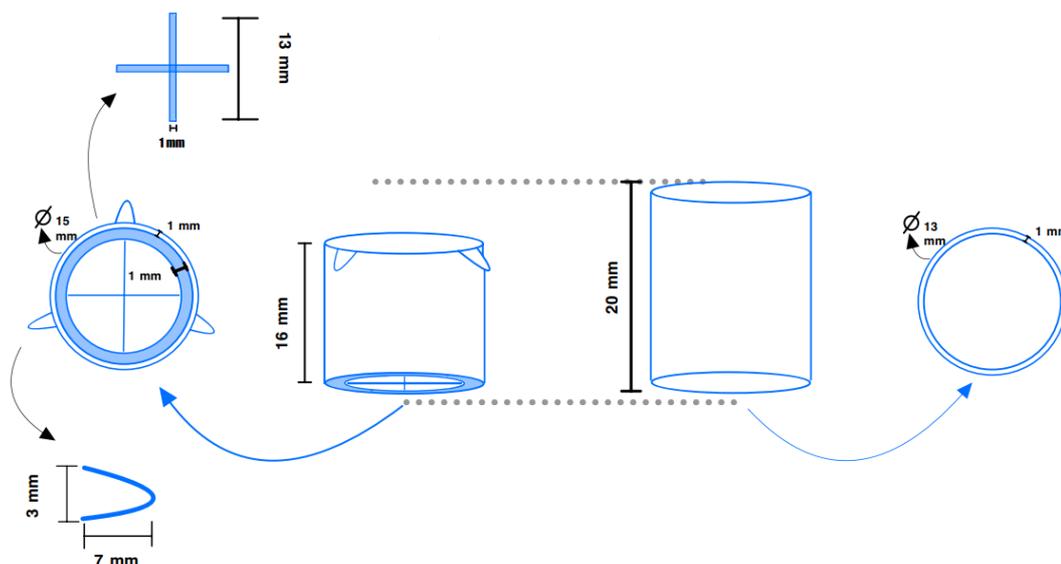


Figura 16 Plano del prototipo 2 con las medidas de cada pieza

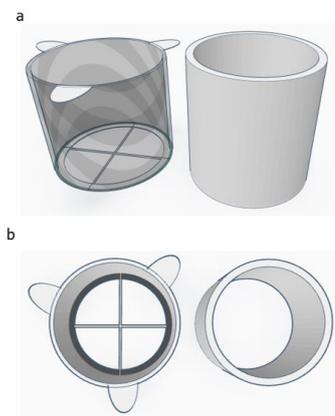


Figura 17 Diseño en 3D de las piezas que componen el prototipo 2 (a) Plano lateral. Pieza exterior en transparente para facilitar la visualización de la rebaba y la cruz (b) Plano superior, con rebaba de la pieza exterior en gris oscuro

En relación con posibles limitaciones en este prototipo, es esencial comprobar cómo el contacto de la cruz con el lado basolateral del tejido podría influir en el análisis de permeabilidad ya que reduciría la superficie de tejido en contacto directo con el compuesto presente en el pocillo. Por otro lado, para contrarrestar esta reducción en la superficie de tejido debido a la incorporación de la cruz, en comparación con el prototipo anterior se ha disminuido el tamaño de la rebaba aumentando así superficie de tejido en la circunferencia. Por este ajuste, habría que evaluar si las dimensiones de las rebabas son adecuadas para garantizar el sellar el tejido.

2.3.3 Prototipo 3

Este último prototipo, tiene una base en forma de "L". La estructura de la "L" está formada por una rebaba de 2 mm de grosor, sobre la cual se añade una extensión de 1 mm de alto y 1 mm de ancho. Esta base en forma de "L" crea una hendidura de 1 mm de ancho permitiendo encajar a la perfección la pieza interior de 1 mm de grosor. El tejido quedaría introducido en la hendidura y comprimido entre ambas piezas logrando un sellado efectivo.

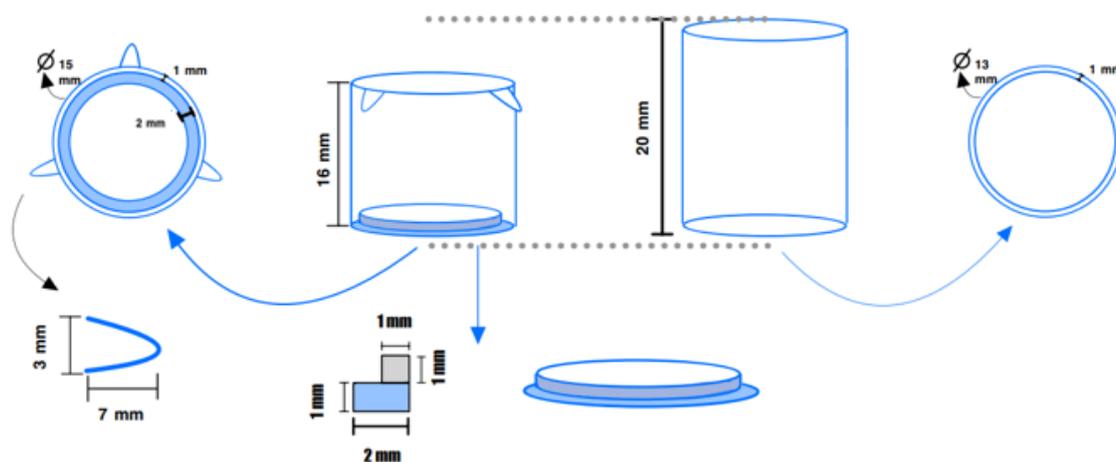


Figura 18 Plano del prototipo 3 con las medidas de cada pieza

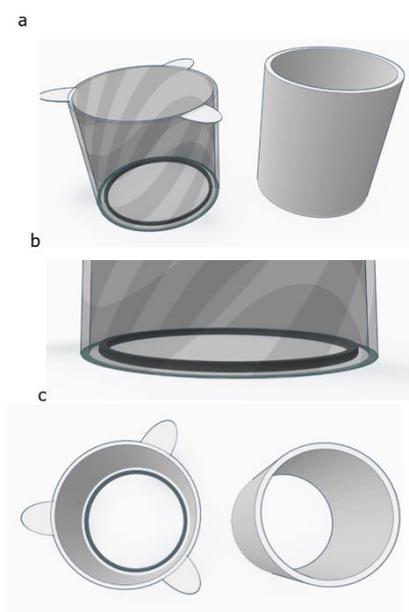


Figura 19 Diseño en 3D de las piezas que componen el prototipo 3 (a) Plano lateral. Pieza exterior en transparente para facilitar la visualización de la "L" (b) Parte inferior de la pieza exterior aumenta para una mejor visualización de la "L" (c) Plano superior, elevación de "L" en gris oscuro.

En este prototipo es necesario evaluar cómo afectaría la inserción del tejido en la hendidura ya que se presionaría y generaría una tensión en toda la circunferencia pudiendo crear una expansión del tejido. También habría que evaluar la posibilidad de ruptura al ejercer presión sobre del tejido contra la elevación de la "L" con posibilidad de cortar o rasgar el tejido. Para este prototipo podría ser conveniente ajustar el diámetro de la circunferencia a la hora de cortar el tejido aumentándola de 14 mm de diámetro a 16 mm. Esta modificación permitiría que los 2 mm adicionales sean los insertados en la hendidura lo que podría ayudar a mitigar los posibles efectos negativos en la tensión del tejido y la probabilidad de ruptura.

En cuanto a las posibles limitaciones asociadas al uso del método de impresión en 3D, el amplio desarrollo en esta área y la creciente diversidad de tipos de impresoras capaces de emplear variadas opciones de materiales como plásticos, metales, cerámicas... añade la dificultad de evaluar y seleccionar que tipo de impresora y material sería la más adecuada. Adicionalmente, surge la consideración del costo para adquirir una impresora profesional destinada al uso personal, lo cual puede representar una inversión inicial significativa.

Por otro lado, es relevante tener en cuenta que los prototipos se imprimen de forma individual lo que supone un aumento de tiempo a invertir para la producción de la cantidad de prototipos deseados. Además, la configuración de la impresora y la técnica de impresión, es decir, el método de impresión 3D que se utilizará (FDM, SLA, SLS, etc.) y cómo este afectará a las propiedades del material y a la resolución de la impresión abre un gran abanico de posibilidades de cometer errores hasta dar con la configuración y material óptimos [14]. Dependiendo de la configuración de la impresora, el proceso puede ser de mayor o menor duración al crear el prototipo. Entre algunos de los factores a tener en cuenta en la configuración de la impresora se encuentra la velocidad de impresión ya que imprimir demasiado rápido podría resultar en capas mal adheridas [14]. La configuración de temperatura para fundir el material y en consecuencia la velocidad de enfriamiento de este, también es uno de los factores que pueden afectar a la fusión de las diferentes partes del montaje pudiendo resultar en una incorrecta consolidación y una mala permeabilidad de la pieza final. El análisis de precisión y resolución de las capas, es decir, debe ser lo suficientemente precisa para replicar las características y estructuras relevantes del objeto a imprimir ya que es un factor clave para obtener una mejor calidad del producto [14].

Finalmente, como dato adicional, es importante añadirle al tiempo de producción, el proceso de eliminación manual de filamentos sobrantes que se forman al imprimir un dispositivo en impresora 3D. Estos filamentos se añaden en el proceso de impresión como estructuras de soporte y rafts para las partes del modelo que tienen voladizos como podrían ser los 3 puntos de soporte.

2.3.4 Estudio de materiales

A lo largo de los años, la fabricación de productos con impresora 3D se ha aplicado a una amplia variedad de materiales. Empezó con el uso de polímeros, luego se expandió a metales y cerámicos, y más recientemente ha abarcado los biomateriales, compuestos y cementos. Además, se pueden emplear mezclas de diferentes materiales con variaciones en su composición o forma, así como materiales híbridos para crear aleaciones o compuestos aportando así la posibilidad de elegir el más adecuado al producto a imprimir. Estas

combinaciones de materiales se pueden incorporar en el diseño de productos con propiedades mecánicas, físicas o químicas.

En cuanto a la elección de materiales para imprimir en 3D productos para uso en laboratorio en pruebas de permeabilidad de tejido intestinal, hay varios factores críticos que se deben tener en cuenta para garantizar la precisión, la biocompatibilidad y la confiabilidad de tus resultados. Algunos de los factores más importantes incluyen:

1. Permeabilidad: El material impreso debe permitir la medición precisa de la permeabilidad a través del tejido sin afectar a la composición de los solutos y debe ser capaz de mantener su integridad estructural mientras se realiza la prueba.
2. Biocompatibilidad: Hay que asegurarse de seleccionar materiales que sean seguros para el contacto con tejido y fluidos biológicos. Los materiales deben ser compatibles con el ambiente celular y no causar reacciones adversas
3. Compatibilidad con fluidos: Los materiales deben ser resistentes a los fluidos biológicos y no reaccionar con ellos, es decir, tienen que ser inertes, no tóxicos ni absorbentes, ya que esto podría afectar la precisión de los resultados.
4. Estabilidad a la temperatura: Dado que las pruebas a menudo se realizan a temperaturas corporales (37°C), el material debe ser estable y no degradarse a esta temperatura durante la duración de las pruebas.
5. Limpieza y esterilización: Hay que asegurarse de que el material impreso pueda ser limpiado y esterilizado de manera efectiva para mantener condiciones de laboratorio adecuadas sin deteriorar el material.
6. Propiedades mecánicas: Los materiales impresos deben tener propiedades mecánicas que sean similares al tejido intestinal real. Esto es importante para simular con precisión las condiciones fisiológicas y los resultados de permeabilidad.

Elegir el material adecuado para la impresión 3D es crucial para garantizar resultados confiables y relevantes para la investigación. Si existiera un material que cumpliera con todos estos requisitos sería el material ideal pero actualmente no existe por lo que entre todos los materiales disponibles hay que tratar de elegir el más adecuado, aunque no cumpla alguno de ellos.

Los dispositivos basados en silicio y vidrio, que surgieron de la industria electrónica, han alcanzado suficiente madurez para su uso en impresión 3D. Pero, a pesar de su aplicación sólida en la industria electrónica, las tecnologías de fabricación basadas en silicio y vidrio no son necesariamente las preferidas en aplicaciones de laboratorio debido a su alto costo, mano de obra intensiva y la naturaleza rígida. En consecuencia, la fabricación y el prototipado basados en polímeros han ganado atención en las últimas dos décadas para aliviar estos problemas y hacer que la microfabricación sea una tecnología más económica y accesible [15].

Teniendo en cuenta todos estos factores críticos que hay que evaluar, esta revisión se centrará en analizar algunos de los materiales disponibles para la impresión 3D, centrándolos en los termoplásticos, polímeros y sus propiedades:

Se llevó a cabo un experimento con cuatro tipos de termoplásticos: Copolímero de olefina cíclica (COC), policarbonato (PC), poliestireno (PS), polimetilmetacrilato (PMMA) [15]. En este estudio se manipuló la hidrofobicidad de las superficies mediante la aplicación de tratamientos de oxidación con UV-ozono o plasma de oxígeno. Durante estos tratamientos, se generan grupos funcionales que contienen oxígeno en la capa superficial, resultando en una mayor energía libre de superficie y una disminución en la hidrofobicidad. Este proceso evita la adsorción de compuestos hidrofóbicos. No obstante, cuando la exposición al ozono es excesivamente prolongada, la abundancia de grupos oxigenados en la superficie podría dar lugar a una superficie sustancialmente cargada. En tal caso, la superficie, extremadamente hidrofílica, no absorberá compuestos hidrofóbicos, pero podría interactuar electrostáticamente con compuestos cargados presentes en el entorno [16].

El tratamiento mediante plasma de oxígeno es más agresivo que el tratamiento con UV-ozono debido a la presencia de partículas con elevada energía cinética en el plasma. Esto resulta en una producción mucho mayor de ozono en un período determinado en comparación con la técnica de UV-ozono. En consecuencia, los tiempos de exposición requeridos son considerablemente más cortos, del orden de segundos en lugar de minutos, en el caso del plasma de oxígeno [16].

Tras el tratamiento, en términos de estabilidad de la hidrofiliidad superficial, se prefiere el tratamiento con UV-ozono sobre el tratamiento con plasma de oxígeno. Los dispositivos fabricados a partir de PC después de un tratamiento de oxidación con UV-ozono de 15 minutos, o de COC después de una oxidación de 30 minutos, resultan apropiados para la incorporación de células o tejidos. Sin embargo, incluso después del tratamiento, PMMA mostro una recuperacion más baja de los compuestos hidrofóbicos. En relación con la permeabilidad al gas y la resistencia química ante solventes orgánicos, PC y COC superan a PS y PMMA en estas características [16].

Resumiendo, estos termoplásticos permiten la producción económica de dispositivos biocompatibles con perfiles de adsorción bajos tanto para compuestos hidrofóbicos como hidrofílicos.

1. PC (Policarbonato):

- Hidrofiliidad: Superficie hidrofílica después del tratamiento con UV-ozono.
- Biocompatibilidad: Alta viabilidad celular después del tratamiento con UV-ozono y recubrimiento con colágeno.
- Permeabilidad al gas: Buena permeabilidad al gas. (Mayor que PS)
- Resistencia Química: Buena resistencia química ante solventes orgánicos. (Mayor que PS)

2. COC (Cicloolefina-Copolímero):

- Hidrofilicidad: Superficie hidrofílica después del tratamiento con UV-ozono.
- Biocompatibilidad: Alta viabilidad celular después del tratamiento con UV-ozono y recubrimiento con colágeno.
- Permeabilidad al gas: Buena permeabilidad al gas. (Mayor que PS)
- Resistencia Química: Buena resistencia química ante solventes orgánicos. (Mayor que PS)

3. PS (Poliestireno):

- Hidrofilicidad: Superficie hidrofílica después del tratamiento con UV-ozono.
- Biocompatibilidad: Alta viabilidad celular después del tratamiento con UV-ozono y recubrimiento con colágeno.
- Permeabilidad al gas: Permeabilidad al gas moderada.
- Resistencia Química: Resistencia química ante solventes orgánicos moderada

4. PMMA (Polimetilmetacrilato):

- Hidrofilicidad: Superficie menos estable en hidrofilicidad después del tratamiento con UV-ozono.
- Biocompatibilidad: Menor viabilidad celular después del tratamiento con UV-ozono y recubrimiento con colágeno.
- Permeabilidad al gas: Permeabilidad al gas limitada.
- Resistencia Química: Resistencia química ante solventes orgánicos limitada.

En resumen, PC y COC demostraron ser los termoplásticos más adecuados para la fabricación de dispositivos microfluídicos biocompatibles, con resistencia a la adsorción de compuestos hidrofóbicos y características favorables de permeabilidad al gas y resistencia química. PS también fue prometedor en términos de adsorción y estabilidad, mientras que PMMA mostró limitaciones en cuanto a la viabilidad celular y la recuperación de compuestos hidrofóbicos [16].

5. Ácido poliláctico (PLA):

Los materiales como el PLA (ácido poliláctico) encuentran un amplio uso en la tecnología de impresión 3D y demuestran ser apropiados para aplicaciones específicas en entornos como la medicina y la biotecnología [17]. Este tipo de material es comúnmente empleado en industrias alimentarias y médicas debido a su carencia de toxicidad, lo cual lo hace ideal para la fabricación de envases y utensilios que entren en contacto con alimentos, así como para la creación de prótesis y herramientas médicas [19]. El PLA se destaca por su biocompatibilidad,

lo que implica que es compatible con los tejidos corporales y los fluidos biológicos [17].

No obstante, el PLA presenta ciertas limitaciones. Comparado con otros plásticos, es menos flexible, lo que lo hace resistente a cargas ligeras y tensiones mínimas. Su naturaleza frágil lo vuelve susceptible a impactos y carece de robustez. Además, el PLA exhibe un grado de higroscopicidad, absorbiendo humedad del entorno circundante. Dado que el PLA proviene de fuentes vegetales, es naturalmente biodegradable, lo que resulta en una menor resistencia ante químicos agresivos y en una escasa tolerancia al calor, propenso a deformarse bajo altas temperaturas [19]. Es importante mencionar que ciertos compuestos químicos pueden causar que el PLA libere sus componentes químicos originales, especialmente el ácido láctico, lo cual puede resultar perjudicial para experimentos científicos[19].

Una ventaja del PLA es su asequibilidad en comparación con otros materiales de impresión más especializados, lo que lo convierte en una opción económicamente favorable.

- Hidrofilicidad: Variable según modificaciones y procesamiento. Puede ser ajustada mediante tratamientos superficiales o modificaciones químicas.

- Biocompatibilidad: Biodegradable y biocompatible. Se descompone en productos no tóxicos en el cuerpo. Ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas y de tejidos [17].

- Permeabilidad al Gas: Puede variar según la estructura y aditivos. No siempre es la mejor barrera hermética comparado con otros materiales.

- Resistencia Química: Resistente a muchos solventes orgánicos y ácidos débiles. Menos resistente a solventes fuertes y ácidos concentrados. Limitaciones en ciertas aplicaciones químicas [18].

6. Polidimetilsiloxano (PDMS):

Es un polímero de silicona ampliamente utilizado en aplicaciones científicas, médicas e industriales debido a sus propiedades únicas y versátiles. La impresión 3D de PDMS (polidimetilsiloxano) aunque es una opción interesante generalmente no se utiliza en impresoras 3D convencionales debido a su naturaleza líquida y el proceso de curado que implica. En su lugar, es más comúnmente utilizado para fabricación de moldes [11]. Este material también tiene sus propias consideraciones y limitaciones.

El PDMS inicialmente es un líquido viscoso y es conocido por su elasticidad, estabilidad térmica y biocompatibilidad, generalmente no reacciona con muchos productos químicos y reactivos biológicos lo que lo hace adecuado para aplicaciones que involucran biomédicos y cultivos celular lo que lo hace adecuado para diversas aplicaciones en el ámbito del laboratorio. Este material proporciona una superficie inerte, permeable a líquidos y gases y tiene baja adherencia por lo que no es tóxico, además, es económico [11]. La transparencia óptica es otra ventaja ya que facilita el análisis visual del tejido mediante microscopios de luz estándar. Esta posibilidad para observar las células es importante ya que facilita el rastreo a tiempo real de la viabilidad, actividad y morfología de las células [11]. Actualmente este material es ampliamente utilizado para fabricar moldes y réplicas de microestructuras como dispositivos microfluídicos y otras estructuras precisas.

Algunos de los inconvenientes que podría suponer el uso de este material en laboratorio, sería la hidrofobicidad ya que puede adsorber moléculas pequeñas, proteínas, fármacos u otros marcadores fluorescentes que están presentes en el medio y por lo tanto reduce la reproducibilidad de la concentración de moléculas de soluto [11]. Ciertamente es que, para reducir esta absorción, se han desarrollado protocolos de modificación de superficies de PDMS, con el objetivo de mejorar su utilidad y ampliar su uso en aplicaciones biomédicas [11]. Aunque el PDMS es flexible, su durabilidad puede ser menor en comparación con materiales más rígidos, lo que puede ser un factor para considerar en aplicaciones de larga duración. Por otro lado, en cuanto a la impresión 3D de PDMS, puede ser más compleja en comparación con otros materiales debido a sus propiedades viscoelásticas y al proceso de curado. Se necesita un proceso de impresión y curado adecuado para obtener resultados óptimos. Puede tener limitaciones en términos de resolución, precisión y tiene una baja adherencia a muchas superficies, lo que puede dificultar la adhesión de las piezas impresas a sustratos o a otros materiales.

En cuanto a los métodos de modificación de superficies para mejorar su aplicabilidad, las técnicas se dividen en tres categorías principales: modificación por activación superficial, fisisorción y modificaciones químicas [15].

1. Modificación por activación superficial [15]:

- Tratamiento con plasma de oxígeno: Utiliza gas ionizado para funcionalizar la superficie del PDMS y hacerla hidrofílica. Es ampliamente utilizado, pero presenta limitaciones en cuanto a la estabilidad a largo plazo y su influencia en adhesión celular y propiedad mecánica.
- Tratamientos UV/ozono: Implican la exposición a radiación ultravioleta u ozono para cambiar la superficie del PDMS, aumentando su hidrofobicidad. Evita debilitamiento mecánico y aumenta la estabilidad, reduciendo la absorción de analitos. Sin embargo, tiene una velocidad de tratamiento lenta, alto costo y requerimientos específicos.
- Descarga de corona: Crea campos electromagnéticos cerca de cables o puntos cargados, formando plasma alrededor de electrodos. Une PDMS a otros sustratos y usa fuentes fácilmente disponibles como bobinas Tesla. La exposición prolongada puede limitar la recuperación de hidrofobicidad.

- Sol-Gel: Implica hidrólisis y condensación para formar sílice nanométrica en el canal de PDMS. Mejora propiedades físicas y reduce absorción de compuestos, pero puede causar hinchamiento, disolución y grietas en PDMS. El proceso de gelificación es complejo y requiere consideraciones cuidadosas.

2. Fisiorción [15]:

- Deposición capa por capa (LBL): Se generan películas delgadas alternando polianiones y policationes en cualquier sustrato para crear capas polielectrolíticas. Aunque puede ser eficaz para prevenir la unión no específica de proteínas, a menudo carece de estabilidad a largo plazo y requiere un control preciso de múltiples factores para mantener la estabilidad y funcionalidad.
- Surfactantes no iónicos: Estos surfactantes se utilizan para reducir la adsorción de proteínas al ser fácilmente adsorbidos en superficies hidrofóbicas para volverlas hidrofílicas in situ. Aunque es un método rápido y efectivo, la eficacia y estabilidad pueden variar según el tipo de surfactante empleado.
- Polímeros cargados: La adsorción electrostática se aprovecha para crear superficies resistentes a la incrustación de elementos biológicos. Este método crea una superficie que no absorbe proteínas, siendo sencillo y eficiente. Sin embargo, puede requerir materiales específicos y una preparación previa de los polímeros cargados. Las propiedades de los recubrimientos pueden depender de la concentración y la interacción electrostática.

3. Modificaciones químicas [15]:

- Deposición química de vapor (CVD): Esta técnica crea una capa delgada en la superficie mediante la transformación de moléculas gaseosas en sólidos, proporcionando enlaces estables y resistencia contra la degradación. Sin embargo, puede requerir equipos y condiciones específicas, así como un control preciso para evitar modificaciones no deseadas.
- Autoensamblaje de monocapas (SAMs): Este enfoque aprovecha la autoorganización de grupos químicos en la superficie para obtener propiedades que evitan la incrustación de elementos biológicos y previenen la absorción de proteínas. Requiere compuestos específicos y procesos secuenciales, y su eficacia depende de la selección de moléculas funcionales y la optimización para lograr cobertura uniforme y estable.
- Silanización: Introduce grupos funcionales en la superficie mediante reacciones de silano, un proceso en dos pasos que puede ser complejo y

llevar más tiempo. La estabilidad a largo plazo de las propiedades obtenidas debe evaluarse ya que puede variar.

- Polímeros de cepillo mediante métodos de injerto: Involucra la generación de grupos funcionales en la superficie del PDMS para su posterior modificación con polímeros. Esta técnica ofrece robustez mecánica y química, junto con alta flexibilidad sintética. Se clasifica en injerto "a" (adicción de polímeros preformados) e injerto "desde" (creación de grupos activos en la superficie antes de la polimerización)

- Hidrofilicidad: Superficie hidrofóbica por naturaleza, que puede requerir tratamientos de superficie para mejorar su afinidad con líquidos acuosos. Sus propiedades hidrofílicas pueden variar según el tratamiento y la formulación.

- Biocompatibilidad: Ampliamente utilizado en aplicaciones biológicas y biomédicas debido a su alta biocompatibilidad. No induce respuestas inmunológicas significativas y es apto para cultivos celulares.

- Permeabilidad al Gas: Relativamente permeable al gas, lo que puede limitar su uso en aplicaciones que requieren hermeticidad completa. Puede permitir la difusión de gases a través de las estructuras.

- Resistencia Química: Buena resistencia química ante solventes orgánicos y ácidos/bases diluidos. Puede ser vulnerable a solventes y reactivos químicos fuertes. Es importante considerar la compatibilidad con sustancias específicas.

Además, al considerar las propiedades del PDMS, surge una nueva idea de crear un molde maestro en lugar de fabricar directamente la pieza, lo que permite la producción de múltiples prototipos simultáneamente. Las ventajas que brinda el uso de materiales como el PDMS radican en su estado líquido, que permite verterlo en los moldes, desgasificar la solución en un desecador para eliminar burbujas de aire y luego curarlo en un horno a 80 °C durante aproximadamente 2 horas [10]. Una vez que el material se ha curado, es posible extraer el prototipo del molde y reiniciar el proceso para crear dispositivos necesarios de manera sencilla, sin requerir preparación o habilidades técnicas previas, como podría ser necesario con el uso de una impresora 3D. Además, esta aproximación no exige una gran inversión en impresoras 3D; solo sería necesario realizar una inversión inicial en la creación de un molde maestro que pueda producir varios prototipos al mismo tiempo reduciendo costes y tiempo de producción.

Tras el análisis de los diversos materiales, como conclusión, se descarta el PLA por su poca resistencia a calor y productos químicos. Por otro lado, se puede afirmar que el PDMS ha desempeñado un papel crucial en la industria de dispositivos debido a sus numerosas ventajas. Su bajo costo y su facilidad de uso son dos factores clave para su éxito. Sin embargo, es esencial manejar con precaución el uso del PDMS, ya que su empleo puede llevar a resultados inesperados y artificiales que obstaculicen innecesariamente programas de investigación completos. Como materiales alternativos, están los termoplásticos como el

PC y COC. Como se ha podido observar tienen propiedades muy adecuadas para su uso en laboratorio para análisis de tejido, además, son más económicos que el PDMS y más usados en impresoras 3D.

2.3.5 Métodos de testaje

Una vez diseñado y seleccionado los materiales, tras la impresión de los 3 prototipos, habría que realizar pruebas preliminares para validar la idoneidad del material y evaluar cuál de los tres prototipos es eficaz para el método de análisis de permeabilidad *AtB*. Con esas pruebas también se podrá estudiar la posibilidad de modificar los diseños para mejorar más su funcionalidad. Estas pruebas deben incluir pruebas de permeabilidad y de viabilidad del tejido.

La prueba de permeabilidad es un método utilizado para evaluar la capacidad de una barrera, como una membrana celular o una barrera epitelial, para permitir el paso de moléculas y para medir la resistencia eléctrica asociada a esa barrera. Como se ha podido observar durante esta revisión, la barrera intestinal es una división funcional del cuerpo que separa la luz intestinal (lado apical) del huésped interno (lado basolateral), implicando componentes mecánicos (moco, capa epitelial), componentes humorales (defensinas, inmunoglobulina A), componentes inmunológicos (linfocitos, células inmunitarias innatas), componentes musculares y neuronales. La barrera intestinal protege un área aproximada de 400 m² y requiere alrededor del 40% del gasto energético del cuerpo.

Una de las características funcionales de la barrera intestinal es la permeabilidad del tejido que se define como el paso de solutos a través de la pared desde el lado apical hacia el lado basolateral. Se pueden medir analizando las tasas de flujo a través de la pared intestinal o registrando el paso de marcadores de permeabilidad a través de la ruta paracelular o la ruta transcelular [22]. En un intestino sano, la permeabilidad es estable y no hay signos de intoxicación, inflamación ni deterioro de las funciones intestinales. A diferencia de un intestino enfermo que la permeabilidad está alterada y cambia de forma no transitoria provocando una pérdida de homeostasis intestinal y alteraciones funcionales que pueden derivar en enfermedades. Una buena permeabilidad del tejido intestinal evita pérdida de agua y electrolitos, así como la invasión de toxinas bacterianas, antígenos y microorganismos en el cuerpo mientras que a su vez permite el intercambio de moléculas entre el huésped y el entorno y la absorción de nutrientes [22].

Como ya se ha comentado anteriormente, la permeabilidad intestinal puede ser evaluada mediante la medición de la resistencia transepitelial (TEER), que es un método no invasivo y funciona evaluando la resistencia eléctrica a través de una capa celular aportando así información de la permeabilidad e integridad de esta capa. Es importante destacar que las mediciones de TEER deben analizarse en el contexto de cada sistema individual, ya que un valor más alto no es necesariamente indicativo de una barrera superior y hay que tener en cuenta factores como la temperatura, la formulación del medio, el número de pasadas de células y las técnicas de medición.

Los valores de TEER son indicadores sólidos de la integridad de las barreras celulares antes de ser evaluadas para el transporte de fármacos o sustancias químicas. Las mediciones de TEER se pueden realizar en tiempo real sin dañar las células y generalmente se basan en

La medición de la resistencia ohmica o la impedancia en todo un espectro de frecuencias. La resistencia eléctrica de una monocapa celular, medida en ohmios, es una medida cuantitativa de la integridad de la barrera [21]. En teoría, la resistencia ohmica se determina aplicando un voltaje de corriente continua (CC) a los electrodos y midiendo la corriente resultante. La resistencia ohmica se calcula según la ley de Ohm como la relación entre el voltaje y la corriente [21]. Sin embargo, las corrientes de CC pueden dañar tanto las células como los electrodos. Para superar este problema, se aplica una señal de voltaje de corriente alterna (CA) con una forma de onda cuadrada [21].

Para llevar a cabo medición de TEER con el dispositivo propuesto, el uso de instrumentos como la cámara *EndOhm* (*EVOM/STX2/EndOhm systems*) podrían ser de gran utilidad [21]. En este dispositivo, tanto la cámara como la tapa contienen un par de electrodos concéntricos: una pastilla de cloruro de plata sensible a voltaje en el centro más un electrodo de corriente anular [21]. La disposición simétrica de estos electrodos circulares en ambos lados de la membrana en una cámara proporciona una distribución más uniforme de la corriente a través de la membrana en comparación con otros tipos de electrodos. Además, son adecuados para su uso en placas de cultivo de 6, 12 o 24 pocillos que cuentan con insertos removibles lo que lo hace compatible con el diseño creado como método alternativo [20]. Las 3 patas del prototipo brindan estabilidad mecánica, asegurando que la membrana se mantenga en posición paralela a los electrodos durante las mediciones. Este diseño contribuye a minimizar cualquier interferencia que pudiera afectar la precisión de las mediciones; tiene una precisión del 1% [20]. El procedimiento de prueba para verificar el rendimiento de estos electrodos es simple y directo, lo que facilita su implementación en el laboratorio.



Figura 20 Electrodo ENDOHM EVOM™ para medición de TEER en insertos de 6.5 mm, 12 mm y 24 mm [20]



Figura 21 Electrodo ENDOHM-12 EVOM™ para medición de TEER en insertos 12 mm [20]

Pero también se puede medir analizando el paso de solutos sobre el epitelio a través de diferentes rutas de paso (paracelular y transcelular).

La ruta paracelular es un mecanismo en el intestino donde las células epiteliales están unidas, pero no fusionadas, creando espacios entre ellas. Esto permite el paso de sustancias como nutrientes e iones a través de estas aberturas intercelulares. En el intestino, esta ruta es esencial para la absorción de nutrientes, agua y electrolitos [22]. La permeabilidad paracelular está regulada por uniones estrechas y proteínas específicas. Citoquinas y factores patógenos pueden influir en esta permeabilidad al modificar las uniones estrechas y el citoesqueleto celular. El control de esta vía es vital para mantener la barrera protectora del intestino y prevenir la entrada de sustancias dañinas al cuerpo. En ocasiones, las mediciones de la TEER se conocen como permeabilidad paracelular [22]. La TEER se relaciona con el movimiento libre de iones y solutos a través del epitelio y puede considerarse como la integridad paracelular del tejido. Sin embargo, es importante entender que la TEER no es equivalente a la permeabilidad paracelular de los marcadores paracelulares. En los experimentos, es común que la TEER no varíe mientras la permeabilidad paracelular aumenta, o viceversa [22].

La ruta transcelular es otro mecanismo de transporte en el intestino que difiere de la ruta paracelular. En lugar de pasar entre las células epiteliales, las moléculas y los nutrientes atraviesan directamente a través de las propias células epiteliales, lo que implica cruzar su membrana apical (lado que está en contacto con la luz intestinal) y membrana basal (lado que está en contacto con el torrente sanguíneo) [22]. Este proceso implica que las sustancias deben atravesar no solo las membranas celulares, sino también las diversas estructuras intracelulares, como vesículas y orgánulos, antes de ser liberadas. La ruta transcelular es particularmente relevante para la absorción de nutrientes que no pueden cruzar fácilmente las uniones estrechas en la ruta paracelular. Es un proceso altamente regulado y específico, que implica la participación de diversas proteínas transportadoras y mecanismos de transporte activo y pasivo. Esta ruta es especialmente importante para moléculas más grandes o específicas, como ciertos nutrientes, lípidos y vitaminas [22].

En conjunto, la ruta transcelular y la ruta paracelular contribuyen a la eficiente absorción de nutrientes y la regulación de la permeabilidad en el intestino. Mediante las mediciones de TEER se puede analizar cambios en las uniones estrechas de las células, pero es importante poder estudiar y medir los marcadores de permeación de diferentes tamaños, que como ya se ha comentado, según el tamaño pueden variar la ruta de transporte [22].

En el caso de las moléculas, se utilizan sondas marcadas o sustancias trazadoras que pueden ser detectadas. La tasa a la que estas sustancias pasan a través de la barrera proporciona información sobre la permeabilidad de esa barrera para diferentes tamaños y tipos de moléculas. A continuación, se hablará sobre diferentes marcadores útiles para el análisis de la permeabilidad del intestino:

1. Sondas paracelulares:

- **⁵¹Cr-EDTA:** es una sonda utilizada en estudios de permeabilidad intestinal. Se trata de una molécula inerte que se emplea para evaluar cómo las moléculas atraviesan la barrera intestinal. Esta sonda se basa en el paso entre las células a través de la ruta paracelular. Su fuerte unión al cromo radioactivo (⁵¹Cr) garantiza que su movimiento sea equivalente, evitando interacciones con el calcio que podrían causar efectos no deseados. Debido a su estabilidad en el entorno intestinal y su facilidad de detección en la orina mediante conteo gamma, el ⁵¹Cr-EDTA se utiliza para medir la permeabilidad intestinal en estudios tanto *in vivo* como *ex vivo* [22].
- **Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)–Dextrano:** es una sustancia utilizada en estudios biológicos para evaluar la permeabilidad en ciertos tejidos, especialmente en el intestino. Consiste en una molécula de dextrano, que es un tipo de azúcar, al cual se le ha conjugado el isotiocianato de fluoresceína (FITC), un compuesto fluorescente. Como está marcado con fluorescencia, se puede rastrear su movimiento a través de las células y tejidos. La ventaja de usar FITC-dextrano en comparación con opciones que involucran sustancias radiomarcadas, como es el caso anterior, es que no está radiomarcado, lo que facilita su uso. Experimentos han confirmado que FITC-dextrano y ⁵¹Cr-EDTA proporcionan resultados iguales de permeabilidad paracelular [22].
- **PEG (polietilenglicol):** es un polímero ampliamente utilizado en diversas aplicaciones médicas, farmacéuticas y de biotecnología. Es un compuesto sintético que se encuentra en diferentes tamaños y consiste en cadenas repetidas de unidades de etilenglicol, lo que le confiere propiedades únicas y versátiles. Al encontrarse en varios tamaños, a diferencia de otras sondas paracelulares que proporcionan información limitada sobre cambios dependientes del tamaño en la permeabilidad, el método que incluye PEG puede medir la dependencia del tamaño en la permeabilidad aparente. Esto hace que sea una herramienta importante para determinar tanto el camino paracelular de poros como de fugas [22].
- **¹⁴Carbono (C)-Manitol y ¹⁴C-Inulina:** Mannitol es una molécula de azúcar hidrofílica que atraviesa las barreras epiteliales a través de los poros acuosos en los complejos de unión estrecha. Por esta razón, se utiliza como un marcador de permeabilidad paracelular. La inulina es otra molécula de azúcar que atraviesa la barrera de manera similar al manitol. Cuando el manitol o la inulina se marcan con ¹⁴C, pueden ser fácilmente detectados en un contador gamma. Estos métodos

permiten evaluar la permeabilidad y el movimiento de estas sustancias en diferentes sistemas biológicos [22].

- **Amarillo Lucifer:** es un compuesto fluorescente utilizado en investigaciones biológicas para rastrear y visualizar diferentes procesos celulares y tisulares. Es una molécula de color amarillo verdoso que emite luz fluorescente cuando es excitada por la luz ultravioleta o la luz azul. Este compuesto atraviesa el tejido por medio de la difusión pasiva. Su captación puede ser observada utilizando técnicas de microscopía de fluorescencia en estudios de captación, y se puede medir su paso mediante fluorimetría. El amarillo lucifer se ha empleado en investigaciones de permeabilidad paracelular tanto en configuraciones *in vitro*, *ex vivo* como *in vivo*, especialmente en estudios de absorción de fármacos. Su capacidad para emitir luz fluorescente permite realizar un seguimiento en tiempo real de diversos procesos biológicos, lo que lo convierte en una herramienta útil en la investigación en biología celular, molecular y otros campos relacionados [22].
- **Sondas marcadas con biotina:** Son moléculas utilizadas en investigaciones biológicas para etiquetar y rastrear componentes específicos en muestras biológicas. La biotina es una vitamina B soluble en agua que tiene una fuerte afinidad por la proteína avidina, lo que permite su detección y aislamiento eficientes. Este ensayo en forma de sándwich se basa en el sistema avidina-biotina e implica el uso de dextranos biotinilados y conjugados con fluorescencia que se unen a las membranas basolaterales de las células epiteliales previamente marcadas con avidina adherente a las células. La solución de la sonda puede ser un solo dextrano biotinilado o una secuencia de dextranos biotinilados de diferentes tamaños y con etiquetas fluorescentes. Al unir la biotina a una sonda es posible etiquetar de manera precisa componentes celulares o moleculares específicos [22].

2. Sondas transcelulares:

- **Peroxidasa de rábano picante (HRP):** es una enzima que se encuentra en el rábano picante y es utilizada en investigaciones científicas y biotecnología. Es una proteína antigénica utilizada como marcador de la captación de proteínas, con la capacidad antigénica de iniciar respuestas inmunitarias en seres humanos. En condiciones normales, se sabe que la HRP atraviesa las células mediante macropinocitosis, es decir, las células capturan partículas y líquidos del entorno circundante mediante la formación de vesículas o vacuolas llamadas macropinosomas. La HRP es fácil de detectar mediante ensayo de inmunohistoquímica e inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y ha sido ampliamente usada en estudios de permeabilidad. Una ventaja de la HRP es su capacidad de ser detectada mediante microscopía electrónica. Su versatilidad la convierte en una herramienta valiosa para generar señales detectables en una variedad de aplicaciones [22].
- **Partículas y bacterias marcadas con fluorescencia:** El fluoróforo puede estar unido a la superficie de la partícula o incorporado en su estructura. En la mayoría de los estudios, se han utilizado partículas fluorescentes de látex ya que se encuentran en una variedad de tintes y tamaños definidos, que varían según el propósito del estudio. Por ejemplo, tamaños de 2-5 μm podrían ser adecuados para experimentos *ex vivo*. Por consiguiente, es esencial considerar detenidamente el tamaño óptimo de

las partículas antes de implementar el experimento de función de barrera. Por otro lado, las bacterias pueden servir como indicadores para investigar la absorción bacteriana transcelular en un huésped o en un entorno *in vitro/ ex vivo*. Estos experimentos pueden realizarse utilizando bacterias vivas o inactivadas. Hay disponibles numerosas bacterias inactivadas con marcaje fluorescente (ya sea mediante calor o procesos químicos) en una amplia gama de tamaños, formas y propiedades antigénicas naturales [22].

En lo que respecta a la evaluación de la viabilidad del tejido, existen diversas técnicas disponibles, y una de ellas se basa en medir la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH está presente en varios tipos de células y participa en el metabolismo energético. Cuando las células sufren daño o mueren, la LDH se libera al entorno extracelular, lo que puede indicar la ruptura de las membranas celulares y la pérdida de integridad celular. Un aspecto relevante es que la LDH se mantiene estable en las células durante aproximadamente 36 horas, lo que permite un análisis confiable de la viabilidad en tejidos que necesitan ser procesados después de ser extraídos [23].

El proceso implica preparar y posteriormente incubar el tejido, generalmente a una temperatura de 37°C, que es equivalente a la temperatura corporal. Durante esta etapa de incubación, si las células están vivas y tienen actividad metabólica, la LDH presente en su citoplasma transforma un sustrato específico, generando un cambio de color que puede ser detectado. Las áreas que presentan un cambio de color indican la presencia de LDH activa y, por lo tanto, la cantidad de células que están metabólicamente activas y en estado viable [23].

La distribución de estas áreas coloreadas se analiza para determinar la viabilidad general y la integridad del tejido. Esta técnica proporciona información sobre la proporción de células vivas y activas en el tejido evaluado. Es un enfoque valioso para comprender cómo el tejido responde y se mantiene en condiciones *ex vivo*, especialmente cuando se necesita procesar el tejido después de su extracción [23].

2.4 Estudio de patentabilidad

Una patente es un documento legal que, si la solicitud es aceptada, se le otorga al inventor el derecho exclusivo de fabricar, vender o licenciar el producto durante un periodo de tiempo determinado impidiendo que otros lo hagan sin su consentimiento. A cambio de este derecho, el inventor debe hacer pública la información detallada de la invención. Esto fomenta la innovación al permitir a los inventores proteger sus ideas y recuperar inversiones, al mismo tiempo que fomenta el avance de la tecnología al compartir conocimientos.

El principal beneficio de una patente no radica tanto en la capacidad de fabricar, ofrecer en el mercado o utilizar la invención patentada, sino más que nada en el derecho de excluir a otros de realizar estas actividades con el producto o método patentado en el ámbito comercial. Una patente puede abarcar diversos tipos de invenciones, como un nuevo

procedimiento, un nuevo dispositivo, un nuevo producto o incluso una mejora o perfeccionamiento de alguno de estos.

La Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM) en colaboración con la Oficina Europea de Patentes (EPO) y con la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), ha desarrollado el sistema informático de solicitud electrónica de invenciones (EPO Online Filing o EOLF) que permite la presentación electrónica de solicitudes de las diferentes modalidades de protección de invenciones, así como la presentación de documentos posteriores a dichas solicitudes o la realización de otros trámites relacionados con ellas o con los títulos concedidos [27].

Las principales características de este sistema son:

- Es un software gratuito.
- Requiere una instalación en local de la aplicación y mantenerla actualizada con los parches compatibles para España.
- Requiere certificado electrónico para firmar y enviar la solicitud
- Permite preparar borradores de la solicitud
- Permite adjuntar la documentación de la solicitud (descripción, reivindicaciones, etc.) en formato PDF o XML.
- Permite enviar la solicitud a diferentes organismos (OEPM, OMPI, EPO, etc.).

Este sistema es beneficioso ya que ahorras tiempo para la gestión, te dan una validación automática de los requisitos mínimos que hay que presentar, garantiza un mayor nivel de seguridad ante filtraciones de datos y recibes al instante un justificante de presentación de la solicitud. La presentación de la solicitud puede hacerse de manera presencial, pero gracias a este sistema también se puede hacer de manera telemática. En este último caso debe visitar la página Web de la OEPM y entrar en la Sede Electrónica, además, los datos presentados por Internet tienen un descuento del 15% en las tasas [27].

RESUMEN DE LAS TASAS

Solicitud electrónica en línea:.....	130 Euros
Solicitud presentada de otras formas (p. e. en papel):	270 Euros

Ilustración 1 Resumen de tasas de solicitud electrónica y presencial [27]

El proceso para patentar una innovación varía según el país y la región en la que desees obtener la patente.

Los documentos de patentes constan de [27]:

- Una primera página que contiene información básica, como el título de la invención, el nombre del inventor o inventores, datos del solicitante y del representante, datos para notificaciones, la designación del inventor o inventores y

si no es el solicitante, cómo ha adquirido éste el derecho a la patente, la relación de documentos que acompañan la solicitud y la firma del solicitante o de su representante.

- Una descripción detallada de la invención, que indica cómo está construida, cómo se utiliza y qué beneficios aporta en comparación con lo que ya existe.
- Reivindicaciones que contienen una definición clara y concisa de lo que la patente protege legalmente.
- Dibujos/Esquemas.
- Resumen de la invención

Cualquier individuo o entidad, incluyendo entidades gubernamentales, tiene la capacidad de solicitar una patente, ya sea de manera directa o a través de un agente de propiedad industrial o un representante debidamente autorizado. Sin embargo, aquellos que no sean residentes en un Estado miembro de la Unión Europea deben, en todos los casos, contar con un agente de propiedad industrial para llevar a cabo sus gestiones. Por otro lado, los residentes en un Estado de la UE que deseen actuar por sí mismos deben designar una dirección en España para recibir notificaciones o, como alternativa, pueden solicitar que las notificaciones les sean enviadas por correo electrónico [27].

Los requisitos necesarios para poder obtener una patente son los siguientes:

- **Novedad:** Se considera que una invención es nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica (Art. 6.a LPE).
- **Actividad inventiva:** Se considera que una invención implica actividad inventiva si aquella no resulta del estado de la técnica de una manera EVIDENTE para un experto en la materia.
- **Aplicación industrial:** Se considera que una invención es susceptible de aplicación industrial cuando su objeto puede ser fabricado en cualquier tipo de industria, incluida la agrícola.

Los requisitos de patentabilidad se evalúan en relación con el estado de la tecnología, que abarca todo lo que se haya hecho accesible al público en España o en el extranjero antes de la fecha de presentación de la solicitud, ya sea a través de una descripción escrita, verbal, su uso o cualquier otro medio (Art. 6.2.LPE) [27].

Para determinar la novedad, también se incluye en el estado de la tecnología el contenido de las solicitudes de patentes españolas o de Modelos de Utilidad, así como las solicitudes de patentes europeas que mencionen a España y las solicitudes internacionales de patente bajo el PCT que hayan entrado en la fase nacional en España. Esto es válido siempre y cuando dichas solicitudes hayan sido presentadas originalmente antes de la fecha de la nueva solicitud y hayan sido publicadas en español en esa fecha o en una fecha posterior (Art. 6.3.LPE) [27].

No se consideran invenciones (Art. 4.4 LPE) [27]:

- Descubrimientos, teorías científicas y métodos matemáticos.
- Obras literarias, artísticas u otras expresiones estéticas, así como obras científicas.
- Planes, reglas y métodos para la realización de actividades intelectuales, juegos o actividades económicas y comerciales, así como programas informáticos.
- Formas de presentación de información.

No pueden ser objeto de patente (Art. 5 LPE) [27]:

- Invenciones cuya explotación comercial sea contraria al orden público o a las buenas costumbres, que incluyen procedimientos de clonación de seres humanos, procedimientos de modificación de la identidad genética de seres humanos, utilización de embriones con fines industriales o comerciales, y procedimientos de modificación de la identidad genética de animales que causen sufrimientos sin utilidad médica o veterinaria sustancial para el hombre o el animal, así como los animales resultantes de dichos procedimientos.
- Variedades vegetales y razas animales.
- Procedimientos esencialmente biológicos para obtener vegetales o animales.
- El cuerpo humano en sus diversos estados de constitución y desarrollo, así como el mero descubrimiento de uno de sus componentes, incluyendo la secuencia o secuencia parcial de un gen.
- Una secuencia de ADN sin indicación de ninguna función biológica.

La Ley 24/2015, del 24 de junio, de Patentes, establece un único proceso de concesión en el cual se elabora un Informe sobre el Estado de la Técnica (IET). Este informe incluye una lista de divulgaciones previas relacionadas con elementos idénticos o similares a la invención, que se consideran relevantes para evaluar su novedad y creatividad. Además, se adjunta una Opinión Escrita (OE), preliminar y no vinculante, sobre si la invención descrita en la solicitud de patente cumple con los requisitos de patentabilidad estipulados en la Ley, especialmente en relación con los resultados de la búsqueda y si la solicitud cumple con los requisitos establecidos por la Ley y el Reglamento [27].

Posteriormente, a solicitud del solicitante, se lleva a cabo un examen exhaustivo para determinar si la solicitud de patente y la invención en cuestión cumplen con los requisitos formales, técnicos y de patentabilidad. Finalmente, la Oficina toma una decisión de conceder o denegar la patente [27].



Figura 22 Proceso de solicitud de una patente [25]

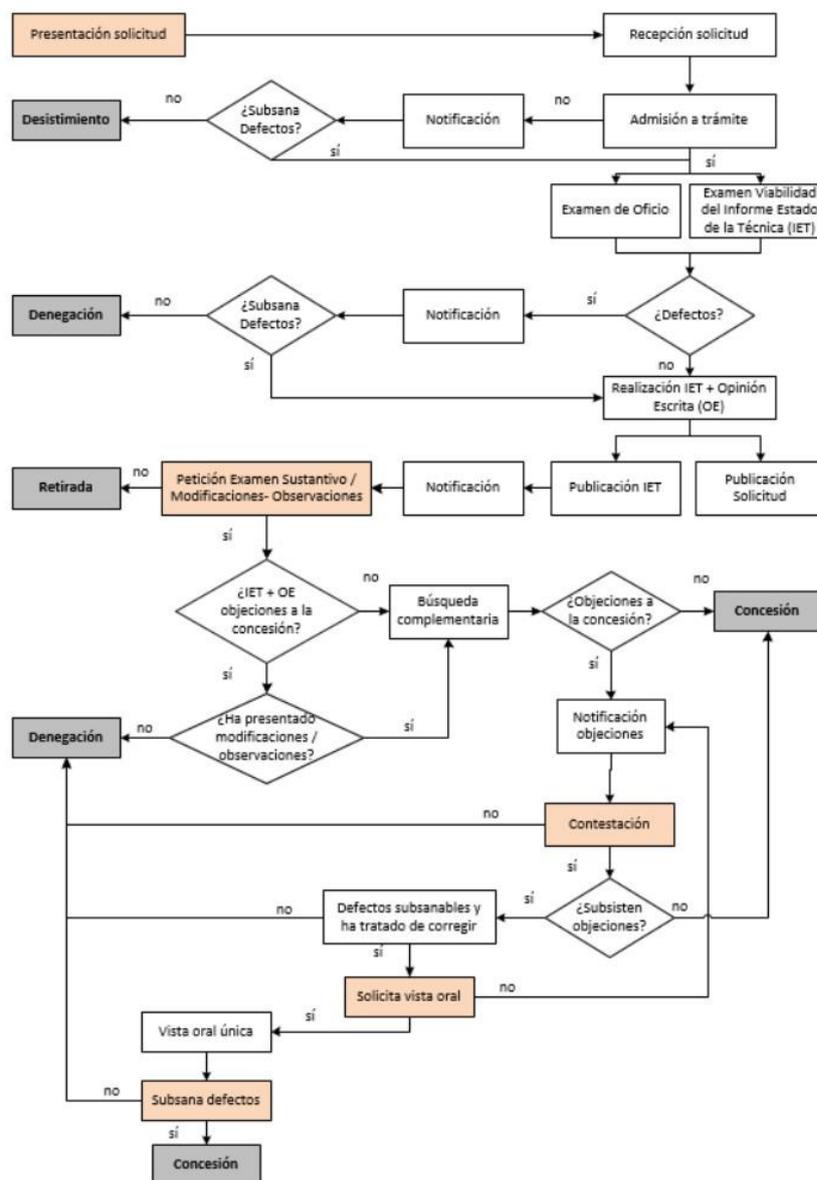


Figura 23 Flujo del procedimiento de concesión de patentes [27]

En cuanto a la patentabilidad de dispositivos fabricados mediante impresión 3D, es importante destacar que esta tecnología de impresión tridimensional está experimentando un notable aumento en su uso, lo que ha suscitado preocupaciones sobre su posible impacto en el sistema de patentabilidad. Inicialmente, se prestó escasa atención a los desafíos que plantea la impresión en 3D desde una perspectiva de propiedad intelectual, pero el interés académico en este ámbito ha ido creciendo en los últimos años [24].

Cuando se hace uso de la tecnología de impresión en 3D para imprimir un objeto tridimensional, se puede hacer una distinción entre cuatro hipótesis diferentes. Un inventor o diseñador puede poner la tecnología de impresión en 3D a trabajar para [24] :

1. Imprimir un objeto totalmente nuevo, que antes era imposible de fabricar mediante medios convencionales.
2. Desarrollar un objeto que ya existía, pero que ahora se produce con una forma algo diferente.
3. Ayudar en la fabricación de un objeto que ya existía, pero que ahora se produce en un material diferente.
4. Crear un objeto existente con materiales idénticos.

En el proceso de impresión en 3D, la creación del archivo CAD es un componente crucial ya que es la representación digital de un objeto físico. Existen dos formas de crear el archivo CAD: El inventor puede usar software para crear digitalmente de manera independiente el objeto patentado desde cero, o puede escanear un objeto existente mediante un escáner 3D para crear una copia digital patentado [24].

La protección de patente para archivos CAD en la impresión 3D es un tema complejo. En ausencia de innovaciones significativas en el formato del archivo o en el método de impresión que lo acompañe, es difícil lograr una protección sólida de patente para un archivo CAD [24]. En lugar de eso, la protección por derechos de autor es la opción más probable. Algunos argumentan que los archivos CAD podrían ser patentables como software, pero esto enfrenta desafíos legales similares a las reclamaciones de software tradicionales. Una alternativa propuesta es tratar los archivos CAD como objetos físicos y otorgarles protección de patente en función de su valor casi igual al del objeto real. La facilidad de adaptar, compartir y copiar archivos CAD en la impresión 3D ha llevado a debates sobre su estatus legal y su potencial para la innovación y la protección de la propiedad intelectual [24].

La creación de archivos CAD en la impresión 3D plantea cuestiones de infracción de patentes. Mientras la perspectiva convencional considera que la creación de archivos CAD no constituye una infracción directa debido a que se considera un archivo de meros datos e información (sin implicar la creación directa del objeto), hay un enfoque alternativo que equipara la creación del archivo CAD con la fabricación del objeto patentado[24]. Es decir, se debería de considerar más que un solo archivo de datos ya que al ser imprimible es prácticamente lo mismo que tener el producto físico, lo que podría considerarse una infracción de patente. La infracción indirecta también es un tema discutido y según la ley

europea, puede depender de si el archivo CAD se comparte o distribuye, si está relacionado con un elemento esencial de la invención y si son adecuados e intencionados para producir el objeto. En última instancia, la aplicación de la ley de infracción en la impresión 3D es compleja y plantea preguntas legales significativas en torno a la propiedad intelectual y la innovación [24].

Los actos realizados en privado y con fines no comerciales están exentos de la infracción de patente, la llamada "excepción de uso privado". La ley de patentes europea exime de infracción directa de la patente a un objeto patentado impreso que está destinado únicamente para uso estrictamente personal [24]. Por otro lado, si el aficionado imprime algunas copias adicionales del objeto patentado estaría protegido de la infracción bajo la excepción de uso privado siempre y cuando no obtenga ningún beneficio económico con ello, es decir, se puede regalar, pero no vender, de lo contrario se consideraría una infracción directa. En este momento, la jurisprudencia y la erudición europeas no han discutido las cuestiones relacionadas con la excepción de uso privado de manera completa, y mucho menos en el contexto de la impresión 3D. Se necesita más investigación para examinar las difíciles preguntas relacionadas con la cantidad de objetos patentados replicados que están exentos de infracción por considerarse de uso privado [24].

Volviendo a los archivos CAD, compartir el archivo CAD no se considera una infracción directa de patente, ya que no es el objeto patentado en sí mismo sino un archivo de datos. Si los archivos CAD se considerarían de igual importancia que el objeto físico, en este caso el objeto patentado, compartir del archivo podría considerarse una infracción directa de patente [24].

Existen numerosas ventajas asociadas a la protección de tus invenciones [26]:

1. Establecer una posición sólida en el mercado y obtener una ventaja competitiva. La titularidad de un título de protección de invención otorga a su poseedor el derecho exclusivo de evitar que otros utilicen comercialmente la invención protegida, reduciendo así la incertidumbre, los riesgos y la competencia [26].

2. Incrementar los beneficios y maximizar las inversiones. Si has dedicado tiempo y recursos considerables a la investigación y desarrollo de tu invención, su protección te ayudará a recuperar los gastos y obtener un rendimiento superior de tus inversiones [26].

3. Generar ingresos adicionales a través de la cesión o licencia de derechos de protección. Como titular de un derecho de protección de invención, puedes obtener ingresos adicionales al vender o conceder licencias a terceros, permitiéndoles explotar tu invención a cambio de pagos fijos y/o regalías (royalties) [26].

4. Acceso a la tecnología mediante acuerdos de licencia cruzada. Si estás interesado en tecnología propiedad de otros, puedes utilizar tus derechos de protección de invención para negociar acuerdos de licencia mutua [26].

5. Acceso a nuevos mercados. La negociación de acuerdos de licencia sobre invenciones protegidas puede abrirte puertas a mercados que de otro modo serían

inaccesibles, siempre que la invención esté protegida también en esos mercados extranjeros correspondientes [26].

6. Evitar que otros protejan tu invención. Aunque un título de protección de invención no garantiza la "libertad de uso" de la invención, sí impide que otros protejan invenciones similares o idénticas, además de señalar que tu invención es nueva y significativamente diferente del "estado de la técnica" [26].

7. Mejorar la capacidad de obtener financiación a tasas razonables. La titularidad de derechos de protección de invenciones o la posibilidad de licenciar derechos de otros puede aumentar tus posibilidades de obtener financiamiento para llevar un producto al mercado [26].

8. Reforzar la capacidad para emprender acciones legales. Poseer un título de protección de invención aumenta significativamente la capacidad para emprender acciones legales con éxito contra quienes copien o imiten tu invención protegida [26].

9. Proyectar una imagen innovadora de tus productos. Se recomienda incluir el número de patente que protege un producto en su etiquetado, envoltorio o publicidad para transmitir una imagen de innovación al público [26].

3 Conclusión

Las complejidades del intestino y todos los requisitos que se han observado para su completa simulación no permitirán que los investigadores reemplacen las pruebas en humanos o la necesidad de tejido animal tan fácilmente. Sin embargo, claro está que la integración de la ingeniería biomédica y los avances tecnológicos ofrecen una visión de futuro prometedora ya que estos avances ayudaran a los investigadores a mejorar sus capacidades y a realizar múltiples avances en este campo.

Si bien ya se ha realizado un trabajo extenso en la búsqueda de modelos de análisis de tejido intestinal, el campo tiene importantes desafíos que debe superar para mejorar la utilidad y la implementación de estos dispositivos en entornos industriales y químicos. En general, los nuevos sistemas deben equilibrar la complejidad con la relevancia para optimizar el costo, la facilidad de uso y la salida de datos significativos utilizando tecnologías como el aprendizaje automático. El desafío principal actual es la incorporación de células fisiológicamente relevantes. Mas allá de las mejoras en el abastecimiento de células, la incorporación de materiales sensibles a estímulos y biosensores en los sistemas puede ayudar a dirigir y monitorear mejor la diferenciación de células madre en los tipos de células mejorará aún más los modelos.

Para estudiar los procesos enteroendocrinos, es esencial disponer de suficiente tejido que contenga células endocrinas en cantidad adecuada para medir la secreción hormonal. Además, dado que las poblaciones de células enteroendocrinas se distribuyen de manera diferente a lo largo del tracto gastrointestinal, es fundamental estudiar estos procesos en diferentes segmentos intestinales. También se destaca la importancia de preservar la

separación entre los lados apical y basolateral del epitelio, ya que esto refleja la disposición natural *in vivo*.

Este estudio se ha centrado en una evaluación exhaustiva de los métodos actuales utilizados para investigar la permeabilidad intestinal, destacando tanto sus ventajas como sus limitaciones. Además, se ha propuesto un enfoque más eficiente mediante el uso de dispositivos fabricados mediante impresión 3D, específicamente el sistema *AtB*, como una opción prometedora para investigar las propiedades intestinales.

Durante la revisión, se ha abordado la importancia crítica de mantener la integridad de la barrera intestinal y se han analizado en detalle varios métodos tradicionales utilizados en la investigación, como el saco evertido, la cámara de *Ussing*, el sistema *InTESTine™* y los modelos de microfluidos *Gut-On-Chip*. Cada uno de estos métodos ha demostrado tener sus propias ventajas y desafíos específicos en el análisis de la permeabilidad y la resistencia del tejido intestinal.

El método alternativo propuesto, denominado *AtB*, ofrece una solución innovadora y eficiente para el estudio de procesos enteroendocrinos en el sistema gastrointestinal utilizando tejido de cerdo y/o rata. A lo largo de esta revisión, se han destacado varias limitaciones de los métodos tradicionales de estudio de tejido intestinal, como las cámaras *Ussing*, y se ha argumentado la necesidad de desarrollar un enfoque más completo y representativo de la fisiología intestinal humana.

El sistema *AtB* se basa en la preparación de muestras de tejido intestinal, que se ensamblan en un dispositivo que permite la separación de los lados apical y basolateral, imitando la fisiología intestinal natural. Se llevaron a cabo pruebas para evaluar la eficacia de este sistema en la separación de lados y la integridad de la barrera intestinal, y se compararon los resultados con las cámaras *Ussing*. Se demostró que el sistema *AtB* mantenía las características necesarias para estudiar procesos que ocurren a través de la pared intestinal y permitía el estudio de la secreción vectorial de enterohormonas de manera más cercana a la situación fisiológica.

El sistema *AtB* presenta ventajas significativas en comparación con los métodos tradicionales, como la capacidad de trabajar con más muestras simultáneamente a un costo más razonable, el uso de tejidos más representativos de la fisiología humana (tejido porcino) y la garantía de una detección precisa de las enterohormonas. Esto lo convierte en una herramienta valiosa para investigar cómo diferentes compuestos afectan la interacción con el intestino, así como para identificar nuevas formas de modular estos procesos en condiciones fisiológicas más cercanas a la realidad.

En resumen, el método *AtB* representa un avance importante en el estudio de la fisiología intestinal y ofrece nuevas oportunidades para la investigación de procesos enteroendocrinos en el sistema gastrointestinal, con el potencial de contribuir al desarrollo de terapias y tratamientos más efectivos en el futuro.

Además, se han llevado a cabo esfuerzos para mejorar la eficiencia del sistema AtB mediante el desarrollo de prototipos de dispositivos diseñados para optimizar la preparación y sujeción del tejido en el sistema. Estos prototipos se han centrado en eliminar la necesidad de insertos de cultivo celular desechables y adhesivo para tejido biológico. Cada prototipo ha sido diseñado con un enfoque único en el sistema de sujeción del tejido, buscando garantizar un sellado efectivo del tejido y minimizar la posibilidad de fugas, lo que permitiría prescindir del uso de adhesivo. Sin embargo, se han identificado posibles limitaciones y desafíos asociados con estos prototipos, como posibles efectos en la superficie del tejido en contacto con el compuesto en el lado basolateral o generación de tensiones en el tejido.

Por otro lado, se ha abordado la cuestión de la elección de materiales para la impresión 3D en aplicaciones de laboratorio, considerando una variedad de factores clave, como la hidrofiliidad, la biocompatibilidad, la permeabilidad al gas, la resistencia química y la resistencia al calor. Se ha explorado una gama de materiales, desde polímeros como el policarbonato, el copolímero de olefina cíclica, el poliestireno y el polimetilmetacrilato, hasta el ácido poliláctico (PLA) y el polidimetilsiloxano (PDMS).

Se ha destacado que los materiales como el policarbonato y el copolímero de olefina cíclica han demostrado ser prometedores para aplicaciones de impresión 3D en laboratorio debido a sus propiedades adecuadas y su asequibilidad en comparación con el PDMS. Sin embargo, cada material tiene sus ventajas y limitaciones específicas que deben evaluarse cuidadosamente según los requisitos de investigación específicos.

En resumen, la elección del material adecuado para la impresión 3D es esencial y debe basarse en una consideración cuidadosa de las necesidades específicas de la investigación y los compromisos entre diversas propiedades.

También, se enfatiza la importancia de realizar pruebas preliminares para validar la idoneidad del material y evaluar cuál de los prototipos diseñados es más eficaz para el método de análisis de permeabilidad *AtB*. Estas pruebas deben incluir tanto pruebas de permeabilidad como de viabilidad del tejido, ya que ambas son cruciales para comprender cómo responde y se mantiene el tejido en condiciones *ex vivo*.

Se han discutido diversos métodos y marcadores para evaluar la permeabilidad, incluyendo la resistencia transepitelial (*TEER*), sondas marcadas con biotina, ⁵¹Cr-EDTA, isotiocianato de fluoresceína (FITC)-Dextrano, PEG, ¹⁴C-Manitol, ¹⁴C-Inulina y Amarillo Lucifer. Cada uno de estos enfoques proporciona información valiosa sobre la permeabilidad de la barrera intestinal desde diferentes perspectivas.

La selección de los prototipos y la evaluación de la permeabilidad intestinal deben llevarse a cabo de manera rigurosa utilizando una variedad de métodos y marcadores para obtener una comprensión completa de la eficacia de los dispositivos y la salud del tejido intestinal. Estas pruebas preliminares son fundamentales para el desarrollo exitoso de herramientas y técnicas relacionadas con el análisis de permeabilidad en el intestino.

Finalmente, se aborda la cuestión de la patentabilidad y su importancia en la protección de la propiedad intelectual en el contexto de la impresión 3D y la investigación de la permeabilidad intestinal. La tecnología de impresión 3D ha introducido al derecho de patentes en la era de la digitalización, lo que significa que en algún momento el derecho de patentes tendrá que abordar este desafío ya que los titulares de patentes podrían estar a punto de enfrentar su propia batalla en el ámbito digital.

Se ha subrayado que el proceso de solicitud de patente es esencial para determinar si una invención cumple con los requisitos necesarios para obtener una patente. Se han mencionado los requisitos clave, como la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial, así como las exclusiones y limitaciones para ciertos tipos de invenciones.

Se destaca que obtener una patente puede ofrecer una serie de ventajas significativas, como una posición sólida en el mercado, ingresos adicionales a través de licencias, acceso a nuevos mercados y la capacidad de emprender acciones legales contra infractores. También se ha mencionado la complejidad de la infracción de patentes en el contexto de la impresión 3D y la importancia de considerar alternativas como la protección por derechos de autor. Resumiendo, el estudio de patentabilidad y la obtención de patentes son elementos fundamentales para proteger y aprovechar la propiedad intelectual, lo que a su vez fomenta la innovación y el avance tecnológico.

Existía la posibilidad de llevar a cabo el análisis económico, pero finalmente no se ha realizado debido a la influencia de numerosos elementos, tales como la elección del modelo de impresora y la determinación del material definitivo entre las opciones consideradas hasta ahora. Además, el costo del material es susceptible de fluctuar en función de diversos factores, como el proveedor, la marca, la disponibilidad al momento de la adquisición, la calidad del producto, la cantidad adquirida (por lo general, mayor cantidad implica un precio menor), y el costo del envío dependiendo de su procedencia. Debido a todas estas variables, la fase actual del proyecto no contempla el análisis económico.

En conjunto, este estudio proporciona una visión completa y detallada de la investigación en torno a la permeabilidad intestinal, la tecnología de impresión 3D y la propiedad intelectual, subrayando su relevancia para la comprensión de la fisiología intestinal y el desarrollo de nuevas herramientas y enfoques en este campo. Estos avances tienen el potencial de tener un impacto significativo en la investigación médica y la mejora de tratamientos relacionados con el intestino y la microbiota.

4 Referencias

- [1] Pearce, S., Coia, H. G., Karl, J., Pantoja-Feliciano, I. G., Zachos, N. C., & Racicot, K. (2018). Intestinal in vitro and *ex vivo* models to study Host-Microbiome interactions and acute stressors. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01584>
- [2] Haroun, E., Kumar, P.A., Saba, L. et al. Intestinal barrier functions in hematologic and oncologic diseases. *J Transl Med* 21, 233 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04091-w>
- [3] Raquel. (2019). [SerIe] Evidencia científica II: ¿Qué diferencia hay entre un ensayo in vivo, in vitro, ex vivo e in silico? *Ciencia y cosmética*. <https://cienciaycosmetica.com/2019/02/10/evidencia-cientifica-diferencia-in-vivo-in-vitro-ex-vivo-ensayos-clinicos/>
- [4] Rahman, S., Ghiboub, M., Donkers, J. M., Van De Steeg, E., Van Tol, E. A., Hakvoort, T. B. M., & De Jonge, W. J. (2021). The progress of intestinal epithelial models from cell lines to *Gut-On-Chip*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13472. <https://doi.org/10.3390/ijms222413472>
- [5] Thomson, A., Smart, K., Somerville, M., Lauder, S. N., Appanna, G., Horwood, J., Raj, L. S., Srivastava, B., Durai, D., Scurr, M., Keita, Å. V., Gallimore, A., & Godkin, A. (2019). The ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease. *BMC Gastroenterology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12876-019-1002-4>
- [6] Westerhout, J., Van De Steeg, E., Grossouw, D., Zeijdner, E., Krul, C., Verwei, M., & Wortelboer, H. M. (2014). A new approach to predict human intestinal absorption using porcine intestinal tissue and biorelevant matrices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 167-177. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.07.003>
- [7] Westerhout, J.; Wortelboer, H.; Verhoeckx, K. Ussing Chamber. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*; Verhoeckx, K., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2015; pp. 263–273.
- [8] Aziz, A. U. R., Geng, C., Fu, M., Yu, X., Qin, K., & Liu, B. (2017). The role of microfluidics for organ on chip simulations. *Bioengineering*, 4(4), 39. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020039>
- [9] Donkers, J. M., Amirabadi, H. E., & Van De Steeg, E. (2021). Intestine-on-a-Chip: Next level in vitro research model of the human intestine. *Current Opinion in Toxicology*, 25, 6-14. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.11.002>
- [10] Kim, H. J., Huh, D., Hamilton, G. A., & Ingber, D. E. (2012). Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab on a Chip*, 12(12), 2165. <https://doi.org/10.1039/c2lc40074j>

- [11] Ashammakhi, N., Nasiri, R., De Barros, N. R., Tebon, P., Thakor, J., Goudie, M. J., Shamloo, A., Martin, M. G., & Khademhosseini, A. (2020). Gut-on-a-chip: current progress and future opportunities. *Biomaterials*, 255, 120196. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120196>
- [12] Ginés, I., Gil-Cardoso, K., Robles, P., Arola, L., Terra, X., Blay, M., Ardévol, A., & Pinent, M. (2018). Novel *ex vivo* experimental setup to assay the vectorial transepithelial enteroendocrine secretions of different intestinal segments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(44), 11622-11629. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03046>
- [13] Costa, M. O., Nosach, R., & Harding, J. C. S. (2017). Development of a 3D printed device to support long term intestinal culture as an alternative to hyperoxic chamber methods. *3D printing in medicine*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s41205-017-0018-z>
- [14] Bousquet, O., & Tabary, P. (2014). Development of a nationwide Real-Time 3-D Wind and Reflectivity Radar composite in France. HAL (Le Centre pour la Communication Scientifique Directe). <https://doi.org/10.1002/c>
- [15] Gökaltun, A., Yarmush, M. L., Asatekin, A., & Usta, O. B. (2017). Recent advances in nonbiofouling PDMS surface modification strategies applicable to microfluidic technology. *Technology*, 05(01), 1-12. <https://doi.org/10.1142/s2339547817300013>
- [16] Van Midwoud, P. M., Janse, A., Merema, M. T., Groothuis, G. M. M., & Verpoorte, E. (2012). Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models. *Analytical Chemistry*, 84(9), 3938-3944. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac300771z>
- [17] Dissa, S. E. B. P. S., & Dissa, S. E. B. P. S. (2023). Biocompatibilidad y PLA. System Dissa. <https://systemdissa.com/technology/biocompatibilidad-y-pla/#:~:text=El%20PLA%20tambi%C3%A9n%20tiene%20propiedades,riesgo%20de%20infecci%C3%B3n%20en%20pacientes.>
- [18] Dissa, S., & Dissa, S. (2023). Filamento PLA: la resistencia química. System Dissa. <https://systemdissa.com/technology/filamento-pla-la-resistencia-quimica/>
- [19] EdgarMejia. (2021, 17 septiembre). PLÁSTICO/MATERIAL PLA: TODO LO QUE NECESITAS SABER. – IDEA161. <https://idea161.org/2021/09/17/plastico-material-pla-todo-lo-que-necesitas-saber/>
- [20] EVOMTM Electrode for TEER. (s. f.). WPI. <https://www.wpiinc.com/var-evm-el-03-01-01-evomtm-electrode-for-teer.html>

- [21] B. Srinivasan, A.R. Kolli, M.B. Esch, H.E. Abaci, M.L. Shuler, J.J. Hickman, TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems, *J. Lab. Autom.* 20 (2) (2015) 107–126. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25586998/>
- [22] Schoultz I, Keita ÅV. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells.* 2020 Aug 17;9(8):1909. doi: 10.3390/cells9081909. PMID: 32824536; PMCID: PMC7463717. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32824536/>
- [23] Gibson ALF, Shatadal S. A simple and improved method to determine cell viability in burn-injured tissue. *J Surg Res.* 2017 Jul;215:83-87. doi: 10.1016/j.jss.2017.03.064. Epub 2017 Apr 7. PMID: 28688666. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022480417301956>
- [24] Van Overwalle, G., & Leys, R. (2017). 3D Printing and Patent Law: A disruptive technology disrupting patent law? *International Review of Intellectual Property and Competition Law*, 48(5), 504-537. <https://doi.org/10.1007/s40319-017-0602-1>
- [25] Portal OEPM. (s. f.-c). <https://www.oepm.es/es/invenciones/Presentar-una-solicitud/tramitar-una-patente-nacional/proceso-de-solicitud/>
- [26] Portal OEPM. (s. f.). Beneficios de proteger las invenciones <https://www.oepm.es/es/invenciones/como-proteger-las-invenciones/beneficios-de-proteger-las-invenciones/>
- [27] Sede electrónica. (s. f.-b). Solicitud electrónica mediante EOLF https://www.oepm.es/export/sites/portal/comun/documentos_relacionados/PDF/Manuales/Manual_Solic_Patentes_Ley_24_2015.pdf