



**UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI**

Revisió bibliogràfica del desenvolupament de fàrmacs amb l'ajuda
dels òrgan on a chip

Albert Cañellas Solé

Treball FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA

Tutor acadèmic: Cristina Reguant Miranda. Departament de Bioquímica i
Biotecnologia(URV). Email: cristina.reguant@urv.cat

Data de convocatòria; Juny 2021

Jo, Albert Cañellas Solé, amb DNI 49422040-P, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de juny de 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Albert', with a horizontal line drawn through it.

Índex

1. Resum	1
2. Abstract	2
3. Justificació del tema	3
4. Introducció	4
5. Hipòtesis i Objectius	7
5.1. Hipòtesis del treball	7
5.2. Objectius principal i secundari	7
6. Metodologia/ Cerca bibliogràfica	8
6.1. Criteris de cerca	8
6.2. Criteris de inclusió	8
6.3. Criteris d'exclusió	8
7. Resultats i Discussió	9
7.1. Pulmó en un xip	9
7.2. Intestí en un xip	12
7.3. L'aplicació dels OoC per l'estudi del càncer o malalties del sistema immune	14
7.4. Aplicació dels OoC per l'estudi i tractament de les malalties minoritàries	17
8. Conclusions	20
9. Autoavaluació	21
10. Agraïments	22
10. Bibliografia	23

1. Resum

Abans que un medicament surti al mercat ha de passar diferents assajos clínics, actualment els estudis preclínic utilitzen animals o models in vitro de dues dimensions, per així analitzar el comportament i la toxicitat dels medicaments. Però aquests estudis no són del tot fiables, és difícil predir l'eficàcia real del medicament, la toxicitat a causa de les diferències genètiques que es presenten entre espècies, a més dels problemes/debats ètics que presenta l'experimentació animal. Per tant, és necessari un model alternatiu més fidel a la fisiologia humana. Els recents avenços en la tecnologia de xips microfluídics amb l'aparició d'òrgans en un xip (OoC per l'abreviatura en anglès) pot ser utilitzada per substituir els models actuals. Els OoC poden simular fisiològicament i químicament els ambients microcel·lulars, així com replicar la interconnexió, i la morfologia cel·lular present en els òrgans del cos humà. En aquesta revisió ens centrarem en explicar els òrgans en un xip i com diferents models d'aquests estan ajudant en la investigació de medicaments.

2. Abstract

Before a drug can be marketed, it must undergo different clinical trials. Currently and preclinical studies use two-dimensional in vitro models or animal models to analyze the behavior and toxicity of drugs. But these studies are not entirely reliable, it is difficult to predict the actual drug efficacy and toxicity due to the genetic differences that occur between species, in addition the ethical problems / debates that animal experimentation presents. Therefore, a more faithful alternative model to human physiology is needed. Recent advances in microfluidic chip technology with the advent of organ-on-a-chip (OoC) can be used to replace current models. OoCs can physiologically and chemically simulate microcellular environments, as well as replicate the interconnection, and the cell morphology present in the organs of the human body. In this review we will focus on explaining organ-on-a-chip and how different models of these are helping in drug research.

3. Justificació del tema

L'elecció del tema es deu al fet que vaig realitzar les pràctiques en una de les empreses pioneres en el desenvolupament d'òrgan-on-a-chip, com és TissUse GmbH localitzada a Berlín, Alemanya. Em va semblar un tema interessant i actual, ja que es presenta com una tecnologia disruptiva en l'àmbit de la recerca de medicaments.

Els òrgans en un xip es desenvolupen per la necessitat actual de trobar alternatives a les tècniques pel desenvolupament de fàrmacs, actualment les proves clíniques per saber el comportament dels fàrmacs es realitzen amb ratolins. Això presenta diferents problemes ètics com tècnics. Per començar els problemes ètics que esdevenen de fer proves amb animals, el sofriment que aquests poden patir. I per altra banda es troben els problemes relacionats amb la biologia i les diferències entre les cèl·lules humanes i dels animals, normalment ratolins. Un fàrmac que pot tenir una bona reacció amb els ratolins, presentant mínims efectes secundaris, a l'hora de fer-se en cèl·lules humanes pot ser que no tingui els mateixos resultats. S'ha buscat solucionar aquests problemes mitjançant els cultius basats en cèl·lules humanes. Amb el nou model i gràcies a les últimes investigacions de l'òrgan o cos en un xip, s'ha volgut presentar com a possible solució.

En aquesta revisió, repassarem que és un òrgan en un xip i com aquests poden ajudar o estan ajudant en el desenvolupament de fàrmacs.

4. Introducció

En els últims anys la indústria farmacèutica s'ha trobat amb diferents reptes en l'àmbit de la investigació de nous medicaments: els alts preus i la poca efectivitat. La predicció dels sistemes actuals tant *in vitro* com *in vivo*, ha portat els assaigs clínics a buscar nous enfocaments en la investigació farmacèutica per poder avaluar els medicaments.

Fins ara els estudis amb animals segueixen essent el referent pels estudis preclínic, no obstant això, la precisió i la reproducció dels resultats obtinguts amb animals es veu minvada en humans a causa de les diferències entre espècies.

A conseqüència dels resultats poc fiables i la toxicitat inesperada en humans, el 40% dels fàrmacs desenvolupats fracassen en els assaigs clínics tot i haver obtingut resultats positius en les proves amb animals [1], [2].

Per això, els models de cultius cel·lulars 3D han adquirit en els últims anys l'atenció per a presentar-se com una solució a la poca fiabilitat dels models actuals, aquests presenten un nivell de diferenciació i organització de teixits impossible de trobar-se en els sistemes 2D convencionals. L'evolució dels models de cultius cel·lulars 3D amb la tecnologia de microcanals ha permès controlar l'ambient cel·lular, permeten reproduir biològicament i fisiològicament les interaccions entre teixits i/o òrgans humans.

Aquests microdispositius són coneguts com a òrgan-on-a-chip (OoC), permeten miniaturitzar unitats funcionals d'òrgans humans. Estan formats per microcanals polimèrics transparents orgànics basats en silici amb cèl·lules funcionals humanes que presenten els tres aspectes vitals dels òrgans: La microarquitectura 3D definida per la distribució espacial dels teixits. Les interaccions funcionals teixit-teixit. I les interaccions, els estímuls bioquímics i mecànics dels mateixos òrgans.

Els xips són compactes i formats per microcanals que permeten la manipulació de diferents paràmetres fluídics i químics, com ara el cabal, la pressió, el nivell d'oxigen i el pH, proporcionant condicions de cultiu controlables. Això permet simular les característiques microestructurals i funcionals dels teixits o òrgans *in vivo*.

Aquests xips poden ser utilitzats com a models *in vitro* per a simulacions farmacològiques i per poder estudiar processos biològics complexos com la distribució dels medicaments en els teixits, monitoratge d'anàlisis i aprofundir en diagnòstics mèdics a partir de teràpies i investigacions.

Tot i la revolució que pot suposar aquesta tecnologia, el seu impacte encara està per determinar amb reptes com integrar aquesta tecnologia en les fases de desenvolupament d'un medicament[3].

L'origen de l'OoC es remunta dècades enrere, amb l'aplicació de dispositius microfluidics per al cultiu cel·lular i l'anàlisi biològic. A diferència de l'enginyeria de teixits, l'OoC no busca reproduir els teixits o òrgans sencers a escala original, sinó que té com a objectiu imitar l'arquitectura i funcionalitat organotípica, la matriu extracel·lular, els factors bioquímics i senyals biofísics a petita escala, amb la finalitat de servir com a model per a malalties i proves per medicaments.

L'any 2010 el grup Ingber de la facultat de medicina de la Universitat de Harvard va anunciar un model Pulmó en un xip basat en el treball de Hugh del grup Takayama, això va cridar l'atenció de la comunitat científica i es va considerar que va marcar el camí pel desenvolupament de l'OoC. El model consistia en cultivar cèl·lules capil·lars i alveolars als dos costats de la membrana porosa dels del pulmó-a-un xip, així els investigadors podien estudiar els mecanismes respiratoris que es produeixen en la unió alvèol-capil·lar. El model podria ajudar a desxifrar els mecanismes patològics involucrats en malalties respiratoris, com podria ser la COVID-19.[4]

A partir d'aquest estudi van aparèixer nombrosos òrgans en un xip, com: ronyo en un xip [5]; pàncreas en un xip [6], [7]; cor en un xip [8], [9]; intestí en un xip [10], [11]; barrera hematoencefàlica en un xip [12], [13]; i xip d'os i medul·la òssia [14]–[16].

Els OoC poden ajudar a identificar mecanismes biològics crítics, així com provar l'eficàcia i la toxicitat de fàrmacs en òrgans concrets. Proporcionant una referència fiable per als assaigs clínics.

Tot i que els OoC se centren a imitar les funcions dels òrgans individualment, els OoC multi-òrgan integren múltiples unitats d'òrgans, permeten l'estudi d'interaccions entre òrgans.

Per exemple, es va desenvolupar un OoC de tres òrgans amb cor-fetge-pell per analitzar els efectes de l'exposició aguda prolongada a medicaments en el cor i fetge. També es va desenvolupar un OoC de 4 òrgans amb connexions seqüencials amb compartiments intestinal, hepàtic, cutani i renal per provar la toxicitat dels medicaments en els diferents teixits i òrgans.

Actualment s'està desenvolupant una versió millorada denominada cos en un xip o humà en un xip, capaços de reflectir la fisiologia de tot el cos humà en un sol xip.

Els OoC es presenten com una alternativa als sistemes actuals per fer desenvolupar o estudiar nous fàrmacs. Segons experts es calcula que tindrà una reducció de costos en R&D del 10 al 26%

per fàrmac, traduïnt-se en un estalvi entre 169 milions o 706 milions de dòlars per fàrmac sortint a mercat [17].

Actualment la majoria de start-ups que proveeixen OoCs distribueixen xips de fetge i xips de cèl·lules canceroses a causa de la gran demanda d'estudis de PK-PD i toxicitat en fàrmacs. Tot i que els xips actualment presenten cadenes de fabricació similars, start-ups intenten millorar i diferenciar-se per presentar solucions específiques pels clients. Per exemple Mimetas OrganoPlate presenta una plataforma que permet fins a 96 models de teixits en una placa de 384 pous estàndard, per tenir bona compatibilitat amb els equipaments actuals. Actualment podem trobar 3 models de negoci per les start-ups d'OoC: (1) distribuir els xips microfluidics preparats pel cultiu, (2) proporcionar un OoC llest per servir i funcional, (3) oferir tot el servei, des del disseny inicial fins a manteniment post-venda [2], [18].

Diferents versions del xip HUMIMIC distribuïdes per TissUse, permeten el cultiu de dos a més òrgans i així, poder estudiar les relacions i comunicacions entre òrgans. A més TissUse ofereix l'opció de crear un OoC personalitzat per avaluació de fàrmacs a petició del client[2].

L'empresa distribuïdora d'OoC Emulate Inc. té contractes amb diferents farmacèutiques, com podrien ser AstraZeneca i Johnson & Johnson per fer validacions dels seus productes, avaluant la seguretat i l'eficàcia dels fàrmacs per l'ús humà [2].

Sens dubte, la plataforma Human-on-a-Chip té el potencial de servir com a sistema de models alternatius per substituir els models animals en el desenvolupament de medicaments, revolucionant finalment la indústria farmacèutica; no obstant això, hi ha nombrosos reptes tècnics que cal abordar, atesa la complexitat del sistema humà [19], [20].

5. Hipòtesi i Objectius

5.1. Hipòtesi del treball

Els OoC es presenten com una alternativa millorada als models preclínic actuals, el seu ús facilitaria el desenvolupament de medicaments.

5.2. Objectius principal i secundari

El principal objectiu d'aquesta revisió bibliogràfica és il·lustrar l'impacte dels OoC en el desenvolupament de medicaments. I explorar l'ús actual d'aquests en la indústria farmacèutica.

Com a objectius secundaris tindrem:

- Introduir els models d'OoC de pulmó i intestí.
- Explica els models d'OoC per l'estudi del càncer.
- Com els OoC poden ajudar en l'estudi de malalties minoritàries.
- Introduir com els OoC, poden considerar-se una alternativa a l'experimentació animal.

6. Metodologia/ Cerca bibliogràfica

6.1. Criteris de cerca

Per la cerca bibliogràfica s'han utilitzat les bases de dades *NCBI*, *ResearchGate*, *Science Direct* i *PubMed*. Com també *google scholar*, *ACS Publications*, *annualReviews* i la revista *cellPress*.

Primerament, es va fer una cerca més general amb les paraules clau "Organ-on-a-chip", "review" i "introduction". Es van seleccionar articles que explicaven que són els OoC, l'evolució de l'*organ on a chip*, l'origen, els beneficis. Aquesta cerca va permetre tenir una idea d'on es troben els OoC actualment, així com l'impacte que aquests podran tenir.

Un cop recollida la informació més general. La segona cerca va ser més precisa buscant les paraules clau "Organ-on-a-chip", "Body-on-a-chip", "drugs", "development", "review", per buscar articles on es parlés sobre el paper dels OoC en el desenvolupament de fàrmacs. Aquesta cerca va permetre conèixer els diferents camps que engloben els OoC en el desenvolupament de fàrmacs. Un cop trobats els diferents camps es va anar fent cerques més específiques per buscar informació de la utilització dels diferents models en l'indústria farmacèutica. Es van realitzar cerques per "lung-on-a-chip", "intestine/gut-on-a-chip", "cancer-on-a-chip" i com també "rare diseases-on-a-chip".

També es van utilitzar els operadors AND, OR, NOT per combinar les paraules i acabar de precisar en la cerca.

6.2. Criteris de inclusió

S'han seleccionat els articles científics que complien els següents requisits:

- Que parlin sobre òrgan/body-on-a-chip de manera introductòria.
- Que parlin sobre el paper de l'OoC en el desenvolupament de medicaments.
- Que parlessin sobre els camps desitjats; "lung-on-a-chip", "intestine/gut-on-a-chip", "cancer-on-a-chip" i com també "rare diseases-on-a-chip".
- Idioma l'anglès
- Que l'article sigui de contingut gratuït.

6.3. Criteris d'exclusió

- Articles que tot i parlar del tema cercat, no s'ajustaven totalment a la temàtica desitjada.
- Que l'idioma no fos l'anglès.
- El contingut de l'article fos de pagament.

7. Resultats i Discussió

Actualment trobem gran varietat d'OoC, depenent del teixit que es vulgui estudiar. A continuació s'explicaran dos models d'OoC i l'ús que estan tenint aquests models. I després com els models OoC poden ajudar en l'estudi del càncer i de les malalties minoritaris, tot això orientat en l'àmbit de la medicina i investigació de medicaments.

7.1. Pulmó en un xip

Els models actuals d'OoC de pulmó simulen la tràquea i els vasos sanguinis substituint-los per un canal microfluídic, i el flux d'aire i l'estrès fluídic de cisallament del torrent sanguini els simulen controlant el flux líquid o d'aire [21]. La membrana respiratòria es simula mitjançant la col·locació d'una membrana entre el microcanal de la tràquea i el microcanal dels vasos sanguinis. La membrana es pot utilitzar com a suport per un cultiu cel·lular i per realitzar la simulació del moviment respiratori i l'estrès que aquest comporta [22]. Amb l'ajuda de models matemàtics i mecànics, es troben els paràmetres necessaris per la configuració del pulmó en un xip referents a la mecànica de fluids i a l'estrès per expansió. Aquests paràmetres són el cabal del fluid, la freqüència d'expansió, i la mida per presentar l'estructura fisiològica real [23], [24]. El model biològic del pulmó en un xip és una simplificació de la barrera alvèol capil·lar, també coneguda com la barrera respiratòria, i el microambient que aquesta comporta tan bioquímica i biofísicament. Els factors bioquímics són els components de la cèl·lula, les proteïnes, polisacàrids i gas. I els factors biofísics són l'estrès fluídic de cisallament, l'estrès per expansió, i el cultiu de tres dimensions [25], [26].

A causa de la naturalesa de l'estructura de la barrera alvèol pulmonar, el pulmó en un xip presenta una estructura de sandvitx. El xip va ser desenvolupat per Huh et al., aquest va ser construït amb polidimetilsiloxa (PDMS) i pot simular el procés de respiració. El xip es divideix en tres capes: la capa superior és el canal on es troba l'aire, la capa intermèdia una membrana porosa i flexible de PDMS, i en la capa inferior és on es troba el fluid.

Les cèl·lules epitelials alveolars es cultiven a la part superior de la membrana i es troben en les interfícies gas-líquid, en la part inferior es col·loquen les cèl·lules endotelials vasculars en un entorn dinàmic format per fluid per simular la barrera alvèol-capil·lar humana. Els canvis regulars en la pressió del gas fan deformar la membrana de PDMS, permeten simular l'extensió i contracció de les parets alveolars durant la respiració. Aquest xip, no només proporciona un nou punt de vista pels estudis de malalties pulmonars, sinó que també suposa un precedent per la construcció d'altres OoC [27]–[29].

El pulmó en un xip, no només simula el microambient de cèl·lules i teixits pulmonars en circumstàncies fisiològiques o patològiques, sinó que es pot utilitzar per estudiar malalties pulmonars, com lesions pulmonars, inflamacions, càncers de pulmons i la fibrosi pulmonar entre d'altres.

Com el pulmó és un òrgan dinàmic es presenten diferents estressos a causa de forces mecàniques en els alvèols pulmonars, com són les forces de cisallament i les forces d'expansió. Per representar les forces de cisallament s'ha estudiat mitjançant un model que presenta una intersecció de líquid amb aire en un canal, recreant la barrera alvèol-capil·lar. Per simular aquest estrès i simular el possible dany durant la reobertura de les vies respiratòries, es crea un tap de líquid prohibint la circulació de aire. Quan el tap es trenca es presenta un augment de la pressió en el canal. Si aquesta ruptura se succeeix repetides vegades, pot causar la mort cel·lular.

S'ha demostrat que la reobertura de la tràquea pot agreujar la lesió pulmonar sobretot si es presenta una disfunció de surfactant pulmonar. El surfactant pulmonar ha presentat un rol crucial en la mitigació de l'estrès per reobertura i pot prevenir la mort cel·lular [24].

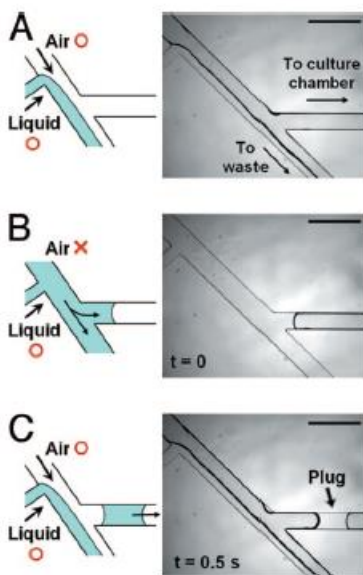


Figura 1. Formació del tap de líquid. (A) Flux constant d'aire i líquid. (B) Es bloqueja el flux d'aire, i el líquid entra en el canal de la cambra de cultiu. (C) Es reobre el flux d'aire i es forma el tap de líquid. (Figura modificada de [24]).

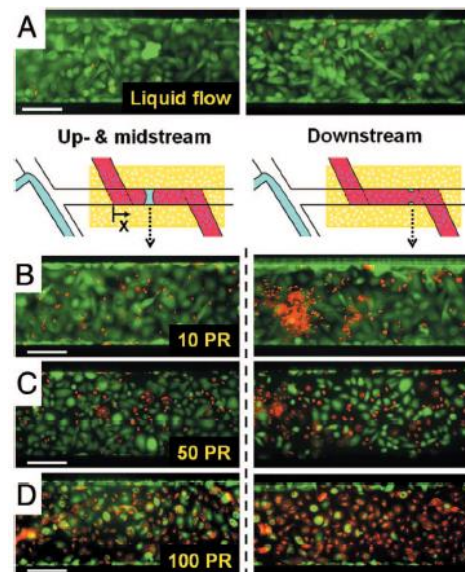


Figura 2. Imatges del cultiu cel·lular. El verd representa les cèl·lules vives i el vermell les cèl·lules mortes. (A) Cultiu cel·lular sense haver experimentat cap estrès. (B-D) Cultiu cel·lular a 10, 50, 100 trencaments de taps. Es pot observar com augmenta la mort cel·lular progressivament. (Figura modificada de [24]).

L'estudi permet entendre la resposta de les cèl·lules a forces mecàniques complexes en les artèries del pulmó i pot contribuir al disseny d'una estratègia per tractar i prevenir lesions relacionades amb la mecànica de fluids [30]. Per tant, el surfactant pulmonar es pot considerar com a possible tractament per diferents malalties pulmonars com la síndrome de dificultat respiratòria aguda [28].

La inflamació pulmonar és una malaltia comuna que pot causar-se per infecció per bacteris, virus, micoplasmes, fongs o per pneumònia no infeccioses [31]. Aquests factors inflamatoris poden provocar una sèrie de respostes inflamatòries com l'expansió dels capil·lars i l'exsudació de glòbuls blancs. S'està utilitzant els pulmons en un xip per simular les respostes inflamatòries, per exemple amb el pulmó en un xip format per doble membrana es van introduir citosines proinflamatòries i bacteris en la cambra alveolar, la capa superior de la barrera al·veol·capil·lar [27], [23]. Això va produir l'expressió de les molècules d'adhesió intracel·lulars-1 per part de les cèl·lules endotelials vasculars a l'altre costat de la membrana, la qual cosa va promoure la reclutament de neutròfils a la superfície del canal de les cèl·lules epitelials. Es va observar com els neutròfils travessen les cèl·lules endotelials vasculars i la membrana per entrar a la cambra alveolar, resultant en una migració direccional i fagocitosis del bacteri.

Gràcies al fet que el xip pulmonar de doble membrana presenta una membrana porosa de PDMS, es pot observar i analitzar el procés, i el reclutament i la migració de les cèl·lules inflamatòries. A més dels estudis sobre la inflamació pulmonar, també s'han realitzat models d'algunes malalties inflamatòries pulmonars cròniques, com la malaltia pulmonar obstructiva crònica i l'asma.

Benam et al va dissenyar un pulmó en un xip per simular els bronquis pulmonars [32]. El pulmó en un xip estava format per cèl·lules del tracte respiratori, cèl·lules productores de mucosa, cèl·lules club i cèl·lules basals en una concentració igual que a la realitat, que reproduïa el microambient del bronqui pulmonar. Benam et al també va estudiar la influència del tabac en pacients amb COPD. Mitjançant la combinació de dos pulmons en un xip, un microrespirador i un dispositiu de fumar que reproduïa la inhalació de fum [33]. Es va apreciar la influència de fumar en les cèl·lules, com 276 gens presentaven una expressió diferent del grup control on 147 gens tenien relació amb el COPD. L'estudi demostrava el gran potencial de pulmó en un xip de simular les malalties, per ajudar a realitzar un diagnòstic i tractament individualitzat, i per poder facilitar el descobriment de nous fàrmacs que ajudin en les malalties pulmonars [28].

7.2. Intestí en un xip

La funció principal de l'intestí humà és dur a terme la digestió, l'absorció, secreció, i a més establir una barrera epitelial protectora entre l'entorn digestiu i el cos. Els intestins també regulen el cos a través de la metabolització de fàrmacs, comunicació entre òrgans, com el fetge i el pàncrees a través de la circulació portal hepàtica [34], [35]. I compta amb un sistema nerviós que forma part de l'eix intestí-cervell [36], [37]. L'intestí també és on es troba el microbioma intestinal, que interaccionen amb el teixit limfoide i el sistema immune del cos, que ajuda a tindre una bona homeòstasi intestinal. Per exemple s'ha descobert recentment que el microbioma intestinal i els seus metabòlits presenten un rol important en la salut del sistema digestiu, en el sistema immune i el desenvolupament de malalties. Malgrat això, l'estudi de les interaccions entre el microbioma i les cèl·lules intestinals s'ha limitat l'estudi genètic o metagenòmic, ja que no s'ha pogut cultivar la microbiota en epiteli viu per més d'un dia, amb els mètodes convencionals. Per això, s'ha dedicat molts esforços a desenvolupar models experimentals *in vitro* i *ex vivo* per permetre l'estudi intestinal amb profunditat [38].

Els models més comuns d'intestí *in vitro* s'utilitzen per estudiar la funció de la barrera gastrointestinal, l'absorció de fàrmacs. Aquests models consisteixen en cultivar cèl·lules epitelials de l'intestí en una matriu extracel·lular recoberta per ECM i formada amb porus de membrana en un insert Transwell. Tot i que aquests models són molt utilitzats en la indústria farmacèutica, aquests cultius de dues dimensions fallen en representar la fisiologia de tres dimensions de l'intestí així com en funcions clau en l'intestí. Aquests també fallen al realitzar cocultius amb microbiota intestinal, molt importants en l'intestí [39]. Els models actuals per estudiar l'absorció dels medicaments, com l'*Everted gut sac* o el *Ussing chamber*, presenten una vida útil esperada de <8 hores, insuficient per desenvolupar models per malalties o per estudiar la intercomunicació de la microbiota amb l'hoste [38], [40]–[42].

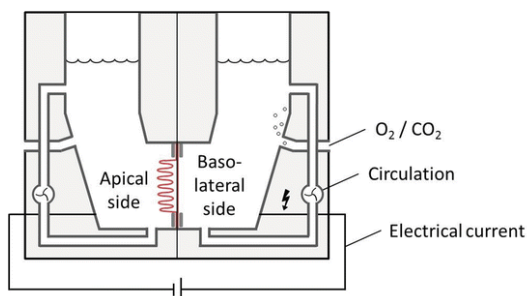


Figura 3. Representació d'una Using chamber, aquesta està formada per dues cambres separades per una membrana amb cèl·lules epitelials. Els principals desavantatges de l'Using chamber és la poca vida útil de l'experiment i que no permet la preparació ni l'estudi de diferents teixits simultàniament. (Figura modificada de [40]).

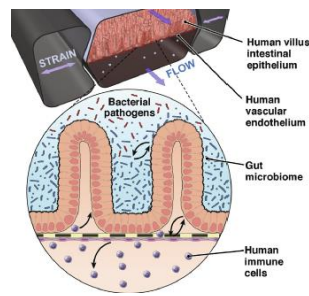


Figura 4. En la cambra del mig trobem una membrana recoberta per la cara superior amb vellositats intestinals i en la cara inferior amb endoteli vascular, per simular les interaccions en l'intestí. A més les dues cambres laterals generen contraccions per simular el moviment natural de l'intestí. (Figura modificada de [38]).

En els últims 5 anys, els models d'intestí en un xip han anat guanyant complexitat, com incorporant canals revestits per endoteli microvascular, microbiota, cèl·lules immunes i bacteris patògens, i alguns permet aplicar forces mecàniques per mimetitzar el moviment de l'intestí *in vivo* [29], [38].

Un dels models nous és l'intestí en un xip de dos canals, que permet cultivar cèl·lules epitelials intestinals, cèl·lules immunes i microbiota, i estudiar les seves interaccions en un medi amb un flux constant i amb moviments peristàltics. L'intestí en un xip està format per el polímer de silicona transparent, flexible i permeable als gasos, que permet obtenir imatges d'alta resolució [39], [43].

El xip est format per 2 microcanals paral·lels separats per una membrana porosa flexible i recoberta per matriu extracel·lular i envoltada pels dos costats per cambres laterals. Les cèl·lules epitelials intestinals es troben a la part superior de la membrana, el canal parenquimàtic, i les cèl·lules microvasculars endotelials a la capa inferior de la mateixa membrana, dins del canal vascular. Gràcies al moviment pneumàtic cíclic d'expansió i compressió de les cambres laterals provoca la deformació dels murs verticals i de la membrana, simulant el moviment peristàltic dels teixits de l'intestí [44].

En aquestes condicions les cèl·lules epitelials intestinals caco-2, que en cultius tradicionals presenten una monocapa plana, experimenten una morfogènesi fins a una vellositat intestinal. Les vellositats intestinals es presenten amb els seus 4 llinatges diferents: enteròcits, cèl·lula enter endocrina, cèl·lula caliciforme, cèl·lula de Paneth; les quals presenten una morfologia de columna similar a la trobada al intestí *in vivo*. Aquesta morfologia és acompanyada pel desenvolupament de l'axi crypt-villus, amb la limitació de proliferació de les cèl·lules basals en els crypts i la migració ascendent, metabolització de fàrmacs, protecció per mucus i recaptació de glucosa [44].

Gràcies al fet que l'intestí en un xip presenta un flux de fluid constant, formació de vellositats, segregació de mucus, es possible cocultivar microbiota intestinal amb contacte directe amb les cèl·lules intestinals, sense comprometre la barrera gastrointestinal. De fet, es va demostrar que la funció de la barrera augmentava arran de cocultivar amb *L rhamnosus GG*. A més s'ha demostrat, a partir d'anàlisi transcriptòmic a 23.000 gens, que els moviments mecànics provocats pel mecanisme pneumàtics canviava enormement l'expressió dels gens en comparació els models estàtics com els cultius Transwell. Això demostrava que el nivell d'expressió genètica era similar l'intestí humà real [39].

L'intestí en un xip simula fidelment el microambient dinàmic de l'intestí humà, en comparació amb els models clàssics i permet la incorporació de bacteris per estudiar l'efecte de la microbiota.

L'intestí en un xip s'ha utilitzat per demostrar les complexes interaccions entre el sistema immune i la microbiota en la inflamació crònica. També s'ha demostrat que l'addició d'endotoxina lipopolisacàrida al microcanal luminal, induïa la secreció de citocines proinflamatòries, com la interleucina-1b, -6, -8 i factors de necrosis tumorals en el canal vascular. A més si s'injectaven glòbuls blancs a través del microcanal capil·lar, es podia observar l'expressió de la molècula d'adhesió intercel·lular-1 en l'endoteli, atròfia de les vellositats intestinals, que acabava compromentent l'estructura de la paret intestinal [38], [43].

Amb experiments posteriors es va demostrar, que era necessari la presència de les 4 citosines per començar la resposta envers una lesió. També es va demostrar que l'aturada del moviment peristàltic provocava un augment de la microbiota, com passa en els pacients amb íleus. A partir del control de la peristalsi es va poder establir que l'aturada del flux de fluid no és la causant del creixement de la microbiota, sinó que és degut a l'aturada del moviment mecànic de l'intestí. La modularitat del intestí en un xip permet obtenir nous punts de vista per l'estudi de la fisiologia i de malalties de l'intestí, que amb els mètodes convencionals no seria possible [38], [45].

7.3. L'aplicació dels OoC per l'estudi del càncer o malalties del sistema immune

Els OoC tenen el potencial de simular la complexitat del microambient present en tumors, i així ajudar en investigar la complexa naturalesa del càncer, com descobrir noves teràpies. Els ambients tumorals són complexos, amb interconnexions amb múltiples cèl·lules i molècules, i amb nínxols dinàmics. La naturalesa modular de l'OoC permet la unió de diferents models, i així estudiar quin és l'impacte i les interaccions que esdevenen per l'aparició del càncer en un dels models. Els recents avanços en el càncer en un xip han permès una gran detecció de fàrmacs, avaluació de teràpies, estudis de la metastasi i medicina personalitzada [46].

A més, els càncer en un xip estan estretament relacionats amb els OoC que presenten un component del sistema immune. Aquest normalment es focalitzen en tres àrees: la primera en la interacció de les cèl·lules immunes amb tumors, la segona àrea la interacció entre leucòcits i cèl·lules endotelials, i com a última àrea els processos d'inflamació. Els OoC presenten uns avantatges clau envers els cultius clàssics i esferoides, presenten una estructura 3D controlada i amb unes condicions dinàmiques amb intercanvi de nutrients i d'oxigen, que permet una gran supervivència dels cultius. L'addició de cèl·lules del sistema immune, ha permès l'estudi per

imatges seqüencials dels diferents fenotips migratoris de macròfags i cèl·lules canceroses, i com cèl·lules NK penetraven en un glioblastoma. També es va poder abordar el rol de les interaccions directes entre cèl·lules envers les senyals paracrines. Moore et al. va presentar un model microfluídic per mapar les interaccions entre fragments de tumors i limfòcits infiltrants de tumors (TIL), es va trobar que les cèl·lules mortes per limfòcits TIL responia a anti-PD-1, un inhibidor de control immune [47], [48].

Al contrari que els models amb animals els OoC permeten la manipulació de paràmetres individualment. Això va permetre a Pavesi et al. a estudiar les conseqüències de baixos nivells d'Oxigen i l'impacte les citosines inflamatòries en l'activitat antitumoral de cèl·lules T, que amb cultius clàssics 2D produïa resultats erronis al no poder tenir en compte la migració de les cèl·lules T [47].

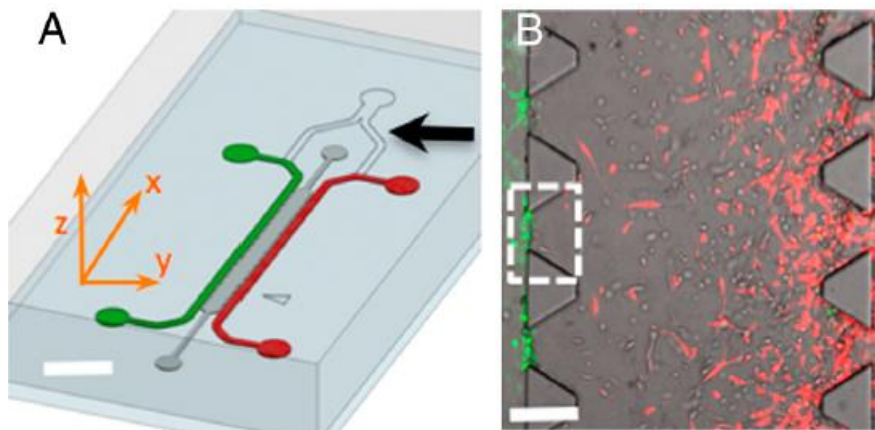


Figura 5. (A) El xip està format per un canal amb cèl·lules endotelials (canal verd), per un canal amb cèl·lules tumorals (canal vermell), interconnectats per una matriu extracel·lular 3D d'hidrogel (gris). (B) Es pot observar com les cèl·lules del fibrosarcoma (vermelles) envaeixen la matriu extracel·lular en direcció les cèl·lules endotelials (verdes). (Figura modificada de [49]).

Per exemple, Zervantonakis et al. va crear un microxip format per dos canals independents on cèl·lules canceroses i endotelials van ser dipositades. Aquests dos canals estaven interconnectats mitjançant una membrana extracel·lular d'hidrogel, dividida per diferents regions per permetre l'observació simultània. Això permetia simular un context cancerós en els vasos sanguinis i estudiar la invasió de les cèl·lules sanguínies en el torrent sanguini (intravasació). Amb la incorporació de macròfags també es va poder estudiar el rol que presenten aquests en la intravasació per carcinoma. Es va trobar que la modificació de la permeabilitat de la barrera endotelial per factors bioquímics, com $TNF-\alpha$, o a través dels macròfags facilitava la intravasació [49]–[51].

Amb la utilització d'un xip compartimentat, Huh et al. van desenvolupar un ambient per carcinoma ductal formant un model de tres capes. En la primera capa trobàvem cèl·lules epitelials mamàries, la segona capa una membrana ECM, i sota aquesta una capa d'hidrogel amb fibroblasts; es va inocular esferoides de carcinoma ductal per acabar el model. Amb aquest model es va poder avaluar els efectes de medicaments anticancerosos, per exemple es va provar que el paclitaxel no presentava toxicitat en les cèl·lules epitelials, però presentava una força toxicitat envers els esferoides de carcinoma. El paclitaxel a més inhibia el creixement dels esferoides, si es comparava en el model control sense el fàrmac, es notava una mida constant de l'esferoide [52].

Diferents tipus de tumor en un xip han sigut desenvolupats. Gervais et al. van cultivar teixits de pacients amb ooforoma en forma d'esferoides en un xip microfluídic, en cada mostra es va afegir carboplatí. El cisplatí penetra en els esferoides per difusió i s'uneix amb el DNA formant enllaços inter i intra cadena (interstrand), aquest enllaços inhibeixen la replicació del DNA i com a conseqüència la mort cel·lular, reduint així la proliferació cel·lular. També es va descobrir que les cèl·lules disminuïen el nivell de replicació amb l'absència d'aliments, provocant una major resistència al tractament del cisplatí. D'aquesta manera es va poder estudiar com responia el teixit de cada pacient a aquest medicament i així poder adaptar el medicament i obtenir un tractament més personalitzat [53].

Guenat et al. van desenvolupar un dos OoC per avaluar la quimiosensibilitat del càncer de pulmó no petites (NSCLC) i del mesotelioma pleural maligne. Van cocultivar esferoides amb cèl·lules de càncer de pulmó i perícits de pulmó, es va observar que les cèl·lules aïllades de pacients amb càncer de pulmó presentaven una major quimioresistència al cisplatí en els cocultius en comparació amb els esferoides monocultius[54], [55].

Alternativament, Wang va fabricar un cocultiu 3D multifuídic que permetia monitorar la invasió de les cèl·lules tumorals en temps real, va permetre establir que els fibroblasts tenien un rol important en el capacitat invasiva de les cèl·lules NSCLC, desregulant l'expressió de proteïnes relacionades amb la glucosa.

Els OoC no només presenten avantatges facilitant la interconnexió entre els models sinó que també permeten una anàlisi i monitoratge digital. Zhang et al. va implementar una plataforma que integrava diferents càncer en un xips per l'estudi de la metabolització de la doxorubicina, aquest sistema multiòrgan està controlat per diferents sensors, que permeten controlar la morfologia, marcadors bioquímics, i sensors físics per monitorar la temperatura, el nivell d'oxigen i el pH. La interconnexió dels diferents òrgans i el monitoratge en temps real,

permetent una anàlisi de l'eficàcia i la toxicitat de DOX. Així el sistema pot estar controlat a llarg termini, sense necessitat de prendre mostres o manipular el sistema, reduint així la interacció i possible contaminació d'aquest.

7.4. Aplicació dels OoC per l'estudi i tractament de les malalties minoritàries

El desenvolupament de medicaments per malalties rares, classificades amb una prevalença menor a 200000 pacients, està limitat per l'alt cost en la investigació i el poc públic objectiu. L'humà en un xip (Hoac per l'abreviatura en angles) té el potencial d'abaratir els costos i fer viable el desenvolupament de fàrmacs per aquestes malalties. Encara que aquestes malalties estan guanyant un ressò social, encara falten tractaments efectius [56]–[58].

L'OoC pot simular l'estat d'una malaltia en un o més teixits en el mateix sistema o model. Aquest disseny es conegut com a malaltia en un xip (Doac per l'abreviatura en angles). Una avantatge que presenta els models Doac és l'habilitat de poder incorporar cèl·lules iPSCs derivades de pacients, això permet desenvolupar teràpies més personalitzades. Escollir la teràpia més eficient per cada pacient. Per exemple, els pacients presenten activitats enzimàtiques molt variades en el citocrom P450 del fetge involucrat en el metabolisme de fàrmacs. Aquestes diferències provoquen una variabilitat a l'hora de l'absorció o l'eliminació del medicament, afectant la tolerància del pacient al medicament. L'OoC proporciona una nova manera d'enfocar les malalties i tractar les malalties més minoritàries [59].

Actualment trobem, com a mínim 80 desordres autoimmunes, que es podrien considerar malalties minoritàries. Les malalties autoimmunes es poden presentar en qualsevol òrgan, tot i que normalment es pot apreciar un patró [60]. Les persones que presenten aquesta malaltia són desproporcionadament un 78% dones, especialment durant l'etapa de maternitat, suggerint un rerefons hormonal, i apareixen amb més freqüència en determinats grups ètnics, suggerint també un component genètic. Els Hoac amb la tecnologia CRISPR en cèl·lules iPSC podria modular les mutacions d'aquesta malaltia, i estudiar el rol genètic [61].

Recentment s'ha desenvolupat un OoC de la unió neuromuscular amb motoneurons derivades de cèl·lules iPSC i miotubs (cèl·lula precursora de la fibra muscular esquelètica). La barrera formada per motoneurons i els miotubs estan connectats a través de túnels on els axons migren i innerven els miotubs formant NMJs funcionals. El sistema mesura la transmissió funcional de senyals entre les motoneurons i les fibres musculars en la unió neuromuscular, com també la funció muscular i pot ser utilitzat per tests amb fàrmacs. Tractaments amb

neurotoxines o micotoxines en una disfunció neuromuscular. Demostrant la utilitat del model pel desenvolupament de medicaments neuromusculars. Si s'utilitzen motoneurons diferenciades de iPSCs de pacient, es podria estudiar la disfuncionalitat neuromuscular en malalties rares com en l'esclerosi lateral amiotròfica. També es podrien diferenciar mioblasts de cèl·lules iPSC de pacients, ja actualment aconseguit, i utilitzar aquestes per malalties musculars com les distròfies musculars [62].

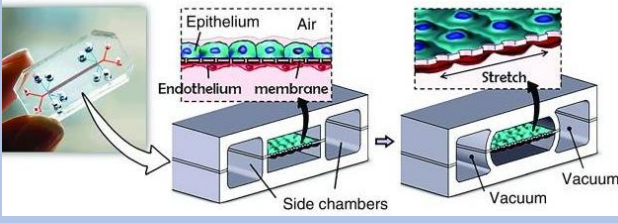
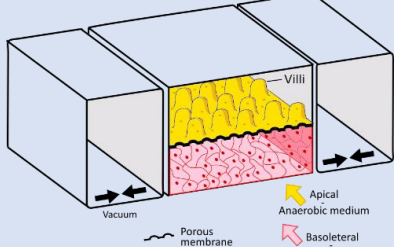
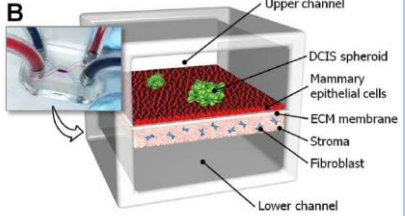
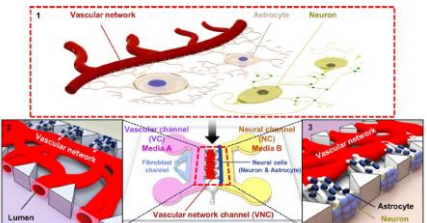
També trobem OoC de la barrera hematoencefàlica, aquests models podrien estar inclosos en un model més gran com un humà en un xip, i així estudiar malalties rares on la barrera hematoencefàlica presenta un rol desconegut, o on presenta una disfunció com en les malalties del sistema nerviós central [63], [64]. Per exemple la malaltia de Huntington és una malaltia del sistema nerviós central que provoca canvis vasculars cerebrals, però la disfuncionalitat de la barrera hematoencefàlica encara no ha estat estudiada [65].

Un dels reptes en la investigació, diagnòstic i tractament de desordres neurològics i neurodegeneratius és que els símptomes se superposen o s'amplifiquen entre malalties, comunament relacionades amb un rerefons genètic [66], [67]. Poder estudiar una malaltia sense interferències a través del model Hoac i cèl·lules iPSC derivades de pacients, podria ser una estratègia a seguir.

Les malalties rares, normalment amb un rerefons genètic o ambiental complex, són difícils i cares d'estudiar, a causa del petit mercat de sortida. Els models Hoac tenen la capacitat de representar models on el teixit està danyat i estudiar el comportament de fàrmacs en aquests. També poden millorar l'eficiència i minimitzar toxicitats i efectes secundaris.

Es pot combinar la tecnologia d'iPSC i un model Hoac per estudiar malalties minoritàries amb un rerefons genètic, oferint un grau de precisió major, i si les cèl·lules iPSC són derivades de pacients, es podrà adaptar la teràpia específicament per cada pacient [68].

Taula 1. Taula resum dels diferents OoC descrits.

Nom	Imatge	Descripció
<p>Pulmó en un xip (Lung-on-a-chip)</p>		<p>Representació d'un tall perpendicular d'un pulmó en un xip format per 3 canals, en aquest model les càmeres laterals permeten simular el moviment respiratori del pulmó, a través d'una força cíclica de succió. En la càmera central trobaríem una membrana de cèl·lules epitelials, i per damunt d'aquesta un flux d'aire i per sota un flux de medi. Simulant així la interfície gas-líquid [69], [70].</p>
<p>Intestí en un xip (Gut-on-a-chip)</p>		<p>Representació d'un tall perpendicular d'un intestí en un xip on es pot apreciar els tres canals, com també trobem en el pulmó en un xip, conté dos càmeres al buit que a través d'una força cíclica simulen els moviments peristàltics. En la cambra del mig trobaríem una membrana porosa amb cèl·lules epitelials intestinals, per sota i sobre d'aquesta membrana hi hauria un flux de medi [38], [71].</p>
<p>Càncer en un xip (Cancer-on-a-chip)</p>		<p>Xip utilitzat per estudiar la formació del càncer de mama en un conducte mamari, està format per una membrana extracel·lular, on en la capa superior trobem cèl·lules mamàries epitelials i per sota una capa d'hidrogel amb fibroblast. Per poder estudiar la conducta de les cèl·lules mamàries, es col·loca un esferoide amb cèl·lules d'un carcinoma ducal [52].</p>
<p>Malaltia en un xip (disease-on-a-chip)</p>		<p>El OoC de la barrera hematoencefàlica està compost per una complexa xarxa de capil·lars i astròcits. Els astròcits es relacionen directament amb els capil·lars a través dels peus dels astròcits, els quals ancoren les neurones a la xarxa vascular. Aquest xip permet la simulació de la barrera hematoencefàlica incorporant les diferents interaccions de les cèl·lules que la formen [63].</p>

8. Conclusions

La indústria farmacèutica fa anys que busca una tècnica eficient per mesurar l'eficiència dels medicaments i els seus possibles efectes adversos. La tecnologia dels OoC que ha anat evolucionant en els últims cinc anys, es presenta com a alternativa als mètodes actuals en camps com el desenvolupament de fàrmacs, estudis de relacions entre òrgans i modelització de malalties, entre d'altres. Els OoCs s'estan començant a utilitzar en l'estudi de fàrmacs en diferents òrgans com s'ha explicat en aquesta revisió. Però tot i el que poden aportar, encara es presenten reptes en la tecnologia dels OoC, que necessàriament s'ha de solucionar si aquests volen substituir les tecnologies actuals.

Un dels reptes seria explorar noves tècniques per millorar la diferenciació de cèl·lules pluripotents humanes, tant dins del mateix OoC com fora. Un protocol de diferenciació de les cèl·lules més senzill i ràpid permetria generar OoC més ràpidament i econòmicament, facilitant així la integració dels OoC en més estudis.

Una altra consideració seria explorar materials alternatius per la fabricació dels OoC. Actualment la majoria d'OoC són fabricats a partir de PDMS, aquest material presenta inconvenients, com l'absorció de biomolècules no específiques, comprometen així la precisió dels estudis citotòxics. Com a material alternatiu es pot estudiar el silici, ja utilitzat en cultius tradicionals.

Per tant crec que els OoC es presenten com la tecnologia del futur, un cop solucionats les limitacions actuals, així com una tecnologia a tenir en compte.

9. Autoavaluació

La realització d'aquest treball ha estat tant enriquidora com difícil, m'ha permès aprendre i entendre conceptes relacionats amb els OoC, i com d'important aquests, poden arribar a esdevenir per la indústria farmacèutica i per la biotecnològica.

Aquest treball esdevé una gran experiència, que m'ha ajudat a aprendre com fer una revisió bibliogràfica i ser més eficient en les cerques per internet. Resultant ser un repte per la gran envergadura del treball.

Algunes de les limitacions són que tot i tenir un bon volum d'articles que relacionen els OoC amb el desenvolupament de fàrmacs, molts d'aquests són de pagament, reduint el volum d'articles als quals tenia accés. Això m'ha fet ser més agraït pels investigadors que penen gratuïtament els seus articles i valorar més positivament la seva feina.

Estic satisfet amb el treball realitzat, i com m'ha donat major confiança en fer un treball que des del primer moment no sabia si seria capaç de realitzar. Personalment, i després d'haver tingut un petit tast de la indústria, considero el món dels OoC molt interessants i que presenten un gran potencial. També penso que els OoC encara són bastant desconeguts fora dels sectors més especialitzats, per tant, amb aquest treball també m'he proposat donar a conèixer una mica més els OoC en l'àmbit de la medicina.

10. Agraïments

A l'equip que forma TissUse GmbH per donar-me l'oportunitat de poder realitzar les pràctiques amb ells i així ensenyar-me el món dels OoC. Les pràctiques van ser font d'inspiració per fer el treball i voler conèixer més sobre el tema.

Donar les gràcies a la meua família per transmetre'm positivitat i estar al costat per donar-me suport quan ho necessitava.

Per últim, però no menys important, agrair a la meua tutora acadèmica del TFG, Cristina Reguant, tant per oferir-me consells com també ajudar-me a través de les diverses revisions i comentaris realitzades del treball.

10. Bibliografia

- [1] G. A. Van Norman, "Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach?," *JACC Basic to Transl. Sci.*, vol. 4, no. 7, pp. 845–854, 2019, doi: 10.1016/j.jacbts.2019.10.008.
- [2] C. Ma, Y. Peng, H. Li, and W. Chen, "Organ-on-a-Chip: A New Paradigm for Drug Development," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 42, no. 2, pp. 119–133, 2021, doi: 10.1016/j.tips.2020.11.009.
- [3] J. Zhu, "Application of Organ-on-Chip in Drug Discovery," *J. Biosci. Med.*, vol. 08, no. 03, pp. 119–134, 2020, doi: 10.4236/jbm.2020.83011.
- [4] N. Azizpour, R. Avazpour, D. H. Rosenzweig, M. Sawan, and A. Ajji, "Evolution of biochip technology: A review from lab-on-a-chip to organ-on-a-chip," *Micromachines*, vol. 11, no. 6, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3390/mi11060599.
- [5] S. Musah *et al.*, "Mature induced-pluripotent-stem-cell-derived human podocytes reconstitute kidney glomerular-capillary-wall function on a chip," *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 1, no. 5, pp. 1–12, May 2017, doi: 10.1038/s41551-017-0069.
- [6] K. Shik Mun *et al.*, "Patient-derived pancreas-on-a-chip to model cystic fibrosis-related disorders," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 3124, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-11178-w.
- [7] A. L. Gliberman *et al.*, "Synchronized stimulation and continuous insulin sensing in a microfluidic human Islet on a Chip designed for scalable manufacturing," *Lab Chip*, vol. 19, no. 18, pp. 2993–3010, Sep. 2019, doi: 10.1039/c9lc00253g.
- [8] S. Ahn *et al.*, "Mussel-inspired 3D fiber scaffolds for heart-on-a-chip toxicity studies of engineered nanomaterials," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, no. 24, pp. 6141–6154, Sep. 2018, doi: 10.1007/s00216-018-1106-7.
- [9] A. Marsano *et al.*, "Beating heart on a chip: A novel microfluidic platform to generate functional 3D cardiac microtissues," *Lab Chip*, vol. 16, no. 3, pp. 599–610, Feb. 2016, doi: 10.1039/c5lc01356a.
- [10] Y. Guo, Z. Li, W. Su, L. Wang, Y. Zhu, and J. Qin, "A Biomimetic Human Gut-on-a-Chip for Modeling Drug Metabolism in Intestine," *Artif. Organs*, vol. 42, no. 12, pp. 1196–1205, 2018, doi: 10.1111/aor.13163.

- [11] R. Poceviciute and R. F. Ismagilov, "Human-gut-microbiome on a chip," *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 3, no. 7, pp. 500–501, Jul. 2019, doi: 10.1038/s41551-019-0425-0.
- [12] N. R. Wevers *et al.*, "A perfused human blood-brain barrier on-a-chip for high-throughput assessment of barrier function and antibody transport," *Fluids Barriers CNS*, vol. 15, no. 1, p. 23, Aug. 2018, doi: 10.1186/s12987-018-0108-3.
- [13] Y. Koo, B. T. Hawkins, and Y. Yun, "Three-dimensional (3D) tetra-culture brain on chip platform for organophosphate toxicity screening," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–7, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-20876-2.
- [14] Y. Torisawa *et al.*, "Modeling Hematopoiesis and Responses to Radiation Countermeasures in a Bone Marrow-on-a-Chip," *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 22, no. 5, pp. 509–515, May 2016, doi: 10.1089/ten.tec.2015.0507.
- [15] S. Hao *et al.*, "A Spontaneous 3D Bone-On-a-Chip for Bone Metastasis Study of Breast Cancer Cells," *Small*, vol. 14, no. 12, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1002/sml.201702787.
- [16] A. Marturano-Kruik *et al.*, "Human bone perivascular niche-on-a-chip for studying metastatic colonization," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 6, pp. 1256–1261, Feb. 2018, doi: 10.1073/pnas.1714282115.
- [17] N. Franzen, W. H. van Harten, V. P. Retèl, P. Loskill, J. van den Eijnden-van Raaij, and M. IJzerman, "Impact of organ-on-a-chip technology on pharmaceutical R&D costs," *Drug Discov. Today*, vol. 24, no. 9, pp. 1720–1724, 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2019.06.003.
- [18] M. Mastrangeli, S. Millet, and J. van den Eijnden-Van Raaij, "Organ-on-chip in development: Towards a roadmap for organs-on-chip," *ALTEX*, vol. 36, no. 4, pp. 650–668, 2019, doi: 10.14573/altex.1908271.
- [19] C. Y. Chan *et al.*, "Accelerating drug discovery via organs-on-chips," *Lab Chip*, vol. 13, no. 24, pp. 4697–4710, Dec. 2013, doi: 10.1039/c3lc90115g.
- [20] Y. A. Jodat *et al.*, "Human-Derived Organ-on-a-Chip for Personalized Drug Development," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 24, no. 45, pp. 5471–5486, 2019, doi: 10.2174/1381612825666190308150055.
- [21] P. Bajaj, J. F. Harris, J. H. Huang, P. Nath, and R. Iyer, "Advances and Challenges in Recapitulating Human Pulmonary Systems: At the Cusp of Biology and Materials," *ACS Biomaterials Science and Engineering*, vol. 2, no. 4. American Chemical Society, pp. 473–488, Apr. 11, 2016, doi: 10.1021/acsbiomaterials.5b00480.

- [22] A. Doryab, G. Amoabediny, and A. Salehi-Najafabadi, "Advances in pulmonary therapy and drug development: Lung tissue engineering to lung-on-a-chip," *Biotechnology Advances*, vol. 34, no. 5. Elsevier Inc., pp. 588–596, Sep. 01, 2016, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.02.006.
- [23] D. Huh *et al.*, "A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice," *Sci. Transl. Med.*, vol. 4, no. 159, pp. 159ra147-159ra147, Nov. 2012, doi: 10.1126/scitranslmed.3004249.
- [24] D. Huh *et al.*, "Acoustically detectable cellular-level lung injury induced by fluid mechanical stresses in microfluidic airway systems," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 48, pp. 18886–18891, Nov. 2007, doi: 10.1073/pnas.0610868104.
- [25] N. J. Douville *et al.*, "Combination of fluid and solid mechanical stresses contribute to cell death and detachment in a microfluidic alveolar model," *Lab Chip*, vol. 11, no. 4, pp. 609–619, Feb. 2011, doi: 10.1039/c0lc00251h.
- [26] Y. W. Chu *et al.*, "Selection of Invasive and Metastatic Subpopulations from a Human Lung Adenocarcinoma Cell Line," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 17, no. 3, pp. 353–360, Sep. 1997, doi: 10.1165/ajrcmb.17.3.2837.
- [27] D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Yuan Hsin, and D. E. Ingber, "Reconstituting organ-level lung functions on a chip," *Science (80-.)*, vol. 328, no. 5986, pp. 1662–1668, Jun. 2010, doi: 10.1126/science.1188302.
- [28] K. Li, X. Yang, C. Xue, L. Zhao, Y. Zhang, and X. Gao, "Biomimetic human lung-on-a-chip for modeling disease investigation," *Biomicrofluidics*, vol. 13, no. 3, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1063/1.5100070.
- [29] R. Mittal *et al.*, "Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 234, no. 6. Wiley-Liss Inc., pp. 8352–8380, Jun. 01, 2019, doi: 10.1002/jcp.27729.
- [30] H. Tavana, P. Zamankhan, P. J. Christensen, J. B. Grotberg, and S. Takayama, "Epithelium damage and protection during reopening of occluded airways in a physiologic microfluidic pulmonary airway model," *Biomed. Microdevices*, vol. 13, no. 4, pp. 731–742, Aug. 2011, doi: 10.1007/s10544-011-9543-5.
- [31] H. Moghadas, M. S. Saidi, N. Kashaninejad, and N. T. Nguyen, "Challenge in particle delivery to cells in a microfluidic device," *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 830–

- 842, Dec. 2018, doi: 10.1007/s13346-017-0467-3.
- [32] K. H. Benam *et al.*, "Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro," *Nat. Methods*, vol. 13, no. 2, pp. 151–157, Feb. 2016, doi: 10.1038/nmeth.3697.
- [33] K. H. Benam *et al.*, "Matched-Comparative Modeling of Normal and Diseased Human Airway Responses Using a Microengineered Breathing Lung Chip," *Cell Syst.*, vol. 3, no. 5, pp. 456-466.e4, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.cels.2016.10.003.
- [34] J. G. Bloemen, K. Venema, M. C. van de Poll, S. W. Olde Damink, W. A. Buurman, and C. H. Dejong, "Short chain fatty acids exchange across the gut and liver in humans measured at surgery," *Clin. Nutr.*, vol. 28, no. 6, pp. 657–661, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.clnu.2009.05.011.
- [35] L. Z. Benet, C. Y. Wu, M. F. Hebert, and V. J. Wachter, "Intestinal drug metabolism and antitransport processes: A potential paradigm shift in oral drug delivery," in *Journal of Controlled Release*, May 1996, vol. 39, no. 2–3, pp. 139–143, doi: 10.1016/0168-3659(95)00147-6.
- [36] J. F. Cryan and T. G. Dinan, "Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 13, no. 10. Nature Publishing Group, pp. 701–712, Oct. 12, 2012, doi: 10.1038/nrn3346.
- [37] E. A. Mayer, "Gut feelings: The emerging biology of gut-"brain communication," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 12, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 453–466, Aug. 13, 2011, doi: 10.1038/nrn3071.
- [38] A. Bein *et al.*, "Microfluidic Organ-on-a-Chip Models of Human Intestine," *Cmgh*, vol. 5, no. 4, pp. 659–668, 2018, doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.12.010.
- [39] H. J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, and D. E. Ingber, "Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow," *Lab Chip*, vol. 12, no. 12, pp. 2165–2174, Jun. 2012, doi: 10.1039/c2lc40074j.
- [40] J. Westerhout, H. Wortelboer, and K. Verhoeckx, "Ussing Chamber," in *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, Springer International Publishing, 2015, pp. 263–273.
- [41] V. Rozehnal *et al.*, "Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs," *Eur. J. Pharm.*

- Sci.*, vol. 46, no. 5, pp. 367–373, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.ejps.2012.02.025.
- [42] M. A. Alam, F. I. Al-Jenoobi, and A. M. Al-Mohizea, “Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: Limitations and applications,” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 64, no. 3. Oxford Academic, pp. 326–336, Mar. 06, 2012, doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01391.x.
- [43] H. J. Kim, H. Li, J. J. Collins, and D. E. Ingber, “Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 1, pp. E7–E15, Jan. 2016, doi: 10.1073/pnas.1522193112.
- [44] H. J. Kim and D. E. Ingber, “Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation,” *Integr. Biol.*, vol. 5, no. 9, p. 1130, Sep. 2013, doi: 10.1039/c3ib40126j.
- [45] C. Beurivage *et al.*, “Development of a gut-on-a-chip model for high throughput disease modeling and drug discovery,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 22, 2019, doi: 10.3390/ijms20225661.
- [46] M. R. Carvalho, D. Lima, R. L. Reis, V. M. Correlo, and J. M. Oliveira, “Evaluating Biomaterial- and Microfluidic-Based 3D Tumor Models,” *Trends in Biotechnology*, vol. 33, no. 11. Elsevier Ltd, pp. 667–678, Nov. 01, 2015, doi: 10.1016/j.tibtech.2015.09.009.
- [47] A. Polini, L. L. del Mercato, A. Barra, Y. S. Zhang, F. Calabi, and G. Gigli, “Towards the development of human immune-system-on-a-chip platforms,” *Drug Discov. Today*, vol. 24, no. 2, pp. 517–525, 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2018.10.003.
- [48] A. Boussohier-Calleja, R. Li, M. B. Chen, S. C. Wong, and R. D. Kamm, “Microfluidics: A New Tool for Modeling Cancer–Immune Interactions,” *Trends in Cancer*, vol. 2, no. 1. Cell Press, pp. 6–19, Jan. 01, 2016, doi: 10.1016/j.trecan.2015.12.003.
- [49] I. K. Zervantonakis, S. K. Hughes-Alford, J. L. Charest, J. S. Condeelis, F. B. Gertler, and R. D. Kamm, “Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 34, pp. 13515–13520, 2012, doi: 10.1073/pnas.1210182109.
- [50] W. Sun *et al.*, “Organ-on-a-Chip for Cancer and Immune Organs Modeling,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 8, no. 4, pp. 1–21, 2019, doi: 10.1002/adhm.201801363.
- [51] J. S. Jeon *et al.*, “Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast

- cancer cell extravasation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 1, pp. 214–219, Jan. 2015, doi: 10.1073/pnas.1417115112.
- [52] Y. Choi *et al.*, "A microengineered pathophysiological model of early-stage breast cancer," *Lab Chip*, vol. 15, no. 16, pp. 3350–3357, Aug. 2015, doi: 10.1039/c5lc00514k.
- [53] M. Astolfi *et al.*, "Micro-dissected tumor tissues on chip: An ex vivo method for drug testing and personalized therapy," *Lab Chip*, vol. 16, no. 2, pp. 312–325, 2016, doi: 10.1039/c5lc01108f.
- [54] J. Ruppen *et al.*, "Towards personalized medicine: Chemosensitivity assays of patient lung cancer cell spheroids in a perfused microfluidic platform," *Lab Chip*, vol. 15, no. 14, pp. 3076–3085, Jul. 2015, doi: 10.1039/c5lc00454c.
- [55] J. Ruppen *et al.*, "A microfluidic platform for chemoresistive testing of multicellular pleural cancer spheroids," *Lab Chip*, vol. 14, no. 6, pp. 1198–1205, Mar. 2014, doi: 10.1039/c3lc51093j.
- [56] R. Y. Cheung, J. C. Cohen, and P. Illingworth, "Orphan drug policies: implications for the United States, Canada, and developing countries.," *Health Law J.*, vol. 12, pp. 183–200, Jan. 2004, Accessed: May 01, 2021. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16539081>.
- [57] A. Mullard, "Biotech R&D spend jumps by more than 15," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 15, no. 7, p. 447, Jun. 2016, doi: 10.1038/nrd.2016.135.
- [58] A. Schieppati, J. I. Henter, E. Daina, and A. Aperia, "Why rare diseases are an important medical and social issue," *The Lancet*, vol. 371, no. 9629, Elsevier B.V., pp. 2039–2041, Jun. 14, 2008, doi: 10.1016/S0140-6736(08)60872-7.
- [59] T. S. Tracy *et al.*, "Interindividual Variability in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism," in *Drug Metabolism and Disposition*, Mar. 2016, vol. 44, no. 3, pp. 343–351, doi: 10.1124/dmd.115.067900.
- [60] L. Wang, F.-S. Wang, and M. E. Gershwin, "Human autoimmune diseases: a comprehensive update," *J. Intern. Med.*, vol. 278, no. 4, pp. 369–395, Oct. 2015, doi: 10.1111/joim.12395.
- [61] D. L. Fairweather and N. R. Rose, "Women and autoimmune diseases," in *Emerging Infectious Diseases*, 2004, vol. 10, no. 11, pp. 2005–2011, doi: 10.3201/eid1011.040367.

- [62] Y. Kodaka, G. Rabu, and A. Asakura, "Skeletal Muscle Cell Induction from Pluripotent Stem Cells," *Stem Cells International*, vol. 2017. Hindawi Limited, 2017, doi: 10.1155/2017/1376151.
- [63] S. Bang *et al.*, "A Low Permeability Microfluidic Blood-Brain Barrier Platform with Direct Contact between Perfusible Vascular Network and Astrocytes," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-07416-0.
- [64] M. W. van der Helm, A. D. van der Meer, J. C. T. Eijkel, A. van den Berg, and L. I. Segerink, "Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research," *Tissue Barriers*, vol. 4, no. 1, p. e1142493, Jan. 2016, doi: 10.1080/21688370.2016.1142493.
- [65] J. Drouin-Ouellet *et al.*, "Cerebrovascular and blood-brain barrier impairments in Huntington's disease: Potential implications for its pathophysiology," *Ann. Neurol.*, vol. 78, no. 2, pp. 160–177, Aug. 2015, doi: 10.1002/ana.24406.
- [66] M. Agrawal and A. Biswas, "Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders," *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 2, no. SEP. Frontiers Media S.A., p. 54, Sep. 22, 2015, doi: 10.3389/fmolb.2015.00054.
- [67] J. Koikkalainen *et al.*, "Differential diagnosis of neurodegenerative diseases using structural MRI data," *NeuroImage Clin.*, vol. 11, pp. 435–449, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.nicl.2016.02.019.
- [68] C. P. P. de Mello, J. Rumsey, V. Slaughter, and J. J. Hickman, "A human-on-a-chip approach to tackling rare diseases," *Drug Discov. Today*, vol. 24, no. 11, pp. 2139–2151, 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2019.08.001.
- [69] "Lung-on-a-Chip." <https://wyss.harvard.edu/media-post/lung-on-a-chip/> (accessed May 24, 2021).
- [70] D. Huh, "A human breathing lung-on-a-chip," in *Annals of the American Thoracic Society*, Mar. 2015, vol. 12, no. Suppl 1, pp. S42–S44, doi: 10.1513/AnnalsATS.201410-442MG.
- [71] "Human on a Chip Focus: Digestive System on a Chip | Eden Tech." <https://eden-microfluidics.com/news-events/human-on-a-chip-focus-digestive-system-on-a-chip/> (accessed May 24, 2021).