



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

Els Òrgans on a chip com a model d'estudi de l'eix microbiota
intestinal-cervell

Laura Romero Huete

TREBALL DE FINAL DE GRAU DE BIOTECNOLOGIA

Tutor acadèmic: Miquel Mulero Abellán. Departament de Bioquímica i
Biotecnologia (URV). Email: miquel.mulero@urv.cat

Facultat d'enologia

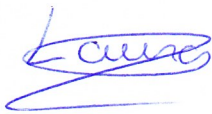
Juny 2021

Tarragona

Jo, **Laura Romero Huete**, amb DNI **39388304E**, sóc coneixedora 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

(signatura)



“Tota malaltia comença a l'intestí”

(Hipòcrates, 460 a.C-360 a.C)

Índex

Resum.....	1
Abstract	1
Resumen.....	1
Introducció	3
Justificació del tema	4
Objectius	5
Mètodes	6
Criteris d'inclusió.....	6
Criteris d'exclusió	6
Resultats i discussió.....	7
Mètodes de comunicació entre la microbiota intestinal i el cervell	7
Xarxa neuronal intestí-cervell	7
Sistema immunitari intestinal	10
Eix hipotalàmic-pituïtari-suprarenal (HPA)	11
Neurotransmissors	11
Malalties relacionades amb l'EMIC.....	11
Malaltia d'Alzheimer	12
Malaltia de Parkinson.....	13
Trastorn de l'aspecte autista.....	14
Trastorn depressiu major.....	15
Que són els òrgans on a chip.....	17
Els òrgans on a chip com a mètode d'estudi de l'eix microbiota intestinal cervell	18
OoC de cervell	21
Plataforma MINERVA	22
Conclusions	24
Autoavaluació.....	25
Agraïments	26
Bibliografia	28

Resum

L'eix microbiota intestinal-cervell és un eix que mostra les relacions que hi ha entre les poblacions bacterianes que resideixen en els intestins i el sistema nerviós. Tot i que les vies de comunicació que hi ha entre la microbiota intestinal i el cervell encara no estan del tot clares s'han dut a terme esforços significatius per tal d'intentar esclarir aquests mecanismes d'interrelació. D'altra banda, també s'ha vist que hi ha una alteració d'aquest eix microbiota-cervell associada a alguns trastorns o malalties neurodegeneratives, com ara l'Alzheimer o el Parkinson.

Per altra banda, els avenços en la biotecnologia han permès desenvolupar els Òrgans on a chip, uns xips microfluidics que poden simular les condicions fisiològiques del cos humà. Amb aquesta tecnologia dels òrgans on a chip es vol intentar estudiar l'eix microbiota intestinal-cervell sense les diferències fisiològica que hi ha entre els models animals i els models humans. Degut a la diferències que hi ha entre les dues espècies, tant pel sistema immunitari i la funció cerebral, com les diferències del perfil de microorganismes que presenten.

Abstract

The gut-brain microbiota axis is an axis that shows the relationships between the bacterial populations that reside in the intestines and the nervous system. Although the communication pathways between the intestinal microbiota and the brain are not yet completely clear, significant efforts have been made to try to elucidate these interrelationship mechanisms. However, it has also been shown that there is an alteration of this microbiota-brain axis associated with some neurodegenerative disorders or diseases, such as Alzheimer's or Parkinson's.

On the other hand, advances in biotechnology have made it possible to develop Organs on a chip, microfluidic chips that can simulate the physiological conditions of the human body. With this technology of the organs where the chip is intended to try to study the intestinal-brain microbiota axis without the physiological differences between animal and human models. Due to the differences between the two species, both for the immune system and brain function, and the differences in the profile of microorganisms they present.

Resumen

El eje microbiota intestinal-cerebro es un eje que muestra las relaciones que existen entre las poblaciones bacterianas que residen en los intestinos y el sistema nervioso. Aunque las vías de comunicación que hay entre la microbiota intestinal y el cerebro todavía no están del todo claras se han llevado a cabo esfuerzos significativos para intentar esclarecer estos mecanismos de

interrelación. Por otra parte, también se ha visto que hay una alteración de este eje microbiota-cerebro asociada a algunos trastornos o enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer o el Parkinson.

Por otra parte, los avances en la biotecnología han permitido desarrollar los Órganos on a chip, unos chips microfluídicos que pueden simular las condiciones fisiológicas del cuerpo humano. Con esta tecnología de los órganos donde chip se quiere intentar estudiar el eje microbiota intestinal-cerebro sin las diferencias fisiológica que hay entre los modelos animales y los modelos humanos. Debido a las diferencias que hay entre las dos especies, tanto por el sistema inmunitario y la función cerebral, como las diferencias del perfil de microorganismos que presentan.

Introducció

La microbiota intestinal és la font més gran de microorganismes del cos humà. Cada cop s'està estudiant més la seva importància no només en el sistema digestiu, sinó també en el desenvolupament del sistema nerviós central (SNC) i l'envelliment [1]. Encara que la composició de la microbiota intestinal sigui relativament estable al llarg de la vida d'una persona, es poden produir canvis a causa de factors genètics o ambientals com poden ser la dieta, els antibiòtics o l'estil de vida [2].

En les últimes dècades s'ha estudiat àmpliament el paper que juga la microbiota intestinal en la salut i en les malalties humanes. Avui en dia és evident que la flora intestinal és un factor determinant i regulador de la fisiologia de l'hoste. Els més de 100 bilions de microbis que habiten a l'intestí humà i que han evolucionat conjuntament amb l'hoste formen una relació simbiòtica, ja que tant els microbis com l'ésser humà en surten beneficiats [3]. A més, s'ha demostrat que la microbiota intestinal i els seus metabòlits participen en la modulació de les funcions gastrointestinals, donada la seva capacitat d'afectar alguns aspectes essencial a nivell d'intestí, com per exemple: (a) la permeabilitat intestinal, (b) la funció immune de la mucosa, (c) la motilitat i la sensibilitat intestinal, (d) i l'alliberament d'hormones gastrointestinals i neurotransmissors de les cèl·lules enteroendocrines així com l'activitat al sistema nerviós entèric. A més, l'evidència preclínica suggereix que és probable que la microbiota i els seus metabòlits estiguin implicats en la modulació de conductes i processos cerebrals, incloent-hi entre altres la capacitat de resposta a l'estrès, la conducta emocional, la modulació del dolor, la conducta d'alimentació i la bioquímica cerebral [4].

Fins ara s'han fet diversos estudis experimentals per avaluar els efectes moduladors de la microbiota intestinal sobre les interaccions entre l'intestí i el cervell en animals. Alguns dels estudis que s'han realitzat inclouen el tractament amb antibiòtics, trasplantament de microbiota fecal i tractament amb probiòtics [4]. Els models animals i, concretament els ratolins gnotobiòtics i els ratolins lliures de gèrmens (LLG), han jugat un paper important per estudiar l'eix microbiota intestinal i el cervell. Els ratolins gnotobiòtics són aquells que tenen una microflora coneguda i controlada, introduïda després d'un naixement per cesària en condicions estèrils, en canvi, els ratolins LLG no tenen cap mena de microorganisme dins del seu cos. Però aquests models presenten diverses limitacions que fan que l'extrapolació de dades de models animals a humans sigui força difícil, ja que els rosegadors sovint no simulen de forma acurada les condicions humanes a causa de les diferències que hi ha entre les dues espècies, tant pel sistema immunitari i la funció cerebral, com les diferències en el perfil de microorganismes

implicats en l'aparició i progressió de malalties. Actualment hi ha un ampli ventall de models *in vitro* dissenyats per investigar la complexitat de la interacció entre la microbiota intestinal i el cervell, com poden ser els Òrgans on a chip (OoC) [3].

Els OoC combinen una varietat de diferents disciplines (químiques, biologies i de ciències dels materials), i va ser seleccionat com una de les deu primeres tecnologies emergents del Fòrum Econòmic Mundial. L'OoC és un sistema biomimètic que imita l'entorn d'un òrgan fisiològic humà. Durant dècades, els sistemes tradicionals de cultius de cèl·lules bidimensionals (2D) van constituir una important plataforma per la investigació en les ciències de la vida. No obstant això, els cultius 2D no aconsegueixen simular amb precisió la fisiologia dels òrgans, les interaccions intraorgàniques i els factors microambientals [5].

Fins ara, l'OoC és la tecnologia miniaturitzada més avançada per simular *in vitro* tot un òrgan o compartiment humà [6].

Justificació del tema

L'eix microbiota intestinal-cervell (EMIC) és un eix que avui en dia encara s'està investigant, però que s'ha vist que pot estar molt relacionat amb algunes malalties neurodegeneratives. Tot i que és un àmbit que encara està en estudi, calen més investigacions per seguir definint aquest eix.

Per altra banda, el fet de poder estudiar la interacció entre la microbiota intestinal amb el cervell amb un model *in vitro* com són els OoC permet evitar l'estudi amb animals, ja que l'experimentació amb animals presenta diversos problemes ètics i tècnics. Alguns dels problemes ètics que sorgeixen de la investigació amb animals serien el patiment que aquest poden rebre, ja que això genera malestar a gran part de la població i la necessitat de dur a terme aquets experiments. Per altra banda trobem els problemes tècnics com les diferències biològiques entre els animals utilitzats en els estudis i els humans, a causa de la diferència d'espècie.

Amb aquesta revisió veurem quines són les principals vies de comunicació que hi ha entre l'intestí i el cervell i com l'estudi de l'EMIC amb els OoC permet avançar en l'estudi de l'EMIC.

Objectius

En aquest treball es pretén fer una revisió bibliogràfica per veure quin és l'estat actual de coneixement de l'EMIC i com s'està estudiant aquest eix a través dels OoC. Això es vol aconseguir mitjançant 3 objectius:

- Estudiar quines són les vies principals de comunicació entre l'intestí i el cervell.
- Estudiar si l'EMIC té un efecte en les malalties o trastorns neurodegeneratius.
- Estudiar si els OoC són un bon model *in vitro* per estudiar la comunicació entre l'intestí i el cervell.

Mètodes

La base bibliogràfica utilitzada en aquest treball és el PubMed. Primerament s'han fet cerques de OoC, ja que era el principal punt d'interès. Per fer aquesta cerca es va utilitzar el concepte "Organ on a chip". Arran de llegir diversos articles dels OoC i de veure tot el potencial que aquest podien oferir vaig llegir sobre l'EMIC.

Per trobar articles que parlessin de l'EMIC es van realitzar diverses cerques amb les paraules clau "Gut-Brain Axis" i "Microbiota Gut-Brain Axis". A més, per acotar la cerca es va aplicar un filtre per tal d'obtenir només aquells articles que han estat publicats en els últims cinc anys. Aquesta cerca va permetre conèixer molts estudis de com es comuniquen bidireccionalment el cervell i la microbiota intestinal.

Per trobar articles que relacionessin l'EMIC amb algunes malalties o trastorns es van realitzar algunes cerques amb els conceptes "Microbiota Gut-Brain Axis", "disorders" i "disease".

La cerca que em va permetre obtenir articles que relacionessin l'estudi de l'EMIC amb els OoC va ser amb les paraules "gut brain axis chip". Amb aquesta cerca es van poder obtenir aquells estudis que amb l'ajuda dels OoC intenten explicar com funciona l'EMIC.

Per altra banda, també s'han seleccionat articles que es trobaven citats en alguns dels primers articles seleccionats.

La última cerca feta a la base de dades va ser realitzada el vint-i-set d'abril de l'any 2021.

Criteris d'inclusió

Els criteris d'inclusió que s'han aplicat per seleccionar els articles científics són: que es parles dels OoC o de l'EMIC, i que s'hagin publicat en els últims cinc anys

Criteris d'exclusió

Finalment s'han exclòs aquells articles que tot estaven escrits en un idioma diferent de l'anglès i aquells que estudiaven l'EMIC a través d'altres metodologies diferents de l'OoC.

Resultats i discussió

Mètodes de comunicació entre la microbiota intestinal i el cervell

Generalment es parlen de cinc mètodes de comunicació entre la microbiota intestinal i el cervell tot i que és un eix que encara no senten perfectament i no està del tot clar. Els principals mètodes de comunicació que es tracten són: (a) la xarxa neuronal entre l'intestí i el cervell; (b) el sistema immunitari intestinal; (c) l'eix hipotalàmic-pituïtari-suprarenal; (d) neurotransmissors i reguladors sintetitzats per la microbiota intestinal i; (e) la barrera de la mucosa intestinal i la barrera hematoencefàlica (BH) [7].

Aquestes serien les possibles vies de comunicació, tot i que tots ells treballen conjuntament per establir l'EMIC.

Xarxa neuronal intestí-cervell

L'intestí pot interactuar amb el cervell a través de dues vies neuronals. A través del sistema nerviós autònom (SNA) i el nervi vague (NV) situat a la medulla espinal i entre el sistema nerviós entèric (SNE) a l'intestí i el SNA i el NV [7].

Sistema nerviós autònom i el nervi vague

El SNA és una xarxa de retransmissió neuronal, amb neurones dins de la zona central i perifèrica encarregades de controlar les funcions corporals sense esforç conscient, de forma autònoma. El SNA és responsable de l'homeòstasi fisiològica, a més de respondre a les àrees endocrines, motores, autonòmiques i de comportament. Juntament amb l'eix hipotalàmic-pituïtari-suprarenal (HPA), el SNA compren una extensa i complexa xarxa de comunicació integrada entre el cervell i l'intestí, que estableix i regula involuntàriament l'homeòstasi fisiològica de l'hoste [8].

La informació visceral entrant de l'intestí a través del SNA és processada pel SNC que dirigeix les respostes essencials per a la supervivència. El processament de la informació implica bucles de retroalimentació positiva i negativa que actuen en òrgans perifèrics. El SNA proporciona a l'intestí la resposta neurològica més directa disponible, que desemboca en canvis ràpids en la fisiologia intestinal, a través de la innervació de l'òrgan objectiu, tant en salut com en malalties, com en la resposta al dolor i l'estrès [8].

Els microbis poden comunicar-se entre ells mitjançant metabòlits, de manera similar als reconeguts per les cèl·lules hostes, i per tant, poden interactuar amb la sinapsi del SNA intestinals. Per exemple, diversos grups de recerca han demostrat que el metabòlit 4-etilfenilsulfat modulats per la microbiota és suficient per induir un comportament d'angoixa en

ratolins. També s'ha vist que la microbiota intestinal modula l'activitat locomotora a *Drosophila*, probablement a través de metabòlits derivats dels bacteris [8].

El NV és el desè nervi cranial i la via més ràpida i directa que connecta el cervell amb l'intestí. Està format per un 80% de fibres aferents i un 20% de fibres eferents que transmeten informació vital del sistema gastrointestinal, respiratori i cardiovascular cap al cervell i proporcionen retroalimentació a les vísceres [8].

Depenent de la ubicació i tipus, les aferències vagals són ideals per detectar diversos estímuls (estiraments, tensions o molècules intestinals com subproductes bacterians, hormones intestinals o neurotransmissors). Per tant, en tenir una gran varietat de receptors, es creu que responen a una varietat de senyals de naturalesa mecànica, química o hormonal (Figura 1)[8].

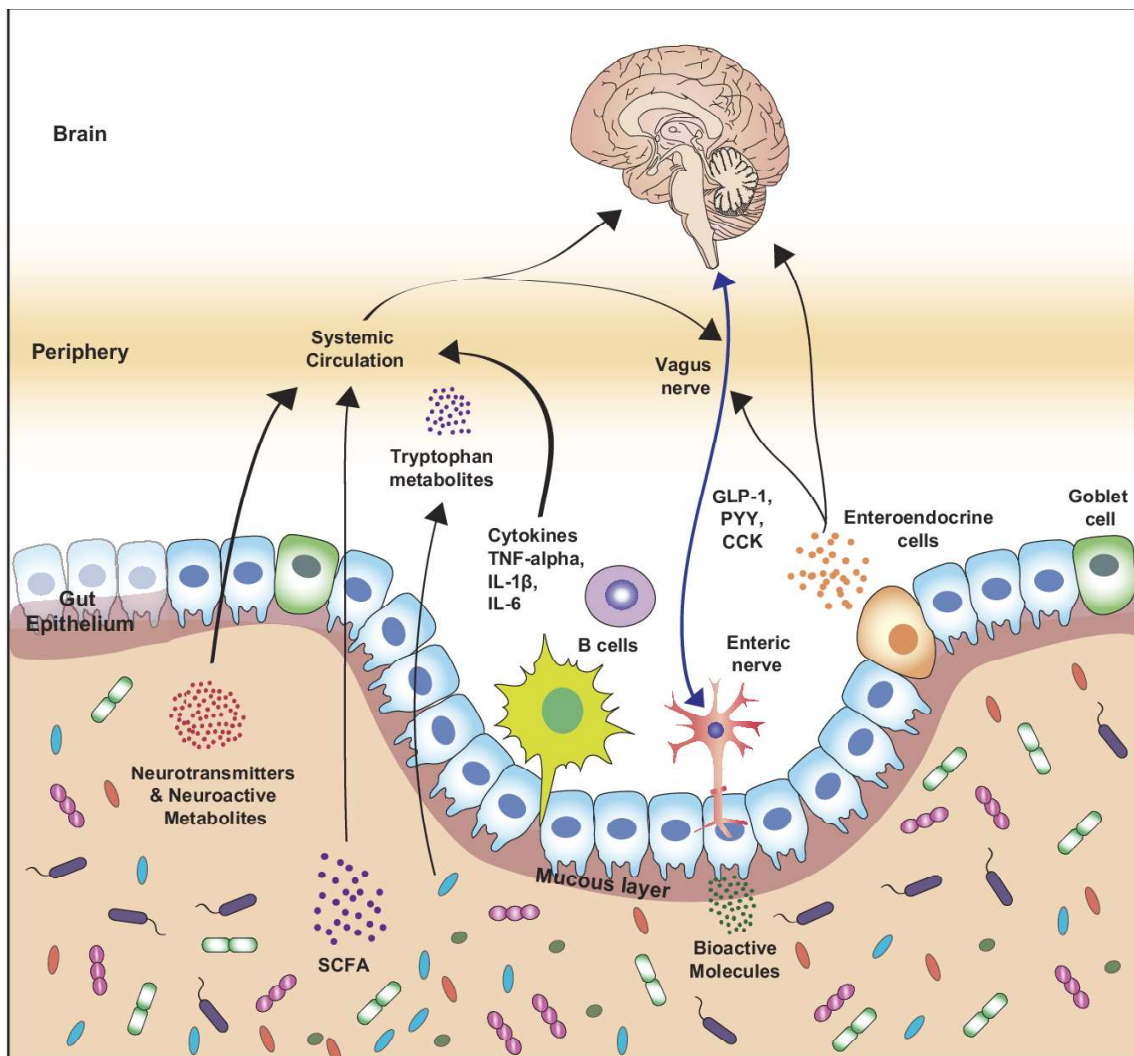


Figura 1. Esquema que resumeix diverses de les vies de comunicació entre la microbiota intestinal i el cervell com neurotransmissors, el nervi vague i el sistema immunitari [8].

Sistema nerviós entèric a l'intestí i l'ANS i el VN

El sistema nerviós entèric (SNE) està situat entre la microbiota i l'hoste per respondre directament o indirectament a la microbiota i als seus metabòlits, entre d'altres. El SNE es comunica amb el SNC mitjançant neurones intestinofugals que resideixen a la paret intestinal, i els axons de les quals estableixen una connexió amb els ganglis colaterals amb informació sensorial que viatja a través de les neurones aferents primàries extrínseques que segueixen les vies aferents espinals i vagal [8].

El desenvolupament de l'ENS es produeix principalment durant l'embriogènesi, tot i que s'acaba de desenvolupar a l'etapa postnatal. En aquesta segona etapa de desenvolupament es produeix la proliferació de les cèl·lules progenitores, la diferenciació de fenotips neuronals madurs i la formació de circuits neuronals funcionals. És també en aquesta etapa postnatal on es desenvolupa la microbiota intestinal [8].

Un estudi recent ha proporcionat una visió mecànica de com la microbiota podria influir en l'ENS, implicant el paper dels receptors de la serotonina (5-HT). La colonització de l'intestí de ratolins LLG amb microbiota va augmentar el 5-HT neural entèric i l'expressió dels receptors 5-HT₄ mentre que la colonització de ratolins LLG que no tenien triptòfan hidroxilasa 1 (TPH1) no va poder restablir el nombre de neurones entèriques (neurones residents al sistema digestiu).

A més, la colonització de l'intestí de ratolins LLG en presència d'un antagonista del receptor 5-HT₄ va influir negativament en el SNE. En canvi, l'estimulació dels receptors 5-HT₄ en animals LLG va tenir l'efecte contrari i va restablir la fisiologia intestinal normal. Aquest estudi proporciona un conjunt d'evidències que impliquen un paper dels efectes induïts per la microbiota sobre el 5-HT i el seu impacte sobre l'ENS, tot i que hi ha subtileses en els descobriments que suggereixen que aquesta via pot influir diferencialment en la neurogènesi, la diferenciació, la renovació cel·lular i l'intestí. Funció que depèn de la naturalesa i el moment de les intervencions [8].

L'alteració de la microbiota intestinal induïda per antibiòtics també s'ha aplicat com a mètode per determinar l'impacte d'aquesta comunitat microbiana sobre el SNE. Dins dels ganglis entèrics resideixen cèl·lules glials, que en animals tractats amb antibiòtics es van veure reduïts [8].

Alguns estudis funcionals sostenen que diferents soques microbianes poden afectar de manera diferent a les respostes secretomotores impulsades per neurones. L'evidència també suggereix que hi pot haver una relació recíproca entre el SNE i la microbiota intestinal. Fins ara s'havia

considerat l'impacte de la microbiota sobre el SNE. Tot i que sembla que el SNE també és capaç de tenir influència sobre la microbiota.

Es va realitzar un estudi amb peix zebra que no tenia ENS a conseqüència d'una mutació en el domini HMG relacionada amb l'SRY (gen del factor de transcripció *sox10*). En aquest model es va desenvolupar un perfil de microbiota "proinflamatori", i es va veure que els seus efectes es podien veure millorats mitjançant un transplantament del SNE de tipus salvatge, o introduint microbis "antiinflamatoris". Aquestes dades poden posar en dubte que les alteracions de la microbiota precedeixen les alteracions del SNE i, per tant, condueixen a la proposta que els canvis en l'activitat neuronal poden precedir les alteracions de la microbiota intestinal [8].

Sistema immunitari intestinal

El sistema immunitari intestinal depèn de la microbiota intestinal. Molts metabòlits dels bacteris de l'intestí, incloent-hi neuromoduladors, bacteriocines, àcids biliars, colina i àcids grassos de cadena curta (SCFA), són immunomoduladors. Un gran nombre d'evidències suggereix que les interaccions microbiota-hoste pel que fa a l'intestí condueixen a l'alliberament de citocines, quimiocines, neurotransmissors, neuropèptids, missatgers endocrins, i subproductes microbians que es poden filtrar a la sang, i els sistemes limfàtics o influir en les neurones (Figura 1) [1].

Pel que fa al sistema immunitari innat es pot veure una relació entre la microbiota i la micròglia. Les micròglies restringides pel SNC són cèl·lules immunes sentinel·les innates que poden detectar canvis subtils en el medi molecular circumdant, i són responsables de l'augment de respostes neuroinflamatòries. Aquestes cèl·lules, que comprometen entre el 5-12% de les cèl·lules del cervell són ramificades i extremadament plàstiques, i un cop activades poden alliberar diverses citocines i quimiocines, expressar nombrosos canvis morfològics extrems. A més, la micròglia constitutivament activa participa críticament en esdeveniments neuronals en diverses etapes del desenvolupament i de l'edat adulta, inclosa la remodelació sinàptica per millorar la xarxa neuronal [8].

El sistema immunitari adaptatiu indueix una resposta específicament dirigida als patògens i comprèn cèl·lules originàries del llinatge limfoide. El vincle entre la microbiota i el sistema immunitari adaptatiu s'ha vist en un estudi recent que examina l'impacte de l'estrès crònic de llarga durada en les cèl·lules reguladores de la IL-10. La IL-10 és una citocina que inhibeix la síntesi de citocines proinflamatòries per limfòcits T i macròfags, sent així una citocina antiinflamatòria. L'expressió de l'IL-10 es va associar amb una major abundància e *Clostridium*,

cosa que reforça la hipòtesi que la microbiota intestinal, el sistema immunitari adaptatiu i el SNC poden estar treballant conjuntament. Posteriorment també es va demostrar que el deteriorament del sistema immunitari adaptatiu en ratolins transgènics Rag1, ratolins que no tenen limfòcits B i T madurs, està relacionat amb alteracions en les tasques de comportament cognitives i d'ansietat, que es van millorar amb el tractament amb una combinació de *Lactobacillus rhamnusus* i *Lactobacillus helveticus*. Pel que es va concloure que la deficiència de limfòcits té com a conseqüència alteracions en la conducta de l'hoste, i que es poden normalitzar amb un tractament probiòtic [8].

Eix hipotalàmic-pituïtari-suprarenal (HPA)

L'eix HPA és un dels principals sistemes neuroendocrins del cos humà i una de les vies de comunicació no neuronals claus dins del EMIC. Es coneix com el principal coordinador neuroendocrí de la resposta a l'estrès [1], [8].

Un estudi ha demostrat que en comparació amb els ratolins lliures de patògens específics, els ratolins mascles LLG tenien un factor neurotròfic derivat del cervell reduït. Pel que van concloure que la regulació del EMIC pot dependre del gènere [8].

A més, l'estrès precoç i la separació materna podrien conduir a un canvi a llarg termini de HPA. En comparació amb rates no reparades de la mare, la diversitat d'ARN ribosòmic 16s en rates adultes que si van patir una separació de la mare durant tres hores al dia des del dia 2 al dia 12 després del naixement, va revelar que l'estrès canviava significativament la microbiota de les femtes. La seqüenciació d'ADNr 16s és la seqüenciació genètica del RNA ribosomal 16s, que permet estudiar la taxonomia de les espècies, l'abundància d'espècies i l'evolució del sistema dins de les mostres [9].

Neurotransmissors

Una de les principals facetes del concepte d'endocrinologia microbiana es basa en el llenguatge neuroquímic compartit que existeix entre l'hoste i el microbi. Especialment les cèl·lules intestinals poden produir molt 5-HT, que tenen un efecte en el cervell. Els enzims bacterians també poden produir productes de neurotoxines com l'àcid D-làctic i l'amoníac. Pel que molts dels neurotransmissors necessaris en el cos són produïts per la microbiota-intestinal, que exerceix influència en el cos humà, inclòs el cervell (Il·lustració 1) [1], [8], [9].

Malalties relacionades amb l'EMIC

L'EMIC s'ha relacionat amb diverses malalties relacionades amb el SNC, com poden ser l'Alzheimer, el Parkinson, el trastorn de l'aspecte autista i el trastorn depressiu major entre

d'altres [4], [11]. La indústria farmacèutica hauria de tenir en compte el paper de la microbiota intestinal alhora de desenvolupar medicaments per tractar aquest tipus de malalties. Estudis recents s'han orientat a comprendre com la dieta, els medicaments, la cirurgia i les toxines ambientals afecten la microbiota intestinal. Aquest coneixement té implicacions per establir la connexió mecànica que falta per a malalties causades per la disbiosi (canvi en la composició o funció microbiana que té un impacte advers en la relació hoste-microbioma) [11].

Malaltia d'Alzheimer

L'Alzheimer és una malaltia multifactorial que afecta tant a la perifèria com el SNC [12]. La malaltia de l'Alzheimer (MA) és actualment la causa més freqüent de demència caracteritzada per una disminució de la funció cognitiva [13], [14]. La característica clau de la malaltia és la deposició de β amiloide (β A) seguit de formacions de plaquetes i embolics neurofibril·lars compostos de proteïna tau hiperfosforilada. Aquests dipòsits desencadenen una neuroinflamació que condueix a la pèrdua de sinapsis i mort neuronal. Tot i que encara no se sap del tot que desencadena la formació d'aquesta placa amiloide[14].

Escherichia coli, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium Tuberculosis*, i *Staphylococcus aureus* són algunes de les espècies bacterianes que poden produir fibres amiloides extracel·lulars funcionals. Aquestes proteïnes amiloides ajuden a les bacteries a formar biofilms i a unir-se fortament entre si per resistir la destrucció per factors físics i immunitaris. Els amiloides formats per bacteris són diferents als amiloides dels SNC, però mostren semblança en l'estructura terciària [13], [14]. Curiosament, treballs recents han demostrat que el desenvolupament de l'AD podria començar a l'intestí i després propagar-se al cervell. Per fer l'estudi es van injectar oligòmers de β A a la paret gàstrica dels intestins dels ratolins. Durant més d'un any es va observar com l'amiloide migrava de l'intestí cap al cervell, i per això es creu que tenen un paper important a l'hora de causar la MA i la neuroinflamació [14].

Cada vegada hi ha més evidències de la comunicació entre la microbiota intestinal i la patogènesi de la MA. Com que la microbiota intestinal es coneix com la font d'un gran nombre d'amiloides, LPS i altres toxines, pot contribuir a la inflamació sistèmica i a la interrupció de barreres fisiològiques. Els productes formats per bacteris a l'intestí poden passar al SNC, especialment en persones grans. A més, els productes de la microbiota intestinal poden activar la micròglia, millorant la resposta inflamatòria del SNC, que al seu torn provoca una funció microglial patològica, un augment de la neurotoxicitat i comença la neuroinflamació al cervell, causant la pèrdua de neurones, un factor important de la malaltia[12], [14].

Per altra banda, els intents de restaurar la microbiota intestinal a una composició que es troba en adults sans pot alentir la progressió de la MA. Els receptors tipus Toll (RTT) tenen també un paper important en el sistema immunitari innat, ja que poden reconèixer patrons moleculars de molts agents infecciosos. Tot i això, les intervencions dirigides directament als RTT encara tenen molt camí per recórrer abans d'estudis més extensos duts a terme per dilucidar la via de senyalització dels RTT i el seu impacte sobre el sistema immunitari, ja que la modulació de la composició de la microbiota intestinal es pot utilitzar com a potencial diana terapèutica en la MA [12], [13]

Malaltia de Parkinson

La malaltia de Parkinson (MP) és la segona malaltia neurodegenerativa més freqüent després de la MA [15]. Es caracteritza per un dany a les neurones dopaminèrgiques de la substància nigra i per cossos d'inclusió que contenen alfa-sinucleïna (cossos de Lewy) a les neurones supervivents [16], [17]. Encara que les característiques principals de la MP siguin motores, hi ha nombrosos símptomes no motors que contribueixen de manera més perjudicial a la qualitat de vida del pacient. Alguns d'aquests símptomes poden ser psiquiàtrics, alteracions sensorials i problemes gastrointestinals. El restrenyiment, per exemple és una de les característiques primerenques de la MP [4].

L'alfa-sinucleïna és una proteïna que s'expressa amb abundància als terminals presinàptics del SNC. Es creu que aquesta participa en la regulació de la neurotransmissió i l'homeòstasi sinàptica. S'ha suggerit que l'alfa-sinucleïna podria actuar com una proteïna prió durant la MP. En aquesta teoria és una alfa-sinucleïna mal plegada, i per tant infecciosa, que fa que les alfa-sinucleïnes que té al voltant també es pleguin malament, convertint una proteïna prèviament sana en una proteïna patògena [16]. Alguns estudis han proposat que la deposició d'alfa-sinucleïna pot començar als bulbs olfactius (OB) o en el SNE per una toxina ambiental desconeguda i/o un patògen microbià provinent de la microbiota intestinal i després procedir cap al SNC. Aquests supòsits semblen ser coherents amb els símptomes no motors detectats durant molt de temps en pacients amb MP [15]–[17].

Hi ha evidències creixents que la microbiota intestinal està alterada en persones que pateixen PD. S'ha trobat una disminució de *Prevotellaceae* en mostres fecals de pacients amb PD. La disminució de la presència de *Prevotellaceae* disminueix els nivells de SCFA neuroactius que promouen la salut i la capacitat de biosíntesi de tiamina i folat, que coincideixen amb la disminució dels nivells d'aquestes vitamines en pacients amb MP. A més, la disminució de nivells

de *Prevotellaceae* podria estar relacionada amb el potencial desenvolupament d'alfa-sinucleïna per la interrupció dels mecanismes d'eliminació de la proteïna intra i extraneuronal mitjançant la modulació de l'expressió gènica de SCFA [15], [16].

Actualment no hi ha cap tractament dissenyat per curar la MP. El medicament que s'utilitza per tractar la malaltia és l'anti-parkinsonià levodopa. Aquesta medicació es basa en compensar la pèrdua de cèl·lules dopaminèrgiques i es centra principalment a reduir els símptomes motors mitjançant la millora de la transmissió dopaminèrgica, però aquest no impedeix la neurodegeneració i és ineficaç sobre símptomes motors. Els nous estudis suggereixen que la deposició d'alfa-sinucleïna no es genera al cervell, sinó que migra cap a aquest des de l'intestí, i per això una millor comprensió de les interaccions intestí-cervell pot aportar nou coneixement sobre la progressió patològica de la MP i així conduir també a nous enfocaments terapèutics. Els lligands dels RTT derivats de probiòtics podrien suprimir parcialment la inflamació mitjançant la producció de citocines antiinflamatòries. És per això, que l'ús de probiòtics, o prebiòtics o simbiòtics, sembla ser una estratègia interessant, atès el seu enorme potencial com a medicaments o agents profilàctics contra la neurodegeneració [15], [16]. També s'ha demostrat que algunes teràpies basades en aliments com dietes probiòtiques i prebiòtiques podrien tenir influència en la progressió patològica de la MP. A més, aquestes teràpies han demostrat ser eficaces sobre la disfunció gastrointestinal i al combinar-les amb levodopa, podrien augmentar l'absorció d'aquesta, podent així reduir la seva dosi [15].

Trastorn de l'aspecte autista

El trastorn de l'aspecte autista (TAA) és un trastorn del neurodesenvolupament caracteritzat per dèficits persistents en la comunicació social de comportament repetitius. Tot i que el diagnòstic de TAA és exclusivament neurocomportamental, el TAA s'acompanya de moltes comorbiditats mèdiques que sovint es produeixen en prevalences molt més altes que en nens no autistes. Entre aquestes afeccions mèdiques coincidents, els problemes gastrointestinals (GI) es troben entre els més freqüents [18]. La prevalença de símptomes gastrointestinals en nens afectats pel TAA és prop de 8 vegades més que en nens sans. A més, la severitat dels símptomes GI està fortament relacionada amb la gravetat dels símptomes del TAA [4]. Per exemple, el restrenyiment funcional en nens amb TAA s'ha associat amb empitjorament dels símptomes conductuals, així com un augment del cortisol, l'estrès i l'ansietat [18].

Diversos articles suggereixen que el TAA s'associa amb la disbiosi [4], [19], [20]. La disbiosi és una composició alterada de la microbiota intestinal que afavoreix els microbis patògens sobre els beneficiosos de l'intestí. És important estudiar els impactes que té la disbiosi en una edat

primerenca, ja que els seus efectes poden afectar a l'estat de salut del pacient durant la infància [19].

Estudis realitzats per observar les diferències entre la diversitat bacteriana en nens amb TAA en comparació amb nens sans generalment conclouen que hi ha una disminució significativa dels gèneres *Bacteroidetes* en contrast amb un nombre elevat de *Firmicutes* en nens amb TAA. A més d'una elevada abundància de *Clostridium spp* en individus autistes correlacionats amb la gravetat del comportament autista. El descobriment i la comprensió de la connexió entre la microbiota i el TEA és especialment important per trobar noves opcions de tractament per a aquesta malaltia. El tractament del comportament autista basat en alteracions de la composició microbiana com els probiòtics i la transferència de microbiota fecal va mostrar resultats prometedors en ratolins LLG i individus autistes [19].

Dos estudis independents van demostrar que els ratolins LLG presenten una disminució de la sociabilitat o la propensió a interactuar amb un ratolí nou respecte a un objecte no social i una reducció de la perifèria social per interactuar amb un ratolí desconegut versus familiar. Un resultat similar es va donar en les rates LLG, que presentaven una interacció social reduïda sobre una parella desconeguda. Alguns dels deterioraments presentats es podia veure corregit mitjançant la colonització postnatal de ratolins LLG amb una microbiota intestinal de ratolí de tipus salvatge al deslletament, que apunta a la capacitat de revertir anomalies en les interaccions social [20].

Trastorn depressiu major

La depressió major és una de les principals causes de discapacitat, morbiditat i mortalitat a tot el món [21]. Vint de cada cent persones desenvolupen depressió en algun moment de la seva vida [22], [23]. Segons les concepcions modernes de la psicologia i la biologia, la depressió major no és només un trastorn mental, sinó també una malaltia fisiològica. Els estudis d'associació de genoma complet (GWAS, per les seves sigles en anglès) van estimar que les probabilitats d'heretar la depressió major són d'entre el 37 i el 48%, per la microbiota obtinguda dels pares [21], [22].

Els neurotransmissors tenen un paper important en el cervell i el comportament. La hipòtesi de deficiència dels neurotransmissors monoaminèrgics postula que els estats d'ànim positius, inclosa la felicitat, estan associats amb l'abundància dels neurotransmissors de monoamina, serotonina, norepinefrina i / o dopamina; i que els símptomes de depressió sorgeixen de nivells insuficients d'aquests neurotransmissors. La recuperació d'aquests nivells de neurotransmissors tindrà efectes antidepressius. No obstant això, la majoria dels inhibidors selectius de la

recaptació de Serotonina (ISRS) funcionen lentament i només aporten alleugeriments a part dels pacients, cosa que indica que hi ha altres mecanismes implicats en la depressió [21].

McVey Neufled i col·laboradors van explorar l'eficàcia dels ISRS amb ratolins vagotomitzats i amb ratolins control. En els animals control, es va poder observar que els ISRS administrats per via oral mostraven una major activitat vagal aparent a través del nervi mesentèric. Per altra banda, els afectes antidepressius del tractament amb ISRS no es podia apreciar en els ratolins vagotomitzats. Amb aquest experiment es va poder demostrar l'evidència que, sense la comunicació del nervi vague entre l'intestí i el cervell, els ISRS són ineficaços. Això demostra que el trastorn depressiu major està relacionat no només amb el cervell i el paper important del nervi vague el EMIC [23].

S'ha vist que també, que els pacients amb depressió sovint presenten disfuncions cerebrals intestinals, com ara trastorns de la gana, trastorns metabòlics, trastorns gastrointestinals funcionals i anomalies de la microbiota intestinal [21].

La microbiota intestinal afecta directament al desenvolupament i el funcionament saludable del cervell dels mamífers. L'evidència principal que consolida aquesta visió és que la composició de la microbiota intestinal dels pacients amb depressió és diferent de la dels individus sans [21]. La microbiota en pacients amb depressió presenta disbiosi de baixa diversitat. Per exemple, els nivells dels gèneres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Firmicutes*, *Faecalibacterium* i *Ruminococcus* es veien disminuïts, mentre que augmenten els nivells dels gèneres *Provetella*, *Bacteroides* i *Proteobacteria* [22]. Molts estudis han demostrat la diferència en la composició de la femta a causa dels canvis en la microbiota intestinal entre pacient amb trastorn depressiu major i pacients sans. Es va fer un experiment en que van trasplantar microbiota fecal de pacients amb depressió i individus sans a rates lliures de gèrmens. Els resultats mostraven que les rates en rebre microbiota fecal de pacients amb depressió presentaven un comportament similar a la depressió. La inducció de la depressió a través d'un trasplantament de femta posa en evidència que la microbiota intestinal pot tenir un efecte en la química cerebral [21]–[23].

Per altre banda, estudis a gran escala han revelat que l'ús d'antibiòtics en la teràpia antiinfecciosa augmenta significativament el risc de trastorns mentals com la depressió. El risc varia segons la dosi i el temps que el pacient hagi pres antibiòtics, cosa que significa que hi ha una correlació positiva [21], [22]. Un altre factor que afecta a la microbiota intestinal és la dieta. S'ha obtingut una gran quantitat d'evidències que suggereixen que una dieta poc saludable altera de forma perjudicial la composició bacteriana de l'intestí, redueix la diversitat i la riquesa bacteriana i predispesa a la depressió causant disbiosi [22].

Que són els òrgans on a chip

Els OoC representen una nova tecnologia que pot canviar la indústria farmacèutica a l'hora de buscar noves maneres de millorar el procés de desenvolupament de medicaments [24]. La seva principal funció és simular l'entorn fisiològic dels òrgans humans. Durant dècades s'han utilitzat els cultius cel·lulars (2D) per estudiar les diverses funcions de les cèl·lules i els seus productes i interaccions. No obstant això, els sistemes 2D no són tan precisos a l'hora de mostrar les relacions fisiològiques dels teixits o òrgans, les interaccions intraorgàniques o els factors microambientals, per al qual cosa això provoca que s'hagin de fer estudis amb *in vivo* per verificar els resultats obtinguts *in vitro* [5].

Alguns dels principals problemes a l'hora de desenvolupar tractaments eficaços contra malalties és la manca de sistemes adequats per identificar els objectius dels fàrmacs, analitzar la seva toxicitat i predir l'eficàcia que tindrà en els pacients. Actualment aquestes proves es realitzen en animals o en cultius cel·lulars convencionals, però sovint aquestes proves no simulen amb molta precisió la fisiologia humana, i això provoca que es detectin efectes adversos dels medicaments en fases tardanes de l'assaig clínic [5], [24]–[26].

Segons els experts que va participar en el Projecte ORCHID, un projecte que es va crear l'any 2017 per posar un full de ruta de la tecnologia OoC i identificar possibles obstacles i solucions corresponents per treballar amb OoC en ciència i I+D [26], un OoC es pot definir com un dispositiu microfluidic adequat per l'ús, que conté subestructures d'òrgans d'enginyeria viva en un microentorn controlat, que reproduïx un o més aspectes de la dinàmica, funcionalitat i resposta fisiològica i patològica de l'òrgan *in vivo* sota un monitoratge a temps real [24].

Els OoC es poden classificar en dos tipus, que poden ser complementaris entre ells. Sistemes d'òrgan únic, en aquests OoC només s'emula un únic òrgan. Sistemes multiorgan, en aquests és combinen diferents OoC per reproduir la relació que es pot produir entre els òrgans en un model *in vivo*. En aquest segon tipus, els diferents òrgans estan comunicats a través de microcanals tubulars.

Els OoC permeten investigar de manera més precisa la comunicació teixit-teixit, i la comunicació òrgan-òrgan, així com esdeveniments biològics que no es poden controlar en animals ni en pacients humans. La possibilitat de controlar el microambient en el qual es troben, la recopilació de dades a temps real i la possibilitat d'interaccionar amb l'espectrometria de masses tant dirigida com no dirigida fan que els OoC siguin un model d'investigació molt potent [24].

Un camp important de la ciència on poden tenir un paper molt important els OoC és en el desenvolupament de fàrmacs. Procés que engloba des de la investigació bàsica fins a la medicina personalitzada [25], [26]. Aquesta aplicació està dirigida a indústries farmacèutiques, hospitals de recerca i investigadors biomèdics. Hi ha quatre contextos d'ús principals:

- Millorar el coneixement dels medicaments i l'etiologia de les malalties humanes.
- Predir l'eficàcia dels medicaments en humans.
- Predir la toxicitat que poden provocar els fàrmacs en humans.
- Obrir pas cap a la medicina personalitzada.

Aquestes noves tècniques poden ajudar a estudiar aquelles malalties per les quals es coneixen pocs o cap medicaments eficaços [26], com podrien ser les malalties neurodegeneratives (que s'han explicat en l'apartat anterior), el càncer, malalties autoimmunes o malalties minoritàries.

Tot i que els OoC segueixen necessitant una evidència científica substancial que correlacioni els resultats obtinguts dels OoC amb el comportament fisiològic humà, en els darrers anys el desenvolupament dels OoC ha estat recolzat per empreses farmacèutiques com Roche o AstraZeneca, que busquen models predictius alternatius o millors, especialment per al pulmó, el fetge i el sistema nerviós i digestiu [24].

Els OoC s'estan obrint pas en la indústria farmacèutica, tant en el desenvolupament de fàrmacs com en el desenvolupament de la medicina personalitzada. La limitació dels cultius cel·lulars preclínic i els models d'animals provoquen que els assajos clínics de fàrmacs tinguin un cost molt elevat, ja que els models no sempre s'acosten suficient a la fisiologia humana. Provocant per tant que es perdin molts diners i molt de temps. Molts models amb un alt potencial per la salut s'eliminen al principi del seu desenvolupament per la poca previsibilitat dels models preclínics. Altres s'han retirat del mercat poc després d'haver-ne sortit perquè els assajos no contemplaven alguns nivells de toxicitat que després es van poder apreciar en pacients. Per aquests motius es creu que els OoC poden permetre proves de fàrmacs més ràpides, precises, rendibles i clínicament rellevants, ja que les dades d'estudis amb animals sovint són poc indicatives de la situació humana [24], [26].

Els òrgans on a chip com a mètode d'estudi de l'eix microbiota intestinal cervell

Tenint en compte les diferents vies de comunicació possibles entre el cervell i la microbiota intestinal descrites anteriorment, la via més fàcil de simular *in vitro* seria aquella que permet el

pas de factors bioquímics alliberats pels microbis que viuen a l'intestí, com podria ser a través del sistema immunitari intestinal [27].

A causa de la complexa estructura del cervell i de la BH, són un model d'estudi molt difícil per les eines que hi ha actualment [27]. Durant les últimes dècades els avenços en la biologia cel·lular tridimensional i l'enginyeria de teixits han permès que es puguin construir noves eines més sòlides per poder estudiar el teixit humà *in vitro*. L'establiment de cultius organotípics a llarg termini de tipus intestinal i cerebral derivats de subjectes humans van permetre el desenvolupament de nous sistemes cel·lulars per estudiar les interaccions hoste-microbioma, entre altres. A més, les noves tecnologies de cultius, que utilitzen formulacions especialment dissenyades, han fet possibles estudis mecànics de microbis intestinals difícils de cultivar o que abans no eren cultivables [3]. Avui en dia, els OoC representen una de les estratègies més prometedores per modelar i estudiar el EMIC [27].

Els OoC presenten diversos avantatges davant dels altres cultius cel·lulars coneguts avui en dia. Proporcionen una interacció cèl·lula-cèl·lula orientada espacialment i una exposició a factors físics som el flux de fluids o la deformació. Mitjançant la perfusió del medi a les cambres de cultiu, es garanteix un intercanvi fisiològic de nutrients i metabòlits i uns valors d'estrès adequats per estimular el creixement, la proliferació i la diferenciació de les cèl·lules. Per altra banda, també es redueix la quantitat de reactius necessaris gràcies a la miniaturització del cultiu. També augmenta la possibilitat d'integrar dispositius electrònics com elèctrodes o sensors que permeten mesurar paràmetres físics i biològics directament del cultiu [27].

Tanmateix, el cervell és l'òrgan central del sistema nerviós i està protegit no només pel crani sinó també per altres estructures anatòmiques, com la BH, les meninges i una capa de membranes que cobreixen el SNC. Tot i això, els patògens poden arribar al cervell quan hi ha una inflamació que altera aquestes barreres [27].

S'han realitzat estudis amb la tecnologia OoC per estudiar models robustos del cervell i la BH, que han demostrat un gran potencial per testejar si els fàrmacs són capaços de creuar la BH i arribar al seu objectiu, el cervell. Es va realitzar un estudi en una plataforma microfluidica amb cèl·lules endotelials microvasculars del cervell derivades de cèl·lules mare pluripotents induïdes per veure la interacció amb diferents fàrmacs. L'estudi es va realitzar amb fàrmacs contra els tumors cerebrals i els resultats van ser millors als models tradicionals *in vitro*[28]. Tot i els bons resultats, no són models perfectes, ja que aquests models sovint no aconsegueixen captar els aspectes estructurals i funcionals del cervell humà [3].

Els OoC d'intestí es realitzen amb l'objectiu d'imitar les característiques estructurals funcionals de l'intestí, com poden ser les vellositats [3]. Quan s'administra un fàrmac de forma oral, aquest ha de recórrer el sistema digestiu i els intestins per arribar al torrent sanguini. És aquí on les vellositats intestinals tenen un paper clau per la correcta adsorció dels fàrmacs, per això es important que a l'hora de recrear un intestí en un OoC es mantinguin la morfologia [5]. Aquest enfocament l'OoC intestinal és millor al model *in vitro* convencional, ja que permeten l'aportació continua de nutrients i l'eliminació de residus a més de la incorporació de components del sistema vascular i immunitari i de la flora intestinal [3].

El primer xip d'intestí que es va crear consistia en una membrana permeable de vidre i una làmina de polidimetilsiloxa (PDMS) que contenia els canals. En ell es van cultivar cèl·lules Caco-2, línia heteròloga continua provinent de cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma colonorectal humà. El microambient de l'intestí es va simular en el xip mitjançant la força de cisallament i la força centrífuga. Les cèl·lules van presentar un creixement perllongat i mantenien la flora microbiana en l'intestí humà. El dispositiu es va formar a partir de cèl·lules obtingudes de biòpsies endoscòpiques o reseccions d'un fragment d'òrgan, i va permetre explorar l'etiologia de les malalties intestinals i identificar-ne les dianes terapèutiques. Fet que demostra el potencial que tenen els OoC d'intestí per realitzar estudis de medicina personalitzada [5].

Tot i que els OoC d'intestí humà revestits per línies cel·lulars epitelials intestinals han estat demostrats que imiten moltes de les funcions fisiològiques i patològiques de l'intestí humà, encara estan limitades pel fet d'utilitzar cèl·lules immortalitzades que originalment estaven aïllades d'un tumor humà. Els models *in vitro* que s'han estudiat es deterioren a les 24h a causa de l'ús d'explants de teixit intestinal fetal humà [10].

Posteriorment es va observar que igual que l'OoC d'intestí revestit de cèl·lules de Caco-2, amb aplicació de flux fluid i deformacions semblants a la peristalsi, les cèl·lules epitelials intestinals pateixen histogènesi de vellositats amb diferenciació multilíneal. La diferenciació cel·lular que es produeix i l'anàlisi transcryptòmica demostra que l'OoC d'intestí mecànicament actiu imita més de prop la proliferació i la resposta de defensa de l'hoste que els organoides d'on es van aïllar les cèl·lules originalment [10].

Els beneficis de cadascun dels OoC explicats anteriorment han estat demostrats individualment, però per tal d'estudiar el EMIC és necessari acoblar el funcionament d'aquests dos OoC.

La capacitat predictiva dels OoC facilita la investigació d'importants efectes *in vivo* que es solen descuidar *in vitro*. Aquestes estratègies es plantegen per pal·liar els problemes que es presenten al realitzar les proves amb animals. Els sistemes d'OoC que simulen més d'un òrgan s'anomenen

multi-OoC [28]. Recentment s'ha demostrat que aquest concepte era especialment adequat per estudiar els defectes de la microbiota intestinal al cervell amb un estudi que combinava OoC individuals que imitaven l'eix intestí-fetge-ronyó-cervell. En aquest estudi es va demostrar que la toxicitat dels metabòlits del microbioma, trimetilamina (TMA) i trimetilamina-N-oxid (TMAO). On es va demostrar que TMAO pot passar a través de la BH i arribar al cervell [3].

Els OoC permeten el cultiu de cèl·lules en càmeres individuals, afavorint la comunicació a través de canals microfluidics i controlant la distribució espacial i temporal del seu microambient. Permeten establir condicions més complexes, establint un flux mitjà per garantir l'intercanvi de nutrients i metabòlits i estimular el creixement, la proliferació i la diferenciació cel·lular, aplicant forces mecàniques per imitar el microentorn físic dels òrgans vius i controlar els paràmetres de funcionament [21].

Els models *in vitro* per estudiar el EMIC representen una estratègia per superar les limitacions que presenten els models *in vivo*. Algunes d'aquestes limitacions són les diferències fisiològiques que hi ha entre els humans i els animals, l'alta variabilitat de patògens i la dificultat per aïllar un únic paràmetre. Més enllà d'aquestes limitacions, la regla de les 3Rs (Refinement, Reduction and Replacement) fa referència a el refinament, la reducció o la substitució de les proves amb animals unes proves que cada vegada s'estan intentant disminuir més, impulsant el desenvolupament dels experiments *in vitro* [6], [27].

Gràcies a la combinació de les condicions fisiològicament rellevants i els dispositius tecnològics dels quals disposem avui en dia, els OoC tenen potencial per donar suport a la investigació orientada a la comprensió dels mecanismes moleculars subjectes a trastorns que impliquen diversos òrgans. Tanmateix, el camí per modelar tot el EMIC en un únic xip comport per múltiples òrgans encara és llarg, però hi ha altres estratègies, com combinar diferents OoC dels òrgans implicats en el EMIC per tal de veure les interaccions [27].

OoC de cervell

Actualment la demanda de models *in vitro* que substitueixin els models *in vivo* en investigació és cada vegada major en el cas de models que imitin fidelment el microambient *in vivo* del cervell. Es va desenvolupar una imitació *in vivo* d'un model de cervell 3D microfluidic amb un nivell de flux intersticial combinant matrius de micropous còncaus amb un sistema de microbomba osmòtic. Per demostrar el potencial d'aquest model en estudis de malalties neurodegeneratives es va fer un estudi amb dos models. Un d'ells amb un model sa de cervell i un altre amb un model amb β A. D'aquesta manera van ser capaços d'imitar la MA i un cervell sa en una mateixa plataforma (Figura 2) [29].

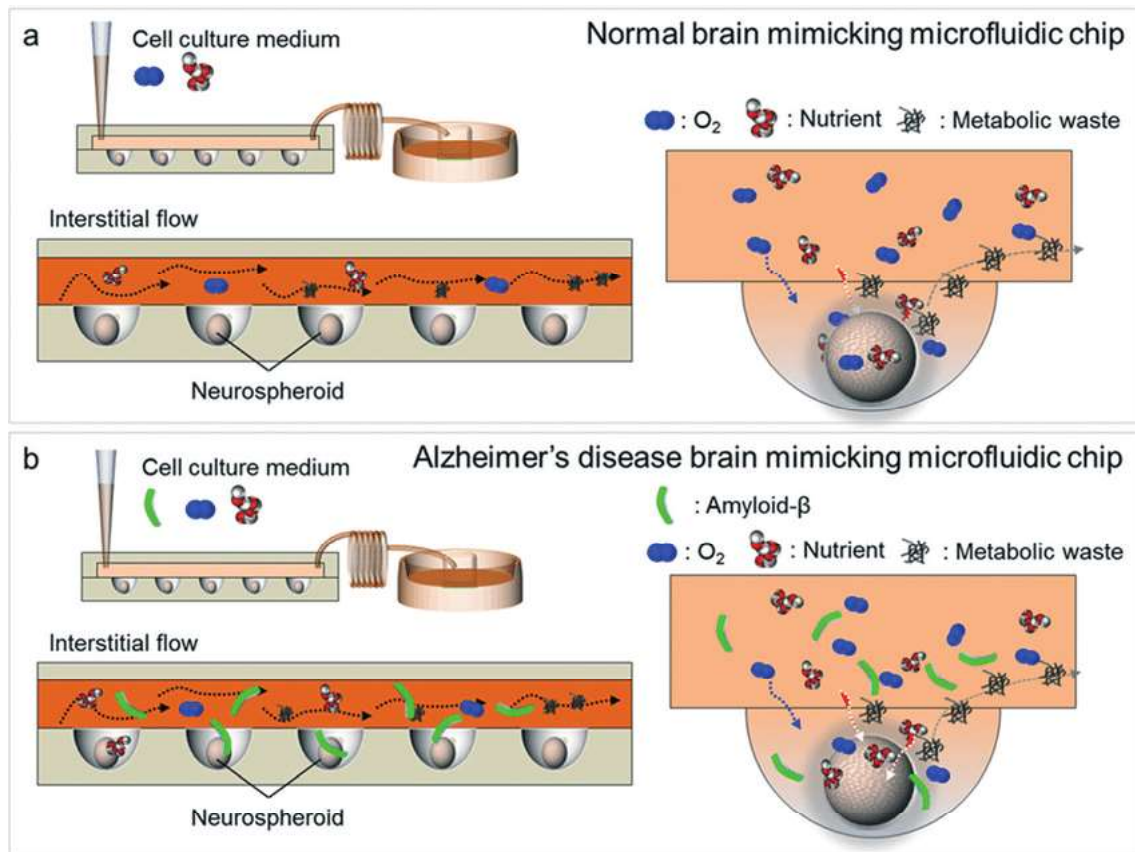


Figura 2 (a) Diagrama esquemàtic del chip microfluidic que imita un cervell sa (b) chip microfluidic que imita un cervell amb MA [29]

Amb una aproximació biomimètica van poder desenvolupar un OoC de cervell per investigar els efectes neurotòxics de β A, demostrant una disminució de la viabilitat cel·lular i un augment de la destrucció neuronal i la disfunció sinàptica, que són trets fisiopatològics de la malaltia de l'Alzheimer *in vivo*. Aquest microambient semblant al model *in vivo* fa que els OoC puguin substituir els models *in vivo* i *in vitro* que s'usen actualment en els estudis del cervell [29].

Plataforma MINERVA

L'any 2016 el Consell Europeu de Recerca (ERC) va finançar un projecte anomenat "MINERVA" (Microbiota-Gut-Brain EngineeRed platform to eVALuate intestinal microflora impact on brain functionality) que té com a objectiu desenvolupar el primer multi-OoC dissenyat per la microbiota intestinal cervell per avaluar l'impacte de la microbiota intestinal sobre la neurodegeneració (Figura 3) [2], [6], [27].

La plataforma MINERVA es basa en cinc OoC que siguin òpticament accessibles, sensibilitzats i miniaturitzats. Cada dispositiu estarà connectat hidràulicament al segon amb un tub microfluidic a través del qual passarà el medi amb una pressió positiva. Els cinc OoC són la microbiota intestinal, l'epiteli intestinal, el sistema immunitari, el BH i el cervell. Cadascun d'ells allotjarà model *in vitro*, on les cèl·lules seran cultivades de forma estàndard i per triplicat per la

microbiota intestinal, l'epiteli intestinal, el sistema immunitari i el BH, mentre que l'OoC del cervell disposa de neurones, astròcits i micròglia incrustada en una matriu d'hidrogel per tal d'obtenir un model 3D [30].

El disseny i el concepte de MINERVA s'ha pensat com una millora tecnològica d'un bioreactor miniaturitzat i òpticament accessible desenvolupat per a la perfusió intersticial de construccions de cèl·lules 3D. La plataforma MINERVA resultant pot ser una eina innovadora per a metges i investigadors i una contribució en el paper de la microbiota en els trastorns neurodegeneratius [6].

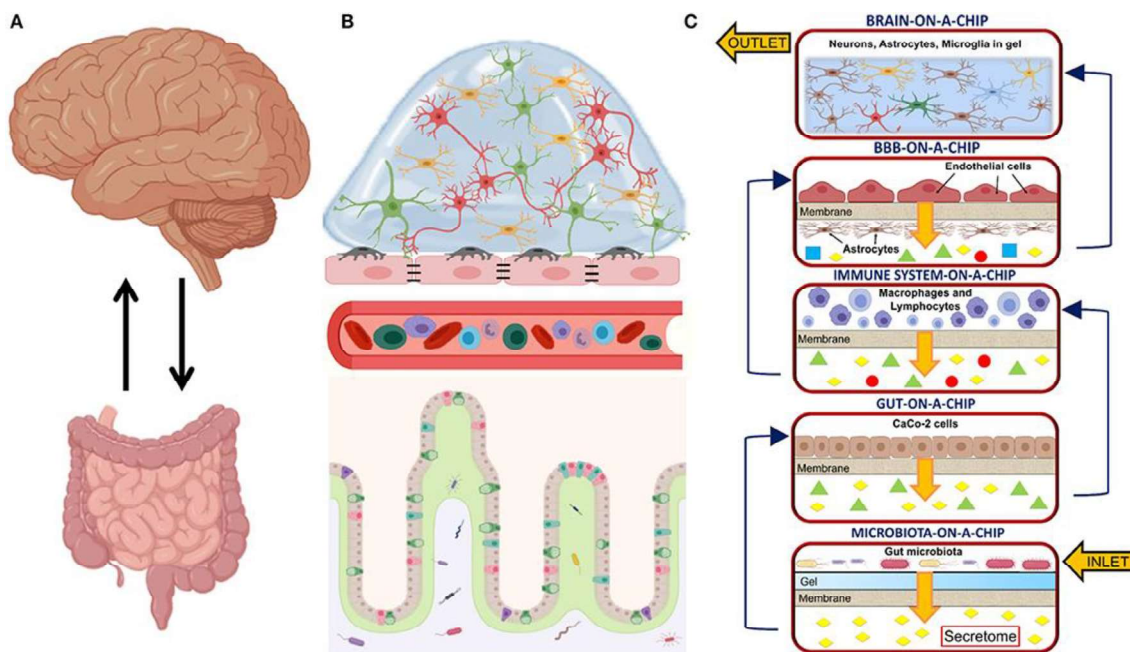


Figura 3 | A, Esquema dels principals òrgans implicats en el EMIC i la seva comunicació bidireccional. B, Esbós que detalla les estructures biològiques del EMIC. De baix a dalt: microbiota que resideix a la llum intestinal, la capa mucosa de l'intestí, les cèl·lules epitelials del sistema immunitari que circulen pel torrent sanguini, la barrera hematoencefàlica (BH) i les cèl·lules cerebrals. C, esbós de la plataforma MINERVA. De baix a dalt: OoC amb una membrana microporosa que suporta una matriu basada en hidrogel que imita el moc intestinal i inoculada amb microbiota intestinal, OoC que allotja la membrana microporosa sembrada de cèl·lules epitelials intestinals, OoC del sistema immunitària amb macròfags i limfòcits, OoC de la BH que allotja dues monocapes especulars de cèl·lules endotelials i astròcits i l'OoC del cervell que allotja una matriu d'hidrogel 3D que imita la matriu extracel·lular del cervell i incorpora neurones, micròglia i astròcits [27].

Conclusions

La microbiota intestinal i el cervell estan connectats a través de l'anomenat eix microbiota intestinal-cervell. Aquesta comunicació s'ha començat a estudiar a fons en la última dècada ja que s'està veient que la microbiota intestinal és de gran importància en el desenvolupament i el correcte manteniment de l'activitat cerebral. S'han trobat també evidències que relacionen la microbiota intestinal amb alguns trastorns o malalties neurodegeneratives.

Des del punt de vista biotecnològic, els OoC estan fent evolucionar la indústria farmacèutica gràcies a poder simular l'entorn fisiològic dels òrgans humans *in vitro*, permetent així que no s'hagi d'experimentar amb éssers vius. Tot i que es tracta d'una tecnologia que té un gran potencial en l'àmbit de la investigació encara hi ha molt per investigar.

Per tal de poder estudiar a fons l'eix microbiota intestinal-cervell a través dels òrgans on a chip eliminarà les diferències fisiològiques que hi ha entre els models animals. Actualment no existeix encara un model d'OoC que mostri tot l'eix complet. El projecte MINERVA té com a objectiu poder connectar cinc OoC per tal de poder simular i estudiar l'EMIC. El seu desenvolupament pot suposar un gran avenç tecnològic per estudiar l'eix microbiota intestinal i els seus efectes en el cervell.

Poder estudiar l'EMIC a fons permetrà poder entendre millor algunes malalties o trastorns neurodegeneratius i trobar-ne algun tractament per tal de frenar la neurodegeneració i millorar la qualitat de vida del pacient.

Autoavaluació

La realització d'aquesta revisió bibliogràfica ha resultat ser tot un repte personal. Ha sigut una gran experiència, ja que he pogut aprendre i entendre molts aspectes relacionats amb l'EMIC, i aprofundir en el potencial que presenten els OoC.

Aquest treball m'ha ajudat a aprendre a fer revisions bibliogràfiques, ja que mai havia fet una revisió bibliogràfica d'aquestes dimensions, per la qual cosa ha suposat també un repte personal per mi. Algunes de les limitacions que he trobat és que hi ha pocs articles estudiïn l'EMIC a través dels OoC. Però això m'ha ajudat a valorar la feina dels altres investigadors.

Estic molt satisfeta amb el resultat del treball, i realitzar-lo m'ha donat molta confiança amb mi mateixa. Personalment considero que el món dels OoC té un gran potencial dins de la ciència tot i que no són molt coneguts per la societat. Igual que l'EMIC, del qual cada vegada hi ha més informació i podria aportar nous enfocaments en la medicina. Tal com hem pogut observar en aquest treball els OoC i l'EMIC són dos àmbits estan encara en estudi, però tenen un gran potencial per canviar la medicina.

Agraïments

Agrair al meu tutor Miquel Mulero, per oferir-me sempre ajuda de manera immediata i a contribuir a la millora del treball gràcies als seus comentaris i a les seves revisions.

A la meva família per sempre confiar en mi i animar-me a seguir endavant davant les adversitats que es puguin presentar.

A l'equip de TissUse GMB per donar-me l'oportunitat d'haver fet pràctiques amb ells i donar-me a conèixer els Òrgans on a chip.

Bibliografia

- [1] C. Benakis, C. Martin-gallausiaux, J. Trezzi, P. Melton, A. Liesz, and P. Wilmes, 'ScienceDirect The microbiome-gut-brain axis in acute and chronic brain diseases', *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 61, pp. 1–9, 2020.
- [2] L. Boeri, L. Izzo, L. Sardelli, M. Tunesi, D. Albani, and C. Giordano, 'Advanced organ-on-a-chip devices to investigate liver multi-organ communication: Focus on gut, microbiota and brain', *Bioengineering*, vol. 6, no. 4, 2019.
- [3] C. M. Moysidou and R. M. Owens, 'Advances in modelling the human microbiome-gut-brain axis in vitro', *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 49, no. 1, pp. 187–201, 2021.
- [4] R. A. K. Possomato-Vieira, José S. and Khalil, 'Gut-Brain Axis and Behavior', *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 12, pp. 139–148, 2016.
- [5] Q. Wu *et al.*, 'Organ-on-a-chip: Recent breakthroughs and future prospects', *Biomed. Eng. Online*, vol. 19, no. 1, pp. 1–19, 2020.
- [6] F. A. Ceppa, L. Izzo, L. Sardelli, and I. Raimondi, 'Human Gut-Microbiota Interaction in Neurodegenerative Disorders and Current Engineered Tools for Its Modeling', vol. 10, no. July, 2020.
- [7] H. X. Wang and Y. P. Wang, 'Gut Microbiota - brain Axis', vol. 129, no. 19, pp. 2373–2380, 2016.
- [8] J. F. Cryan *et al.*, 'THE MICROBIOTA-GUT-BRAIN AXIS', pp. 1877–2013, 2021.
- [9] H. X. Wang and Y. P. Wang, 'Gut microbiota-brain axis', *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 129, no. 19, pp. 2373–2380, 2016.
- [10] A. Bein *et al.*, 'Microfluidic Organ-on-a-Chip Models of Human Intestine', *Cmgh*, vol. 5, no. 4, pp. 659–668, 2018.
- [11] K. G. Hawkins, C. Casolaro, J. A. Brown, D. A. Edwards, and J. P. Wikswo, 'The Microbiome and the Gut-Liver-Brain Axis for Central Nervous System Clinical Pharmacology: Challenges in Specifying and Integrating In Vitro and In Silico Models', *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 108, no. 5, pp. 929–948, 2020.
- [12] C. Lin *et al.*, 'Microbiota-gut-brain axis and toll-like receptors in Alzheimer's disease', *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 17, pp. 1309–1317, 2019.

- [13] A. Megur, D. Baltriukienė, V. Bukelskienė, and A. Burokas, 'The microbiota–gut–brain axis and Alzheimer's disease: Neuroinflammation is to blame?', *Nutrients*, vol. 13, no. 1, pp. 1–24, 2021.
- [14] K. Kowalski and A. Mulak, 'Brain-gut-microbiota axis in Alzheimer's disease', *J. Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 25, no. 1, pp. 48–60, 2019.
- [15] V. Caputi and M. C. Giron, 'Microbiome-Gut-Brain Axis and Toll-Like Receptors in Parkinson's Disease', 2018.
- [16] P. Perez-Pardo *et al.*, 'The gut-brain axis in Parkinson's disease: Possibilities for food-based therapies', *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 817, no. March, pp. 86–95, 2017.
- [17] C. Bullich, A. Keshavarzian, J. Garssen, A. Kraneveld, and P. Perez-Pardo, 'Gut Vibes in Parkinson's Disease: The Microbiota-Gut-Brain Axis', *Mov. Disord. Clin. Pract.*, vol. 6, no. 8, pp. 639–651, 2019.
- [18] and V. A. B. Ashutosh Tripathi, Aaron H. Nile, 'Autism Spectrum Disorder as a Brain-Gut-Microbiome Axis Disorder', *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 10, pp. 139–148, 2017.
- [19] P. Srikantha and M. Hasan Mohajeri, 'The possible role of the microbiota-gut-brain-axis in autism spectrum disorder', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 9, pp. 14–19, 2019.
- [20] H. E. Vuong, 'Emerging roles for the gut microbiome in autism spectrum disorder', 2018.
- [21] S. Liang, X. Wu, X. Hu, T. Wang, and F. Jin, 'Recognizing depression from the microbiota–gut–brain axis', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 6, 2018.
- [22] E. A., Ü. B.Ö., and C. M.E., 'Neuroinflammation, gut-brain axis and depression', *Psychiatry Investig.*, vol. 17, no. 1, pp. 2–8, 2020.
- [23] S. Nanthakumaran *et al.*, 'The Gut-Brain Axis and Its Role in Depression', *Cureus*, vol. 12, no. 9, pp. 10–15, 2020.
- [24] 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.
- [25] M. M. n, Eunsung Mouradian, 'Accelerating drug discovery via organs-on-chips', *Bone*, vol. 23, no. 1, p. 24, 2013.

- [26] M. Mastrangeli *et al.*, 'Building blocks for a European Organ-on-Chip roadmap', *ALTEX*, vol. 36, no. 3, pp. 481–492, 2019.
- [27] I. Raimondi, L. Izzo, M. Tunesi, M. Comar, D. Albani, and C. Giordano, 'Organ-On-A-Chip in vitro Models of the Brain and the Blood-Brain Barrier and Their Value to Study the Microbiota-Gut-Brain Axis in Neurodegeneration', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7. Frontiers Media S.A., 10-Jan-2020.
- [28] 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.
- [29] J. Park, B. K. Lee, G. S. Jeong, J. K. Hyun, C. J. Lee, and S. H. Lee, 'Three-dimensional brain-on-a-chip with an interstitial level of flow and its application as an in vitro model of Alzheimer's disease', *Lab Chip*, vol. 15, no. 1, pp. 141–150, Jan. 2015.
- [30] M. T. Raimondi, D. Albani, and C. Giordano, 'An Organ-On-A-Chip Engineered Platform to Study the Microbiota – Gut – Brain Axis in Neurodegeneration', *Trends Mol. Med.*, vol. 25, no. 9, pp. 737–740, 2019.