

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 151**

51 Int. Cl.:

C12M 3/06 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2010 PCT/EP2010/002286**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010 WO2010118857**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2010 E 10720120 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2419504**

54 Título: **Módulo de cultivos celulares**

30 Prioridad:

14.04.2009 GB 0906236

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.06.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE**

72 Inventor/es:

**MARZORATI, MASSIMO;
POSSEMIERS, SAM;
VAN DEN ABEELE, PIETER;
VAN DE WIELE, TOM;
VANHOECKE, BARBARA y
VERSTRAETE, WILLY**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 617 151 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Módulo de cultivos celulares.

La presente invención se refiere a modelos *in vitro* que permiten el crecimiento, la estabilización y el estudio de las comunidades microbianas que se adhieren y colonizan superficies relacionadas con el hospedante y que imitan el transporte de compuestos químicos a través de superficies epiteliales y que permiten la adaptación hospedante-microbiota y el intercambio de señales.

Antecedentes de la invención

El cuerpo humano alberga una comunidad microbiana tremendamente diversa sobre las superficies hospedantes externas e internas tales como la piel, el tracto respiratorio, la boca, el tracto gastrointestinal, el tracto reproductor, el tracto urinario y los ojos. El número total de células microbianas (10^{14}) supera el número de células hospedantes (10^{13}) con un orden de magnitud y comprende miles de especies. Su enorme diversidad enzimática, su capacidad para provocar respuestas inmunológicas del hospedante y la posibilidad de modular los procesos fisiológicos dentro del hospedante que están relacionados con la etiología del cáncer, la obesidad o las enfermedades cardiovasculares, hace de estos microorganismos asociados con un hospedante un factor de confusión en el estado de salud general de un individuo.

Más en particular, el tracto gastrointestinal, que sigue siendo un ambiente externo al cuerpo del hospedante, es un sitio donde la implicación microbiana en procesos del hospedante es altamente significativa. Hasta ahora, muchos estudios se han focalizado en la comunidad microbiana en el lumen del intestino al investigar su actividad fermentativa, potencias metabólicas y cambios en la composición de comunidad debido a ciertos tratamientos. Sin embargo, las interacciones específicas microbio-hospedante a menudo dependen de la capacidad de los microorganismos para adherirse a la superficie del intestino. Estudios previos emplearon experimentos de cultivos celulares, tales como Caco-2, T84, HT29, etc., para investigar la adherencia específica de microorganismos probióticos o patógenos a las células epiteliales. Sin embargo, por razones de citotoxicidad, los cultivos celulares son muy sensibles a la coincubación con suspensiones microbianas mixtas, limitando así el tiempo experimental a 2 horas como máximo. Por otra parte, el crecimiento de los cultivos celulares insume mucho tiempo y no es posible realizar pruebas de detección de alto rendimiento para evaluar muchas bacterias o componentes al mismo tiempo.

Se ha propuesto que la estructura y la composición del ecosistema gastrointestinal refleja una selección natural tanto a nivel microbiano como a nivel hospedante. Dicho ecosistema requiere una serie de equilibrios evolucionados y anidados para lograr la homeostasis general, en analogía con la teoría de la Estrategia Estable Evolutiva. Las señales derivadas del hospedante y las señales derivadas del microbio pueden estar vinculadas o disociadas. Las señales vinculadas implican una presión selectiva que se basa y favorece la coevolución (Blaser y Kirschner, 2007, *Nature*, 449: 843-849). La selección natural antes mencionada se produce principalmente a lo largo de superficies de mucosa mediante una interacción hospedante-microbiota que conduce a la modulación de la inmunidad del hospedante.

Las vías de señalización inmunológicas específicas se pueden desencadenar a partir del reconocimiento por parte del hospedante de los patrones de pared celular microbiana. Los microorganismos tienen una amplia variedad de patrones de membrana asociados a microbios (MAMP, por su sigla en inglés), que se pueden reconocer mediante receptores específicos del hospedante en células epiteliales. Un ejemplo de este proceso de reconocimiento es la familia de Receptores tipo Toll (TLR, por su sigla en inglés), que reconocen adhesinas microbianas específicas, tales como lipopolisacáridos (LPS), ácidos lipoteicoicos, fimbrias, pili, etc. Sin embargo, en el epitelio intestinal, donde la interacción entre el hospedante y la microbiota endógena es la más alta, se puede regular la disminución del TLR. Antes de la invasión microbiana de células epiteliales, los microorganismos necesitan alcanzar el epitelio. Sin embargo, no hay contacto directo entre las bacterias lumenales y las superficies epiteliales. La superficie real que las bacterias encuentran cuando se aproximan al epitelio del hospedante, es la capa de mucosidad que cubre el epitelio. Por lo tanto, el estudio de la capacidad microbiana para adherirse a la capa de mucosidad intestinal es un prerrequisito importante al evaluar la capacidad de un microorganismo para interactuar con el hospedante. Si bien es posible provocar la producción de mucosidad en, por ejemplo, las líneas celulares HT29 (Novellvaux et al., 2006) así como MKN1, MKN7 y MNK45 (Linden et al., 2007), no es posible monitorizar la colonización y persistencia de las comunidades microbianas mixtas en estas células por razones de citotoxicidad. Por lo tanto, los modelos *in vitro* que permiten el estudio de colonización de mucosidad microbiana durante un período más extenso son, por tanto, muy necesarios.

Los principales componentes de la mucosidad son las mucinas, que suelen estar presentes en una concentración que oscila entre 2 % y 10 % (p/v). Estas son glicoproteínas que contienen altas proporciones de carbohidratos, generalmente entre 70 % a 85 % (p/p). Las mucinas son glicoproteínas inusuales en cuanto a que la mayoría de las cadenas laterales de carbohidratos están unidas a la proteína en residuos de serina y treonina a través de un átomo de oxígeno (es decir, son "O-glicosilados"), aunque también se produce N-glicosilación. La estructura de una molécula de mucina típica consiste en una proteína a la que están unidas las cadenas laterales de carbohidratos mediante O-glicosilación y/o N-glicosilación. La estructura de la proteína consiste en varios miles de residuos de aminoácidos (en el caso de MUC2, un tipo principal de mucina que se encuentra en el sistema gastrointestinal (TGI),

el número de aminoácidos es 5.179) y contiene regiones con muchas cadenas laterales de oligosacáridos y otras regiones sin dichas cadenas laterales. Las regiones ricas en oligosacáridos son resistentes a las proteasas, mientras que las otras regiones son sensibles a la proteasa. Las regiones que contienen oligosacáridos de la proteína son ricas en serina, treonina y prolina. Las cadenas laterales suelen consistir en dos a doce residuos de un intervalo restringido de azúcares, generalmente galactosa, fucosa, *N*-acetilglucosamina, *N*-acetilgalactosamina, manosa y ácidos siálicos.

Las estructuras de proteína de las diversas mucinas producidas están codificadas por una gran familia de genes MUC. El sitio del cuerpo específico determinará cuáles de estos genes se expresan. Por lo tanto, MUC2 es el tipo principal de proteína mucina producida en el tracto intestinal, mientras que la expresión de seis genes MUC se ha detectado en el cuello uterino con diferentes patrones de expresión en diferentes fases del ciclo menstrual. En la cavidad oral, se han identificado dos mucinas secretadas bien conocidas, la glicoproteína 1 de mucosidad (MG1) y la glicoproteína 2 de mucosidad (MG2). La MG1 de alto peso molecular consiste principalmente en el producto de gen MUC5B (Nielsen et al., 1997), mientras que la MG2 de bajo peso molecular es un producto del gen MUC7 (Bobek et al., 1993). Sin embargo, solo unos pocos investigadores han informado la expresión de mucinas asociadas a membranas en la cavidad bucal humana. Sengupta et al. (2001) informó que MUC1 se expresó en los conductos del salival menor. Liu et al. (2002) demostró que MUC1 y MUC4, pero no MUC3 y MUC13, se expresaron en las glándulas parótidas y submaxilares humanas. Recientemente, se ha demostrado que las capas epiteliales de mucosa oral humana estratificadas y cultivadas expresan las transcripciones para las mucinas asociadas a membrana, MUC1, MUC4 y MUC16, pero no MUC3, MUC12, MUC13, MUC15 y MUC17 (Hori et al., 2007; Hori et al., 2008).

También existen diferencias con respecto a los patrones del glicosilación de un tipo particular de proteína mucina; por lo tanto, la composición de las cadenas laterales de carbohidratos de una mucina con una estructura de proteína MUC1 en los tractos respiratorios e intestinales será diferente.

Además de la adherencia de mucosidad, algunas bacterias pueden invadir la capa de mucosidad y utilizar la mucina como Carbono, Nitrógeno y fuente de energía. Los polímeros de mucina necesitan hidrolizarse, antes de la asimilación de los oligómeros de mucina, monómeros de mucina y aminoácidos. La complejidad estructural de los polímeros de mucina implica que es improbable su completa degradación mediante una sola especie microbiana. Dicha degradación requiere la producción de toda una gama de enzimas en un cierto orden porque las regiones de la molécula solo se hacen accesibles una vez que se hayan eliminado otras. Esto se logra más fácilmente mediante consorcios microbianos en lugar de especies individuales. El rango de enzimas necesarias para lograr la degradación completa de mucina se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Enzimas necesarias para la degradación completa de mucina

Tipo de enzima	Papel en la degradación de la mucina
Sulfatasas	Eliminación de residuos de sulfato finales que expone los azúcares subyacentes haciéndolos más susceptibles a la acción de las glicosidasas.
Sialidasa (neuraminidasas)	Eliminación de residuos terminales de ácido siálico: esto expone azúcares subyacentes a la acción de las glicosidasas: el ácido siálico en sí se puede degradar aún más por liasa de piruvato acetilneuraminato a <i>N</i> -acetilmannosamina que se puede utilizar como carbono y fuente de energía por algunas bacterias.
Exoglicosidasas	Escindir los azúcares desde las cadenas laterales (p. ej. β -D galactosidasa, <i>N</i> -acetil- β -D galactosaminidasa, α -fucosidasa, <i>N</i> -acetil- β -D glucosaminidasa).
Endoglicosidasas	Escindir toda la cadena lateral de la estructura del péptido o atacar la cadena lateral en sitios que no sean el residuo terminal. Esto puede ocurrir antes o después de que la cadena lateral se haya escindido de la proteína.
Peptidasas/proteasas	Escindir en regiones no glicosiladas: degradar la estructura de la proteína después de que se hayan eliminado las cadenas laterales.

Se ha detectado la capacidad de degradar mucina, total o parcialmente, en microbios o consorcios microbianos que habitan todos los sitios mucosos del cuerpo. La eliminación de los carbohidratos y otros componentes de la glicoproteína compromete la función protectora en el intestino, especialmente cuando la tasa de degradación de la mucosidad excede la tasa de producción de la mucosidad. La composición y la actividad metabólica de las comunidades microbianas mucosas son bastante diferentes de las comunidades microbianas luminales en el

intestino. Dada su importancia ecológica en cuanto a la composición de la microbiota intestinal y su supuesto papel en la enfermedad inflamatoria intestinal tal como la colitis ulcerosa, es fundamental para comprender la colonización, la composición y la actividad metabólica de la población microbiana de la mucosa intestinal.

- 5 Una vez que los microorganismos intestinales se pueden adherir a la mucosa, tienen la oportunidad de formar una biopelícula en la mucosa dentro del período en que el epitelio del hospedante renueva su capa de mucosidad. Se considera que las biopelículas reflejan el estado estable más usual para el crecimiento bacteriano (Costerton, 1995) con la biopelícula microbiana intestinal que constituye un factor determinante en el establecimiento y mantenimiento de la comunidad microbiana espacialmente diversificada (Hooper y Gordon, 2001). Una característica especial de las biopelículas de mucosa es la presencia de oxígeno en la base, debido a la difusión del flujo de sangre del hospedante a través del epitelio. Las concentraciones de oxígeno lumbales en el colon incluso pueden aumentar a 30 mm Hg. Esto comprometería la colonización y el crecimiento de anaerobios estrictos, tales como las Fusobacterias sésiles que se encuentra que tienen una importante función de "puente" dentro de las biopelículas, formando puentes de coagregación/coadherencia entre los primeros y últimos colonizadores y contribuyendo así hacia el establecimiento y acumulación de biopelículas (Kolenbrander et al., 2000). Sin embargo, es factible el crecimiento de las Fusobacterias en la biopelícula de la mucosidad debido a su asociación local con aerobios y anaerobios facultativos, que localmente agotan la capa de mucosidad de oxígeno. La presencia de oxígeno en la capa de mucosidad también permite la producción de especies reactivas de oxígeno tales como $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} de origen bacteriano. Por ejemplo, se ha demostrado que el *Enterococcus faecalis* forma radicales de hidroxilo mediante la hidroxilación aromática, provocando así estrés oxidativo hacia el epitelio (Huycke y Moore, 2002).
- 10
- 15
- 20 Se han utilizado diferentes enfoques *in vitro* para evaluar la influencia de sustancias y organismos en el sistema gastrointestinal y su flora que incluyen sistemas de cultivo por lotes y continuos.

Fermentadores por lotes

- Los sistemas de cultivo por lotes a corto plazo permiten una prueba de detección rápida y un diseño flexible para evaluar, por ejemplo, la variabilidad interindividual. Sin embargo, en este ambiente simplificado, no es posible controlar las condiciones cambiantes y solo se pueden realizar experimentos a corto plazo.
- 25

Fermentadores continuos de una sola fase

- Los fermentadores continuos de una sola fase ofrecen un mejor modelo para las regiones específicas del tracto gastrointestinal en condiciones controladas. No obstante, no siempre es posible que la comunidad microbiana en estudios a largo plazo sea estable.
- 30 El simulador de lectura
- El simulador de Lectura (Macfarlane y Macfarlane, 2007) simula el intestino utilizando un cultivo continuo de 3 fases con tres recipientes de cristal (220 ml, 320 ml y 320 ml) y un pH diferente en cada recipiente (5,8, 6,2 y 6,8), que imita el colon proximal, transversal y distal humano, respectivamente. Cada recipiente se inocula con 100 ml de 20 % (p/v) de heces humanas. El sistema se ejecuta por 14 días para alcanzar una condición de estado estable en los recipientes, luego por 3 semanas para evaluar un compuesto específico y, por último, para un período de lavado (2 semanas) para determinar durante cuánto tiempo aún se pueden medir los cambios inducidos por la sustancia de prueba en ausencia del sustrato en sí.
- 35

El simulador de colon EnteroMix

- El modelo EnteroMix tiene cuatro unidades paralelas, comprendiendo cada una cuatro recipientes de cristal, permitiendo que se ejecuten cuatro simulaciones simultáneamente con el mismo inóculo fecal (Makivuokko et al., 2006). Los recipientes del modelo EnteroMix 1, 2, 3 y 4 tienen volúmenes de trabajo pequeños (6, 8, 10 y 12 ml, respectivamente). Se controlan los niveles de pH. La simulación comienza con tres horas de incubación de 10 ml del inóculo fecal y a continuación se bombean 3 ml del medio simulador nuevo con (tres canales de prueba) o sin una sustancia de prueba (un canal de control) al primer recipiente. El medio se fermenta en el primer recipiente durante tres horas, después de que se transfieren 3 ml del medio fermentado al segundo recipiente, y se bombean 3 ml del medio nuevo al primer recipiente. La fermentación dura 48 horas, después de las cuales se recogen las muestras de cada recipiente y se termina la simulación.
- 40
- 45

- En los dos últimos sistemas, la parte superior del tracto gastrointestinal (estómago e intestino delgado) está totalmente ausente. Por otra parte, en el simulador EnteroMix de colon, los volúmenes son pequeños en comparación con la situación *in vivo*, no hay estabilización de la comunidad microbiana y solo se pueden realizar experimentos cortos.
- 50

Modelos *in vitro* del sistema gastrointestinal (TGI)

Actualmente, hay dos modelos completos *in vitro* del TGI disponibles en los que se pueden realizar estudios y trabajos, se reducen el tiempo y los costes en comparación con los estudios *in vivo*, sin limitaciones éticas. En estos dos sistemas, la cinética del intestino se simula mediante el control de las concentraciones de las enzimas gástricas, del intestino delgado y pancreáticas, bilis, pH, temperatura, composición del alimento, tiempo de tránsito en el TGI y el ambiente anaeróbico con relevancia fisiológica.

TIM 1 y 2 (modelo intestinal del TNO)

El primer modelo del TGI *in vitro* es el modelo gastrointestinal del TNO (TIM). En realidad, este modelo comprende dos partes complementarias; los sistemas 1 y 2 presentados por Minekus et al. en 1995 y 1999 (US55255305 y Minekus et al., 1999) y WO1994009895. El sistema TIM 1 contiene cuatro cámaras controladas por ordenador que simula las condiciones del estómago, duodeno, yeyuno e íleon. El sistema TIM 2 consiste en cuatro módulos de cristal que imitan el colon proximal de animales monogástricos. En estos modelos dinámicos el transporte de fluido de recipiente a recipiente pasa a través de la válvula-bombas peristálticas y hay una constante, aunque pasiva, absorción de agua y productos de fermentación a través de membranas de diálisis. Para la simulación de la absorción intestinal TIM 1 tiene dos membranas de diálisis integradas de 5 kDa, junto a los módulos del yeyuno e íleon. TIM 2 tiene una membrana de fibra hueca (valor de corte de la masa molecular 50 kDa) en la parte luminal del sistema. Los valores de pH se monitorizan en cada compartimento. En una simulación de TIM 2 el modelo se inocula con 200 ml del inóculo fecal. Se permite que la microbiota se adapte a las condiciones durante 16 horas, sin embargo no hay ninguna estabilización a largo plazo de la comunidad microbiana y los volúmenes en las diferentes cámaras son pequeños en comparación con las situaciones *in vivo*.

El Simulador del ecosistema microbiano intestinal humano (SHIME)

El segundo modelo del TGI *in vitro* es el Simulador del Ecosistema Microbiano Intestinal Humano (SHIME, por su sigla en inglés). El SHIME convencional es un modelo dinámico del intestino humano que comprende 5 compartimentos respectivamente que simulan el estómago, el intestino delgado y el colon ascendente, transversal y descendente. Los compartimentos del estómago y del intestino delgado imitan el ambiente enzimático y fisicoquímico mediante el control del pH y del tiempo de residencia y la dosificación de un medio nutritivo adecuado, las enzimas y las sales biliares. Al controlar el pH, el potencial redox y los tiempos de residencia, cada uno de los diferentes compartimentos del colon albergan una comunidad microbiana que corresponde a la de la situación *in vivo* en cuanto a la actividad metabólica y la composición de la comunidad. En este modelo, se siguen un período de estabilización típico de tres semanas y un período basal de dos semanas por tratamiento y períodos de lavado.

Modelo de simulación de biopelículas (Lacroix, Suiza)

Todos los modelos presentados hasta ahora no tienen en cuenta un aspecto importante en el tracto gastrointestinal: la adherencia de microorganismos a la capa de mucosidad, la formación de biopelículas y su papel potencial en la fisiología del hospedante y la estructuración de la comunidad microbiana y en interacción. Las solicitudes de patente US2005186633 y US20040101906 de Lacroix et al. (2005) abordaron la cuestión de la formación de biopelículas en el tracto gastrointestinal. Reivindicaron un sistema que utiliza la inmovilización celular en cultivos de flujo continuo anaeróbico para modelar el sistema gastrointestinal. Los microbios de las muestras fecales nuevas se inmovilizan en un gel mixto de gellan y xantano en perlas y luego se introducen en un quimiostato de una sola fase o varias fases (sistema de cultivo continuo) que simulan la biopelícula que se forma típicamente en el tracto gastrointestinal. Este sistema permite que se adhieran los microorganismos. Al mismo tiempo, sin embargo, carece del aspecto importante que caracteriza específicamente la biopelícula de la mucosa, a saber, las condiciones anaeróbicas imperantes en la parte superior de la biopelícula y las condiciones microaerófilas imperantes en la base de la biopelícula.

Probert y Gibson (2004) proporcionaron un dispositivo similar con un marco de perlas de mucina cubiertas dentro de una membrana de diálisis. El sistema se inocula con muestras fecales y el agua y los metabolitos se eliminan por ósmosis utilizando una disolución de glicol de polietileno.

Por último, Macfarlane et al. (2005) desarrolló un sistema de cultivo continuo de dos fases, simulando el colon proximal y distal, y utilizó los geles de mucina porcina estéril en tubos de cristal pequeños para determinar cómo las bacterias intestinales colonizan y degradan la mucosidad. Estos tubos se pueden colocar en un fermentador que simula un área específica del tracto gastrointestinal y se eliminan en un período de 48 horas para realizar análisis adicionales de la biopelícula.

Estos sistemas permiten que los microorganismos se adhieran, pero no ofrecen la oportunidad de estudiar la formación de biopelículas del intestino (Lebeer et al., 2007) y la interacción hospedante-microbiano en condiciones continuas simuladas.

Simulación de la interacción hospedante-bacterias

Ninguno de los modelos antes mencionados que simulan el tracto gastrointestinal tiene un dispositivo adecuado para estudiar los mecanismos de adherencia bacteriana en respuesta a las señales del hospedante y la interacción

recíproca. Los estudios previos utilizan animales libres de gérmenes (principalmente roedores y, más recientemente, peces zebra - Cheesman y Guillemín, 2007) o experimentos de cultivos celulares (principalmente células Caco-2 o HT29).

5 Los estudios en animales demostraron que los vertebrados poseen una amplia escala de interacciones conservadas con los microbios con los que evolucionan conjuntamente (Cheesman y Guillemín, 2007) en particular al mantener la homeostasis epitelial intestinal; sin embargo, los estudios mecanicistas no son siempre posibles.

10 El uso de líneas celulares *in vitro* se puede limitar por el hecho de que estas células no producen una capa de mucosidad (células Caco-2) o por el hecho de que los cultivos microbianos puros o solo se puede evaluar una mezcla de algunas cepas, por razones de citotoxicidad. Los cultivos celulares son muy sensibles a la incubación con suspensiones microbianas mixtas, limitando así el tiempo de incubación y la adaptación del hospedante y el metabolismo microbiano.

15 Laube et al. (2000) ha desarrollado un modelo interesante para simular el metabolismo secuencial de sustancias químicas por el hígado y la microbiota intestinal. Aquí, en un sistema de doble cámara, los hepatocitos se cultivan como una monocapa sobre una membrana mientras que, en el compartimento anaeróbico, la microbiota fecal está presente en suspensión. El intercambio de metabolitos se puede producir a través de la membrana permeable.

Parlesak et al. (2004) ha llevado a cabo otro estudio, que investiga la interacción entre los leucocitos y enterocitos mononucleares humanos durante el reto con una sola especie bacteriana utilizando sistemas de cultivo celular Transwell compartimentados.

20 Linden et al (2007) también ha utilizado el sistema de cultivo celular Transwell, en el que líneas celulares epiteliales gastrointestinales humanas (p. ej., MKN1, MKN7, Caco-2,...) crecen en el lado apical de un Transwell y posteriormente, se cocultivan con diferentes cepas microbianas.

Aunque los sistemas antes descritos son muy útiles para los experimentos a corto plazo, generalmente no son adecuados para estudiar las propiedades complejas de la microflora intestinal en estudios a largo plazo, debido a la citotoxicidad de las células microbianas hacia la capa de células humanas.

25 Modelo *in vitro* de la presente invención

30 Una prueba *in vitro* que no representa la complejidad real *in vivo* será poco fiable cuando los resultados se extrapolan a una situación *in vivo* del TGI (Pedersen y Tannock, 1989). Las comunidades bacterianas de la mucosa en el tracto gastrointestinal son difíciles de estudiar *in vivo* y las biopsias se suelen obtener de individuos enfermos. En consecuencia, los datos disponibles no pueden proporcionar una indicación real de una diversidad de mucosa normal (Macfarlane y Dillon, 2007). Además, un dispositivo adecuado para estudiar los mecanismos de adherencia bacteriana en respuesta a las señales del hospedante y sus interacciones recíprocas aún no está disponible.

Por lo tanto, hay una necesidad de modelos *in vitro* que

- reflejen la situación del tracto gastrointestinal (TGI) *in vivo*,
- imiten las condiciones ambientales relevantes de una capa de mucosa,
- 35 – se puedan adaptar a un sistema continuo
- permitan el estudio de la adherencia, colonización, composición y actividad metabólica de la población microbiana de mucosa en un marco de tiempo más extenso,
- permitan la formación de una biopelícula de mucosa con condiciones específicas (en particular anaeróbicas o aeróbicas) imperantes en la parte superior de la biopelícula y las condiciones microaerofílicas imperantes
- 40 – en la base de la biopelícula,
- proporcionen la posibilidad de realizar experimentos con monocultivos y con las comunidades microbianas mixtas y, por lo tanto, más relevantes, y/o
- permitan evaluar la interacción hospedante-microbiota y la consiguiente adaptación recíproca.

45 La presente invención describe diferentes modelos para estudiar la adherencia microbiana a superficies de mucosa. En particular, los modelos de la presente invención comprenden 2 compartimentos separados por una membrana semipermeable. Dicha membrana, en el lado luminal que está recubierto con una capa de mucosidad artificial a la que se permite que se adhieran los microorganismos aplicados en el compartimento luminal. El uso de dichas capas de mucosidad artificial es conveniente en comparación con el uso de capas de mucosidad formadas por células epiteliales, ya que se evita la interacción directa, y como tal, también la citotoxicidad entre los microorganismos y las

células epiteliales, permitiendo análisis a largo plazo. Sin embargo, las células epiteliales y/u otros tipos de células pueden hacerse crecer en el compartimento basal del módulo y se permite que los productos de secreción de estas células, así como de los microorganismos, se esparzan a través de la membrana y la capa de mucosidad artificial en ambas direcciones. Además, el uso de dos compartimentos separados permite el establecimiento de las presiones de oxígeno diferentes en ambos lados de la membrana. Mediante la regulación de la presión de oxígeno en los compartimentos individuales, se pueden establecer las condiciones óptimas para las células epiteliales aeróbicas en el compartimento basal, así como para el microorganismo anaeróbico en el compartimento luminal. Como será evidente en los sucesivos ejemplos, el gradiente de oxígeno a través de la membrana semipermeable da lugar a condiciones microaerofílicas en el lado luminal de la capa de mucosidad artificial que imitan con esmero la situación correspondiente *in vivo* para la adherencia de microorganismos a dicha capa. Por último, los modelos permiten un establecimiento de tensión de corte en el compartimento que contiene los microorganismos, que es muy importante para imitar la situación *in vivo*. La combinación de estas características claramente diferencia el modelo de la presente invención de los modelos descritos en la técnica anterior y ofrece un modelo novedoso del tracto gastrointestinal que imita con esmero la situación correspondiente *in vivo*.

15 Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un módulo de adherencia que se puede utilizar en un modelo del TGI *in vitro*, que comprende 2 compartimentos separados por una membrana semipermeable, presentando dicha membrana una capa de mucosidad artificial aplicada en su sitio luminal, y dicho módulo caracterizándose por condiciones anaeróbicas en su lado luminal y condiciones aeróbicas en su lado basal. Dicha capa de mucosidad comprende al menos un tipo de mucina y el espesor de la capa oscila entre 1 y 1000 μm . Las condiciones aeróbicas en el compartimento basal del módulo pueden comprender un suministro de oxígeno en el lado basal de la capa de mucosidad que oscila entre 1 y 150 mmHg, en particular entre 1 y 45 mmHg de presión parcial.

La membrana semipermeable permite el transporte de los componentes entre 0 y 100.000 Da, en particular entre 0 y 10.000 Da. El material de la membrana semipermeable es policarbonato, poli(cloruro de dialildimetilamonio), tereftalato de polietileno o poliamida (nailon). El módulo de adherencia puede incluir además una capa porosa de apoyo en el lado basal de la membrana semipermeable. El material de la capa porosa de apoyo es poli(cloruro de dialildimetilamonio), poli(ácido acrílico) o combinaciones de los mismos.

El compartimento basal del módulo comprende células viables. Las células pueden ser células Caco-2 y/o células HT29. Las células pueden crecer en una monocapa con su lado apical hacia la membrana semipermeable. El lado apical de las células se puede cubrir opcionalmente con una malla protectora.

En otra realización de la invención el módulo comprende perlas, que tiene desde adentro hacia afuera, una capa de apoyo interna, una membrana semipermeable y una capa de mucosidad artificial. Dichas perlas tienen un radio entre 500 μm y 1 cm, en particular entre 500 μm y 5 mm. La capa de apoyo interna puede comprender componentes de oxígeno de liberación lenta de bioquímicos. Por otra parte, la capa de apoyo interna puede estar cubierta con una capa intermedia que contiene componentes de oxígeno de liberación lenta de bioquímicos.

La superficie de la capa de mucosidad artificial es aproximadamente 1 cm^2 y 200 m^2 , en particular entre 1 cm^2 y 1000 cm^2 , en particular entre 1 cm^2 y 100 cm^2 . Uno o más microorganismos se pueden pegar a la capa de mucosidad y opcionalmente formar colonias o una biopelícula.

Otro aspecto se refiere a un sistema *in vitro* que comprende el módulo de adherencia antes descrito. El sistema *in vitro* puede ser un modelo gastrointestinal *in vitro*, un modelo del tracto reproductor femenino *in vitro*, un modelo del epitelio blando de la boca *in vitro* o un modelo del tracto respiratorio *in vitro*. Este sistema *in vitro* puede ser un modelo gastrointestinal *in vitro* que comprende una combinación de un compartimento del estómago, un compartimento del intestino delgado, un compartimento del colon ascendente, un compartimento del colon transversal y un compartimento del colon descendente. El compartimento del intestino delgado se puede reemplazar por un compartimento del duodeno, un compartimento del yeyuno y un compartimento del íleon. El módulo de adherencia de la invención se puede poner en paralelo y/o en serie con uno de los compartimentos.

Sin embargo, otro aspecto se refiere a un método para determinar el efecto de un elemento en el módulo de adherencia antes descrito, dicho método que comprende: (a) introducir dicho elemento en dicho módulo o dicho sistema; y (b) determinar si se produce cualquier cambio en cualquier característica o función de interés de dicho módulo o dicho sistema, en presencia de dicho elemento o después de la introducción de dicho elemento en dicho módulo o dicho sistema, en el que dicho cambio indica que dicho elemento tiene un efecto en el módulo o el sistema. Así, esta realización de la invención también se refiere al uso del módulo de adherencia o del sistema *in vitro* como se describe anteriormente para el estudio del efecto de un elemento. Esta realización de la invención también se refiere al uso del módulo de adherencia o del sistema *in vitro* como se describe anteriormente para el estudio y la modulación de la señalización molecular y la adaptación entre las células hospedantes y el microorganismo opcionalmente después de la incorporación de un elemento y para el estudio y la modulación de la fisiología, la actividad metabólica o las características probióticas o patógenas de su flora opcionalmente después de la incorporación de un elemento.

El elemento se selecciona del grupo de:

- (a) un microorganismo;
- (b) un sustrato;
- (c) una sustancia química;
- 5 (d) una célula; y
- (e) cualquier combinación de (a) a (d).

10 Sin embargo, otro aspecto se refiere al uso del módulo de adherencia o del sistema *in vitro* como se describe anteriormente para el estudio y el tratamiento de un trastorno relacionado con una barrera de la mucosa deteriorada, en particular con una adherencia de la mucosa deteriorada. El trastorno se puede asociar con la invasión de antígenos que causan reacciones alérgicas, se puede asociar con la adherencia de la mucosa y la invasión de patógenos, un trastorno metabólico o una enfermedad crónica del colon.

Breve descripción de las figuras

FIGURA 1: Prueba MTT llevada a cabo en células Caco-2 para evaluar la viabilidad de las células en diferentes condiciones.

15 FIGURA 2. Esquema de los módulos de adherencia que comprenden dos cámaras. 1A: un módulo de adherencia con una capa funcional que comprende una capa de mucosidad, una membrana semipermeable y una capa de apoyo. 1B: un módulo de adherencia con una capa funcional que comprende una capa de mucosidad y una membrana semipermeable en el que en la cámara basal las células crecen en una monocapa con su lado apical hacia la capa de mucosidad.

20 FIGURA 3: Espesor de la mucosidad a lo largo de las distintas zonas del tracto gastrointestinal (Atuma et al., 2001).

FIGURA 4: Esquema de perlas recubiertas de mucosidad que comprenden una perla de apoyo interna, una capa intermedia que comprende material de liberación lenta de oxígeno, una membrana semipermeable y una capa de mucosidad.

FIGURA 5: Representación esquemática del SHIME convencional.

25 FIGURA 6: Efecto de la presencia (+M) o ausencia (-M) de la capa de mucosidad sobre la viabilidad de células orales TR146 después de 55 horas de tratamiento en presencia o ausencia de bacterias orales.

Descripción detallada

30 El módulo de adherencia de la presente invención comprende 2 compartimentos separados por una membrana semipermeable, presentando dicha membrana una capa de mucosidad artificial aplicada en su lado luminal, y dicho módulo caracterizándose por tener condiciones anaeróbicas en su lado luminal y condiciones aeróbicas en su lado basal.

El término "módulo" o "módulo de adherencia" se refiere a un excipiente (p. ej., un recipiente o un contenedor) en el que se imitan las condiciones ambientales de una capa de mucosa.

35 La combinación de la capa de mucosidad y la membrana semipermeable, para dividir el módulo de adherencia en 2 compartimentos, en lo sucesivo también denominado la capa funcional. Dicha capa funcional puede ser una capa doble, triple o múltiple, pero consiste en al menos dos capas en las que la primera capa, es decir, la capa superior o la capa en contacto directo con el compartimento luminal, es la capa de mucosidad artificial y la segunda capa es la membrana semipermeable. El término "compartimento luminal" se refiere al compartimento que simula el lumen del tracto del hospedante. El término "compartimento basal" se refiere al compartimento en el extremo opuesto de la capa funcional en comparación con el compartimento luminal. El término "lado luminal de la capa de mucosidad" se refiere al lado de la capa de mucosidad en contacto con el lumen simulado del hospedante. El término "lado basal de la capa de mucosidad" o "lado basal de la capa funcional" se refiere al lado opuesto del lado luminal.

La capa funcional puede tener distintos objetivos que incluyen, pero no se limitan al transporte de fluido, sustancias y/o gases y al apoyo de los microorganismos.

Cuando la capa funcional consiste en una capa doble, una capa es la capa de mucosidad y la otra capa es una membrana semipermeable.

La capa de mucosidad siempre se encuentra en el lado luminal del módulo de adherencia. La membrana semipermeable siempre se encuentra en el lado basal de la capa de mucosidad. Cuando la capa funcional es una capa triple o múltiple, puede comprender una capa de mucosidad, una membrana semipermeable y una capa de apoyo, ya sea la membrana semipermeable o la capa porosa de apoyo pueden estar junto a la capa de mucosidad, preferiblemente la capa semipermeable está junto a la capa de mucosidad.

Por lo tanto, la capa funcional comprende una membrana semipermeable, que permite el transporte de oxígeno desde el compartimento basal hasta el compartimento luminal y el transporte de metabolitos microbianos de bajo peso molecular o los componentes alimenticios digeridos desde el compartimento luminal hasta el compartimento basal del módulo y viceversa. El suministro de oxígeno desde el lado basal hasta el lado luminal es crucial para establecer las condiciones microaerófilas imperantes en la interfaz entre la biopelícula y la capa de mucosidad.

Con "condición microaerófila" se hace referencia a la condición que se obtiene cuando la condición aeróbica en el compartimento basal del módulo deriva en una presión de oxígeno parcial, en el lado basal de la capa de mucosidad entre 1 y 150 mm Hg y preferiblemente entre 1 y 45 mm Hg, que está en consonancia con los valores característicos para la situación *in vivo*.

La vida común para la mayoría de las especies animales y plantas requiere la presencia de oxígeno. Con "condición aeróbica" se hace referencia a la condición necesaria para el crecimiento o metabolismo en el que dichos organismos reciben suficiente oxígeno. Por ejemplo, varios géneros de bacterias tienen diferentes necesidades de oxígeno. Algunos, como *Clostridium*, encuentran que el oxígeno es tóxico y generalmente no crecen en el aire. Otros pueden crecer solamente cuando el oxígeno está presente. Dependiendo de la relación con el oxígeno, las bacterias se pueden clasificar en los siguientes grupos en base a su crecimiento en los tubos de mezcla de glucosa (GST, por su sigla en inglés);

- AA = anaerobios estrictos: *Clostridium*, *Sarcina* y muchos géneros desde el rumen del ganado vacuno, intestinos y sitios similares. Los anaerobios estrictos solo crecen cuando no hay oxígeno. Algunos son más sensibles al oxígeno que otros. Algunas especies, especialmente las del rumen y de los intestinos, mueren rápidamente cuando se exponen al oxígeno. Muchas especies de *Clostridium* no se mueren por dicha exposición breve, pero no pueden crecer en el oxígeno. Algunas especies de *Clostridium* pueden crecer lentamente en presencia de aire. Ninguna especie de *Clostridium* puede producir esporas cuando el oxígeno libre (sin combinar) está presente;
- FA = anaerobios facultativos: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Proteus* crecen mejor en oxígeno, pero pueden crecer en ausencia de oxígeno robando oxígeno de los alimentos tales como nitratos, azúcares y otros "oxígenos honorarios". El resultado de esto es la producción de nitrito, ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido fórmico, etc.) y otras sustancias que a menudo tienen olor nauseabundo. Los tubos que contienen anaerobios facultativos presentan un crecimiento total cuando las bacterias se distribuyen de manera uniforme, pero suele haber un mayor crecimiento en la superficie del agar porque éstas crecen mejor en el aire;
- MA = microaerófilos: *Azospirillum*, *Aquaspirillum*, *Cytophaga* requieren oxígeno, pero crecen mejor bajo la superficie del agar, donde el oxígeno es reducido. Este tipo de bacterias es relativamente infrecuente en los laboratorios porque algunas no crecerán en GST ni en otros medios comunes. Es difícil encontrar una especie que crezca en una banda bien definida de un milímetro o similar por debajo de la superficie para producir una banda debajo de la superficie como se observa aquí. A menudo la banda está tan cerca de la superficie que se las puede confundir por especies aeróbicas; sin embargo, no crecen profusamente en la superficie del agar como las especies aeróbicas;
- A = aerobios estrictos: *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* crecen solamente en la superficie del agar donde consiguen mucho oxígeno. La mayoría producen un fuerte crecimiento por encima del agar que puede ser un líquido. Algunas bacterias producen babaza o cápsulas y estas producen un crecimiento profuso excepcional sobre el agar y pueden penetrar en el agar suavemente. Las células que contienen líquido pueden caer entre las paredes del tubo y el tapón del agar, pero no se debe confundir esto con crecimiento; e
- I = indiferente: *Lactobacilos*, algunos *estreptococos* y la mayoría de otros organismos en la leche crecen igual de bien en la superficie y en el agar porque son indiferentes al nivel de oxígeno. Tenga en cuenta que las bacterias crecen uniformemente sobre la superficie y en la parte inferior del tubo siempre que las células que estén distribuidas uniformemente. El crecimiento es similar al de los anaerobios facultativos excepto que los FA tienen un fuerte crecimiento de bacterias en la superficie. En la superficie, las bacterias indiferentes pueden tener un crecimiento de las células apenas perceptible. Los autores de la invención saben que pueden crecer en la superficie porque lo hacen cuando se propagan en una placa de petri. En

realidad, muchas de estas bacterias requieren vitaminas, aminoácidos, y otros factores de crecimiento y las colonias pueden ser diminutas incluso en los medios más adecuados para ellas.

5 Como tal, "condición anaeróbica" se refiere a la condición necesaria para el crecimiento o metabolismo de un organismo que no requiere oxígeno, tales como las bacterias AA antes mencionadas. En una realización particular de la presente invención las "condiciones anaeróbicas" corresponden a una concentración de oxígeno por debajo de 0,5 mg/L.

10 Con el término "membrana semipermeable" se hace referencia a una membrana que permite el transporte de componentes que oscilan entre 0 y 100.000 Da, en particular entre 1-10.000 Da, en particular entre 0 y 5.000 Da, incluso más en particular, entre 0 y 1.000 Da. Un ejemplo del material de membrana para la membrana semipermeable incluye, pero no se limita al policarbonato (PC), poli(cloruro de dialildimetilamonio) (PDDA), poliamida (PA) o tereftalato de polietileno. La función de la membrana semipermeable es distinguir entre los compuestos que pueden o no pueden transportarse a través de la membrana. Cuando la capa funcional consiste en una capa de mucosidad y una capa semipermeable solamente, entonces la capa semipermeable también puede apoyar la capa de mucosidad y opcionalmente una biopelícula.

15 Los ejemplos del material para la capa de apoyo incluyen, pero no se limitan a, poli(cloruro de dialildimetilamonio) (PDDA), poli(ácido acrílico) (PAA) o combinaciones de los mismos. Con el término "capa porosa de apoyo" se hace referencia a una capa que permite el transporte de cualquier tipo de compuesto, ya que su función es solamente de apoyo de, por ejemplo, la membrana semipermeable anterior y la capa de mucosidad y opcionalmente una biopelícula.

20 El término "mucina" se utiliza en la presente memoria para referirse a una proteína obtenida como resultado de la expresión de un gen de mucina. Los genes de mucina humanos incluyen, pero no se limitan a, *muc1*, *muc2*, *muc3*, *muc4*, *muc5*, *muc6*, *muc7*, *muc8* y *muc9* y sus subclases relativas tales como, pero no limitados a, *muc5B* y *muc5AC*. Dentro del sentido de este término, la mucina abarca todas las proteínas codificadas por un gen *muc*, sus mutantes, sus proteínas de empalme alternativas y sus proteínas glicosiladas. Además, tal como se usa en la presente, el término "mucina" incluye los análogos de mucina y los homólogos de mucina y los análogos de otros animales. Los ejemplos de homólogos y análogos de mucina incluyen, pero no se limitan a los dos tipos discretos de proteínas de mucina que existen en el intestino del ratón; Muc2 secretora y Muc3 ligado a la membrana, así como Muc1 de ratón en la vesícula biliar, o Muc2 en el pollo.

30 La capa de mucosidad artificial está determinada por 2 parámetros: el tipo de mucina y el espesor de la capa de mucosidad. Ambos parámetros pueden depender del sitio y del estado de ser del organismo a simular. La capa de mucosidad permite la adherencia de las células microbianas, la formación de agregados y las colonias y la posterior colonización de una biopelícula.

Los ejemplos de tipos de mucina incluyen, pero no se limitan a:

- las proteínas Muc2 gelatinosas y Muc1 no gelatinosas cuando se simula el intestino,
- 35 – seis productos diferentes del gen Muc en el cuello uterino cuando se simulan diferentes fases del ciclo menstrual en el cuello uterino,
- Muc5B y Muc7 secretadas y a las mucinas asociadas con la membrana, Muc1, Muc4 y Muc16 en la cavidad oral,
- 40 – las estructuras de la proteína Muc1 con cadenas laterales de carbohidratos diferentes dependiendo de la simulación del tracto respiratorio o intestinal.

El espesor de la capa de mucosidad puede variar entre 1 μm y 1.000 μm (Figura 2). Esta capa de mucosidad puede ser ligeramente adherente o firmemente adherente dependiendo del tipo de mucina (mucinas gelatinosas y no gelatinosas) y concentración de agua. Preferiblemente el espesor de la capa de mucosidad (Figura 2);

- 45 • está entre 178 y 200 μm , incluso más preferiblemente entre 75 y 85 μm para la capa de mucosidad firmemente adherente y entre 97 y 121 μm para la capa de mucosidad ligeramente adherente, al simular el corpus,
- está entre 233 y 315 μm , incluso más preferiblemente entre 138 y 170 μm para la capa de mucosidad firmemente adherente y entre 82 y 158 μm para la capa de mucosidad ligeramente adherente, al simular el antro,
- 50 • está entre 132 y 208 μm , incluso más preferiblemente entre 13 y 19 μm para la capa de mucosidad firmemente adherente y entre 115 y 193 μm para la capa de mucosidad ligeramente adherente, al simular el duodeno,

- está entre 119 y 127 μm , incluso más preferiblemente entre 13 y 17 μm para la capa de mucosidad firmemente adherente y entre 103 y 113 μm para la capa de mucosidad ligeramente adherente, al simular el yeyuno,
- 5 • está entre 433 y 527 μm , incluso más preferiblemente entre 24 y 34 μm para la capa de mucosidad firmemente adherente y entre 400 y 494 μm para la capa de mucosidad ligeramente adherente, al simular el íleon,
- está entre 720 y 940 μm , incluso más preferiblemente entre 65 y 167 μm para la capa de mucosidad firmemente adherente y entre 605 y 823 μm para la capa de mucosidad ligeramente adherente, al simular el colon,
- 10 • está entre 5 y 150 μm en el sistema respiratorio,
- está entre 150 y 470 μm en la cavidad oral, y
- está entre 100 y 250 μm en el tejido vaginal.

15 El grado de colonización se ve afectado por las fuerzas de corte de la suspensión intestinal a lo largo de la capa de mucosidad. Con el término "fuerza de corte" se hace referencia a: una tensión que se aplica de manera paralela o tangencial a una cara de un material, en contraposición a una tensión normal que se aplica de manera perpendicular. Las fuerzas de corte están influenciadas por los movimientos peristálticos y el tiempo de residencia hidráulico. Por ejemplo, el movimiento peristáltico alto en el intestino superior (duodeno, yeyuno) crea fuerzas de corte altas de 15 a 40 dinas/cm² así como un tiempo de residencia (1 a 4 h), que son demasiado cortos para que los microorganismos colonicen eficientemente la mucosa correspondiente. En cambio, el movimiento peristáltico en el íleon terminal es mucho menor así como las fuerzas de corte (por debajo de 10 dinas/cm²), creando así un tiempo de residencia (5 a 8 h) que permite que las bacterias colonicen el tracto eficientemente. Por último, en el colon las fuerzas de corte disminuyen a valores de 2,5 dinas/cm².

Preferiblemente, las fuerzas de corte y los tiempos de residencia son:

- 25 • de 15 a 20 dinas/cm² con un tiempo de residencia de 1 hora cuando se simula la parte superior del intestino delgado,
- de 8 a 12 dinas/cm² con un tiempo de residencia de 2 horas cuando se simula la parte inferior del intestino delgado,
- de 4 a 6 dinas/cm² con un tiempo de residencia de 10 horas cuando se simula la parte superior del colon,
- de 2 a 3 dinas/cm² con un tiempo de residencia de 24 horas cuando se simula la parte inferior del colon,
- 30 • de 0,5 a 3 dinas/cm² cuando se simula el tracto respiratorio en respiración en reposo (puede llegar a 1700 dinas/cm² con tos y broncoespasmo).

Al utilizar una configuración de celda de flujo, se pueden modificar el caudal y la velocidad del flujo y, por lo tanto, la fuerza de corte sobre la capa de mucosidad.

35 Como la superficie de esta capa de mucosidad puede estar bastante limitada (aprox. 100 cm²) cuando se presenta en una capa funcional, la suspensión intestinal se recicla varias veces para aumentar el tiempo de residencia a los valores relevantes para el compartimento intestinal de interés y aumentar la eficiencia en la absorción del módulo. El número de ciclos puede variar entre 1 y 100.

El compartimento basal del módulo puede comprender células viables.

40 Con el término "célula" se hace referencia a cualquier célula primaria o línea celular derivada de todo tipo de tejidos. La realización con células en el compartimento basal permite la interacción indirecta y continua entre la biopelícula en crecimiento y las células, con el intercambio de moléculas de señal.

Los ejemplos de una célula incluyen, pero no se limitan a, enterocitos, células endoteliales, células dendríticas, monocitos, macrófagos, células vaginales o epiteliales orales (queratinocitos) y/o linfocitos.

45 Preferiblemente, la célula primaria o la línea celular es un enterocito. Las células en el compartimento basal simulan el hospedante, tal y como, por ejemplo, el epitelio del tracto gastrointestinal del hospedante, por lo tanto, el compartimento basal puede incluir un ambiente artificial para estudiar las interacciones hospedante-microbiota. Un ejemplo de líneas celulares para la simulación del hospedante incluye, pero no se limita a, las líneas celulares Caco-2 o HT29.

- Las células diferentes se pueden mezclar y combinar en diferentes proporciones. Preferiblemente, la proporción de las células Caco-2 frente a las células HT29 es 1 a 3 (Nolleaux et al., 2006). Las células pueden crecer hasta formar una monocapa o agregados, en una suspensión o en perlas. Cuando las células crecen en monocapas, pueden crecer en la parte inferior de la cámara basal o en una membrana semipermeable o en una capa de apoyo.
- 5 Cuando las células crecen en una superficie o una perla, estas superficies o perlas se pueden recubrir con colágeno tipo I con el fin de mejorar la adherencia (Straubb et al., 2007). Cuando las células están presentes en una membrana semipermeable y/o en una capa porosa de apoyo, pueden formar una segunda capa independiente, que puede ser una capa funcional. Las células también pueden ser parte de la capa funcional que divide el módulo de adherencia en un compartimento luminal y basal. Las células pueden crecer con su lado apical hacia la capa funcional o lejos de la capa funcional. Preferiblemente, las células crecen con su lado apical hacia la capa funcional.
- 10 El lado apical de las células se puede cubrir con una malla protectora para proteger las células contra, por ejemplo, el flujo o la fuerza de corte.
- Para evitar fenómenos de citotoxicidad o para poder detectar ciertos elementos que incluyen, pero no se limitan a las moléculas de señal, se puede aplicar un flujo continuo o semicontinuo de medio nuevo en el compartimento basal dentro de un plazo pertinente. Con el término "semicontinuo" se hace referencia a que en momentos bien definidos y dentro de períodos de tiempo bien definidos, se eliminan las cantidades del medio celular y se reemplazan por el medio nuevo. El volumen total del medio que se debe reemplazar puede ser entre 0,5 y 50 mL.
- 15 La superficie de la capa de mucosidad en el módulo de adherencia con una cámara luminal y una cámara basal puede ser entre 1 y 1.000 cm² en particular entre 1 cm² y 100 cm².
- 20 En otra realización de la invención el módulo de adherencia comprende perlas, que tiene desde adentro hacia afuera, una perla de apoyo interna, una membrana semipermeable y una capa de mucosidad artificial (Figura 3). La patente de Estados Unidos US25186633 describe un reactor de biopelícula en el que las perlas de gel se utilizan en un reactor de biopelícula.
- Para tener concentraciones de oxígeno relevantes en la base de la biopelícula, las perlas utilizadas en la presente realización de la invención se caracterizan por un material de liberación lenta de oxígeno. En estas perlas se libera oxígeno en una cantidad como se describe anteriormente. En una realización de la invención, las perlas se forman a partir de una perla de apoyo interna que comprende componentes de oxígeno de liberación lenta de bioquímicos. La perla de apoyo interna también se puede cubrir con una capa intermedia que contiene componentes de oxígeno de liberación lenta de bioquímicos. El oxígeno se libera en una cantidad como se describe anteriormente.
- 25 La perla de apoyo interna que comprende los componentes de oxígeno de liberación lenta de bioquímicos o la capa intermedia que contiene los componentes de oxígeno de liberación lenta de bioquímicos, se cubre con una membrana semipermeable y una capa de mucosidad externa que comprende las mucinas como se describe anteriormente. La perla de apoyo interna que comprende los componentes de oxígeno de liberación lenta de bioquímicos o la capa intermedia liberadora de oxígeno, además se puede separar de la membrana semipermeable y de la capa de mucosidad externa por una capa de apoyo permeable al oxígeno.
- 30 En una realización alternativa de las perlas antes mencionadas, la perla de apoyo interna no está presente y el material de liberación lenta de oxígeno se encuentra en cambio dentro de una perla porosa.
- Cuando el módulo de adherencia de la invención comprende perlas, con el término "el lado luminal de dicho módulo" se hace referencia al ambiente interno del módulo de adherencia que se encuentra en contacto directo con la superficie exterior de la perla y con el término "el lado basal de dicha capa de mucosidad" se hace referencia al lado de la capa de mucosidad que se da internamente al centro de las perlas.
- 40 El radio de las perlas utilizadas en el reactor de biopelículas se encuentra entre 500 μm y 1 cm, más en particular, entre 500 y 5 mm. Por ejemplo, 1.000 perlas de un radio de 5 mm resultarían en una superficie específica de alrededor de 3.140 cm², que es más relevante para abordar valores de superficie amplios como se describe en la situación *in vivo*.
- 45 En el módulo de adherencia antes descrito, la superficie de la capa de mucosidad puede ser entre 1 cm² y 200 m². Uno o más microorganismos se pueden pegar a la capa de mucosidad y opcionalmente formar colonias o una biopelícula.
- Los términos "modelo *in vitro* de la invención" y "sistema *in vitro* de la invención" son intercambiables y se utilizan en la presente memoria para indicar un modelo y/o sistema que comprende un módulo de adherencia, tal y como se describe anteriormente.
- 50 El módulo de adherencia de la presente invención se puede incluir en un modelo gastrointestinal *in vitro*, un modelo del tracto reproductor femenino *in vitro*, un modelo del tracto respiratorio *in vitro*, un modelo de la mucosa oral *in vitro* o cualquier otro modelo que comprenda un epitelio blando cubierto por una capa de mucosidad
- 55 El módulo de adherencia de la presente invención se puede incluir, poner en paralelo o poner en serie con los diferentes compartimentos en diferentes modelos *in vitro*. Uno, dos o más módulos de adherencia se pueden

implementar en los diferentes modelos *in vitro*. Preferiblemente, un módulo de adherencia se pone en paralelo con uno de los compartimentos de un sistema *in vitro*.

5 Los ejemplos de los diferentes compartimentos que permiten la implementación del módulo de adherencia de la presente invención incluyen, pero no se limitan a modelos que simulan los compartimentos del tracto reproductor femenino, del epitelio blando de la boca o del tracto respiratorio.

Además, el módulo de adherencia de la presente invención se puede colocar en paralelo con o entre los diferentes compartimentos del SHIME - el Simulador del Ecosistema Microbiano Intestinal Humano. El módulo de adherencia continuo se puede implementar en, junto a o después del:

- compartimento del estómago,
- 10 • compartimento del intestino delgado,
- compartimento del colon ascendente,
- compartimento del colon transversal, o
- compartimento del colon descendente.

15 El SHIME además se puede desarrollar para simular mejor la *situación in vivo*. En la situación *in vivo*, el íleon terminal se considera el lugar donde se produce la colonización significativa de los microorganismos (>7 log UFC/g). Así, se puede realizar una extensión del SHIME donde se imitan por separado el duodeno, yeyuno e íleon. Una corrección gradual de pH con NaHCO₃, una secreción más precisa de las enzimas pancreáticas y sales biliares y un control de los tiempos de retención caracterizan a los procesos digestivos y las condiciones en el duodeno. Esta digestión enzimática del intestino delgado además se mantiene en el compartimento del yeyuno. La extensión del modelo SHIME radica en la incorporación de un componente microbiológico en el compartimento del íleon. Una comunidad microbiana crece aquí a través de la colonización inicial de reflujo desde el colon ascendente. Los tiempos de residencia más cortos, las concentraciones de enzimas y sal biliar más altas en el compartimento del íleon conducirán a una comunidad microbiana adaptada que representa tanto en composición como en actividad metabólica la del íleon terminal *in vivo*.

25 Así, el módulo de adherencia de la presente invención también se puede implementar en los diferentes compartimentos del SHIME extendido. El módulo de adherencia continuo se puede implementar en, junto a o después del:

- compartimento del duodeno,
- compartimento del yeyuno, o
- 30 • compartimento del íleon.

En otro aspecto, se describe un sistema *in vitro* que comprende el módulo de adherencia de la invención.

35 En otro aspecto, la invención además proporciona un método para determinar el efecto de un elemento en el módulo de adherencia o el sistema *in vitro*, comprendiendo dicho método: (a) introducir dicho elemento en dicho módulo o dicho sistema; y (b) determinar si se produce cualquier cambio en cualquier característica o función de interés de dicho módulo o dicho sistema en presencia de dicho elemento o después de la introducción de dicho elemento en dicho módulo o dicho sistema, en el que dicho cambio indica que dicho elemento tiene un efecto en el módulo o el sistema.

El término "cambio en cualquier característica o función de interés de dicho módulo" incluye, pero no se limita a una modulación del;

40 a) crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de microorganismos no patógenos o beneficiosos. Los ejemplos de microorganismos no patógenos o beneficiosos incluyen, pero no se limitan a, lactobacilos, bifidobacterias, bacterias que producen butirato y/o propionato,

b) crecimiento y/o actividad de uno o un número de microorganismos patógenos. Ejemplos de microorganismos patógenos incluyen, pero no se limitan a *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Clostridium perfringens* o *C. difficile*,

45 c) crecimiento y/o actividad de una o un número de células y líneas celulares derivadas de las mismas. Los ejemplos de los tipos de célula incluyen, pero no se limitan a enterocitos, células epiteliales, células endoteliales, células dendríticas, monocitos, macrófagos, células T y/o células B.

d) sujeción de microorganismos beneficiosos, no patógenos o patógenos a la mucosa de los sistemas antes mencionados,

5 e) absorción o liberación de las moléculas de señalización que incluyen, pero no se limitan a los antígenos, moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias, receptores, productos de microorganismos y/o células que simulan el hospedante. Los ejemplos de dichas moléculas de señalización incluyen, pero no se limitan a anticuerpos, hormonas, citoquinas, lipopolisacárido bacteriano, proglucagón, GLP-1, GLP-2 y/o FIAF,

f) regulación hacia arriba y hacia abajo de los genes en el nivel de ADN, ARN o proteínas por microorganismos y/o células que simulan el hospedante,

10 g) producción de metabolitos bacterianos específicos tales como pero que no se limitan a propionato y/o butirato, y/o

h) adaptación recíproca de los tipos de células que simulan el hospedante y/o los microorganismos.

El término "modulación" incluye, pero no se limita a, un aumento, un estímulo, una disminución, una inhibición o una reducción.

15 El término "señalización molecular" incluye, pero no se limita a, cualquier característica, función descrita en (e), (f) y (g) anteriormente.

El término "adaptación" incluye, pero no se limita a, cualquier cambio en cualquier característica/función de interés descrita en (a) a (g) que se produce en una célula, línea celular y/o microorganismo en respuesta a un cambio en cualquier característica o función de interés descrita en (a) a (g) que se produce en cualquier otra célula, línea celular y/o microorganismo.

20 El término "respuesta celular del hospedante" incluye, pero no se limita a cualquier cambio en cualquier característica/función de interés descrita en (a) a (g) que se produce en una célula en la cámara basal del módulo.

Un elemento como se describe anteriormente o a continuación se selecciona del grupo que consiste en:

(a) un microorganismo;

(b) un sustrato;

25 (c) una sustancia química;

(d) una célula; y

(e) cualquier combinación de (a) a (d).

30 Un ejemplo de un microorganismo incluye, pero no se limita a un virus, una bacteria (probiótica, comensal o patógena), una levadura o un hongo. Un ejemplo de un sustrato incluye, pero no se limita a un producto alimenticio, un prebiótico, un simbiótico o una fibra dietética. Un ejemplo de una sustancia química incluye, pero no se limita a una pequeña molécula (p. ej., un antibiótico), un péptido, una hormona, una citoquina, un producto proinflamatorio y antiinflamatorio, un producto bacteriano o metabolito o un constituyente vírico. Un ejemplo de una célula incluye, pero no se limita a un enterocito, una célula epitelial, una célula endotelial, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago y/o un linfocito.

35 Otro aspecto proporciona el uso del módulo de la invención o el sistema de la invención para el estudio y la modulación de la señalización molecular y la adaptación entre el hospedante simulado y el microorganismo opcionalmente después de la incorporación de un elemento.

Otro aspecto proporciona el uso del módulo de la invención o el sistema de la invención para el estudio del efecto de un elemento en la flora, en particular en la adherencia de la flora.

40 Otro aspecto proporciona el uso del módulo de la invención o el sistema de la invención para el estudio de la composición, actividad y adherencia de la flora en diferentes condiciones ambientales.

Otro aspecto proporciona el uso del módulo de la invención o el sistema de la invención para el control y la modulación de la fisiología, actividad metabólica o características probióticas o patógenas de la flora.

45 Otro aspecto proporciona un método que comprende el cultivo de microorganismos en el módulo o sistema antes mencionado y el control o ajuste de las condiciones de cultivo en relación con el elemento o aspecto funcional y su

efecto en la flora, en particular en la adherencia de la flora.

Otro aspecto proporciona un método que comprende el cultivo de microorganismos y células en el módulo o sistema antes mencionado y permite la adaptación para estudiar el efecto recíproco, en particular la adherencia de la flora, y/o la respuesta celular detectable mediante la producción de un péptido, una hormona, una citoquina y/o un producto proinflamatorio o antiinflamatorio.

Así, el módulo de adherencia de la invención cuando se implementa en, por ejemplo, el SHIME o el SHIME extendido se puede utilizar para estudiar los efectos de diferentes factores sobre la composición, actividades metabólicas y adherencia de la flora gastrointestinal y las células hospedantes. Se puede utilizar para estudiar las poblaciones bacterianas mixtas del intestino grueso. Puede proporcionar una referencia reproducible para estudiar la ecología del ecosistema intestinal, particularmente los cambios inducidos en la adherencia después de la perturbación de la flora por dietas, fármacos y una gran variedad de productos y sustancias químicas y los efectos respectivos en cuanto a la respuesta celular del hospedante. Este módulo de adherencia de la invención cuando se implementa en el SHIME o en el SHIME extendido se puede utilizar para el desarrollo y prueba de alimentos probióticos, prebióticos o simbióticos y sus efectos en la microflora gastrointestinal, en particular sus efectos en la adherencia y en la respectiva respuesta celular del hospedante. También se puede utilizar para evaluar la flora intestinal muestreada de un animal enfermo (p. ej., un mamífero [p. ej., un humano]) o flora desequilibrada.

Así, se puede utilizar el módulo de adherencia de la invención cuando se implementa en el SHIME o el SHIME extendido para mantener una población microbiana que puede servir como inóculo para experimentos de cultivo por lotes de poco tiempo para evaluar, por ejemplo, las características de la adherencia, la cinética del crecimiento o la producción de toxinas de muestras microbianas y para evaluar la respuesta celular del hospedante al retar las células *in vitro* con comunidades microbianas mixtas.

Otro aspecto proporciona el uso del módulo de la invención o el sistema de la invención para el estudio del efecto de un elemento en el módulo o el sistema, en particular para evaluar el efecto de diferentes tratamientos que se podrían utilizar para modular la adherencia de su flora, o la respuesta celular del hospedante, y eventualmente tratar al paciente.

Otro aspecto proporciona el uso del módulo de la invención o el sistema de la invención para el estudio y el tratamiento de trastornos relacionados con una barrera de mucosa deteriorada, en particular con una adherencia de mucosa deteriorada.

Otro aspecto proporciona un método que comprende el cultivo de microorganismos en el módulo o sistema antes mencionado y el control o ajuste de las condiciones de cultivo en relación con el elemento o aspecto funcional y su efecto en el módulo o el sistema, en particular con respecto a la adherencia de su flora y la respuesta celular del hospedante y su efecto en el módulo o el sistema.

Otro aspecto proporciona un método que comprende el cultivo de microorganismos en el módulo o sistema antes mencionado para evaluar el efecto de diferentes tratamientos que se podrían utilizar para modular una barrera de mucosa deteriorada, en particular con una adherencia de mucosa deteriorada y eventualmente tratar al paciente.

El término "que trata" o "tratamiento" tal como se usa en la presente memoria cubre cualquier tratamiento de una enfermedad y/o afección en un animal, especialmente un ser humano, e incluye: (i) prevenir una enfermedad y/o afección que ocurre en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad y/o afección, pero aún no se le ha diagnosticado que la tiene; (ii) inhibir la enfermedad y/o afección, es decir, detener su evolución; (iii) aliviar la enfermedad y/o afección, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o afección.

La invasión realizada por los antígenos que causan reacciones alérgicas se asocia con una barrera de la mucosa deteriorada. Dichos alérgenos pueden comprender ciertas sustancias alimenticias, productos químicos y otras moléculas. Así, en otra realización, la presente invención proporciona el uso del sistema o módulo de adherencia de la invención en el estudio y el tratamiento de afecciones asociadas con la invasión de antígenos que provocan reacciones alérgicas (p. ej., alergias alimenticias, asma, eczema).

El sistema o módulo de adherencia de la invención se puede utilizar para evaluar la sujeción de la mucosa y la invasión de los patógenos, tales como ciertas especies de *Clostridium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Pseudomonas*, así como levaduras tales como *Candida albicans* y la respuesta celular del hospedante consecuente. Así, en otra realización, la presente invención proporciona el uso del sistema o módulo de adherencia de la presente invención en el estudio y tratamiento de afecciones asociadas con la adherencia de mucosa y la invasión de patógenos (p. ej., infecciones vaginales, oculares, auditivas y de las vías respiratorias, diarrea adquirida y diarrea del turista).

La microbiota intestinal afecta la homeostasis energética y metabólica del hospedante, es decir, el control de la ingesta alimentaria y energética, el metabolismo de los alimentos y energético, el desarrollo de la masa grasa y los trastornos metabólicos asociados, tales como obesidad y diabetes tipo 2 (Cani y Delzenne, 2007). Por lo tanto, una realización adicional de la presente invención proporciona el uso del sistema o modelo de adherencia de la invención para el estudio y tratamiento de los trastornos metabólicos.

- También la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) se asocia con una barrera de la mucosa gastrointestinal deteriorada. Generalmente, se acepta que en la EII, la lesión de la mucosa gastrointestinal con una resolución deteriorada de las lesiones es uno de los elementos clave que conducen a esta indicación crónica. La EII también conocida como "enfermedades crónicas del colon", tal como se usa en la presente incluyen cualquier afección
- 5 caracterizada por lesiones de la mucosa persistentes en diferentes niveles del tracto gastrointestinal, y la reacción excesiva consiguiente del hospedante, tal como, por ejemplo, el síndrome del intestino irritable, mucositis, úlceras gástricas, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, cáncer colorrectal y pouchitis. Por consiguiente, es otra realización de la presente invención proporcionar el uso del modelo de adherencia del sistema de la invención para el estudio y el tratamiento de enfermedades crónicas del colon.
- 10 Otro aspecto proporciona un sistema que comprende 3 compartimentos: un lado luminal con la comunidad microbiana, un compartimento basal con las líneas de células hospedantes y, a continuación de este último, un tercer compartimento que simula el flujo de sangre. Este módulo se puede utilizar para investigar la tasa de absorción de p. ej. compuestos activos, siguiendo el metabolismo microbiano y la difusión a través de la capa de mucosidad y la superficie intestinal simulada.
- 15 Si bien se describen varias realizaciones de la invención en la presente memoria, se pueden realizar muchas adaptaciones y modificaciones dentro del alcance de la invención según el conocimiento general común de los expertos en esta técnica. Dichas modificaciones incluyen la sustitución de equivalentes conocidos para cualquier aspecto de la invención con el fin de lograr el mismo resultado en substancialmente la misma forma. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. En las reivindicaciones y la descripción, los términos "que comprende" y cada ejemplo dado se utilizan como un término indefinido, sustancialmente equivalente a la frase "que incluye, pero no se limita a".
- 20

Los siguientes ejemplos ilustran diferentes aspectos de la invención y no limitan los aspectos generales de la invención como se describe en la presente memoria.

Parte experimental

25 1. Configuración del modelo del TGI

El módulo más básico de adherencia según la presente invención consiste en una cámara luminal (compartimento superior) que contiene el medio de cultivo y la/las cepa/cepas bacteriana/bacterianas inoculada/inoculadas y una cámara basal (compartimento inferior) en que la presión de oxígeno se puede regular y del que se permite que se difunda el oxígeno a través de una capa de separación en la cámara luminal. La capa de separación es una

30 membrana semipermeable, que permite la difusión de oxígeno y las moléculas señal y que en su lado luminal se cubre con una capa de mucosidad artificial, relevante para la región específica del tracto gastrointestinal. Dicha capa de mucosidad es una capa de mucina-agar de cierto espesor, vertida sobre la parte superior de la membrana utilizando un Aplicador automático de biopelículas (Elcometer 4340).

2. Resistencia de la mucosidad a una tensión de corte

35 En una primera prueba del modelo del TGI según la invención, se evaluó la capacidad de la capa de mucosidad para adherir firmemente a la membrana y ofrecer resistencia a la eliminación mecánica mediante una tensión de corte. Se probaron tres tipos de material de membrana: policarbonato hidrofílico, poliamida y policaprolactona. El último se descartó inmediatamente porque era muy complejo de manejar durante los procedimientos posteriores. Se vertió una capa de mucina-agar de 200 μm en la parte superior de la membrana utilizando un Aplicador automático de biopelículas (Elcometer 4340). Se agregó FITC-dextrano (4 kDa) a la capa de mucosidad para su posterior análisis de la integridad de la mucosidad por medio de Microscopía óptica confocal (LSCM, por su sigla en inglés). La capa

40 doble funcional así formada a continuación se incorporó en el módulo de adherencia y se aplicaron dos tensiones de corte diferentes (es decir, 10 y 20 dinas/cm²) durante un período de 5 horas (T5). El análisis mediante LSCM de la capa de mucosidad en una sección vertical y la comparación de T0 con T5 condujo a las siguientes conclusiones: el 95 % de la capa de mucosidad original estaba todavía presente después de 5 horas en tensión de corte media (10 dinas/cm²) y 45 % en tensión de corte elevada (20 dinas/cm²) para el policarbonato hidrofílico y la poliamida.

45

3. Permeación de los compuestos a través de la capa doble funcional

La segunda prueba se realizó para evaluar la permeación a través de la capa doble funcional (membrana y capa de mucosidad artificial) de diferentes compuestos, simulando posibles metabolitos (de origen procarriótico o eucariótico)

50 de diferentes dimensiones y radio molecular. Se utilizaron como compuestos modelo FITC-dextranos- conjugados de 4 kDa, 20 kDa y 150 kDa. Se creó una curva estándar en base a la concentración molar para cada compuesto. Se evaluó la permeabilidad utilizando una capa doble funcional con una membrana de poliamida (tamaño del poro: 0,5 μm) y una membrana de policarbonato (tamaño del poro: 0,4 μm). La tabla 2 ofrece los resultados para los diferentes compuestos en el módulo de adherencia con ambos tipos de membrana con y sin una capa de mucosidad

55 de 200 μm .

Se calculó el coeficiente de permeabilidad según la siguiente fórmula

$$P_c = \frac{(C_{u4} - C_{u0,5})V^*}{AtC_0}$$

donde $C_{u0,5}$ y C_{u4} son las concentraciones de FITC-dextrano- conjugado en la cámara inferior en 0,5 y 4 horas, respectivamente, V^* es el volumen de la cámara, A es la superficie de la membrana expuesta, C_0 es la concentración inicial en la cámara superior y t es la duración del flujo de estado estable (3,5 horas).

Tabla 2: Permeación de compuestos a través de la capa doble funcional. Los datos (coeficiente de permeabilidad) se expresan en cm/seg. NE = no evaluado

FITC-dextrano	Membrana de poliamida		Membrana de policarbonato	
	Sin mucosidad	Mucosidad	Sin mucosidad	Mucosidad
4 kDa	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$3,55 \cdot 10^{-6}$	$6,64 \cdot 10^{-5}$	$3,96 \cdot 10^{-5}$
20 kDa	NE	NE	$3,08 \cdot 10^{-5}$	$2,55 \cdot 10^{-5}$
150 kDa	$4,05 \cdot 10^{-6}$	$4,46 \cdot 10^{-5}$	$2,53 \cdot 10^{-5}$	$4,91 \cdot 10^{-6}$

4. Establecimiento de condiciones microaerófilas en la capa doble funcional

El módulo de adherencia se construyó con una capa doble funcional separando la cámara superior completamente anaeróbica (95 % de N_2 -5 % de CO_2) de la cámara inferior aeróbica (95 % de O_2 -5 % de CO_2). Se midió la concentración de oxígeno en la cámara superior por medio de una sonda luminiscente de oxígeno LDO de Hach Lange. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente con una capa de mucosidad de 200 μm de espesor utilizando un policarbonato o una membrana de poliamida. Los datos del aumento de la concentración de oxígeno en la cámara superior, recopilados en los primeros 30 minutos, se utilizaron para calcular la permeabilidad relativa (P_{mO_2}). P_{mO_2} para la membrana de policarbonato resultó ser $4,9 \cdot 10^{-4}$ cm/seg con un coeficiente de difusión relativa (D_{O_2}) de $9,8 \cdot 10^{-6}$ cm²/seg; y para la poliamida, $P_{mO_2} = 2,5 \cdot 10^{-4}$ cm/seg, $D_{O_2} = 5,0 \cdot 10^{-6}$ cm²/seg.

5. Potencial de adherencia de cultivos bacterianos puros vs comunidades microbianas mixtas

Un primer objetivo de trabajar con el módulo de adherencia *in vitro* es explorar el potencial de adherencia de cultivos puros de microorganismos intestinales vs comunidades microbianas mixtas en una capa cubierta de mucosidad. Un cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* GG se cultivó en un medio relevante y se inoculó en la cámara luminal del módulo de adherencia. La cámara luminal de un segundo sistema se inoculó con una comunidad microbiana adaptada *in vitro* originada en el colon ascendente de un reactor de Simulador del ecosistema microbiano intestinal humano (SHIME). El módulo de adherencia consistía en una cámara luminal que contiene el medio de crecimiento y la cepa bacteriana inoculada y una cámara basal de la que se podría difundir oxígeno a través de una membrana de policarbonato semipermeable, que se cubrió en su lado luminal con una capa de mucina, relevante para la región específica del tracto gastrointestinal. El tiempo de contacto entre las bacterias inoculadas y la capa funcional se estableció en 1,5 h. A continuación, se eliminó la suspensión luminal y se eliminaron las bacterias no adheridas de la capa de mucosidad al enjuagar la capa funcional dos veces con PBS. Posteriormente, el lado luminal de la capa funcional se enjuagó con Triton X-100 para eliminar las bacterias adheridas. La suspensión obtenida se analizó en cuanto a concentración microbiana utilizando recuentos por placa específicos para diferentes grupos bacterianos. Los *Lactobacillus rhamnosus* GG se adhirieron fuertemente a la capa de mucina-agar, siendo la adherencia porcentual ($15,7 \pm 3,2$ %) un factor 6,19 superior respecto del de adherencia al agar libre de mucina. Con respecto a la compleja comunidad microbiana del reactor SHIME, la adherencia difirió sustancialmente entre las bacterias y disminuyó de lactobacilos totales ($27,0 \pm 4,1$ %) sobre coliformes fecales ($18,3 \pm 3,6$ %), bifidobacterias totales ($12,9 \pm 1,5$ %) y clostridios totales ($1,8 \pm 0,3$ %) a anaerobios totales ($0,6 \pm 0,1$ %). Si bien no se hizo un análisis adicional en ese momento, también se pueden obtener muestras del medio y las células opcionalmente presentes de la cámara basal y se puede llevar a cabo diversos análisis para estimar la respuesta celular simulada del hospedante.

6. Supervivencia de la línea celular

Se formó un módulo de adherencia con dos cámaras separadas por una membrana semipermeable (es decir, policarbonato, tamaño de poro: 0,4 μm) en el que se vertió la capa de mucosidad. Se inoculó el compartimento superior con una comunidad bacteriana del colon ascendente de un simulador dinámico *in vitro* del tracto gastrointestinal. En el compartimento inferior se permitió que creciera una monocapa pura de células Caco-2. El módulo permitió la interacción indirecta y continua entre la biopelícula en crecimiento y la monocapa de enterocitos. La membrana semipermeable entre las dos cámaras permitió el intercambio de moléculas de señalización entre la biopelícula y las células epiteliales, así como la difusión de O_2 hacia la parte inferior de la biopelícula microbiana.

En una segunda configuración, se permitió el contacto directo entre la comunidad microbiana derivada del TGI y la línea celular. Se comparó la viabilidad celular entre ambas configuraciones por medio de la prueba colorimétrica de MTT ((bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) después de 48 h de incubación para la primera configuración y después de 2 h en la segunda configuración. Para evaluar posibles fenómenos de citotoxicidad en la cámara de enterocitos, se han evaluado diferentes configuraciones (por triplicado): a) incorporación de una suspensión bacteriana no diluida; b) aplicación de una suspensión bacteriana diluida 1:4. Estas dos condiciones en combinación con: 1) flujo semi-continuo del medio nuevo cada 24 h; 2) flujo semi-continuo del medio nuevo cada 5 h. Como control negativo se volvió a hacer circular una suspensión esterilizada con filtro del inóculo bacteriano en el compartimento superior.

Como se muestra en la figura 1, en las condiciones de prueba la viabilidad celular después de 48 h de incubación no fue significativamente diferente del control, mientras que, por contacto directo, la viabilidad disminuyó considerablemente ya después de 2 h. También se evaluó la morfología de las células por microscopía de contraste de fase comparando el control con las células tratadas después de 48 h de incubación, sin embargo, no hubo diferencias entre los controles y las células tratadas (no se muestran los datos).

7. Potencial de adherencia de comunidades microbianas mixtas en respuesta a un tratamiento prebiótico a corto plazo

Un segundo objetivo de trabajar con el módulo de adherencia *in vitro* es explorar el potencial de adherencia de cultivos microbianos seleccionados en presencia de una compleja comunidad microbiana para el íleon terminal y colon respectivamente y evaluar la respuesta celular del hospedante hacia esta comunidad. Para ello, se obtuvieron muestras de y se inoculó una suspensión del compartimento del colon ascendente de un sistema SHIME en el compartimento luminal del módulo de adherencia en presencia de inulina con un grado de polimerización entre 2 y 20 y arabinosilanos (AX) con un grado de sustitución de 0,7 y un grado muy variable de polimerización (en promedio 200). Se evaluó el efecto a corto plazo de estos alimentos funcionales. AX disminuyó la capacidad de adherencia de todos los grupos investigados, mientras que la inulina tuvo menos influencia o ninguna influencia (no se muestran los datos).

8. Medir la biodisponibilidad de metabolitos procarióticos y eucarióticos

La configuración experimental del módulo de adherencia que incorpora una membrana semipermeable además de la capa de mucosidad permite no solo la difusión de oxígeno desde el lado basal hasta el lado luminal, sino también el transporte de compuestos específicos de interés desde el lado luminal hasta el lado basal. En principio, medir estos compuestos de interés en la suspensión basal daría una estimación de la biodisponibilidad de esos compuestos. En este estudio, los autores de la invención caracterizan los metabolitos procarióticos y eucarióticos en la suspensión serosa por medio de la técnica GC-MS 24 h después de la inoculación del dispositivo con una suspensión bacteriana que se origina en el colon ascendente de un sistema SHIME (lado luminal) y con células Caco-2 (cámara inferior). La presencia y la ausencia de bacterias en el compartimento luminal indujeron un perfil metabólico claramente diferente en el compartimento seroso (no se muestran los datos).

9. Evaluación *in vitro* durante un período más largo de los compuestos prebióticos en la comunidad microbiana asociada con la pared intestinal humana

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de compuestos prebióticos conocidos (inulina y arabinosilano-AX) en la microbiota asociada con la pared intestinal en diferentes áreas del tracto gastrointestinal y en condiciones representativas a largo plazo. Para ello, se utilizó el módulo de adherencia junto con un modelo gastrointestinal debidamente validado: el Simulador del ecosistema microbiano intestinal humano (SHIME). Claramente, la potencia de adherencia inherente, la tasa de crecimiento específico, el estado de la capa de mucosidad y la interacción con microorganismos endógenos (adheridos o en suspensión) determinaron la potencia microbiana para colonizar el epitelio intestinal.

9.1 El SHIME

La configuración del reactor se adapta desde el sistema, representando el tracto gastrointestinal del humano adulto, tal como lo describe Molly et al. (1993). El SHIME consiste en una sucesión de cinco reactores que simulan las diferentes partes del tracto gastrointestinal humano. Los dos primeros reactores son del principio de llenado y

drenaje para simular diferentes etapas en la absorción y la digestión de alimentos, con bombas peristálticas que agregan una cantidad definida de alimentación SHIME (140 mL 3x/día) y líquido pancreático y bilis 60 mL (3x/día), respectivamente al compartimento del estómago (V1) y duodeno (V2) y que vacían los respectivos reactores después de los intervalos especificados. Los últimos tres compartimentos son reactores que se revuelven continuamente con volumen constante y control de pH. El tiempo de retención y el pH de los diferentes recipientes se eligen con el fin de parecerse a las condiciones *in vivo* en las diferentes partes del tracto gastrointestinal. El tiempo total de residencia de los últimos tres recipientes, simulando el intestino grueso, es 76 h. Tras la inoculación con microbiota fecal, estos reactores simulan el colon ascendente (V3), transversal (V4) y descendente (V5). Possemiers et al (2004) describieron previamente la preparación del inóculo, el tiempo de retención, el pH, los ajustes de temperatura y la composición de alimentación del reactor. En el TWINSHIME, se ejecutan en paralelo dos sistemas con idénticas condiciones ambientales (pH y control de la temperatura idénticos). Las capacidades investigativas del SHIME luego se expanden con la conexión de dos módulos de adherencia de biopelículas en paralelo a cada compartimento del intestino delgado. Por último, se agregan 21 perlas liberadoras de oxígeno, cubiertas con una capa de mucosidad a cada uno de los compartimentos del colon.

9.2. Diseño del experimento para el SHIME:

Período de estabilización: Los compartimentos del colon de los reactores SHIME primero se inoculan con una comunidad microbiana fecal aislada de un voluntario sano seleccionado. El reactor SHIME funciona en condiciones nominales para estabilizar la comunidad microbiana y para dejar que adapte su actividad metabólica y composición de comunidad a las condiciones imperantes en los compartimentos respectivos del colon. Este período de estabilización dura 3 semanas.

Período basal: Durante el período basal, el reactor SHIME funciona en condiciones nominales. Los parámetros tales como la producción de ácido graso de cadena corta (AGCC) y la producción de amonio se determinan 3 veces/semana y los análisis de recuento por placa se realizan una vez por semana para grupos bacterianos seleccionados ((an)aerobios totales, clostridios totales, lactobacilos, bifidobacterias, coliformes totales, estafilococos). Los resultados de estos análisis sirven como valores de fondo que se utilizarán para comparar los parámetros medidos del período de tratamiento. Los módulos de adherencia se conectan a los recipientes del intestino delgado y se agregan las perlas en los recipientes del colon. El período basal dura 2 semanas.

Período de tratamiento: Durante el período de tratamiento, el reactor SHIME funciona en condiciones nominales, pero con una dieta modificada que contiene una menor cantidad de almidón en el medio en comparación con la del período basal y se evalúa el efecto de un compuesto específico (inulina o arabinosilano - 2,5 g/L). La producción de AGCC y amonio se determina 3 veces/semana y se realiza el análisis del recuento por placa una vez por semana. Por lo general, este período de tratamiento dura 3 semanas.

Período de lavado: Durante el período de lavado, el reactor SHIME funciona en condiciones nominales, con la dieta inicial. La producción de SCFA y amonio se determina 3 veces/semana y se realiza el análisis del recuento por placa una vez por semana. El análisis de estos parámetros microbianos permite evaluar si los posibles cambios del período de tratamiento se normalizan nuevamente para llegar a los niveles del período basal.

9.3 Resultados sobre la formación de biopelículas:

Cada módulo de adherencia se conectó en paralelo con los reactores del colon ascendente y se sustituyó por uno nuevo cada 24 h (exposición máxima por membrana = 48 h). Se permitió que el contenido del colon ascendente circule en la capa funcional con un caudal de 10 mL/min. Se evaluó el efecto de los productos evaluados por medio del llamado Índice prebiótico relacionado con la adherencia (AR-PI, por su sigla en inglés) para la comunidad microbiana adherida a la mucina. Los recuentos en placa (realizados antes y después del tratamiento) sobre los medios específicos para los lactobacilos, bifidobacterias, clostridios, coliformes fecales y anaerobios totales indicaron que la inulina y AX (arabinosilano) ejercieron un efecto prebiótico sobre la microbiota adherida a la mucina del SHIME (AR-PI de 14 y 70, respectivamente). AX fue particularmente potente para estimular los lactobacilos adheridos. La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE, por su sigla en inglés) específica para las bifidobacterias demostró que diferentes especies dominaban este grupo microbiano en la fracción luminal o adherida. En general, el efecto de AX sobre las bacterias luminales y las bacterias asociadas con la mucina fue más fuerte y más permanente en comparación con el de la inulina.

10. Formación de biopelículas en el modelo de la mucosa oral

Se formó un módulo de adherencia con dos cámaras separadas por una membrana semipermeable (es decir, policarbonato, tamaño de poro: 0,4 µm) y sobre la parte superior se vertió la capa de mucosidad y se permitió que creciera la biopelícula oral. Se inoculó el compartimento superior con una suspensión bacteriana obtenida de un exudado bucal de la mejilla interna. En el compartimento inferior se permitió que creciera una monocapa de células TR146 epiteliales orales. El módulo permitió la interacción indirecta y continua entre el la biopelícula en crecimiento y la monocapa epitelial. La membrana semipermeable entre las dos cámaras permitió el intercambio de moléculas de señalización entre la biopelícula y las células epiteliales, así como la difusión de O₂ hacia la parte inferior de la

biopelícula microbiana. Se evaluó la viabilidad de la monocapa de TR146 en presencia o ausencia de la biopelícula oral por medio de la prueba colorimétrica de MTT ((bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). La figura 6 muestra que la presencia de la capa de mucina es crítica para la supervivencia a largo plazo (55 horas de tratamiento) del epitelio oral en presencia de la biopelícula oral.

5 Referencias

- Atuma C., Strugala V., Allen A., y Holm L. (2001) *The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280: G922-G929
- Cani P. y Delzenne N. (2007) *Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis*. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab.* 10(6): 729-734
- 10 Cheesman y Guillemin (2007) *We know you are in there: conversing with the indigenous gut microbiota*. *Res. Microb.* 158: 2-9
- Costerton J.W. (1995) *Overview of microbial biofilms*. *J. Ind. Microbiology and Biotechnology* 15: 137-140
- Hooper y Gordon (2001) *Commensal Host-Bacterial Relationship in the Gut*. *Science* 292: 1115-1118
- 15 Hori Y, Nishida K, Yamato M, Sugiyama H, Soma T, Inoue T, Maeda N, Okano T, Tano Y. (2008) *Differential expression of MUC16 in human oral mucosal epithelium and cultivated epithelial sheets*. *Exp Eye Res.* Sep 87(3): 191-6.
- Hori Y., H. Sugiyama, T. Soma y K. Nishida (2007) *Expression of membrane-associated mucins in cultivated human oral mucosal epithelial cells*. *Cornea* 26: S65-S69
- 20 Huycke y Moore (2002) *In vivo production of hydroxyl radical by enterococcus faecalis colonizing the intestinal tract using aromatic hydroxylation*. *Free Radicals in Biology and Medicine* 33: 818-826.
- Kolenbrander, P. E., R. N. Andersen, K. M. Kazmerzak, y J. R. J. Palmer. (2000) *Coaggregation and coadhesion in oral biofilms*, p. 65-85. En D. G. Allison, P. Gilbert, H. M. Lappin-Scott, y M. Wilson (ed.), *Community structure and cooperation in biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- 25 Laube, B., Winkler, S., Ladstetter, B., Scheller, T., y Schwarz, L.R. (2000). *Establishment of a novel in vitro system for studying the interaction of xenobiotic metabolism of liver and intestinal microflora*. *Arch Toxicol* 74, 379-387.
- Lebeer, S., De Keersmaecker, S.C.J., Verhoeven, T.L.A., Fadda, A.A., Marchal, K., y Vanderleyden, J. (2007) *Functional analysis of luxS in the probiotic strain Lactobacillus rhamnosus GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation*. *J Bact.* 189: 860-871.
- 30 Lindén, S.K., Driessen, K.M., y McGuckin, M.A. (2007) *Improved in vitro model systems for gastrointestinal infection by choice of cell line, pH, microaerobic conditions, and optimization of culture conditions*. *Helicobacter.* 12: 341-53.
- Liu B., J.R. Lague, D.P. Nunes, P. Toselli, F.G. Oppenheim, R.V. Soares, R.F. Troxler y G.D. Offner (2002) *Expression of membrane-associated mucins MUC1 and MUC4 in major human salivary glands*. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 811-820.
- Macfarlane y Dillon, (2007) *Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract*. *J Appl Microbiol.* 102: 1187-1196
- 35 Macfarlane y Macfarlane (2007) *Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut*. *Curr Opin Biotechnol.* 18: 156-162
- Macfarlane S, Woodsmansley E y Macfarlane G. (2005) *Colonization of mucin by human intestinal bacteria and establishment of biofilm communities in a two-stage continuous culture system*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7483-7492
- 40 Mäkivuokko HA, Saarinen MT, Ouwehand AC, Rautonen NE. (2006) *Effects of lactose on colon microbial community structure and function in a four-stage semicontinuous culture system*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (9): 2056-63

- 5 Minekus M., Smeets-Peeters M., Bernalier A., Marol-Bonnin S., Havenaar R., Marteau P., Alric M., Fonty G. y Huis in't Veld J.H.J. (1999) *computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. Appl. Microb. Biotech.* 53: 108-114
- 5 Molly K., Woestyne M.V. y Verstraete W. (1993) *Development of A 5-Step Multichamber Reactor As A Simulation of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. Applied Microbiology and Biotechnology* 39, 254-258
- Nielsen P.A., E.P. Bennett, H.H. Wandall, M.H. Therkildsen, J. Hannibal y H. Clausen (1997) *Identification of a major human high molecular weight salivary mucin (MG1) as tracheobronchial mucin MUC5B. Glycobiology* 7: 413-419.
- 10 Nollevaux G., Devillé C, El Moualij B., Zorzi W., Deloyer P., Schneider Y., Peulen O. y Dandrifosse G. (2006) *Development of a serum-free co-culture of human intestinal epithelium cell-lines (Caco-2/HT29-5M21). BMC Cell Biol.* 7:20
- Parlesak A., Haller D., Brinz S., Baeuerlein A., Bode C. (2004) *Modulation of Cytokine Release by Differentiated CACO-2 Cells in a Compartmentalized Coculture Model with Mononuclear Leucocytes and Nonpathogenic Bacteria. Scandinavian Journal of Immunology* 60, 477-485
- 15 Pedersen y Tannock (1989) *Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli. Appl Environ Microbiol.* 55(2): 279-283
- Possemiers S., Verthe K., Uyttendaele S., Verstraete W. (2004) *PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. FEMS Microbiology Ecology*, 49: 495-507
- 20 Probert y Gibson (2004) *Development of a fermentation system to model sessile bacterial populations in the human colon. Biofilms* 1: 13-19
- Sengupta A., D. Valdramidou, S. Huntley, S.J. Hicks, S.D. Carrington y A.P. Corfield (2001) *Distribution of MUC1 in the normal human oral cavity is localized to the ducts of minor salivary glands. Arch. Oral Biol.* 46: 529-538
- 25 Straub, T. M., K. Höner zu Bentrup, P. Orosz-Coghlan, A. Dohnalkova, B. K. Mayer, R. A. Bartholomew, C. O. Valdez, C. J. Bruckner-Lea, C. P. Gerba, M. Abbaszadegan, y C. A. Nickerson. (2007) *In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. Emerging Infectious Diseases.* 13:396-403.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un módulo de adherencia que comprende 2 compartimentos separados por una membrana semipermeable; presentando dicha membrana una capa de mucosidad artificial aplicada en su sitio luminal; y dicho módulo caracterizándose por tener condiciones anaeróbicas en su lado luminal y condiciones aeróbicas en su lado basal; en las que el compartimento basal del módulo comprende células viables y en las que uno o más microorganismos se pegan a dicha capa de mucosidad artificial.
2. El módulo de la reivindicación 1 en el que la capa de mucosidad comprende al menos una mucina y el espesor de la capa es entre 1 y 1000 μm .
- 10 3. El módulo de la reivindicación 1 o 2 en el que las condiciones aeróbicas en el compartimento basal del módulo deriva en una presión parcial de oxígeno, en el lado basal de la capa de mucosidad entre 1 y 150 mmHg, en particular entre 1 y 45 mmHg.
4. El módulo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la membrana semipermeable permite el transporte de los componentes entre 1-100.000 Da, en particular entre 1-10.000 Da.
- 15 5. El módulo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el material de la membrana semipermeable es policarbonato, poli(cloruro de dialildimetilamonio), tereftalato de polietileno o poliamida (nailon).
6. El módulo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que además comprende una capa porosa de apoyo en el lado basal de dicha membrana semipermeable.
7. El módulo de la reivindicación 6 en el que el material de la capa porosa de apoyo es poli(cloruro de dialildimetilamonio), poli(ácido acrílico) o combinaciones de los mismos.
- 20 8. El módulo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que las células comprenden las células Caco-2 y/o las células HT29.
9. El módulo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que las células crecen en una monocapa con su lado apical hacia la membrana semipermeable.
- 25 10. El módulo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que el lado apical de las células está cubierto con una malla protectora.
11. El módulo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que el módulo comprende perlas, que tiene desde adentro hacia afuera, una perla de apoyo interna, una membrana semipermeable y una capa de mucosidad artificial.
- 30 12. El módulo según la reivindicación 11, en el que las perlas tienen un radio entre 500 μm y 1 cm, en particular entre 500 μm y 5 mm.
13. El módulo de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12 en el que la capa interna de apoyo comprende componentes de oxígeno de liberación lenta de bioquímicos o en el que la capa interna de apoyo está cubierta con una capa intermedia que contiene componentes de oxígeno de liberación lenta de bioquímicos.
- 35 14. El módulo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la superficie de la capa de mucosidad artificial es entre 1 cm^2 y 200 cm^2 .
15. El módulo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la superficie de la capa de mucosidad artificial es entre 1 cm^2 y 1000 cm^2 , en particular entre 1 cm^2 y 100 cm^2 .

FIGURA 1

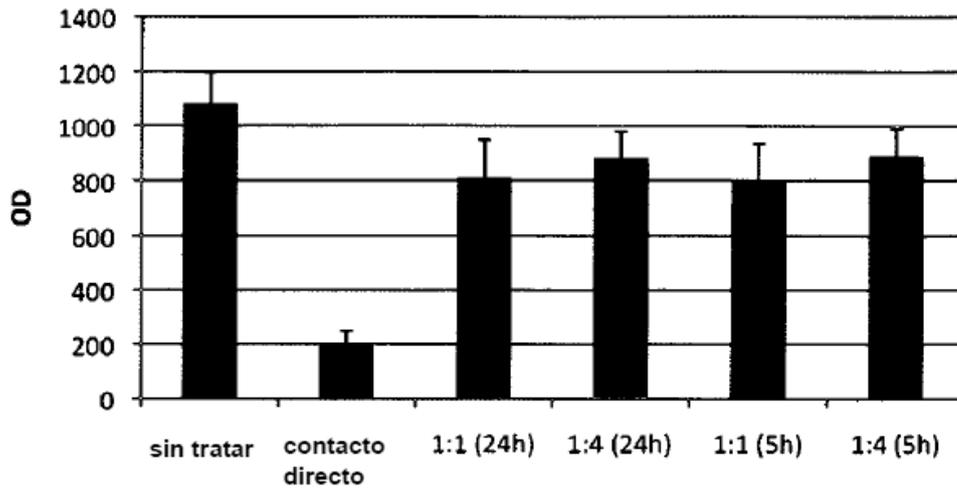


FIGURA 2A

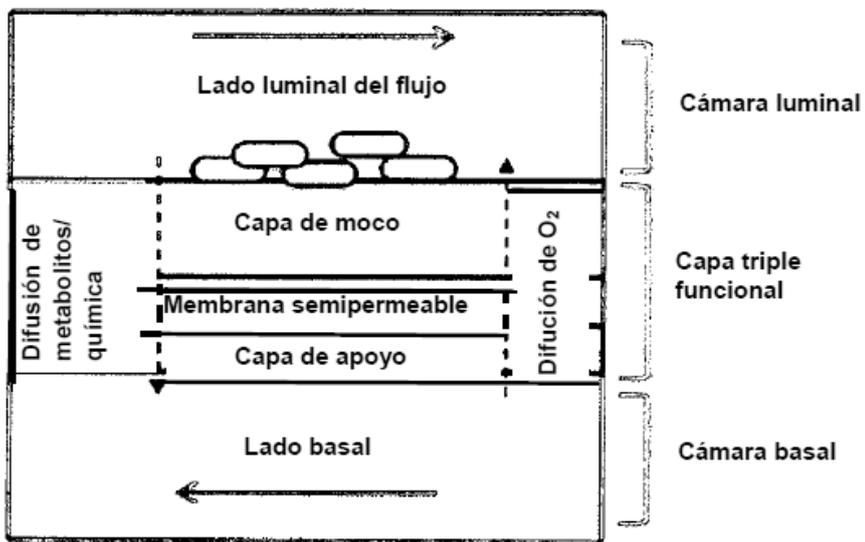


FIGURA 2B

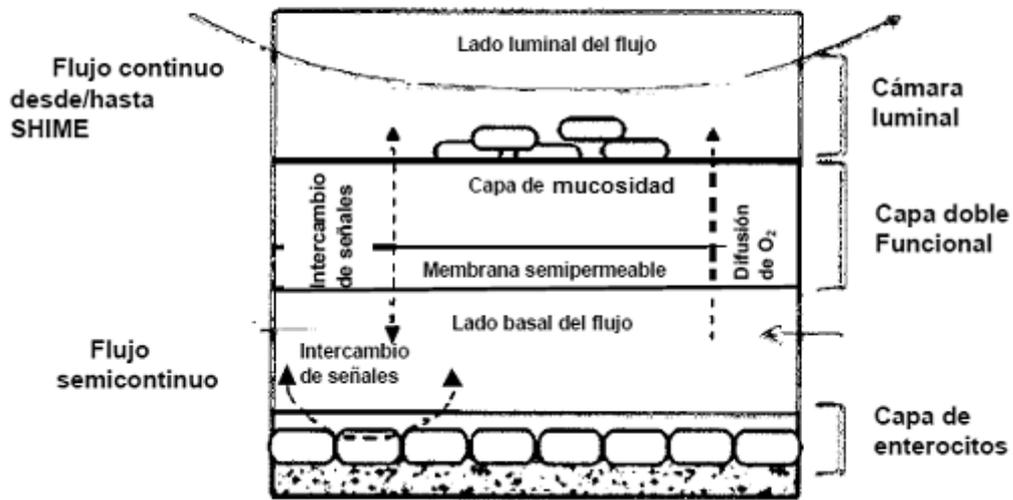


FIGURA 3

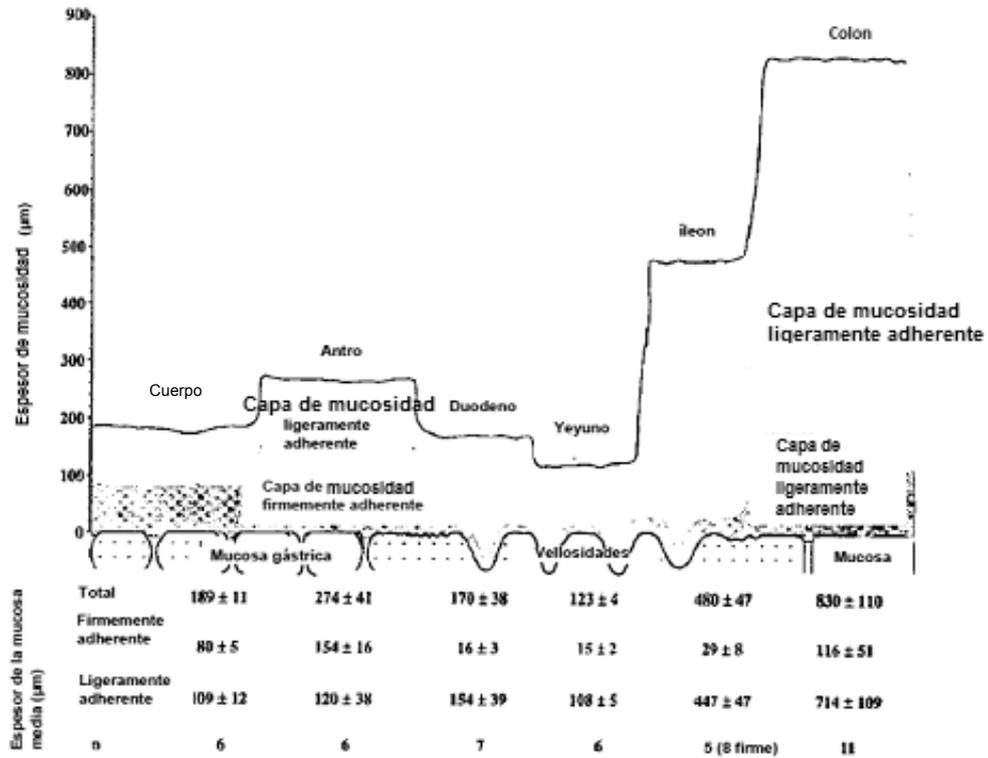


FIGURA 4

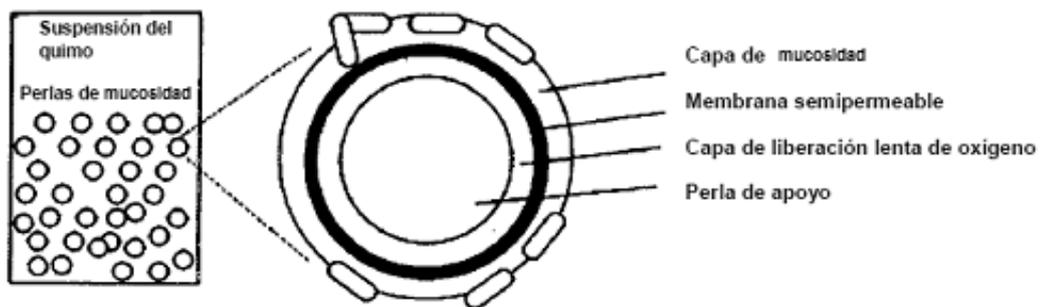


FIGURA 5

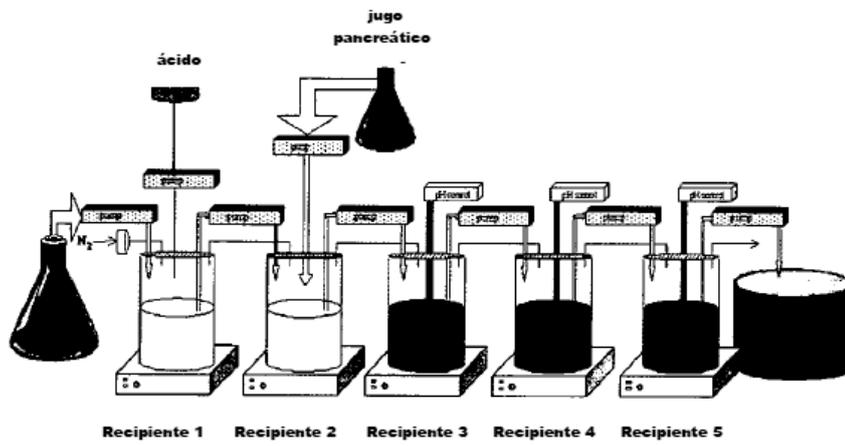


FIGURA 6

