Ekaia, 2025, 48, 161-177
https://doi.org/10.1387/ekaia.27092

ekaia
ZIENTZIA eta TEKNOLOGIA ALDIZKARIA

ISSN 0214-9001 – eISSN 2444-3255

Hesteetako organoideak, homeostasian eta gaixotasunean mikrobiota-immuno-epitelio interakzioak aztertzeko tresna

(Intestinal organoids as a tool for the study of microbiota-immune-epithelial interactions in homeostasis and disease)

Ainize Peña-Cearra, Estibaliz Mateo, Elena Eraso, Leticia Abecia*

Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU)

LABURPENA: Azken urteotan, mikrobiotaren eta organismoaren arteko interakzioak sakon aztertu dira, bai homeostasiaren eta bai gaixotasunen ikuspegitik, eta garrantzi handia izan dute, bereziki, hesteetako harremanean. Mikrobiotaren eta organismoaren arteko elkarreragina hobeto ulertzeko eta animalia-ereduak ordezkatzeko, *in vitro* ereduak garatu dira; adibidez, hesteetako organoideak. Organoide hauek hiru dimentsioko (3D) egiturak dira, hainbat heste-zelula mota dituztenak, eta hesteetako funtzioen eta gaixotasunen antza izan dezaketenak; *in vitro* ikerketa bideragarria bihurtu da horrela. Hesteetako organoideak laborategian sor daitezke, ehun helduetan dauden zelula amak edo zelula ama pluripotenteak ingurune egokian ipintzean. 3D egitura konplexuetan autoantolatzeko gaitasuna dute, eta, horrela, gai dira heste-epitelioaren dinamikak eta gaixotasun-prozesuak simulatutzeko. Organoideen polaritate apiko-basala hestearen berezko ezaugarria da, eta horrek aukera ematen du ikerketa ugari egiteko. Organoideetako kokultibo sistemek aukera ematen dute zelula immunitarioen eta epitelioaren arteko elkarrekintzak aztertzeko. Haietan asko aztertu da, adibidez, gure sistema immunitarioko T linfozitoek hestean duten eragina. Mikroorganismo-epitelio interakzioak ere iker daitezke, baina, horretarako, zenbait protokolo garatu dira mikroorganismoak organoideen alde apikalera sartzeko. Hori mikroinjekzio bidez egin daiteke edo organoideen polaritatea alderantzikatu daiteke «apikala kanpora» organoideak sortzeko. Baina aukera onenetako bat hesteetako bi dimentsioko (2D) monogeruzak dira, une berean alde apikala eta basolaterala erabil daitezkeelako. Hesteetako organoideen erabilerak informazio zehatza eskaintzen du heste-hesia kaltetzen eta konpontzen duten mekanismoei buruz, eta horrek balio handia du diana terapeutiko berriak bilatzeko prozesuan. Beraz, hesteetako organoideen ikerketa funtsezkoa da heste-hesiaren funtzionamenduaren gakoak bilatzeko, batez ere gaixotasun konplexuetan, hala nola hesteetako hanturazko gaixotasunean, non ezinbestekoa den epitelioaren, mikrobiotaren eta zelula immunitarioen arteko oreka.

GAKO-HITZAK: hesteetako organoideak, hestea, mikrobiota, immunitate-sistema, hesteetako hanturazko gaixotasuna.

ABSTRACT: *In recent years, the interactions between the microbiota and the organism have been studied in depth from both homeostasis and disease perspectives, particularly with a focus on the gut. To better understand these interactions and reduce the use of animal models,* in vitro *models such as intestinal organoids have been developed. Intestinal organoids are three-dimensional (3D) structures composed of various types of intestinal cells that mimic intestinal functions and disease states. They can be generated in the lab by placing stem cells from adult tissue or pluripotent stem cells in an appropriate environment. They exhibit apical-basal polarity mirroring that of natural intestine and have the capacity to self-organize into complex 3D structures, simulating the dynamics of intestinal epithelium and disease processes. Co-culture systems in organoids enable the study of interactions between immune cells and epithelium, as seen in studies examining the effects of T lymphocytes on the intestine. Microorganism-epithelial interactions can also be investigated, though different protocols have been developed to access the apical side of organoids. Microorganisms may be introduced into organoids via microinjection, or the polarity of the organoids can be reversed to create «apical-out» organoids. One of the best alternatives, however, is the use of two-dimensional, 2D, intestinal monolayers, which allow simultaneous access to both apical and basolateral sides. The use of intestinal organoids provides specific insights into the mechanisms of damage and repair within the intestinal barrier, which is highly valuable in the search for new therapeutic targets. Research on intestinal organoids is therefore essential for uncovering the key elements of barrier function, especially in complex diseases such as inflammatory bowel disease, where the balance between the epithelium, microbiota, and immune cells is crucial.*

KEYWORDS: intestinal organoids, gut, microbiota, immune system, inflammatory bowel disease.

*** *Harremanetan jartzeko/Corresponding author:*** Ainize Peña-Cearra, Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU), Sarriena auzoa, z/g (48940 Leioa). https://orcid.org/0000-0003-3855-6664, ainize.pena@ehu.eus

Nola aipatu/How to cite: Peña-Cearra, Ainize; Mateo, Estibaliz; Eraso, Elena; Abecia, Leticia (2025). «Hesteetako organoideak, homeostasian eta gaixotasunean mikrobiota-immuno-epitelio interakzioak aztertzeko tresna», *Ekaia*, 48, 2025, DOI: https://doi.org/10.1387/ekaia.27092

Jasoa: azaroak 22, 2024; Onartua: martxoak 05, 2025

ISSN 0214-9001-eISSN 2444-3225 / © UPV/EHU Press

Lan hau *Creative Commons Aitortu-EzKomertziala-PartekatuBerdin 4.0 Nazioartekoa* lizentzia baten mende dago

1. **SARRERA**

Azken urteotan, asko aztertu da mikrobiotak gure organismoarekin duen harremana, bai homeostasian, bai gaixotasunean. Hesteetako harremanetan funtsezko zeregina du. Mikrobiotak gure organismoarekin duen elkarreragina ulertzeko eta animalia-ereduen erabilera osatzeko, *in vitro* ereduak garatu dira, hala nola hesteetako zelulen bi dimentsioko (2D) ereduak eta hesteetako organoideak. Hesteetako epitelio-zelulen 2D ereduak mugatuak dira beren konplexutasun zelularrean; zelula horiek ezin dira epe luzera mantendu eta bereizmen espazial txikia dute, eta horrek mugatu egiten du haien garrantzi fisiologikoa eta hesteetako *in vivo* ingurunearekin duten antzekotasuna. Hesteetako organoideek hiru dimentsioko (3D) egitura dute, eta haiei esker sinplifikatu egin da hesteekin lotutako gaixotasunen ikerketa. Duten funtzionamendua ulertzeko, hestea bera eta haren seinalizazio-bideak deskribatu behar dira lehenik eta, gero, haien egitura eta mikroorganismo-epitelio elkarrekintzak ikertzeko protokoloak deskribatuko dira eta aplikazioak aztertu.

2. **HESTEETAKO MUKOSA**

Mukosa digestio-hodiaren kanpoaldeko geruza da, eta, beraz, kontaktuan dago digestio-aparatuko lumenean dauden substantzia guztiekin. Muki-geruza batek inguratzen du eta berritze-tasa handiko ehuna da, hiru eta bost egun bitartean erabat berritzen dena [1]. Geruza honen funtzio nagusiak organismoa kanpoko erasoetatik babestea eta nutrienteak xurgatzea dira. Hesteetako mukosa zelula ostalarien eta inguruneko faktoreen (metabolito dietetikoak, mikroorganismo jankideak eta heste-lumeneko patogenoak) arteko elkarrekintzarako gune dinamikoa da.

Heste-hesia zelula epitelialen geruza bakar batek osatzen du, eta geruza horren azpian dago lamina propioa, ehun konektibozko geruza baskularizatua eta inerbatua, zelula immunitarioak, fibroblastoak eta beste zelula estromal batzuk dituena (1. irudia).

Hesiaren osotasuna funtsezkoa da hesteetako homeostasirako, eta epitelioaren eta zelula immunitarioen arteko elkarrekintza etengabeak babesten ditu; izan ere, zelula epitelialek funtzio immunitario kritikoa betetzen dute, patogenoak detektatzen baitituzte, eta, askotan, zuzenean ezabatu. Aldi berean, kalterik eragiten ez duten eta komentsalak diren mikroorganismoekiko eta elikagaien antigenoekiko tolerantzia bultzatzen dute [2]. Babes-funtzioa faktore immunitario eta ez-immunitarioen ekintza koordinatuaren bidez gauzatzen da. Kaliza-itxurako zelulek sortzen eta jariatzen duten muki-geruzak propietate tentsioaktiboak eta hidrofoboak ematen dizkio hesteari, hari agente patogenoak edo heste-epitelioari substantzia kalte-

garriak atxikitzea saihesteko [3]. Gainera, muki-geruza horrek mikrobioen aurkako beste substantzia batzuk ere baditu, hala nola A immunoglobulina (ingelesez, IgA edo *Immunoglobulin A*), lamina propioko zelula plasmatikoek ekoiztua, eta gaitasun antimikrobianoa duten peptidoak, Paneth-en zelulek jariatuak [4]. Mukosaren babes horri hesteetako epitelioa osatzen duten zelulen arteko lotura estuak gehitu behar zaizkio, haiek bermatzen baitute hesi-funtzioa, mikroorganismoen translokazioa saihesteko funtsezkoa dena [5].

Xurgatze-funtzioa, bestalde, enterozitoen bidez gauzatzen da. Funtzio hori hesteetako argirantz orientatutako hainbat egiturarekin egiten da. Lehenengo, enterozitoetan dauden mikrobilositateak ditugu: proiekzio mikroskopikoak dira eta enterozitoen aurpegi apikalenean kokatzen dira, zelula bakoitzeko milakako kopuruan. Halaber, biloek xurgatze-eremua handitzen laguntzen dute.

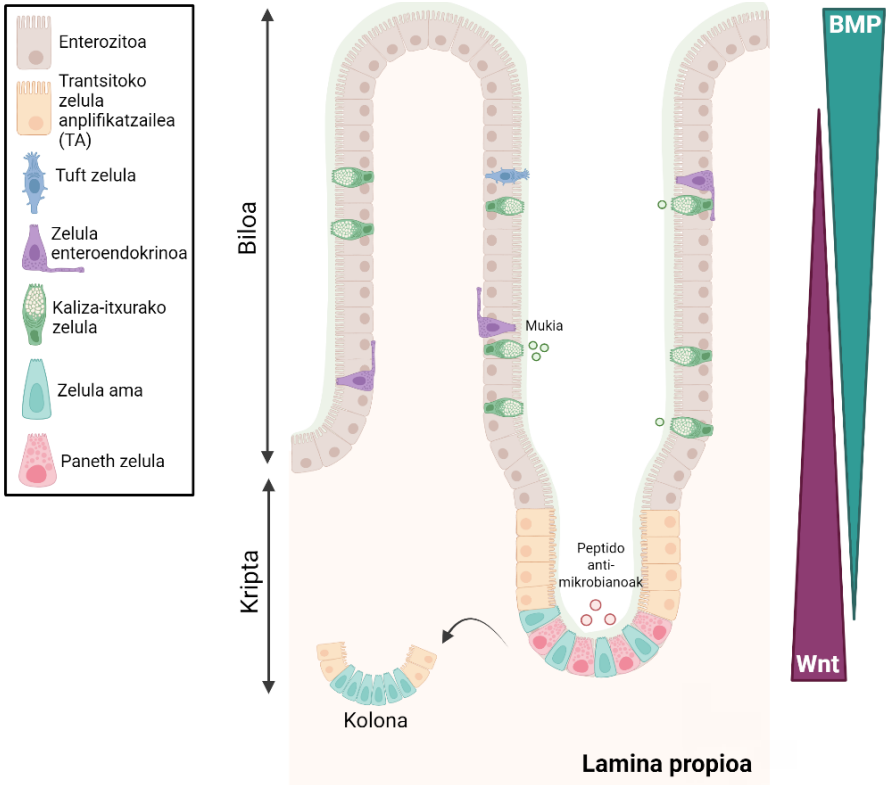
2.1. **Hestearen egitura**

Organoideen funtzionamendua eta hazkuntza hobeto ulertzeko, hestearen egitura azalduko da. Kripta-bilositate bakoitza hiru segmentutan bana daiteke, dauden zelula moten arabera (1. irudia). Heste meharrean, kriptaren oinarrian zelula amak daude, peptido antimikrobianoak sortzen dituzten Paneth zelulekin batera (lehenengo segmentua). Hala ere, heste lodian zelula amak baino ez daude. Zelula amak berritu edo trantsitoko zelula anplifikatzaileetan (TA) bereiz daitezke. Kriptaren oinarrian, Wnt maila altuak ezinbestekoak dira zelula amen ugaritze eta pluripotentziari eusteko. Zelula estromaletik eta epitelialetik jariatutako Wnt glikoproteina funtsezkoa da enbrioi-garapenerako eta ehunen homeostasirako, zelulen auto-berrikuntza, ugalketa eta bereizketa bultzatzen duelako. Ondoko eremuan (bigarren segmentua, kripten amaieraraino / biloen hasieraraino doan eremua), TA zelulak agertzen dira, azken segmentuan —hau da, biloetan— aurkituko ditugun zelula bereiziak sortuko dituztenak [1, 6].

BMP proteinak mesenkimatik eratorritako proteinak dira, eta funtsezko zeregina dute zelulen bereizketan. Hain zuzen ere, hesteetako zelula amen ugalketa inhibitzen dute, eta, horrela, zelulen bereizketa sustatu eta hesteetako kripten ugalketa murriztu. Hestean, BMP seinalizazioa handiagoa da kriptaren goialdean, eta TA zelulak zelula xurgatzaile eta jariatzaileetan bereiztea sustatzen du (hirugarren segmentua), hala nola enterozito xurgatzaileetan, eta zelula jariatzaileen artean, kaliza-itxurako zeluletan, Tuft zeluletan eta zelula enteroendokrinoetan (1. irudia) [6].

Laburbilduz, hiru segmentu horiek zelula amak zatitzen direnetik bereizten diren arte gertatzen den dinamika zelularraren ondorio dira; hala, kriptaren hondoan sortzen diren zelula berriak zinta gisa biloetara joaten

dira bereizi arte. Dinamika horren salbuespena Paneth zelulak dira, bereizi ondoren kriptaren hondoraino jaitsiko baitira zelula amen artean tartekatzeko. Bestalde, heste meharrean M zelulak daude, heste argitik Peyer plakaraino antigenoak garraiatzen dituzten zelula espezializatuak. Heste-organoideek ez dute berez M zelularik sortzen, inguruneko seinale espezifikoak behar dituztelako [7, 8]. Hala ere, haiekin lan egin nahi izanez gero, RANKL zitokinarekin (immunitate-sistemako zelulek jariatutako proteina) haien ekoizpena bultza daiteke, hesteetako zelula epitelialak M zeluletan bereiztea sustatzen duelako [7]. Askotan, mikroorganismo-epitelio elkarrekintzak kolonean aztertzen dira mikroorganismo kopuru handiena han dagoelako, baina ez dago M zelularik.



1. irudia. Heste meharreko epitelioa. Kriptaren oinarrian zelula amak eta Paneth zelulak daude; kriptaren hormetan trantsitoko zelula anplifikatzaileak daude; eta biloetan enterozitoak daude, kaliza-itxurako zelulak, zelula enteroendokrinoak eta Tuft zelulak tartekatuta dituztenak. Wnt proteinek kriptaren ondoan dauden zelula amen ugalketa bultzatzen dute, eta, kriptaren goialdean, BMP proteinek zelula amak zelula epitelial ezberdinetan bereiztea bultzatzen dute.

Aipatutako ezaugarriak direla eta, ehunetik eratorritako gizaki organoideak hazteko, beharrezkoa da kultibo-medioei Wnt proteina gehitzea, eta Wnt proportzioa murriztea organoideak desberdintzatu nahi direnean, zelula jariatzaileen proportzioa handitzeko. Wnt proportzioaren murrizketa BMP seinaleak bultzatzen du. Bestalde, beste organoide mota batzuetan, zelula ama induzituetatik eratorritako kolonoideak (kolona erreplikatzen duten organoideak) sortzeko, beharrezkoa da mediora BMP seinaleak gehitzea [9].

3. **HESTEETAKO ORGANOIDEAK**

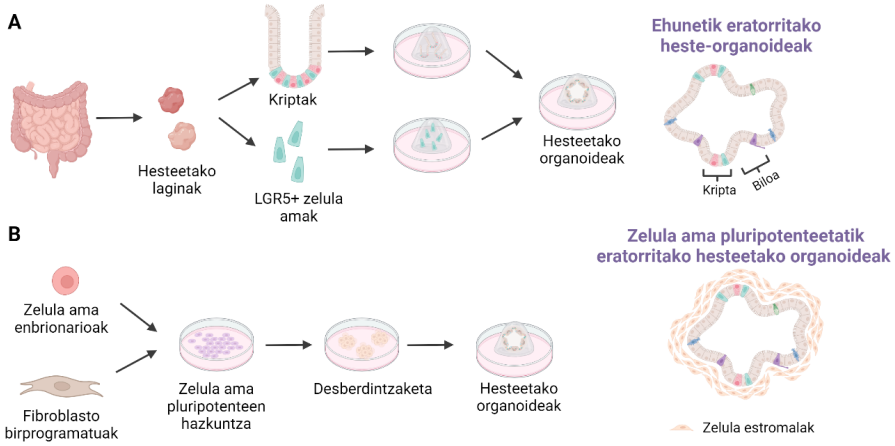
Hesteetako organoideak 3D egitura txikiak dira eta zelula epitelial mota bat baino gehiago izatea dute ezaugarri; 2Dko lerro zelularra, berriz, zelula mota bakar batek osatzen du; adibidez, Caco-2 lerroa (giza kolonondesteko adenokartzinomaren enterozitoak). 2D lerro zelularrek ez dute lortzen organoen konplexutasuna erreproduzitzea, hesteetako funtzio konplexuak barne [10]. Hala, alternatiba gisa, hesteetako epitelioa imitatzen duten eta hesteetako epitelioko gaixotasunen fisiologia normala edo patogenesia gertutik islatzen duten hesteetako organoideak ezarri dira. Animalia-ereduarekin alderatuta, gai etikoak saihesteaz gain, organoideek kostu txikiagoa dute, eta giza ehunekin erraz sor daitezke; beraz, ahalmen handia dute giza gaixotasunak modelatzeko.

2009ko ikerketa historiko batean, aurkitu zen saguen heste-kripta isolatuak edo LGR5 markatzailea duen ($LGR5^+$) heste-zelula ama bakarra epe luzera sar eta haz daitezkeela gel-formako zelulaz kanpoko matrize aberats batean; alegia, hazkuntza-faktoreek definitutako ingurune batean [11]. Hesteetako organoideak lehen aldiz saguak erabiliz ezarri baziren ere, protokoloak egokitu egin dira giza heste meharreko organoideak («enteroideak») edo giza koloneko organoideak («kolonoideak») sortzeko [12]. Aipatzekoa da, egin nahi den ikerketaren arabera, beste organoide mota asko sor daitezkeela, hala nola birika-, giltzurrun- eta garun-organoideak [13].

Organoideak hesteetako zelula ama helduetatik, zelula ama enbrionarioetatik edo induzitutako zelula ama pluripotenteetatik gara daitezke, eta zelulaz kanpoko matrize aberats batean hazten dira *in vitro;* adibidez, ohikoena den Matrigel izen komertziala duen matrizea, saguen Engelbreth-Holm-Swarm tumoretik lortua (2. irudia) [14].

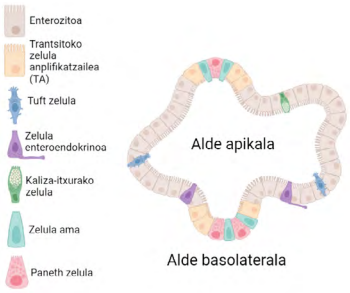
Zelula amek 3D egitura konplexuak sortzeko gaitasuna dute, beren ugaritze, antolakuntza eta bereizketarako egokiak diren hazkunde-faktoreak dituen medioan ipintzean; esate baterako, Wnt3a, EGF, R-spondin eta Noggin (BMP antagonista). Zelula ama enbrionarioetatik eta fibroblasto birprogramatuetatik sortutako organoideek konpartimentu epitelial eta estromalak dituzte, eta, ehunetik eratorritako heste-organoideek, berriz, ez

dute zelula estromalik (2. irudia). Estroma da epitelioaren euskarri-ehuna, ehun konektiboz eta odol-hodiz osatua. Hau da, zelula estromalek mukosari egitura ematen dion zelulaz kanpoko matrizea ekoizten dute eta epitelio-zelulen eta zelula immunitarioen homeostasia babesten dute. Zelula ama pluripotenteetatik eratorritako hesteetako organoideetan, zelula mesenkimalen garapenak konplexutasun-maila berri bat gehitzen du, eta transkripzio-analisiek adierazten dute organoide horiek fetu baten hestearen antz handiagoa dutela heste helduarena baino [7]. Baina organoide horiek askoz konplexuagoak dira sortzeko eta mikrobiota-ostalari elkarrekintza aztertzeko.



2. irudia. Ehun edo zelula ama pluripotenteetatik eratorritako hesteetako organoideak sortzeko prozedura. Hesteetako organoideak bi metodologia jarraituz sortzen dira nagusiki. (**A**) Ehunetik eratorritako hesteetako organoideak kripta isolatuetatik edo zelula ama bakar batetik (Lgr5+) abiatuta sor daitezke. Epitelio-egitura zelularra baino ez da sortzen. (**B**) Zelula ama enbrionarioak edo zelula ama pluripotente induzituak sekuentzialki bultza daitezke endodermora eta hesteetako diferentziaziora zelula ama pluripotenteetatik eratorritako hesteetako organoideak sortzeko, zelula epitelial eta mesenkimalak dituztenak**.** Irudia Kromman eta lankideen 2024ko berrikuspen bibliografikotik eraldatu da [15].

Hesteetako organoideak hesteetan dauden zelula epitelial motek osatzen dituzte: zelula amek, enterozitoek eta zelula jariatzaileek (adibidez, Paneth eta Tuft zelulak, zelula kaliziformeak eta enteroendokrinoak), non zelulek beren polaritate apiko-basala mantentzen duten (3. irudia). Gainera, hestearen funtzioak dituztela frogatu da, mukia ekoiztea eta jariatze-funtzioak barne [16]. Organoideek immunitate sistema-epitelio, mikroorganismo-epitelio edo immunitate sistema-mikroorganismo-epitelio arteko interakzioak ikertzeko aukera ematen dute.



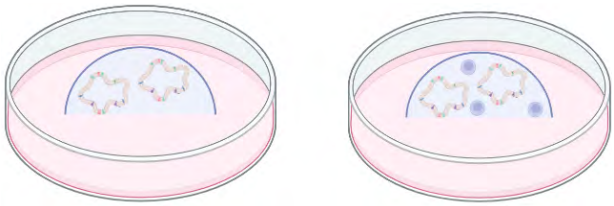
3. irudia. Hesteetako organoideen egitura. Organoide horiek polaritate apiko-basala dute eta hesteetan dauden zelula epitelial motek osatzen dituzte.

4. ORGANOIDEEN ERABILERAK

4.1. Kokultiboak

Hesteetako organoideen arteko kokultiboen abantaila nagusia da, mikroingurune anatomiko konplexu batean, hestean bezala, animalietan eta gizakietan aztertzen zailak diren interakzioak ikertzeko aukera ematen digutela; alegia, bertan dauden zelula immunitarioen eta mikroorganismoen funtzioa aztertzeko aukera ematen digute.

Organoideak polaritate apiko-basala duten hiru dimentsioko egitura itxiak dira. Horrek esan nahi du polaritate apikala organoidearen barnealdera orientatuta dagoela (mikroorganismoak egongo liratekeen lekua); basolaterala, berriz, kanpoaldera, eta kanpoalde hori zelula immunitarioak modu fisiologikoan dauden lekua da (3. irudia). Organoideak Matrigel tanta bakar batean jartzen dira, eta zitokina edota zelula immunitarioekin dituzten interakzioak aztertzeko, hesteetako organoideak zelula immuneekin eta zitokinekin batera kokultibatzen dira (4. irudia). Horretarako, zelula immuneak organoideekin batera jartzen dira, hala nola T linfozitoak eta hesteetako organoideak, Matrigel tanta batean (4. irudia) [17].



4. irudia. Hesteetako organoideen hazkuntza (ezkerrean) eta zelula immuneen eta hesteetako organoideen kokultiboa (eskuinean) Matrigel tanta batean.

Hesteetako organoideak zelula immunitarioekin batera haztean egindako aurkikuntzek garrantzi handia izan dute. Besteak beste, 2023. urtean argitaratutako artikulu batean, iradoki zen ILC3ak (ingelesez, *Innate Lymphoid Cells*) eta heste meharreko organoideak kokultibatuz, ILC3aren eta kaliza-itxurako zelulen arteko elkarrekintza erabakigarria izan daitekeela IL-22 zitokina sortzeko eta hesteetako hesia indartzeko [18]. Beste lan batean, saguen hesteetako organoideak eta immunitate-sistemako T CD4+ zelulak (Th1, Th2 eta Th17 zelula laguntzaileak; ingelesez T-helper cells) kokultibatzean, identifikatu zen proinflamatorioak ziren T zelula laguntzaileek hesteetako zelula amen populazioa murriztu zutela, eta antiinflamatorioak ziren T zelula erregulatzaileek, berriz, zelula amen populazioa mantentzen lagundu zutela [19]. Laburbilduz, ikerketa hauek erakusten dute organoideak *in vitro* eredu erredukzionista oso aproposa direla zelula immunitarioen eta heste-epitelioaren arteko elkarrekintza aztertzeko, besteak beste, zelula immunitarioek epitelioko zelula amen populazioa mantentzeko duten funtzioa ikertzeko orduan.

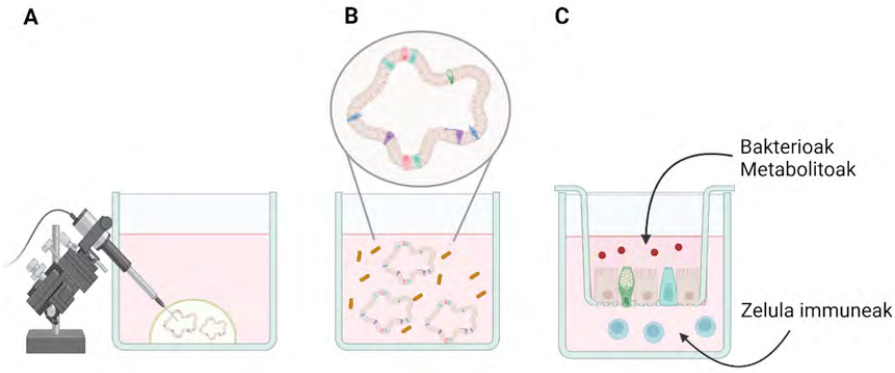
4.1.1. *Mikroorganismo-epitelio interakzioak aztertzeko protokoloak*

Mikroorganismoen eta hesteetako epitelioaren arteko interakzioak ikertzeko, mikroorganismoak hestearen alde apikalean daudenez —hau da, lumenean—, organoideen alde apikalera sartu behar dira. Lumenera sartzea zaila da eta mikroorganismoen mikroinjekzioa eskatzen du, teknika zaila eta denbora asko eskatzen duena (5A irudia) [20]. Beraz, duela gutxi 3D organoideen polaritatea alderantzikatzeko protokoloak deskribatu dira, eta «apikala kanpora» organoideak sortu dira (ingelesez, *apical-out*). Hau da, alde apikala kanpoaldera orientatuta duten organoideak (5B irudia).

«Apikala kanpora» organoideak suspentsioan jartzen dira edozein mikroorganismorekin batera hazkuntza-medioan, zelulaz kanpoko Matrigel matrizea erabili beharrik gabe (5B irudia). Normalean, organoideak bi egunez uzten dira suspentsioan, haien polaritatea alderantzikatzeko. «Apikala kanpora» organoideak sortzen direla baieztatzeko, zenbait markatzaile erabiltzen dira: hesteetako organoideak nukleoetarako Hoescht-ekin tindatzen dira; zitoeskeletoan aktina aztertzeko, faloidinarekin; alde basolateralean zelulen atxikidurak detektatzeko, ECAD antigorputzarekin; eta alde apikalean lotura estuen markatzaile gisa, ZO-1 artigorputzarekin [21, 22]. Zelula epitelialen barruan, aktina-harizpiak batez ere mintz plasmatikoan espresatzen dira, eta espresio handiagoa dute mintz apikalaren eremuan [22]. Organoideen polaritea itzultzea oso metodo erabilgarria da, baina organoideak suspentsioan daudenez, murriztu egiten da haien bideragarritasuna eta, alde basolateralera sartzeko zailtasunaren ondorioz, metodologiarik onena hesteetako 2D mo-

nogeruzak erabiltzea litzateke. Hala ere, kontuan izan behar da monogeruzen kostua handiagoa dela.

Monogeruzak disoziatutako 3D organoideetatik datoz. Organoideetan dauden heste-zelula motak 2Dan haz daitezke, eta, neurri handi batean, heste-epitelioaren ezaugarriak simulatzen dira horrela [23, 24]. Monogeruzak sortzeko, Transwell (TW) sistemak erabiltzen dira eta TWaren mintza kolagenoz edo Matrigelez estaltzen da zelulak jarri baino egun bat lehenago (5C irudia) [25]. Ondoren, organoideen disoziaziotik lortutako zelula indibidualak estalitako mintzean ereiten dira, eta, 10-15 egunen ostean, monogeruza konfluentea bihurtzen da [25]. Monogeruzen TW sistemarekin, alde apikalera (mikroorganismoak, metabolitoak) eta alde basolateralera (immunitate-sistemako zelulak) iristeko gaitasuna dugu (5C irudia).



5. irudia. Mikroorganismo-hesteetako organoideak kokultibatzeko metodoak. (**A**) Mikroorganismoen mikroinjekzioa organoideen lumenean. (**B**) «Apikala kanpora» organoideak. Mikroorganismoak hesteetako organoideekin batera suspentsioan daude kultibo medioan. (**C**) 2D hesteetako monogeruza, non epitelioaren alde apikala zein basolaterala erabil daitekeen.

4.1.2. *Monogeruzen kokultiboak, mikroorganismo-epitelio edo mikroorganismo-immunitate sistema-epitelio elkarrekintzak aztertzeko*

Heste-hesian kalteak edo konponketak eragiten dituzten mekanismoak ulertzea ezinbestekoa da zenbait gaixotasunetan hesiaren osasuna mantentzeko eta itu terapeutiko posibleak aurkitzeko.

Hesteetako monogeruzak erabiltzen dituzten hainbat ikerlan argitaratu dira. Adibidez, *Shigella* generoko espezie patogenoak eta giza mono-

geruzen enteroideak kokultibatuz, deskribatu zen, infekzioaren ondoren, *Shigella*-k hesteak ekoizten duen IL-8 zitokina proinflamatorioaren igoera bultzatu zuela [26]. *Shigella*-k alterazioak eragin zituen hesteetako zelulen arteko lotura estuetan eta, horrela, bakterioaren inbasioa ahalbidetu zuen. Ondoren, sistema hori erabili zen *Shigella* patogenoak neutrofilo polimorfonuklearretan duen eragina aztertzeko [27]. *Shigella* gehituta, handitu egin zen neutrofiloetan kimiotaxiarekin erlazionatutako markatzaileen espresioa, eta horrek ahalbidetu egin zuen haien transmigrazioa epitelio-hesian, eta bakterioak ezabatzea bultzatu [27].

Beste lan batean, bi *Escherichia coli* andui patogeno erabiliz, makrofagoen eta epitelioaren arteko elkarrekintza aztertu zen. *Escherichia coli* anduiak monogeruzen alde apikalean gehitu zituzten eta makrofagoek hantura areagotzen zutela ikusi zuten. Makrofagoen dendritek epitelioa zeharkatu eta, epitelioraen osotasuna kaltetu gabe patogenoak hiltzeko gaitasuna zeukaten [28]. Lan hauek iradoki egiten dute monogeruzen garrantzia norainokoa den patogenoek hesteetako homeostasi immunologikoan duten eragina ikertzeko.

4.2. **Hesteetako hanturazko gaixotasuna aztertzeko**

Hesteetako Hanturazko Gaixotasuna (HHG) hanturazko eritasun idiopatikoa, kronikoa, errepikakorra eta etiologia ezezaguna duen gaixotasuna da. Hesteetako mikroorganismoekiko erantzun immunitario aberrante eta jarraitu baten emaitza dela uste da, genetikoki sentikorra den ostalari batean agertzen dena, ingurumen-faktoreek baldintzatuta [29-31]. HHGaren bi forma nagusiak Crohn-en gaixotasuna eta ultzeradun kolitisa dira.

Hesteetako mikrobiota funtsezkoa da osasunerako eta gaixotasunerako. Ebidentziak iradokitzen du faktore garrantzitsua dela HHGaren patogenesian, nahiz eta ez dagoen argi gaixotasunaren kausa edo ondorioa den. Hesteetako mikroorganismoek harreman mutualista dute ostalariarekin: hark giro egonkorra eta baliabideak eskaintzen dizkie, eta bakterioek, besteak beste, zuntza digeritzen dute, bitaminak eta funtsezko mantenugaiak sortzen dituzte, eta hesteetako hesia babesten laguntzen dute, hesteetako funtzioa eta immunitatea bermatzen duten metabolitoen bidez [32]. Metabolito horien artean kate laburreko gantzazidoak (KLGA) daude, gizakiak digeritu ezin dituen karbohidratoen hartziduratik eratorriak eta immunomodulazio-propietateak dituztenak [32]. HHGko hantura mikroorganismo-konposizioaren aldaketarekin, hau da disbiosiarekin, lotzen da: dibertsitatea murrizten da, Proteobacteria filoko anaerobioak ugaritzen dira, eta Firmicutes filoko KLGA ekoizleak gutxitzen dira [33]. Disbiosi fungikoa ere ikusten da, *Candida albicans* ugaltzen baita, egoera espezifikoetan infekzioak sor di-

tzakeen onddoa [34, 35]. Mikrobiota alteratuak hesteetako funtzio immunologikoari eragiten dioten metabolitoak eta toxinak sortzen ditu, eta HHGaren patogenesian du eragina, ondorioz [36]. Hesteetako mikrobiotak HHGaren patogenesian duen zeregina ezagutzeaz gain, ikerketan egiten ari diren ahaleginek duten norabidea da HHGaren diagnostikoarekin eta pronostikoarekin lotutako mikroorganismo-firma espezifikoak eta gaixotasunak eragiten dituzten mikroorganismoak identifikatzea lortzea. Hori dela eta, mikrobio fekalak diagnostikorako tresna gisa erabil litezke HHG azpimotak eta koloneko beste gaixotasun batzuk bereizteko [31, 37].

Beraz, hesteetako mikrobiota-konposizioa modulatzeko tratamenduak estrategia terapeutiko bideragarriak izan daitezke HHGak dituzten pazienteentzat. Horretarako, funtsezkoa da mikroorganismo espezifikoek gaixotasunean duten funtzioa ulertzea, eta argitu nahi baldin badira ostalariaren, immunitate-sistemaren eta mikrobiotaren arteko interakzioen atzean dauden mekanismoak, ekosistema gastrointestinala imitatzen duten eredu adierazgarriak behar dira; ekosistema horrek barne hartzen ditu hesteetako epitelioa, hesteetako mikrobiota eta zelula immunitarioak. Horri begira sortu dira hesteetako organoideak, ostalariaren eta mikroorganismoen arteko elkarrekintzak aztertzeko. Adibide gisa, duela gutxi argitaratutako artikulu batean, saguaren hesteetako organoideak erabili zituzten, non *Bacillus subtilis*-ek hesteetako zelula jariatzaileen desberdintzapena estimulatzen zuela ikusi zuten, Notch seinalearen inhibizioaren bidez [38]. Ondorioz, Paneth zelulen kopurua eta mukiaren ekoizpena handitu ziren, eta horrek hesteetako hesia babestu zuen *Salmonella Typhimurium*-en aurka. Ondorio hori garrantzi handikoa izan daiteke HHGarentzat, kasu horietan muzinen zein peptido antimikrobianoen ekoizpena murriztuta dagoelako [39]. Organoideen erabilerak mikroorganismo gakoak aurkitzen lagun dezake, bai hesteetako kaltean, bai hesteetako konponketan.

HHGari dagokionez, ikerketa batek zelula ama induzituetatik (ingelesez, iPSC edo *induced pluripotent stem cells*) eratorritako hesteetako organoide eredu bat garatu zuen, giza ultzeradun kolitisa zuten pazienteen fibroblastoetatik sortuta (ingelesez, iHUCO edo *induced human ulcerative colitis-derived organoid*) [40]. iHUCO-ek gaixoen kolona bezalako ezaugarri histologiko eta funtzionalak zituztela ikusi zuten, hala nola muki-jario eza eta epitelio-hesian lotura estu aberranteak [40,41]. Hesteetako organoide eredu honek konpartimentu epitelialak zein estromalak ditu. Baina, aldi berean, askoz konplexuagoa da organoideak sortzu eta erabili mikrobiota-ostalariaren arteko elkarrekintza aztertzeko. Hala ere, organoideen eredu horrek ateak ireki dizkio giza HHG gaixotasunaren eredu berriak sortzeari, eta eredu horiek funtsezkoak dira mikroorganismoek edo immunitate-sistemako zelulek eragindako heste-hesiaren kaltea aztertzeko eta

konpontzeko. Gainera, hesteetako beste gaixotasun batzuk erreplikatzen dituzten organoideak garatu dira; bestek beste, gaixotasun zeliakoa eta kolon-ondesteko minbizia [42, 43].

Gaixotasunei lotutako akats epitelialak aztertzeko, ehunetatik eratorritako pazienteen organoideak edo sagu transgenikoetatik eratorritako organoideak erabiltzen dira. Bestalde, CRISPRean oinarritutako teknologiek genoma editatzea ahalbidetzen dute zelula ama pluripotenteetatik eratorritako hesteetako organoideetan eta, ondorioz, itu terapeutiko berriak aurkitzea bultzatzen dute [44]. Ondoren, ehunetatik eratorritako organoideetan, geneen espresioa sustatzen edo *knockdown*-a eragiten duten interferentziako CRISPRa eta CRISPR aktibazioa garatu ziren [45]. Aurkikuntza horiek aukera berriak eskaintzen dituzte gaixotasunetan espezifikoak diren giza hesteetako organoideak garatzeko eta mikrobiota-ostalari interakzioak patologian ikertzeko.

5. **ONDORIOAK**

Ondorio gisa, hesteetako organoideak epitelio —immunitate sistema— mikrobiota interakzioak ulertzeko tresna baliagarriak direla baieztatu da hainbat artikulutan. Heste-organoideen erabilerak informazio espezifikoa ematen du heste-hesia kaltetzen eta konpontzen duten mekanismoei buruz, zeina baliagarria den itu terapeutikoak bilatzeko. Etorkizunean, organoideek ikerkuntzan animalien erabilera murriztea ahalbidetuko dutela espero da.

Organoideen mugen artean, aipatu beharra dago aldakortasun handia dagoela kultibo medioen osaeran ikerketa-taldeen artean, erreaktiboen kostu handia dela eta. Bestalde, *in vivo*-n ikusi diren hesteetako organoideek ez dauzkate seinale biokimiko eta biofisiko guztiak. Muga horiek gorabehera, gaur egun hesteetako organoideak dira hesteetako *in vitro* sistemarik zehatzena; modu erredukzionistan ahalbidetzen dute hesteetako interakzioen ikerketa, potentzial handiz, bai oinarrizko ikerketan bai nazioartekoan.

ESKER ONAK

Artikulu hau UPV/EHUk eta Eusko Jaurlaritzak finantzatu dute. Ainizek Eusko Jaurlaritzaren doktoretza-ondoko programaren finantzaketa jaso du. Ainizek eskerrak eman nahi dizkio Joana Neves doktoreari, beraren laborategian heste-organoideei buruz ikasten laguntzeagatik.

BIBLIOGRAFIA

[1] KARMAKAR, S., DENG, L., HE, X. C., LI, L. 2020. «Intestinal epithelial regeneration: active versus reserve stem cells and plasticity mechanisms». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **318**, G796-G802.

[2] CONSTANT, D. A., NICE, T. J., RAUCH, I. 2021. «Innate immune sensing by epithelial barriers». *Current Opinion in Immunology*, **73**, 1-8.

[3] MUNIZ, L. R., KNOSP, C., YERETSSIAN, G. 2012. «Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease». *Frontiers in Immunology*, **3**, 310.

[4] CAMILLERI, M. 2019. «Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans». *Gut*, **68**, 1516-1526.

[5] CAMILLERI, M., MADSEN, K., SPILLER, R., VAN MEERVELD, B. G., VERNE, G. N. 2012. «Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease». *Neurogastroenterology & Motility,* **24**, 503-512.

[6] MERAN, L., BAULIES, A., LI, V. S. W. 2017. «Intestinal Stem Cell Niche: The Extracellular Matrix and Cellular Components». *Stem Cells International,* **2017**, 1-11.

[7] DE LAU, W., KUJALA, P., SCHNEEBERGER, K., MIDDENDORP, S., LI, V. S. W., BARKER, N., MARTENS, A., HOFHUIS, F., DEKOTER, R. P., PETERS, P. J., NIEUWENHUIS, E., CLEVERS, H. 2012. «Peyer's Patch M Cells Derived from Lgr5 + Stem Cells Require SpiB and Are Induced by RankL in Cultured "Miniguts"». *Molecular and Cellular Biology,* **32**, 3639-3647.

[8] ROUCH, J. D., SCOTT, A., LEI, N. Y., SOLORZANO-VARGAS, R. S., WANG, J., HANSON, E. M., KOBAYASHI, M., LEWIS, M., STELZNER, M. G., DUNN, J. C. Y., ECKMANN, L., MARTÍN, M. G. 2016. «Development of Functional Microfold (M) Cells from Intestinal Stem Cells in Primary Human Enteroids». *PLOS ONE,* **11**, e0148216.

[9] MÚNERA, J. O., SUNDARAM, N., RANKIN, S. A., HILL, D., WATSON, C., MAHE, M., VALLANCE, J. E., SHROYER, N. F., SINAGOGA, K. L., ZARZOSO-LACOSTE, A., HUDSON, J. R., HOWELL, J. C., CHATUVEDI, P., SPENCE, J. R., SHANNON, J. M., ZORN, A. M., HELMRATH, M. A., WELLS, J. M. 2019. «Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Colonic Organoids via Transient Activation of BMP Signaling». *Cell Stem Cell,* **24**, 829.

[10] YOO, J.-H., DONOWITZ, M. 2019. «Intestinal enteroids/organoids: A novel platform for drug discovery in inflammatory bowel diseases». *World Journal of Gastroenterology,* **25**, 4125-4147.

[11] SATO, T., VRIES, R. G., SNIPPERT, H. J., VAN DE WETERING, M., BARKER, N., STANGE, D. E., VAN ES, J. H., ABO, A., KUJALA, P., PETERS, P. J., CLEVERS, H. 2009. «Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche». *Nature,* **459**, 262-265.

[12] SATO, T., STANGE, D. E., FERRANTE, M., VRIES, R. G. J., VAN ES, J. H., VAN DEN BRINK, S., VAN HOUDT, W. J., PRONK, A., VAN GORP, J., SIERSEMA, P. D., CLEVERS, H. 2011. «Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Hu-

man Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium». *Gastroenterology,* **141**, 1762-1772.

[13] Tang, X.-Y., Wu, S., Wang, D., Chu, C., Hong, Y., Tao, M., Hu, H., Xu, M., Guo, X., Liu, Y. 2022. «Human organoids in basic research and clinical applications». *Signal Transduction and Targeted Therapy,* **7**, 168.

[14] Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., van den Brink, S., Geurts, V., Beumer, J., Clevers, H. 2020. «Establishment and Culture of Human Intestinal Organoids Derived from Adult Stem Cells». *Current Protocols in Immunology,* **130**, DOI: 10.1002/cpim.106.

[15] Kromann, E. H., Cearra, A. P., Neves, J. F. 2024. «Organoids as a tool to study homeostatic and pathological immune–epithelial interactions in the gut». *Clinical and Experimental Immunology,* **218**, 28-39.

[16] Fair, K. L., Colquhoun, J., Hannan, N. R. F. 2018. «Intestinal organoids for modelling intestinal development and disease». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences,* **373**, 20170217.

[17] Kromann, E. H., Peña-Cearra, A., Neves, J. F. 2024. «Organoids as a tool to study homeostatic and pathological immune-epithelial interactions in the gut». *Clinical and Experimental Immunology,* **218**, DOI: 10.1093/cei/uxad118

[18] Read, E., Peña-Cearra, A., Coman, D., Jowett, G. M., Chung, M. W. H., Coales, I., Syntaka, S., Finlay, R. E., Tachó-Piñot, R., van der Post, S., Naizi, U., Roberts, L. B., Hepworth, M. R., Curtis, M. A., Neves, J. F. 2024. «Bi-directional signaling between the intestinal epithelium and type-3 innate lymphoid cells regulates secretory dynamics and interleukin-22». *Mucosal Immunology,* **17**, DOI: 10.1016/j.mucimm.2023.11.002

[19] Biton, M., Haber, A. L., Rogel, N., Burgin, G., Beyaz, S., Schnell, A., Ashenberg, O., Su, C.-W., Smillie, C., Shekhar, K., Chen, Z., Wu, C., Ordovas-Montanes, J., Alvarez, D., Herbst, R. H., Zhang, M., Tirosh, I., Dionne, D., Nguyen, L. T., Xifaras, M. E., Shalek, A. K., Von Andrian, U. H., Graham, D. B., Rozenblatt-Rosen, O., Shi, H. N., Kuchroo, V., Yilmaz, O. H., Regev, A., Xavier, R. J. 2018. «T Helper Cell Cytokines Modulate Intestinal Stem Cell Renewal and Differentiation». *Cell,* **175**, 1307-1320.e22.

[20] Wilson, S. S., Tocchi, A., Holly, M. K., Parks, W. C., Smith, J. G. 2015. «A small intestinal organoid model of non-invasive enteric pathogen–epithelial cell interactions». *Mucosal Immunology,* **8**, 352-361.

[21] Co, J. Y., Margalef-Català, M., Monack, D. M., Amieva, M. R. 2021. «Controlling the polarity of human gastrointestinal organoids to investigate epithelial biology and infectious diseases». *Nature Protocols,* **16**, 5171-5192.

[22] Joo, S.-S., Gu, B.-H., Park, Y.-J., Rim, C.-Y., Kim, M.-J., Kim, S.-H., Cho, J.-H., Kim, H.-B., Kim, M. 2022. «Porcine Intestinal Apical-Out Organoid Model for Gut Function Study». *Animals,* **12**, 372.

[23] Altay, G., Larrañaga, E., Tosi, S., Barriga, F. M., Batlle, E., Fernández-Majada, V., Martínez, E. 2019. «Self-organized intestinal epithe-

lial monolayers in crypt and villus-like domains show effective barrier function». *Scientific Reports,* **9**, 10140.

[24] STAAB, J. F., LEMME-DUMIT, J. M., LATANICH, R., PASETTI, M. F., ZACHOS, N. C.2023, pp. 207-223.

[25] ZHANG, J., HERNANDEZ-GORDILLO, V., TRAPECAR, M., WRIGHT, C., TAKETANI, M., SCHNEIDER, K., CHEN, W. L. K., STAS, E., BREAULT, D. T., CARRIER, R. L., VOIGT, C. A., GRIFFITH, L. G. 2021. «Coculture of primary human colon monolayer with human gut bacteria». *Nature Protocols,* **16**, 3874-3900.

[26] RANGANATHAN, S., DOUCET, M., GRASSEL, C. L., DELAINE-ELIAS, B., ZACHOS, N. C., BARRY, E. M. 2019. «Evaluating Shigella flexneri Pathogenesis in the Human Enteroid Model». *Infection and Immunity,* **87**, DOI: 10.1128/IAI.00740-18

[27] LEMME-DUMIT, J. M., DOUCET, M., ZACHOS, N. C., PASETTI, M. F. 2022. «Epithelial and Neutrophil Interactions and Coordinated Response to *Shigella* in a Human Intestinal Enteroid-Neutrophil Coculture Model». *mBio,* **13**, DOI: 10.1128/mbio.00944-22

[28] NOEL, G., BAETZ, N. W., STAAB, J. F., DONOWITZ, M., KOVBASNJUK, O., PASETTI, M. F., ZACHOS, N. C. 2017. «A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions». *Scientific Reports,* **7**, 45270.

[29] ANANTHAKRISHNAN, A. N., BERNSTEIN, C. N., ILIOPOULOS, D., MACPHERSON, A., NEURATH, M. F., ALI, R. A. R., VAVRICKA, S. R., FIOCCHI, C. 2017. «Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology,* **15**, 39-49.

[30] MATSUOKA, K., KANAI, T. 2015. «The gut microbiota and inflammatory bowel disease». *Seminars in Immunopathology,* **37**, 47-55.

[31] PEÑA-CEARRA, A., FULLAONDO, A., ABECIA, L. 2023. «Hesteetako hanturazko gaixotasuna: patogenia, tratamenduak eta mikrobiotan oinarritutako biomarkatzaileak». *Ekaia,* **43**, 149-170.

[32] POLETTI, M., ARNAUTS, K., FERRANTE, M., KORCSMAROS, T. 2021. «Organoid-based Models to Study the Role of Host-microbiota Interactions in IBD». *Journal of Crohn's and Colitis,* **15**, 1222-1235.

[33] LLOYD-PRICE, J., ARZE, C., ANANTHAKRISHNAN, A. N., SCHIRMER, M., AVILA-PACHECO, J., POON, T. W., ANDREWS, E., AJAMI, N. J., BONHAM, K. S., BRISLAWN, C. J., CASERO, D., COURTNEY, H., GONZALEZ, A., GRAEBER, T. G., HALL, A. B., LAKE, K., LANDERS, C. J., MALLICK, H., PLICHTA, D. R., PRASAD, M., RAHNAVARD, G., SAUK, J., SHUNGIN, D., VÁZQUEZ-BAEZA, Y., WHITE, R. A., BISHAI, J., BULLOCK, K., DEIK, A., DENNIS, C., KAPLAN, J. L., KHALILI, H., MCIVER, L. J., MORAN, C. J., NGUYEN, L., PIERCE, K. A., SCHWAGER, R., SIROTA-MADI, A., STEVENS, B. W., TAN, W., TEN HOEVE, J. J., WEINGART, G., WILSON, R. G., YAJNIK, V., BRAUN, J., DENSON, L. A., JANSSON, J. K., KNIGHT, R., KUGATHASAN, S., MCGOVERN, D. P. B., PETROSINO, J. F., STAPPENBECK, T. S., WINTER, H. S., CLISH, C. B., FRANZOSA,

E. A., VLAMAKIS, H., XAVIER, R. J., HUTTENHOWER, C. 2019. «Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases». *Nature,* **569**, 655-662.

[34] MAYER, F. L., WILSON, D., HUBE, B. 2013. «Candida albicans pathogenicity mechanisms». *Virulence,* **4**, 119.

[35] SOKOL, H., LEDUCQ, V., ASCHARD, H., PHAM, H. P., JEGOU, S., LANDMAN, C., COHEN, D., LIGUORI, G., BOURRIER, A., NION-LARMURIER, I., COSNES, J., SEKSIK, P., LANGELLA, P., SKURNIK, D., RICHARD, M. L., BEAUGERIE, L. 2017. «Fungal microbiota dysbiosis in IBD». *Gut,* **66**, 1039-1048.

[36] LEVY, M., BLACHER, E., ELINAV, E. 2017. «Microbiome, metabolites and host immunity». *Current Opinion in Microbiology,* **35**, 8-15.

[37] PASCAL, V., POZUELO, M., BORRUEL, N., CASELLAS, F., CAMPOS, D., SANTIAGO, A., MARTINEZ, X., VARELA, E., SARRABAYROUSE, G., MACHIELS, K., VERMEIRE, S., SOKOL, H., GUARNER, F., MANICHANH, C. 2017. «A microbial signature for Crohn's disease». *Gut,* **66**, 813-822.

[38] HOU, Q., JIA, J., LIN, J., ZHU, L., XIE, S., YU, Q., LI, Y. 2022. «Bacillus subtilis programs the differentiation of intestinal secretory lineages to inhibit Salmonella infection». *Cell Reports,* **40**, 111416.

[39] WEHKAMP, J., SALZMAN, N. H., PORTER, E., NUDING, S., WEICHENTHAL, M., PETRAS, R. E., SHEN, B., SCHAEFFELER, E., SCHWAB, M., LINZMEIER, R., FEATHERS, R. W., CHU, H., LIMA, H., FELLERMANN, K., GANZ, T., STANGE, E. F., BEVINS, C. L. 2005. «Reduced Paneth cell α-defensins in ileal Crohn's disease». *Proceedings of the National Academy of Sciences,* **102**, 18129-18134.

[40] SARVESTANI, S. K., SIGNS, S., HU, B., YEU, Y., FENG, H., NI, Y., HILL, D. R., FISHER, R. C., FERRANDON, S., DEHAAN, R. K., STIENE, J., CRUISE, M., HWANG, T. H., SHEN, X., SPENCE, J. R., HUANG, E. H. 2021. «Induced organoids derived from patients with ulcerative colitis recapitulate colitic reactivity». *Nature Communications,* **12**, 262.

[41] ZEISSIG, S., BURGEL, N., GUNZEL, D., RICHTER, J., MANKERTZ, J., WAHNSCHAFFE, U., KROESEN, A. J., ZEITZ, M., FROMM, M., SCHULZKE, J.-D. 2007. «Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease». *Gut,* **56**, 61-72.

[42] SANTOS, A. J. M., VAN UNEN, V., LIN, Z., CHIRIELEISON, S. M., HA, N., BATISH, A., CHAN, J. E., CEDANO, J., ZHANG, E. T., MU, Q., GUH-SIESEL, A., TOMASKE, M., COLBURG, D., VARMA, S., CHOI, S. S., CHRISTOPHERSEN, A., BAGHDASARYAN, A., YOST, K. E., KARLSSON, K., HA, A., LI, J., DAI, H., SELLERS, Z. M., CHANG, H. Y., DUNN, J. C. Y., ZHANG, B. M., MELLINS, E. D., SOLLID, L. M., FERNANDEZ-BECKER, N. Q., DAVIS, M. M., KUO, C. J. 2024. «A human autoimmune organoid model reveals IL-7 function in coeliac disease». *Nature,* **632**, 401-410.

[43] IDRIS, M., ALVES, M. M., HOFSTRA, R. M. W., MAHE, M. M., MELOTTE, V. 2021. «Intestinal multicellular organoids to study colorectal cancer». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer,* **1876**, 188586.

[44] TIAN, R., GACHECHILADZE, M. A., LUDWIG, C. H., LAURIE, M. T., HONG, J. Y., NATHANIEL, D., PRABHU, A. V., FERNANDOPULLE, M. S., PATEL, R., ABSHARI, M., WARD, M. E., KAMPMANN, M. 2019. «CRISPR Interference-Based Platform for Multimodal Genetic Screens in Human iPSC-Derived Neurons». *Neuron,* **104**, 239-255.e12.

[45] SUN, D., EVANS, L., PERRONE, F., SOKLEVA, V., LIM, K., REZAKHANI, S., LUTOLF, M., ZILBAUER, M., RAWLINS, E. L. 2021. «A functional genetic toolbox for human tissue-derived organoids». *eLife,* **10**, DOI: 10.7554/eLife.67886