



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Linboko zelula amen eta
melanozitoen ko-kultiboaren
optimizazioa: hazkuntza medioek
melanozito epidermikoan
hazkundean eta
funtzionaltasunean duten eragina**

*Ainhoa Agirrebengoa-Arrieta,
Ainara Aginaga Etxamendi,
Miguel Perez-Garrastachu,
Cristina Romo-Valera,
Maddalen Rodriguez-Astigarraga,
M^a Dolores Boyano eta
Noelia Andollo-Victoriano*

225-232 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.27>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



Linboko zelula amen eta melanozitoen ko-kultiboaren optimizazioa: hazkuntza medioek melanozito epidermikoaren hazkundean eta funtzionaltasunean duten eragina

Ainhoa Agirrebengoa-Arrieta¹, Ainara Aginaga Etxamendi¹, Miguel Perez-Garrastachu^{1,2},
Cristina Romo-Valera^{1,2}, Maddalen Rodriguez-Astigarraga^{1,2},
M^a Dolores Boyano^{1,2}, Noelia Andollo^{1,2}

¹*Zelulen Biologia eta Histologia Saila. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea. Euskal Herriko
Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa.*

²*Biobizkaia Ikerkuntza Sanitarioko Institutua, Barakaldo.*
ainhoa.agirrebengoa@ehu.eus

Laburpena

Linboko epitelioko zelula amak (LEZA), linbo esklerokornealean (kornea eta esklerotikaren arteko trantsizio gunea) kokatzen direnak, linboko nitxo deritzon ingurune espezializatu batean hain zuzen ere, etengabe ari dira korneako epiteliua berritzen. Linboko nitxoan melanozitoak ere badaude, eta funtsezko zeregina dute aipaturiko zelula amen desdiferentziazio egoera eta funtzionalitatea mantentzeko orduan. LEZAk disfuntzionalak bihurtzen direnean, korneak konjuntibalizazioa jasaten du, eta horrek gardentasuna murriztea eta ikusmena galtzea eragiten du. Transplante autologoa tratamendurik eraginkorrena bada ere, LEZAn eskasiak euren *ex vivo* hedapena eskatzen du, horretarako baldintza optimoak bilatzearen beharrezana nabarmenduz.

LEZAn biziraupena eta pluripotentzia mantentzeko ikuspegi itzaropentsu bezala ikertu da melanozitoekin batera ereitea, zeintzuek funtsezko zeregina duten LEZAn diferentziazio-eza, biziraupena eta funtzionalitatea mantentzerako orduan, linboko nitxo naturala imitatuz. Morfologia, hazkuntza, bideragarritasuna, migrazioa, melaninaren sintesia eta melanozitoen markatzaileen adierazpena ikertzea ardatz nagusi gisa erabiliz, melanozitoak kultibo medio desberdinetan aztertu genituen. Aurkikuntzek adierazi zuten LEZAk ereiteko erabili ohi diren hazkuntza medioek melanozitoen bideragarritasuna eta funtzioak murrizten zituztela. Aitzitik, eraldatutako medio esperimentalek bideragarritasuna eta migrazio gaitasuna emendatzen zuten, melanozitoen morfologia tipikoa mantenduz.

Beste espezieetatik eratorritako konposatu kimikorik, konposatu xenogeniko izenekoak, gabeko hazkuntza medioak garatzeko isoproterenolarekin ordezkatu zen toxina kolerikoa, terapia zelularrerako arriskuak ekar ditzaketen konposatuak saihestuz. Gainera, buruturiko azterketek agerian uzten dute hazkuntza-faktore espezifikoek eta seinale-molekulek (α -MSH eta endotelina-1, adibidez) melanozitoen biziraupenerako duten garrantzia. LEZA eta melanozitoen hazkuntza-baldintzak optimizatzea funtsezkoa da LEZAn hedapena eta transplante-terapiak hobetzeko.

Hitz gakoak: Linboko epitelioko zelula amak, Linboko zelula amen gutxitasuna, melanozitoak, linboko nitxoak, xenogenikorik gabeko medioa.

Abstract

Limbal epithelial stem cells (LESC), which are located in the sclerocorneal limbus (the transition zone between cornea and sclera), precisely in a specialized environment called the limbal niche, are constantly renewing the corneal epithelium. The limbal niche also contains melanocytes, which play a key role in maintaining the state of dedifferentiation and the functionality of said stem cells. When LESC become dysfunctional, the cornea undergoes conjunctivalization, resulting in decreased transparency and loss of vision. Although autologous LESC transplantation is the most effective treatment, the scarcity of LESC requires their ex vivo expansion, highlighting the need to seek optimal conditions for this.

Co-seeding with melanocytes has been recently investigated as a promising approach to maintaining the survival, stemness and functionality of LESC by mimicking their natural niche. Using as the main axis the investigation of morphology, growth, viability, migration, melanin synthesis and expression of melanocyte markers, we analyzed melanocytes in different culture media. The findings

indicated that the commonly used media for LESC is not adequate to culture melanocytes. In contrast, the modified experimental media enhanced viability and migratory capacity while maintaining the typical melanocyte morphology.

Cholera toxin was replaced with isoproterenol to develop growth media free of xenogenic compounds - chemical substances derived from other species- in order to avoid compounds that may pose risks to cell therapy. Furthermore, studies have shown the importance of specific growth factors and signal molecules such as α -MSH and endothelin-1 for melanocyte survival. Optimization of LESC and melanocyte growth conditions is essential to improve LESC expansion and transplantation therapies.

Keywords: Limbal epithelial stem cells, Limbal stem cell deficiency, melanocytes, limbal niche, cell therapy, xenogenic-free culture.

1. Sarrera eta motibazioa

Kornea, begia inguruetik datozen kalte eta substantzia arriskutsuetatik babesten duen egitura da, bere gardentasuna mantentzea beharrezkoa delarik ikusmena ahalbidetzeko. Hau jakinda, kornearen epitelioak daukan berrizatzeko gaitasuna ezinbestekoa da begiko atal honen integritatea mantentzeko eta funtzioak betetzeko (Secker & Daniels, 2009). Kornea berriztatzeaz arduratzen diren zelula amen erreserba linbo esklerokornealean kokatzen da, korneak eta esklerak bat egiten duten trantsizio-arean hain zuzen ere (Osei-Bempong, Figueiredo, & Lako, 2012). Zelula berezi hauek LEZA bezala ezagutzen dira, *limbal epithelial stem cells (LESC)* ingelesez, eta LEZAn nitxoan aurkitu daitezke, euren desberdintzapen-eza mantentzeaz arduratzen den ingurunea. Gune hau baskularizatuta eta inerbatuta ageri da, ezinbestekoak diren hazkuntza faktoreak eta zitokinak eskuragarri egonez, beraz, kaltetzerakoan, zelula amek arazoak izan ditzakete, linboko zelula amen gutxitasuna (LEZAG) izeneko gaixotasuna sortuz, ingelesez *Limbal Stem Cell Deficiency (LSCD)*. Sortzen dituen arazoak anitzak dira, konjuntiba-ehunaren gehiegizko hazkuntza, kornearen baskularizazioa, hantura kronikoa eta ikusmen-urritasuna eraginez (Figueiredo et al., 2021). Patologia hau sarriago lotzen da erredura kimiko eta termiko larri, baina kontaktu-lenteen erabilera, erradiazio ultramorea, kirurgia eta gaixotasun hereditarioekin ere lotuta egon daiteke, besteak beste (Figueiredo et al., 2021).

LEZAGaren tratamenduan, kornea-azalaren egoera hobetzea da lehen ikuspegia, malko artifizialak edo ukipen-lenteak erabiliz, kornea babesteko eta sintomak arintzeko. Kasu larriagoetan, bestelako ikuspegi kirurgikoak lantzen dira, hala nola mintz amniotikoaren transplantea edo kornearen deszelularizazioa, ehun anormalaren hazkuntza ezabatzeko (Suanno et al., 2024). Terapia medikoa eraginkorra ez bada edo gaixotasuna larria bada, ehun-transplantea edo kultibatutako zelulen transplantea egin daiteke, zein *in vitro* burututako LEZAn hedapenean oinarritzen den, geroago kaltetutako begian transplantatzeko (Suanno et al., 2024).

Ingurune berezi horretan badaude ezinbestekoak diren beste zelula batzuk, linboko melanozitoak (LMel) besteak beste. Korneako epitelioaren birsorkuntzan laguntzen dute, baita nitxoaren erregulazio egokian ere. Horretaz gain, LMel hauek LEZAn desberdintzapena ekiditen dute eta edozein kalte eragindako hantura kontrolatu dezakete beste zelula eta molekulekin dituzten elkarrekintza desberdinen bidez (Polisetti et al., 2020). Orain arte behatu da *in vitro* buruturiko linboko epitelioaren kultibo primarioaren mantenuan LEZA eta melanozitoak erraz galtzen direla denbora igaro ahala (Romo-Valera et al., 2021). Horregatik, terapia zelularrerako erabili ohi diren hazkuntza-medioak optimizatzea planteatu da lan honetan, bi zelula moten biziraupen iraunkorra bilatuz *in vitro*.

LMel eta LEZAk kultur euskarri bakar batean behar bezala hazteko ingurune optimo bat oraindik garatzeke dago. Gainera, azken urteetan, beste espezieetatik eratorritako produktuen, xenogeniko deritzenak, eta naturalki gure gorputzean agertzen ez diren substantzien ordezkapena aztertzen ari dira. Azken hauek konposatu xenobiotikoak dira, eta konposatu xenogenikoekin batera ostalariaren erantzun inmunitarioa eragin dezakete transplantearen ondoren, gainera, batzuetan, patogenoak transmititzeko arriskuak areagotzen dituzte ere. Hala, substantzia horrek gabeko konposatu optimoen konbinazioa aurkitu nahi da LEZA eta melanozitoak *in vitro* mantentzeko (Hernández-Moya et al., 2020; Masood et al., 2022).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Linboko zelula amen gutxitasuna (LEZAG) korneako epiteliaren birsortze-ahalmenari eragiten dion baldintza larria da, eta horren ondorioz, neobaskularizazioa, korneako opakutasuna, mina eta, kasu larrietan, itsutasuna gertatzen dira (Calonge et al., 2021). Linboko nitxoan korneako homeostasia mantentzeko ezinbestekoak diren linboko epitelioko zelula amak (LEZA) dauden. Mikroingurune espezializatu hori ez dute soilik LEZAk osatzen, baita melanozitoek (LMel) eta beste motatako zelulek ere. LMel-ek zelula ama horien bereizi gabeko egoera mantentzen dute, baita proliferazio-tasa baxua ere (Calonge et al., 2021; Tonti et al., 2023).

Zelula ametan oinarritutako terapietan aurrerapen esanguratsuak lortu diren arren, hala nola kultibaturiko linboko zelula amen transplanteak, ingelesez *cultivated limbal epithelial transplantation* (CLET), terapia horiek erronka esanguratsuak dituzte aurretik oraindik. Horien artean, nabarmentzekoa da konposatu xenogeniko gabeko hazkuntza-inguruneak garatu behar direla. Nitxo naturalaren baldintzak islatzeko eta LEZAk eta melanozitoak modu eraginkorren elkarrekin hazteko (Calonge et al., 2021; Elhusseiny et al., 2022). Egungo medioek beste espezieetatik eratorritako konposatuak dauzkaten, hala nola, FBS (behien serum fetala) eta kolera toxina modu negatiboan eragin dezakete zelulen bideragarritasunean eta transplanteen osteko integrazioan, terapia horien arrakasta klinikoa mugatuz (Elhusseiny et al., 2022).

Gainera, LEZAG duten pazienteetan buruturiko kornea-transplante gehienek porrot egiten dute, beraren kaltetutako linboko zelulak ez direlako gai korneako epiteliara birsortzeko, ezta emaila baten ehuna erabiltzerakoan ere ez. Kasu hauetan, lehenik eta behin beharrezkoa da linboko nitxoa berreraikitzea, geroago egin daitezkeen prozedurak arrakastatsuak izan daitezen (Calonge et al., 2021; Tonti et al., 2023). Berriki egin diren ikerketek nabarmendu dute melanozitoek funtsezko zeregina dutela LEZAn portaeraren erregulazioan, bi zelula motak barneratzen duten estrategia terapeutikoen garrantzia azpimarratu dute (Tonti et al., 2023).

Beraz, lehentasunezkoztat jotzen da zelula-hazkuntzarako teknologia berriak garatzea, linboko nitxoko baldintzak sortzea eta konposatu xenogenikoetatik sortu daitezkeen arriskuak murriztuko dituztenak, eta, hala, LEZAn transplantean oinarritutako terapien eraginkortasuna eta segurtasuna hobetuko dutenak paziente hauentzat. Kornea donazioak urriak direnez, bertako zelulekin lanean hasi baino lehen askoz ere ugariagoak diren zelulekin burutu dira frogak lan honetan, melanozito epidermikoekin hain zuzen ere.

Guzti hau kontutan hartuta, ikerketa honen helburuak definitu daitezke:

- Laborategian ekoiztutako medioetan hazitako melanozito epidermikoek funtzionaltasuna eta hazkundera aztertzea. Horretarako: Intereseko zelulen morfologia, proliferazioa, aktibitate metabolikoa, migratzeko gaitasuna eta melaninaren sintesia aztertuz medio optimo bat topatzea.
- Konposatu xenogeniko eta xenobiotiko kontzentrazio baxuagoa duen kultibo medio baten bideragarritasuna aztertzea.

3. Ikerketaren muina

LEZA eta LMel zelulak batera kultibatzeke medio komertzialen falta delarik, laborategian hazkuntza-medio definituak sortu dira. Hasiera baten, melanozitoen hazkundera bultzatzen duten konposatu desberdinen konbinazioak burutu dira linboko epitelioko zeluletarako prestatuta dagoen medioa oinarri bezala erabiliz.

Melanozitoen hazkuntzarako asko erabiltzen den M-254 medioa daukagu eta hainbat konposatuz osatuta dago: aminoazido esentzialak, bitaminak, gatz inorganikoak, glukosa,

adenina, timidina eta sodio pirubatoa (Mirea et al., 2020). Medio honekin batera HMGS-2 osagarria, gizakien melanozitoentzako hazkuntza-faktorea (Human Melanocyte Growth Supplement), erabili ohi da melanozitoen kultiborako. Hemendik lortutako medioa MM bezala identifikatuko da, eta melanozitoen hazkuntzarako medio kontroltzat hartzen dugu.

MM medioak, aipaturiko osagaiekin batera beste hainbat substantzia dauzka. Konposatu xenobiotikoei dagokionez, toxina kolerikoa eta behien pituitariotik lortutako aterakina, zeinetan α -MSH izeneko melanozitoen hazkuntzarako hormona sartzen den, medio honen parte dira. Honetaz gain, dimetil sulfoxidoa (DMSO) ere badauka, substantzia xenobiotikoa izanik. Osagai guztien funtzioa, laburbilduz, zelulen proliferazioa, erregulazioa, geneen espresioarekin erlazionatuta dago (Kent & Bomser, 2003; Albert & Boilly, 1988; Ling et al., 2016; Padma, 2016).

SHEM-5 izeneko medioa, (Hormone-supplemented epidermal medium-5) LEZAK kultibatzeko kontrol medioa da. MM-rekin FBS eta Hidrokortisona dauka amankomunean, zelulen biziraupena, mantenuan hedapena eta diferentziazioa bultzatzen duten konposatuak.

Konposatu desberdinek zeluletan daukaten eragina kontuan edukita, lehenengo azterketetan, interesgarrienak aukeratu eta SHEM-5 mediora gehitu ziren, medio modifikatu desberdinak sortuz. Melanozitoen medio komertzialetik eratorriz, intereseko ondorengo 4 konposatuen konbinazioei esker 7 medio desberdin lortu ziren: fibroblastoen hazkunde faktore basikoa, heparina, MSH- α hormona (*Alpha-melanocyte stimulating hormone*) eta endotelina-1 (ET-1). Aipatu beharra dago kontrol bezala erabili zen hirugarren medio bat MMM (melanozitoen medio modifikatua) bezala izendatu zela, aurretik aipaturiko konposatu guztiak zeramatzana.

Nahiz eta hasiera batetik animali jatorridun produktuen erabilerarekin kontu handia eduki behar dela jakin, sortu-berri ziren medio hauen efektua aztertu nahi zen lehenengo, melanozito epidermikoetan hain zuzen ere. Zelula hauen erabileraren zergatia kornea-emaile urritasuna da, linboko melanozito gutxi edukitzea eragiten duena. Melanozito epidermikoaren erabilera aukera interesgarria da, ugariak eta erraz lortzen direlako. Honetaz gain, euren plastikotasuna deskribatu da (Klar et al., 2017), beraz interesgarria izango litzateke ekoiztutako medio hauekiko daukaten erantzuna, etorkizun baten LEZAKin batera haztea planteatzu.

1. taula. Esperimentuetako kontrol eta emaitza hoberenak izan dituzten medioen osagaiak.

Erabilitako kontrol medioak eta eraldatutako medio egokienak		
Kontrol medioak	Emaitza egokienak izan dituzten medio eraldatuak	
		Gehitutako/kendutako konposatuak
SHEM-5	Mod 3	MMM (-1/2 α -MSH)
MM	Mod 4	MMM (- α -MSH)
MMM	M-E	MMM (-DMSO, - Toxina kolerikoa) (+ isoproterenol)

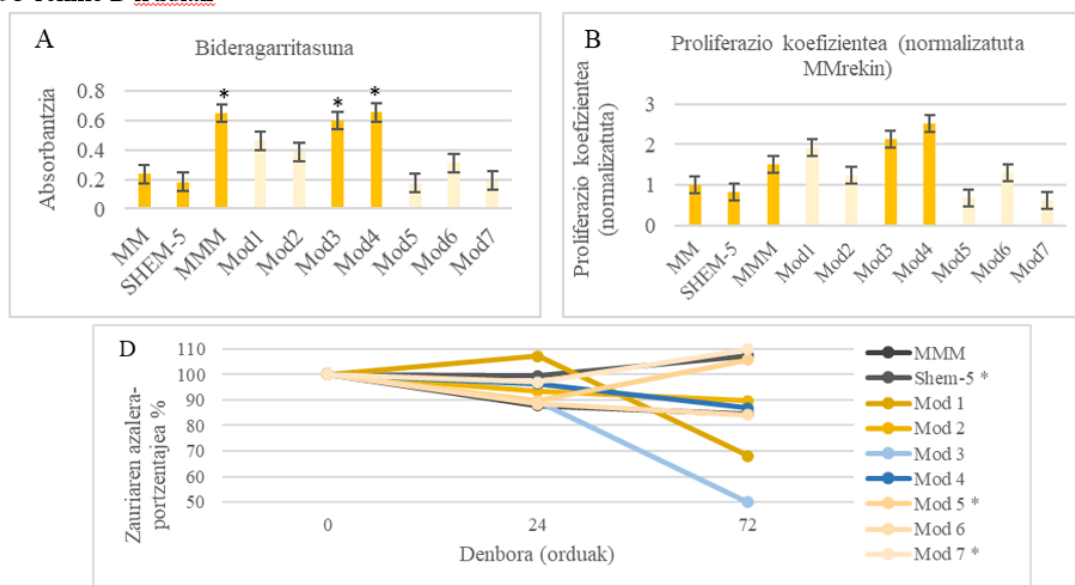
Lehenengo esperimendu txandari dagokionez, hainbat ezaugarri zelular aztertu ziren modifikaturiko medioen eragina neurtzeko: morfologia, proliferazioa eta bideragarritasuna (1 irudia). Bakoitzean 3 erreplika esperimendal burutu ziren, barnean 3 erreplika tekniko landuz. Analisi estatistikoa dagokionez datuen normaltasuna Shapiro-Wilk probarekin ebaluatu zen. Banaketaren arabera, proba parametrikokoak aplikatu ziren (Student-en t bi talderentzat, ANOVA bi baino gehiagorentzat, Tukey-ren post hoc testarekin) edo ez parametrikokoak (Mann – Whitney U bi talderentzat, Kruskal – Wallis Dunn-en post hoc testarekin zenbait talderentzat). Adierazgarritzat jo zen $p < 0,05$.

α -MSH kontzentrazio desberdinak zituzten medioak, Mod 3 eta Mod 4 (1.aula) forma anitzetako zelulak erakutsi zituzten, eta hauek izan ziren ere proliferazio koefiziente handiago bat edukitzeko tendentzia erakutsi zutenak. Balio hau kalkulatzeko zelula kopuru ezagun bat

erein zen, 5 egun itxaron eta berriro kontatu ziren proliferazio koefizientea lortzeko (1B irudia). Bideragarritasunari dagokionez, MTT frogarekin aztertu zena, aipaturiko kondizioek erakutsi zuten medio komertzialarekiko desberdintasun estatistiko esanguratsuak, bertan hazitako zelulen biziraupen eta aktibitate egokia islatuz (1A irudia). Migratzeko gaitasuna Wound Healing esperimentuarekin neurtu zen, non konfluente dagoen zelula monogerruza baten zauri bat egiten den, zelulak 72 ordura zauri hori ixteko eduki dezakete gaitasuna neurtuz. Zauriaren itxiera handiagoa Mod 3-an behatu zen, SHEM-5 medio komertzialarekin alderatuta (1D irudia).

Beraz, melanozitoen funtzionaltasuna orokorrean aztertu ondoren, hazkuntza-medioaren egokitasuna bermatzen duten zenbait konposatu aurkitu dira. Morfologian, dendriten garapenean eta zelulen desberdintzapen mailan ikusi dira desberdintasun nagusiak, ET-1 eta bFGF bezalako faktoreek daukaten eraginaz ohartuz. Gainera, α -MSH hormonak sortzen dituen aldaketak nabariak dira, batez ere luzakin zitoplasmatikoen sorreran parte hartuz. Toxina kolerikoaren garrantzia aztertutako ezaugarri guztietan nabarmentzen da, melanozitoen proliferazioa eta bideragarritasuna bultzatuz (1A eta 1B irudiak), baita migrazioa eraginez (1D irudia). Ikusi da, osagai hauek eskuragarri egoteko DMSO eta heparinak paper garrantzitsua betetzen dute hauek modu egokian disolbatzeko. Laburbilduz, neurtutako ezaugarriek dagokionez, MMM, Mod 3 eta Mod4-en efizientzia adierazgarria da (1 irudia). Medio hauek melanozitoen garapen egokiaz gain, linboko epitelio zelulen hazkunderako konposatuak dituztenez, bai LEZA eta bai melanozitoen hedapenerako baliagarriak izan daitezke. Ko-kultibo hau ahalbidetu dezaketen medioen lorpena pausu handi bat da terapia zelularrerako bidean.

1. irudia. Melanozito epidermikoek: Bideragarritasun (A), proliferazio (B) eta migrazio experimentuen (D) emaitzak. Izartxoarekin estatistikoki esanguratsuak diren medioak adierazten dira. * $p > 0.05$, MMrekiko A eta B irudian eta Mod 3-rekiko D irudian



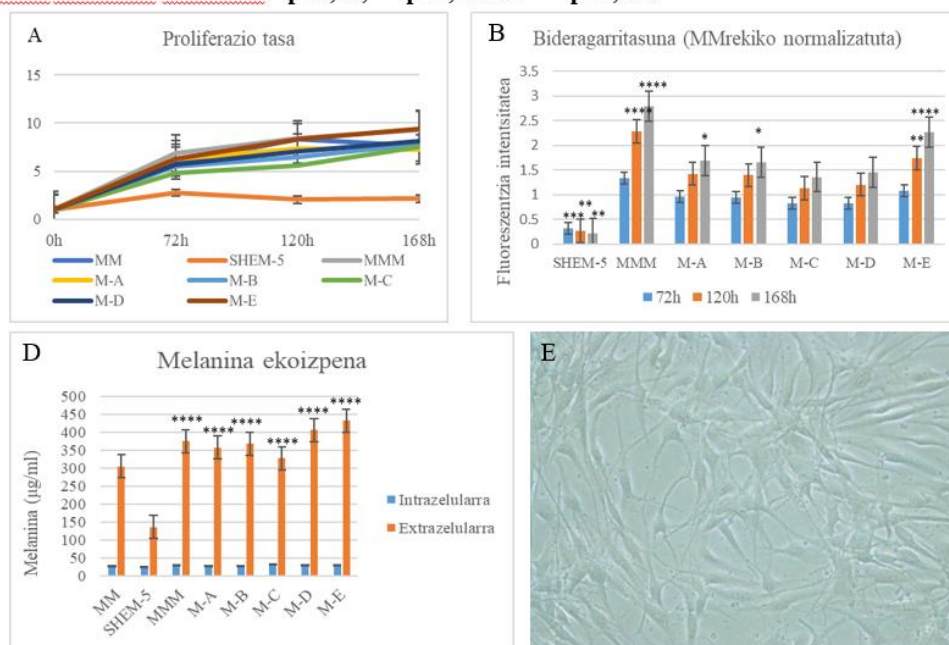
Emaitza hauek behatuta, orokorrean egokienak izan diren medioen optimizazioa izan zen ondorengo helburua. Behien pituitariotik lortutako aterakinik ez izan arren, aurreko esperimentueta emaitza hoberenak lortu zituzten medioek toxina kolerikoa eta DMSO zeuzkaten. Lehenengo konposatu xenogeniko hau bakterio-jatorrikoa da, eta, zenbait txostenen arabera, gizakiengan albo-ondorioak ditu. DMSOari dagokionez, konposatu xenobiotikoa dena, arazo kardiobaskularrak eta arnasketa arazoak sortzen dituela behatu da, efektu hodi-uzkurtzailearen ondorioz (González et al., 2017). Beraz, ordezkapen bezala isoproterenola planteatu da. Agonista beta-adrenergiko ez-selektiboa da, toxina kolerikoaren eta DMSOaren ordezeko gisa balio duela frogatu delarik.

Esperimentuen bigarren txandan, aurretik aztertutako zelulen ezaugarriak ikertu ziren, hazkuntza eta funtzionaltasunarekin erlazionatuta daudenak: morfologia, proliferazioa, eta bideragarritasuna eta melaninaren sintesia. Kasu honetan bideragarritasuna PrestoBlue bidez

neurtu zen. Melaninaren sintesirako L-DOPA estimulatzailea erabiltzen da, gero pigmentu hau bi modutara neurtuz: zelulen barneko melanina (intrazelularra) eta medioan geraturikoa (extrazelularra). Azken hauetan 4 erreplika egin ziren medio bakoitzerako, morfologia eta proliferaziorako berriz erreplika bakarra. Analisi estatistikoa lehenengo txandan egindakoaren berdina izan zen.

M-E medioa (1 Taula) nabarmendu zen melanozito epidermikoaren hazkuntzarako baldintza egokiena bezala, konfluentzia altuak, zelulen ugalketa eta bideragarritasun maila aproposa erakutsi zuelako (2A, 2B eta 2 D irudiak). Gainera, dendrita luzeak eta melanozitoen morfologian funtsezko ezaugarriak diren (Zhang et al., 2004) bestelakoak erakutsi zituzten. MM kontrolarekin alderatuta, M-Ek zelula-ugalketa eraginkorragoa sustatu zuen; SHEMA-5 medioak, berriz, LEZAG-rako egungo terapietan erabiltzen denak (Polisetti et al., 2021), ezohiko morfologia erakusten zuen, ugalketa maila baxuagoak eta bideragarritasun murriztua, agerian utziz ez zela egokia melanozitoen hazkuntzarako. M-Eak ez du toxina koleriko, behi-pituitariotik lortutako aterakin ezta DMSOrik. Hauek ezabatzerakoan, zelulen bideragarritasuna nabarmen hobetu zen eta orkorrean MMM-ren antzeko emaitzak lortu ziren, honek adierazten du hura erabiltzeak ondorio toxikoak saihestu ditzakeela epe luzera kultibatzerakoan.

2 Irudia. Proliferazio (A), bideragarritasun (B), Melaninaren ekoizpena (D), morfologia M-E medioan esperimentuetan lortutako emaitzak. *p<0,05, ** p<0,01 eta * p<0,001**



4. Ondorioak

Buruturiko esperimentuetan giza melanozito epidermikoaren funtzionaltasunari eta hazkuntzari buruzko azterketa sakona egin da, hainbat hazkuntza-medio planteatuz. Nahiz eta Mod 3 eta Mod 4 medioek emaitza egokiak eduki, proliferazio eta funtzionaltasun egoki bat erakutsiz, toxina kolerikoa eta DMSO edukitzeagatik beraien erabilera klinikoak mugatuak izan daitezke.

Hurrengo pausuetan, M-E medioa melanozito epidermikoaren hazkuntzarako alternatiba ezin hobea zela frogatu zen, zelulen ugalketa, bideragarritasuna eta morfologia egokiagoa erakutsiz kontrol-medioekin alderatuz. DMSOa eta toxina kolerikoa kentzeak eta isoproterenolarekin eta α -MSHarekin ordezkatzek indartu egiten dute M-Ek konposatu xenogenikorik gabeko ingurune gisa duen potentziala, eta etorkizun hurbil baten erabilera zabala izan dezake, LEZAG-ren tratamendurako arrisku klinikoak murriztuz eta terapia zelularrean izan zezakeen erabilera erraztuz. Gainera, beraren konposizioak ez du soilik melanozitoen hazkuntza bultzatzen, LEZAG-ko kultiboak burutzeko baliagarria izan liteke ere, zelula amen oligopotentziaren mantenua eta *in vitro* hedapena ahalbidetuz. Kontuan eduki beharra dago, FBS konposatu

xenogenikoa sintetizaturiko medio honen osagaietariko bat izan arren, etorkizunean gizakietatik lortutako serumarekin ordezkatzeari dagoela planteatuta.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lortutako emaitzak ikusita, hurrengo pausua melanozitoak eta linboko zelula amak batera kultibatzea izango litzateke M-E medioa erabiliz eta emaitzak kontrolekin alderatuz, bi zelula moten proliferazioa, bideragarritasuna eta funtzionaltasuna M-E medioak baimentzen duen aztertuz. Honetaz gain, klonogenizitate frogak burutzea interesgarria izango litzateke, non LEZA zelula dentsitate oso baxua ereiten den euren biziraupen eta birsortze ahalmen indibiduala aztertzeko. LEZA koloniak sortzeko gaitasuna daukate (Suanno et al., 2024), eta melanozitoekin batera, gaitasun hori hobetzea espero da. Aipaturikoa M-E medioan egiteko gai diren edo ez ere aztertzeke dago. Eta azkenik, geneen espresioa daukagu, zein zelulen kultiboetan immunoizotokimikaren bidez burutu daitekeen. Oso interesgarria izango litzateke medio desberdinetan korneetatik lortutako zelulek daukaten garapen maila: $\Delta Np63\alpha$ eta CK15 diferentziaturik ez dauden linboko zelula ama epitelialak bereizteko, Melan A eta c-kit linboko melanozitoak markatzeko eta adierazpen konbinatuak euren arteko elkarrekintzak aztertzeko. Esperimentu hauen helburua M-E medio honek LEZA eta melanozitoen hazkuntza, hedapena, mantenua, forma egokia eta dagokien gene espresioa mantentzen duela behatzea da.

6. Erreferentziak

- Albert, P., & Boilly, B. (1988). Effect of transferrin on amphibian limb regeneration: a blastema cell culture study. *Roux's Archives* <https://doi.org/10.1007/bf00427924> of *Developmental Biology*, 197(3), 193–196.
- Calonge, M., Nieto-Miguel, T., De la Mata, A., Galindo, S., Herreras, J. M., & López-Paniagua, M. (2021). Goals and Challenges of Stem Cell-Based Therapy for Corneal Blindness Due to Limbal Deficiency. *Pharmaceutics*, 13(9), 1483. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091483>
- Elhusseiny, A. M., Soleimani, M., Eleiwa, T. K., ElSheikh, R. H., Frank, C. R., Naderan, M., Yazdanpanah, G., Rosenblatt, M. I., & Djalilian, A. R. (2022). Current and Emerging Therapies for Limbal Stem Cell Deficiency. *Stem Cells Translational Medicine*, 11(3), 259–268. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szab028>
- Figueiredo, F., Glanville, J., Arber, M., Carr, E., Rydevik, G., Hogg, J., Okonkwo, A., Figueiredo, G., Lako, M., Whiter, F., & Wilson, K. (2021). A systematic review of cellular therapies for the treatment of limbal stem cell deficiency affecting one or both eyes. *The Ocular Surface*, 20, 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2020.12.008>
- González, S., Chen, L., & Deng, S. X. (2017). Comparative Study of Xenobiotic-Free Media for the Cultivation of Human Limbal Epithelial Stem/Progenitor Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 23(4), 219–227. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2016.0388>
- Hernández-Moya, R., González, S., Urkaregi, A., Pijoan, J. I., Deng, S. X., & Andollo, N. (2020). Expansion of Human Limbal Epithelial Stem/Progenitor Cells Using Different Human Sera: AMultivariate Statistical Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/ijms21176132>
- Kent KD, Bomser JA. (2003) . Bovine pituitary extract provides remarkable protection against oxidative stress in human prostate epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 39(8-9),388-94.
- Klar, A. S., Biedermann, T., Michalak, K., Michalczyk, T., Meuli-Simmen, C., Scherberich, A., Meuli, M., & Reichmann, E. (2017). Human Adipose Mesenchymal Cells Inhibit Melanocyte Differentiation and the Pigmentation of Human Skin via Increased Expression of TGF- β 1. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(12), 2560–2569. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.06.027>

- Ling, L., Camilleri, E. T., Helledie, T., Samsonraj, R. M., Titmarsh, D. M., Chua, R. J., ... Cool, S. M. (2016). Effect of heparin on the biological properties and molecular signature of human mesenchymal stem cells. *Gene*, 576(1), 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.10.039>
- Masood, F., Chang, J.-H., Akbar, A., Song, A., Hu, W.-Y., Azar, D. T., & Rosenblatt, M. I. (2022). Therapeutic Strategies for Restoring Perturbed Corneal Epithelial Homeostasis in Limbal Stem Cell Deficiency: Current Trends and Future Directions. *Cells*, 11(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/cells11203247>
- Mirea, M., Eckensperger, S., Hengstschläger, M., & Mikula, M. (2020). Insights into Differentiation of Melanocytes from Human Stem Cells and Their Relevance for Melanoma Treatment. *Cancers*, 12(9), 2508. <https://doi.org/10.3390/cancers12092508>
- Osei-Bempong, C., Figueiredo, F. C., & Lako, M. (2012). The limbal epithelium of the eye – A review of limbal stem cell biology, disease and treatment. *BioEssays*, 35(3), 211-219. <https://doi.org/10.1002/bies.201200086>
- Padma, D. (2016). A Comparison Between Phorbol 12 Myristate 13 Acetate and Phorbol 12, 13 Dibutyrate in Human Melanocyte Culture. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2016/15544.7115>
- Polisetti, N., Schlötzer-Schrehardt, U., Reinhard, T., & Schlunck, G. (2020). Isolation and enrichment of melanocytes from human corneal limbus using CD117 (c-Kit) as selection marker. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74869-1>
- Polisetti, N., Gießl, A., Zenkel, M., Heger, L., Dudziak, D., Naschberger, E., Stich, L., Steinkasserer, A., Kruse, F. E., & Schlötzer-Schrehardt, U. (2021). Melanocytes as emerging key players in niche regulation of limbal epithelial stem cells. *The Ocular Surface*, 22, 172–189. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2021.08.006>
- Romo-Valera, C., Pérez-Garrastachu, M., Hernáez-Moya, R., Rodríguez-Astigarraga, M., Romano Ruiz, P., Etxebarria, J., ...Andollo, N. (2021). Characterisation of corneas following different time and storage methods for their use as a source of stem-like limbal epithelial cells. *Experimental Eye Research*, 211, 108720. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108720>
- Secker, G. A., & Daniels, J. T. (2009). Limbal epithelial stem cells of the cornea. In *StemBook*. Harvard Stem Cell Institute. <https://doi.org/10.3824/stembook.1.48.1>
- Suanno, G., Genna, V. G., Maurizi, E., Dieh, A. A., Griffith, M., & Ferrari, G. (2024). Cell therapy in the cornea: The emerging role of microenvironment. *Progress In Retinal And Eye Research*, 102, 101275. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2024.101275>
- Tonti, E., Manco, G. A., Spadea, L., & Zeppieri, M. (2023). Focus on limbal stem cell deficiency and limbal cell transplantation. *World Journal Of Transplantation*, 13(6), 321-330. <https://doi.org/10.5500/wjt.v13.i6.321>
- Zhang, R., Zhu, W., Xia, M., & Feng, Y. (2004). Morphology of Cultured Human Epidermal Melanocytes Observed by Atomic Force Microscopy. *Pigment Cell Research*, 17(1), 62–65. <https://doi.org/10.1046/j.1600-0749.2003.00111.x>

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa-azterlan hauek Ikerketa-taldeen (IT524-22) eta Eusko Jaurlaritzako Osasun sailaren (2023111027) dirulaguntzak jaso zituzten. A.A.A.k Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) beka jaso zuen.