



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“Generación de Aloinjerto Simbiótico Temporal
de Membrana Amniótica Humana con Microalga
Fotosintética *Chlamydomonas reinhardtii*”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas,
mención en Biología Celular y Molecular**

KARINA QUEVEDO GONZÁLEZ

**Director: Sebastián San Martín Henríquez
Codirector: José Tomás Egaña E; Ivo Carrasco W**

Marzo 2023



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“Generación de Aloinjerto Simbiótico Temporal
de Membrana Amniótica Humana con Microalga
Fotosintética *Chlamydomonas reinhardtii*”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas,
mención en Biología Celular y Molecular**

KARINA QUEVEDO GONZÁLEZ

**Director: Sebastián San Martín Henríquez
Codirector: José Tomás Egaña E; Ivo Carrasco W**

Marzo 2023



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Generación de Aloinjerto Simbiótico Temporal de Membrana
Amniótica Humana con Microalga Fotosintética
Chlamydomonas reinhardtii”

Alumno: Karina Quevedo González

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del Dr. Sebastián San Martín
Henríquez en el laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad de
Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dra. Daniela López E
Presidente Comisión

Dra. Sandra Montedonico R
Profesor Informante

Dr. Antonio Eblen-Zajjur
Profesor Informante

Dr. Sebastián Andrés San Martín Henríquez
Director de Tesis

**Viña del Mar, Chile
2023**

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS.

Dedicado a mi familia y amigos/as, que, gracias a su apoyo incondicional y a sus palabras de aliento durante los momentos más difíciles, permitió llevar a cabo este trabajo de investigación.

Agradecimientos al grupo de investigación del Laboratorio de Ciencia Morfológicas de la Universidad de Valparaíso, en especial, al Dr. Sebastián San Martín y Juan Varas, por la ayuda, guía y apoyo durante todo el proyecto. De igual manera, al grupo de investigación del Dr. Tomás Egaña, en especial a Rocío Corrales, que, sin su apoyo en la obtención de resultados claves, este innovador proyecto no se habría logrado desarrollar.

Finalmente, a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), por el financiamiento a través del concurso de FONDEF Valorización de la Investigación en la Universidad (VIU) 2020 denominado "*Amniogreen: Apósito simbiótico fotosintético para el tratamiento de heridas crónicas*".

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ATP: Adenosín Trifosfato

AH: Ácido Hialurónico

bFGF: Factor De Crecimiento Fibroblástico Básico

C. reinhardtii: *Chlamydomonas reinhardtii*

CD4+: Linfocitos T Cooperadores

CD8+: Linfocitos T Citotóxicos

Cod: Código

COXs: Ciclooxygenasas

dMA: Membrana Amniótica Descelularizada

dMAB: Membrana Amniótica Descelularizada Del Grupo B

dMAC: Membrana Amniótica Descelularizada Del Grupo C

dMAD: Membrana Amniótica Descelularizada Del Grupo D

DMSO: Dimetilsulfóxido

dsDNA: Double Stranded Deoxyribonucleic acid

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EGF: Factor De Crecimiento Epitelial

Em: Emisión

Ex: Excitación

FGF: Factor De Crecimiento Fibroblástico

GAGs: Glicosaminoglicanos

H&E: Hematoxilina & Eosina

HGF: Factor De Crecimiento De Hepatocitos

HLA-A: Antígeno Leucocitario Humano A

HLA-B: Antígeno Leucocitario Humano B

HLA-C: Antígeno Leucocitario Humano B

HULK: Hyperoxie Unter Licht Konditionierung

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina 10

IL-6: Interleucina 6

IOI: Intensity Of Interest

KGF: Factor De Crecimiento De Queratinocito

M1: Macrófago Fenotipo Proinflamatorio

M2: Macrófago Fenotipo Antiinflamatorio

MA: Membrana Amniótica

MEC: Matriz Extracelular

MHC-1: Complejo Mayor De Histocompatibilidad 1

MINSAL: Ministerio De Salud (Chile)

MMP-2: Metaloproteinasa De Matriz 2

MMP-9: Metaloproteinasa De Matriz 9

MMP: Metaloproteinasa De Matriz

NGF: Factor De Crecimiento Nervioso

nMA: Membrana Amniótica Nativa

O.C.T: Optimal Cutting Temperature Compound

PBS: Buffer Fosfato Salino

PDGF: Factor De Crecimiento Derivado De Plaquetas

ROI: Region Of Interest

ROS: Especies Reactivas De Oxígeno

sGAG: Glicosaminoglicanos Sulfatados

TAP: Tris Fosfato Acetato

TE: Ingeniería De Tejidos

TGF- α : Factor De Crecimiento Transformante Alfa

TGF- β : Factor De Crecimiento Transformante Beta

TNF- α : Factor De Necrosis Tumoral Alfa

UV-VIS: Ultravioleta - Visible

VIU: Valorización De La Investigación En La Universidad

ÍNDICE

<i>RESUMEN.....</i>	<i>9</i>
<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>10</i>
<i>HIPÓTESIS.....</i>	<i>22</i>
<i>OBJETIVO GENERAL.....</i>	<i>22</i>
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	<i>22</i>
<i>METODOLOGÍA</i>	<i>23</i>
<i>RESULTADOS.....</i>	<i>35</i>
<i>DISCUSIÓN</i>	<i>49</i>
<i>CONCLUSIONES</i>	<i>54</i>
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	<i>55</i>
<i>ANEXOS.....</i>	<i>62</i>

RESUMEN

Durante las últimas tres décadas han existido grandes avances en la ingeniería de tejidos de la piel, permitiendo desarrollar sustitutos dérmicos como tratamientos alternativos. La membrana amniótica humana (MA) se ha destacado para el tratamiento de heridas con propósitos reconstructivos, dadas sus capacidades antiinflamatorias, promotor de la epitelización e inhibición de la fibrosis. No obstante, el suministro apropiado de oxígeno en la zona de la herida continúa siendo una gran problemática. La matriz fotosintética HULK, desarrollada mediante el cultivo de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* en una matriz comercial (Integra®), soluciona esta problemática. En este estudio se propone la generación de un aloinjerto simbiótico temporal (MA-microalga), que permite la conjugación de las propiedades fotosintéticas y regenerativas en un solo implante. En una primera fase se procedió a la descelularización de la MA (dMA) y así exponer los componentes de la matriz extracelular (MEC) y una mejor siembra de las microalgas. Se evaluó tres protocolos de descelularización y sus efectos sobre los componentes de la MEC. Se obtuvo una dMA con la capa epitelial, la matriz extracelular de colágeno y glicosaminoglicanos sulfatados intactos. En la segunda fase, se comparó la capacidad de siembra y viabilidad de las microalgas entre la MA nativa (nMA) y la dMA en cultivo sólido y líquido. Se evidenció la viabilidad de las microalgas durante 14 días en ambos métodos de co-cultivo, una eficiente integración y mayor proliferación de las microalgas en el co-cultivo sólido con la nMA. La capacidad fotosintética y la producción de oxígeno fue un 52.85% mayor en los co-cultivos sólidos con nMA, en comparación con la dMA y los co-cultivos líquidos. Estos resultados sugieren fuertemente la viabilidad del método para desarrollar el primer tejido simbiótico humano, basado en el co-cultivo sólido de *C. reinhardtii* en una MA humana nativa, capaz de generar oxígeno fotosintéticamente y con potencial aplicación clínica.

Palabras Claves: Membrana amniótica humana, descelularización, *Chlamydomonas reinhardtii*, herida crónica, ingeniería de tejidos, aloinjerto dérmico.

INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, con un área aproximada de 1.7 m² (1). Cumple un papel crucial siendo una barrera de protección, aislando al organismo del medio que lo rodea, protegiéndolo frente a factores externos como bacterias y sustancias químicas; regulando la temperatura; al igual que la homeostasis de los fluidos y cumple una importante función sensorial (2). Es una estructura extremadamente compleja, conformada por 3 capas principales: (I) La epidermis, que es la capa más externa, de aproximadamente 0.2 mm de espesor y compuesta principalmente de queratinocitos y queratina. Estos al madurar experimentan un proceso llamado queratinización, en donde su núcleo y citoplasma son remplazados por queratina, formando una capa celular aplanada, compacta, resistente a la fricción, impermeable al agua y casi impenetrable por bacterias, otorgándole protección al cuerpo de los daños externos; (II) La dermis, esta es la capa intermedia y está compuesta principalmente por una matriz extracelular de colágeno, glicosaminoglicanos (GAGs), ácido hialurónico (AH), elastina y en menor proporción por su constituyente celular principal, los fibroblastos, proporcionando la fuerza física, así como la flexibilidad de la piel. Por último, (III) la hipodermis, la capa más profunda, está compuesta primordialmente por tejido conjuntivo laxo, en donde están contenidos adipocitos y numerosos vasos sanguíneos, que le dan el aporte de gases y nutrientes a las capas más superficiales (Figura 1) (1,2).

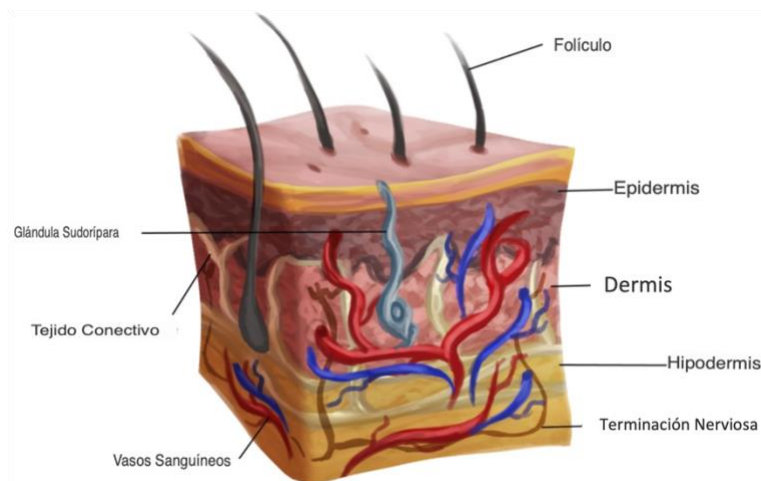


Figura 1. Estructura anatómica de la piel humana. Modificado de Vig et al 2017.

Una herida en la piel, puede ir acompañada de una alteración de la estructura y función del tejido normal subyacente, puede originarse por la rotura precisa del bisturí del cirujano (incisión) o por un daño extendido (traumatismo mayor, quemaduras u otras), que debe ser restaurada rápidamente en vista de las funciones cruciales que cumple este órgano (2,3).

El proceso de cicatrización ocurre como una cascada sistemática de procesos superpuestos, los cuales, se encuentran cuidadosamente regulados, involucrando una amplia comunicación entre los diferentes componentes celulares de los diversos componentes de la piel y su matriz extracelular (MEC) (4). Estos procesos implican cuatro fases principales: Hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación/maduración de la cicatriz (Figura 2) (3,4).

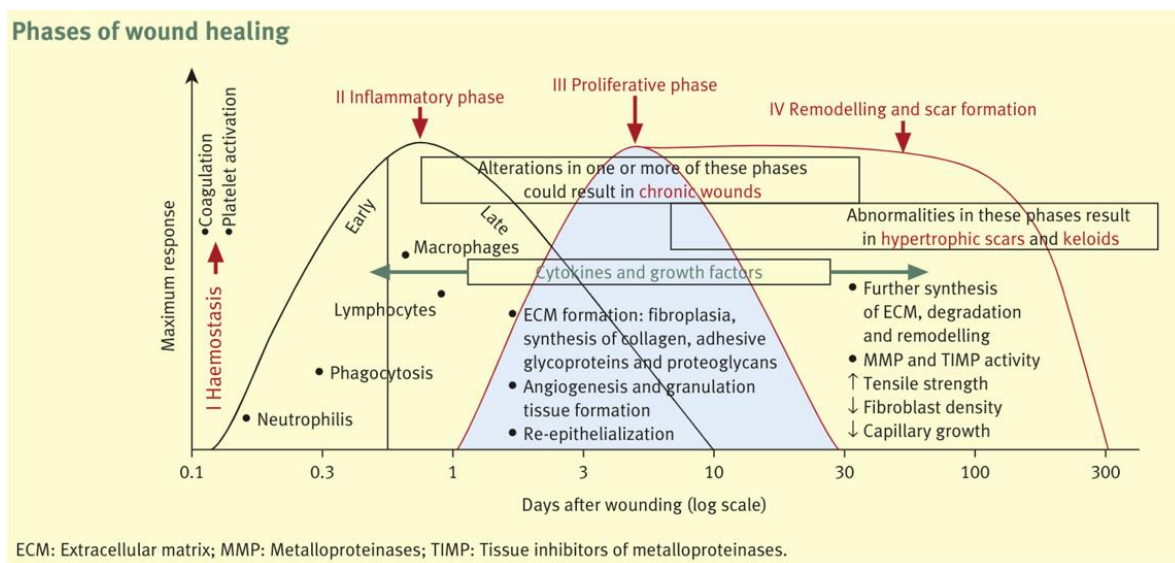


Figura 2. Fases principales del proceso de cicatrización. Enoch & David 2008.

La hemostasia o coagulación es la fase inicial y comienza inmediatamente después de ocurrir la lesión, caracterizándose por la activación plaquetaria y la liberación de factores de coagulación lo que conlleva a la formación de una red (coágulo) de plaquetas, fibrina y trombina, asegurando de esta manera la detención de la hemorragia. Adicionalmente se liberan factores de crecimiento esenciales por parte de las plaquetas, tales como, el

factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), estimulando la quimiotaxis de neutrófilos, macrófagos, células de músculo liso y fibroblastos al sitio de la herida; además, la liberación de citoquinas adicionales (FGF, TNF- α y IL-1) así como la activación de la cascada del ácido araquidónico y sus productos como las prostaglandinas en especial del grupo E y la relevante acción de las ciclooxygenasa 1 y 2 (COXs) (3-11).

La fase inflamatoria, inicia a continuación, mediante la infiltración de neutrófilos y macrófagos proinflamatorios (M1) al sitio de la herida. Durante esta fase se eliminan, vía fagocitosis, materiales extraños, bacterias y tejido necrótico presente en la herida. Además, ocurre la liberación de más PDGF, TGF- β , los que atraen aún más fibroblastos y células de músculo liso al sitio de la lesión (5,6,8). La fase proliferativa o de reparación, se caracteriza por el desarrollo del proceso de re-epitelización, angiogénesis, formación de tejido granular y deposición de nueva MEC como por ejemplo colágeno tipo III, a través de la activación de queratinocitos, fibroblastos, macrófagos antiinflamatorios (M2) y células endoteliales, con el propósito final del cierre de la herida y la neovascularización del nuevo tejido (5,6,8). La fase de remodelación/maduración, es la última etapa en el proceso de cicatrización, en donde se produce la degradación de la MEC provisional y del colágeno tipo III sintetizado anteriormente, siendo remplazado por colágeno tipo I, otorgándole resistencia a la tracción mecánica al nuevo tejido (6,8).

En lesiones leves y en condiciones fisiológicamente normales, la restauración de la barrera epidérmica es altamente eficiente. No obstante, cuando ocurre una lesión más profunda o existe la presencia de factores o de enfermedades concomitantes, tales como, infecciones, diabetes, enfermedades vasculares, cáncer, reacciones inmunes de diverso origen, entre otras, se produce una alteración en la microvasculatura del tejido y por tanto la reducción del suministro de oxígeno al área afectada, impactando negativamente en el proceso de cicatrización y de esta forma desencadenado en la generación de una lesión ulcerativa de la piel o herida crónica (4).

Las heridas crónicas se definen como lesiones cutáneas que no han progresado a través de un proceso de reparación normal, ordenado y oportuno, fallando en la restauración

de la integridad anatómica y funcional del tejido lesionado, por un período mayor a tres meses (12,13) o más en caso de traumatismo reiterado. Se ha observado, en este contexto, que la falla en la progresión de la fase inflamatoria del proceso de cicatrización es una de las características principales en heridas crónicas (14). Específicamente, se ha evidenciado la presencia de una cantidad excesiva de macrófagos de fenotipo proinflamatorios (M1), en comparación con el fenotipo antiinflamatorio (M2), los cuales presentan además una limitada capacidad fagocítica (15). Se observa, también, un aumento en la liberación de citoquinas proinflamatorias, tales como $\text{TNF-}\alpha$ y IL-1, que a su vez inducen al reclutamiento adicional de células inflamatorias, lo que resulta en un estado de inflamación crónica (14,15). Adicionalmente, se ha descrito la liberación de una serie de proteasas y metaloproteínasa de matriz (MMP), como MMP-2 y MMP-9, por parte de los macrófagos presentes, provocando la degradación de la MEC, además de alterar la actividad de los factores de crecimiento y proteínas necesarias para la progresión a las fases proliferativas y de remodelación del proceso de cicatrización (14,15).

Actualmente, con una prevalencia mundial del 1-2% aproximadamente, las heridas crónicas se han descrito como una epidemia mundial silenciosa en aumento. Afectando mayoritariamente a la población adulta mayor, de la cual va asociado en un aumento en las comorbilidades y enfermedades crónicas (obesidad, diabetes, ateromatosis y arterioesclerosis) que aquejan a esta población. Existe una proyección de más de 400 millones de diabéticos a nivel mundial para el año 2024, aumentando principalmente en las regiones de Asia, África y América del Sur (16) . En el ámbito nacional, en la última encuesta nacional de salud 2016-2017 del Ministerio de Salud (MINSAL), se reportó que 12,3% de la población nacional padece de diabetes. De estos últimos, el 15% presentaron una probabilidad de desarrollar úlceras en miembros inferiores en especial de pie diabético y con un 85% de probabilidad de la necesidad de realizar la amputación de la extremidad afectada (17).

Además, el enorme costo de los tratamientos, la prolongada atención médica para la realización de los tratamientos, la incapacitación laboral y el trauma emocional de los pacientes, contribuyen al enorme impacto socioeconómico asociado a estas lesiones

cutáneas. Por lo tanto, facilitar la curación, conseguir la restauración máxima de la función tisular, mejorar la calidad de vida y rebajar los costos de los tratamientos, siguen siendo una preocupación central en la atención clínica para el tratamiento de este tipo de heridas (4,18–20).

En la actualidad el tratamiento clínico para el manejo de heridas crónicas se basa en tratamientos paliativos, principalmente de limpieza y vendaje del área afectada, para evitar de esta manera la generación de infecciones, complementados con el tratamiento y control de la enfermedad de base y fármacos vasodilatadores, reductores de la viscosidad sanguínea, y gabapentinoides para el tratamiento del dolor crónico de base neuropática (13,21). Sin embargo, son procesos muy largos con varias sesiones de curaciones y con un bajo porcentaje de cierre de la herida (21).

Durante las últimas tres décadas han existido avances extraordinarios en el campo de la ingeniería de tejidos (TE) de la piel (2,22). Se han logrado desarrollar sustitutos dérmicos, los cuales cumplen con el rol fundamental de remplazar las funciones de la piel, ya sea temporalmente y/o permanentemente, los cuales están compuestos básicamente por una matriz de materiales sintéticos y/o naturales con el requerimiento fisicoquímico apropiado, lo que permite soportar, guiar y estimular el crecimiento del nuevo tejido. Se han logrado clasificar en 3 categorías y con sus concomitantes subclasificaciones: (1) Clase I, Materiales de vendaje temporales: (a) Capa única y (b) Doble capa; (2) Clase II, Sustitutos permanente de una capa: (a) Epidérmicos y (b) Dérmicos; y, (3) Clase III, Sustitutos compuestos: (a) Injertos de piel; (b) Piel de ingeniería tisular (23–26) y (c) Xenoinjertos (27,28). En la actualidad, ha predominado el uso de matrices descelularizada por la TE de la piel, como una novedosa estrategia para la regeneración tisular, destacando de esta manera, la estructura única de la MEC y sus propiedades, tales como, la presencia de factores de crecimiento, además de glicoproteínas como la laminina y fibronectina, aumentando la adhesión de las células al andamio (29,30). Además, se ha descrito la participación de la MEC en la mitogénesis y quimiotaxis celular, en la diferenciación celular e inducción de la respuesta regenerativa para la remodelación tisular (31). A pesar de todo estos avances, siguen existiendo limitaciones, tales como, el alto costo de producción y de mantención, rechazos inmunológicos y pobres resultados en la recuperación completa de la piel (24,32). Estos

fracasos se deben fundamentalmente a que con estos recursos no se resuelve el problema de base que es el bajo aporte de oxígeno por parte de la microvasculatura local afectada por los procesos fisiopatológicos diabéticos (arterioesclerosis) (33,34). Por lo tanto, existe la gran necesidad de encontrar un biomaterial pro-regenerativo, biocompatible, con alta capacidad de retención de humedad, óptima elasticidad y una porosidad adecuada que permita el intercambio libre de gases y nutrientes, principalmente el suministro apropiado de oxígeno, para su uso como sustituto dérmico (19,24,35-38)

Una de las matrices destacadas y prometedoras para la ingeniería de tejido (TE) de la piel, es la membrana amniótica humana (MA). La MA es un tejido delgado que delimita completamente la cavidad amniótica, conteniendo al líquido amniótico y al embrión/feto suspendido, por lo cual adopta una disposición interna con respecto a la placenta (Figura 3). La función principal de la MA es la de proteger al feto de factores externos no deseados durante todo el desarrollo intrauterino manteniendo el contenido feto-amniótico (39,40).

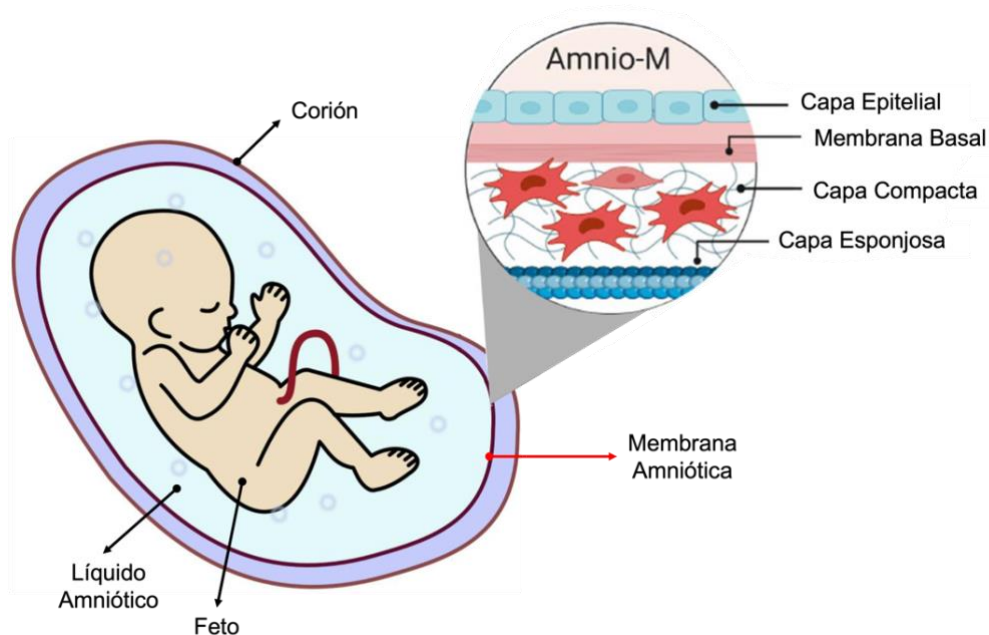


Figura 4. Membrana amniótica humana, su ubicación durante la gestación y sus capas histológicas. Modificado de Elkhenany et al 2022 y Schmiedova et al 2021.

La MA tiene forma discoide, con un diámetro de 15 a 20 cm, su grosor varia de 20 a 500 μm y consta de 5 capas principales: (1) La capa epitelial, constituida por una monocapa de células epiteliales; (2) la membrana basal gruesa, compuesta por gran cantidad de proteoglicanos ricos en heparán sulfato de la cual adyacentemente se encuentra (3) la capa compacta, formada principalmente por colágeno I, III y elastina, que en conjunto forman el esqueleto fibroso de la MA; (4) la capa fibroblástica, es la capa más gruesa y está compuesta por una red de fibroblastos en una matriz fibrilar y (5) la capa esponjosa, representa la capa de transición entre el amnios y el corion y está compuesta por una matriz de colágeno III con un abundante contenido de glicosaminoglicanos (GAGs; Figura 3) (40–42).

La MA es una estructura avascular, la cual además no presenta nervios, músculos ni tejido linfático, pero a pesar de ello, tiene múltiples funciones metabólicas, como el transporte de agua y materiales solubles y la producción de factores bioactivos, incluidos factores de crecimientos y citoquinas (41).

Esta membrana ha sido utilizada con éxito para el tratamiento de heridas y con propósitos reconstructivos desde principios del siglo XX, siendo por primera vez descrito su uso en 1910 por John Staige Davis, como material quirúrgico en el trasplante de piel (43,44). Desde ese entonces el uso de la MA se ha extendido a una variedad de especialidades médicas, incluyendo dermatología, oftalmología, urología, otorrinolaringología, cirugía plástica y oncología (24,39,44).

A lo largo de los años, se han descrito numerosas propiedades regenerativas a la MA, las cuales han resultado beneficiosas. En primera instancia, su aplicación en el lecho de la herida otorga un efecto de barrera previniendo la desecación y la pérdida de fluidos, además de generar un efecto analgésico al proteger las terminaciones nerviosas expuestas en la zona de la lesión (40). Por otro lado, se destaca por ser un material no inmunogénico, debido a la nula expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad 1 (MHC 1) tipo antígeno leucocitario humano (HLA-A, B, C). Además de ser un material de descarte luego del parto, de fácil obtención, procesamiento y transporte (39,40,45).

Adicionalmente, se ha demostrado la liberación de IL-10 por parte de las células epiteliales de la MA, que le otorga un importante efecto antiinflamatorio debido a su efecto supresor de citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α , además de la secreción de trombospondina-1, antagonistas del receptor de IL-1 (39,40). Lei y colaboradores en el 2017, determinaron la existencia de MMP en la MA, pero con un alto nivel de sus inhibidores. Al realizar los ensayos de actividad de proteasa, revelaron que las MMP se encontraban principalmente en su forma latente o en complejo con inhibidores, amplificando la propiedad antiinflamatoria de este tejido, propiedad que se ha propuesto como la responsable de que, durante la gestación, la reparación tisular sea esencialmente sin cicatriz (46–48).

Además, la MA contiene una decena de factores de crecimiento, destacándose, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), el factor de crecimiento de queratinocito (KGF), factores de crecimiento transformante (TGF α y TGF β), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), los cuales cumplen un rol esencial en los procesos fisiológicos que conducen a la cicatrización normal de heridas y la regeneración de tejidos (40).

En el año 2019, Murphy y colaboradores (24) utilizando un modelo de herida de piel completa en porcino, evaluaron la eficacia de cicatrización de dos presentaciones de la membrana amniótica (hidrogel y polvo) y lo compararon con productos comerciales actualmente disponibles: (1) AmnioGraft, constituido básicamente por membrana amniótica criopreservada; y (2) Graftjacket, matriz regenerativa de dermis humana descelularizada. Como resultado demostraron que en aquellos tratamientos en los cuales se hizo uso de la MA en hidrogel y polvo había una rápida y significativa cicatrización, impulsando el cierre de la herida mediante procesos de epitelización en vez de contracción; este último mecanismo predominó mediante la utilización de los productos comerciales. Además, al realizar el análisis histológico, observaron una promoción en la formación de epidermis y dermis madura con una composición similar a la de una piel sana.

Adicionalmente a estos positivos resultados en un modelo de porcino, en el año 2019, Hashemi et al (15), realizaron un ensayo clínico aleatorizado, con cinco pacientes de

entre 30 y 60 años con heridas crónicas diabéticas, las cuales fueron tratadas con membrana amniótica descelularizada sembrada con células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical, aplicada durante 9 días con un seguimiento de 1 mes, observándose una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.002$) en el tiempo de curación y en el tamaño de la herida en los pacientes tratados, al comparar a los pacientes con sus condiciones iniciales al tratamiento.

Gracias a los resultados obtenidos de los estudios anteriormente descritos, es que se logra demostrar el potencial valor de la MA para futuros tratamiento de heridas dérmicas en personas, específicamente de heridas crónicas, destacando principalmente su acción antiinflamatoria (14), promotor de epitelización (24) y su acción como un andamio celular o matriz biológica (18), propiciando de esta manera un proceso de cicatrización eficiente.

A pesar de todo lo anteriormente descrito y a los grandes avances en la TE de la piel, el suministro apropiado de oxígeno continúa siendo uno de los grandes problemas transversales en el diseño de sustitutos dérmicos (36,38)

El oxígeno es una molécula clave durante todo el proceso de cicatrización debido a su participación directa en una serie de procesos fisiológicos y de señalización celular esenciales para la cicatrización, destacando su participación en la producción necesaria de energía (ATP) y de especies reactivas de oxígeno (ROS), además, de su rol en el control de infecciones al eliminar las bacterias a través de oxidación, así como de estimular la producción de componentes de la MEC y angiogénesis. Por lo tanto, una falla en el suministro apropiado de oxígeno en el sector de la herida conllevará a la generación de una herida crónica (Figura 4). En particular, bajo condiciones de significativa hipoxia, la producción de ATP vía fosforilación oxidativa se detiene y los sistemas de transportadores transmembranas dependientes de ATP, tales como, Na^+/K^+ -ATPasa o Ca^{+2} -ATPasa fallan, provocando la acumulación de Ca^{+2} intracelular, estimulando la liberación de citoquinas proinflamatorias, como $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1, atrayendo a neutrófilos y macrófagos al sitio de la herida. Adicionalmente, bajo estas condiciones, se facilita la producción de ROS, exacerbando el daño tisular y por lo tanto afectando negativamente la reparación de la herida (12,49). Este escenario se complica aún más,

por cuanto metabólicamente el estado hiperglicémico diabético aporta mucha más glucosa en un ambiente hipóxico desviando el metabolismo hacia la fermentación y la consecuente acidificación tisular debido al incremento del lactado y del piruvato (34,50,51).



Figura 5. Hipoxia y sus consecuencias fisiológicas en el proceso de cicatrización.

Modificado de Eming et al 2014.

Para combatir esta problemática en el año 2014, Hopfner y colaboradores desarrollaron una matriz fotosintética denominada **HULK** (por sus siglas en alemán **H**yperoxie **U**nter **L**icht **K**onditionierung), mediante el cultivo de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) en una matriz comercial de colágeno (Integra® bilayer matrix), otorgándole la capacidad de producir oxígeno al ser expuesto a la luz. Desde su publicación se ha investigado intensamente su aplicación como sustituto dérmico temporal para el tratamiento de heridas (36,38,52,53).

Schenck et al., en el año 2015, aplicaron la matriz HULK en heridas de piel completa en ratones desnudos atímicos y observaron el desarrollo de un tejido quimérico (mamífero + células fotosintéticas) en dichas lesiones, sin una aparente respuesta inmune innata significativa, frente a la presencia de la microalga. No obstante, debido a que el modelo de estudio utilizado no tiene una respuesta inmunológica completa, el mismo grupo de investigación, replicó el diseño experimental, pero utilizando ratones inmunocompetentes y de esta forma corroborar sus resultados. A los 14 días posterior a la administración de HULK, no se observaron signos de inflamación ni existió un aumento significativo en la activación leucocitaria entre HULK y el control (38). Además, observaron un mayor reclutamiento de células endoteliales y la formación de un tejido granular bajo la matriz HULK, el cual revestía por completo a la herida, con una unión firme al musculo subcutáneo y a los bordes de la dermis (38). Cabe destacar que el proceso de epitelización depende de la presencia de una base de tejido granular sano, en donde su desarrollo es dependiente de oxígeno (54). Por lo tanto, los autores concluyen que la matriz fotosintética puede ser implantada en hospederos inmunocompetentes, sin causar inflamación ni desencadenar una respuesta inmune, promoviendo la epitelización y favoreciendo de esta manera el proceso de cicatrización (36,38,52).

En el año 2021, Obaíd et al (53), ejecutaron el primer ensayo clínico de fase 1 de la matriz fotosintética HULK, evaluando su seguridad y viabilidad en el tratamiento de heridas cutáneas de espesor completo en humanos. El estudio se realizó con ocho pacientes inmunocompetentes y sin comorbilidades asociadas, de entre 21 y 63 años de edad, portadores de heridas de espesor completo, la cuales fueron tratadas con la matriz fotosintética durante 21 días con un seguimiento de 3 meses, donde no se observaron signos de inflamación en el sitio de la lesión tratada, tales como edema o eritema, durante todo el tratamiento, concordando con los resultados de la autoevaluación realizada por los pacientes, donde no se informó niveles significativos de malestar.

Uno de los resultados más relevante del ensayo, fue la baja respuesta inmunitaria observada frente a HULK, donde no se evidenció un aumento significativo en el porcentaje total de linfocitos T, ya sea colaboradores (CD4+) como citotóxicos (CD8+)

luego de iniciado el tratamiento. Situación similar se observó con la liberación de citoquinas inflamatorias, no evidenciándose un aumento significativo en su concentración. Adicionalmente, mediante el análisis histológico de biopsias obtenidas durante el transcurso del ensayo, se evidenció una coexistencia, en la matriz HULK, de microalgas y células infiltradas del propio paciente, las que incluyeron fibroblastos, macrófagos y de neovascularización en la herida, indicando una excelente integración entre la matriz fotosintética y el lecho de la herida.

Gracias a estos resultados, se demostró el potencial valor del uso de organismos fotosintéticos cultivados en matrices comerciales sintéticas, logrando la administración local y controlada de oxígeno al lecho de la herida y estimulando de esta manera la regeneración tisular en el tratamiento de heridas de la piel (53,55,56).

Por consiguiente, en el presente estudio se propone la generación de un aloinjerto simbiótico temporal, utilizando la matriz extracelular biológica de la membrana amniótica humana para ser cultivada con la microalga *C. reinhardtii* (Figura 5), potenciando de esta manera las propiedades regenerativas de la MA, además, de permitir la conjugación de las propiedades fotosintéticas y regenerativas en un solo implante.

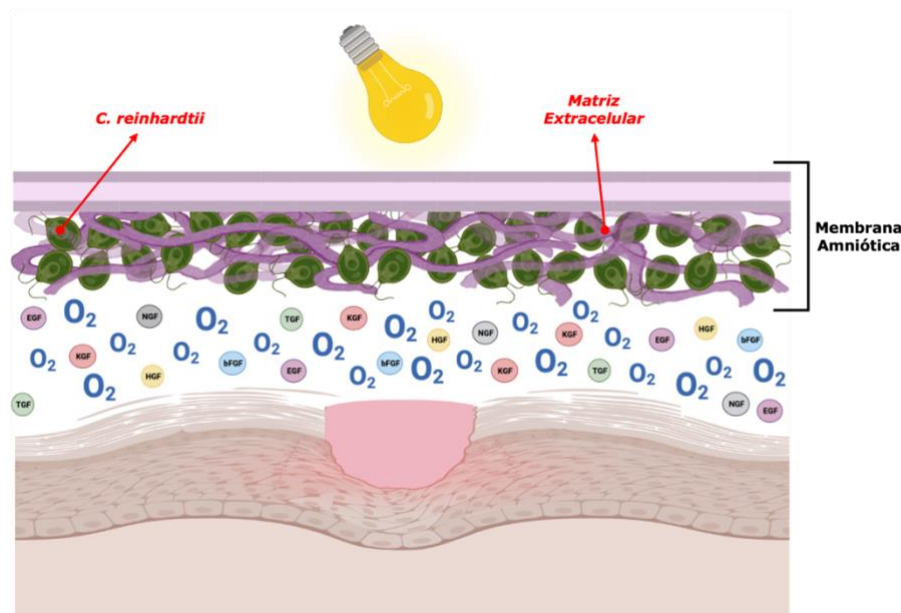


Figura 6. Esquema representativo de aloinjerto simbiótico temporal de membrana amniótica humana descelularizada cultivada con

HIPÓTESIS

La microalga *C. reinhardtii* es incorporada eficientemente a la membrana amniótica humana descelularizada, otorgándole un óptimo ambiente para su proliferación y capacidad fotosintética.

OBJETIVO GENERAL

Generar un aloinjerto simbiótico temporal de membrana amniótica humana descelularizada cultivada con microalgas *C. reinhardtii* con capacidad de liberar oxígeno frente a un estímulo lumínico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la eficiencia de la descelularización y su efecto sobre los componentes de la matriz extracelular de la membrana amniótica humana mediante tinciones histológicas y cuantificación de ADN, colágeno y glicosaminoglicanos sulfatados (sGAG)
2. Comparar histológica y fisiológicamente la integración de cultivo de *C. reinhardtii* en la membrana amniótica nativa (nMA) y descelularizada (dMA).
3. Evaluar la capacidad fotosintética de la nMA y dMA cultivadas con *C. reinhardtii* mediante las determinaciones de clorofila y oximetría.

METODOLOGÍA

El siguiente estudio se encuentra enmarcado en el proyecto de investigación VIU de FONDEF código VIU20P0096 denominado "Amniogreen: Apósito simbiótico fotosintético para el tratamiento de heridas crónicas".

1. Diseño Experimental

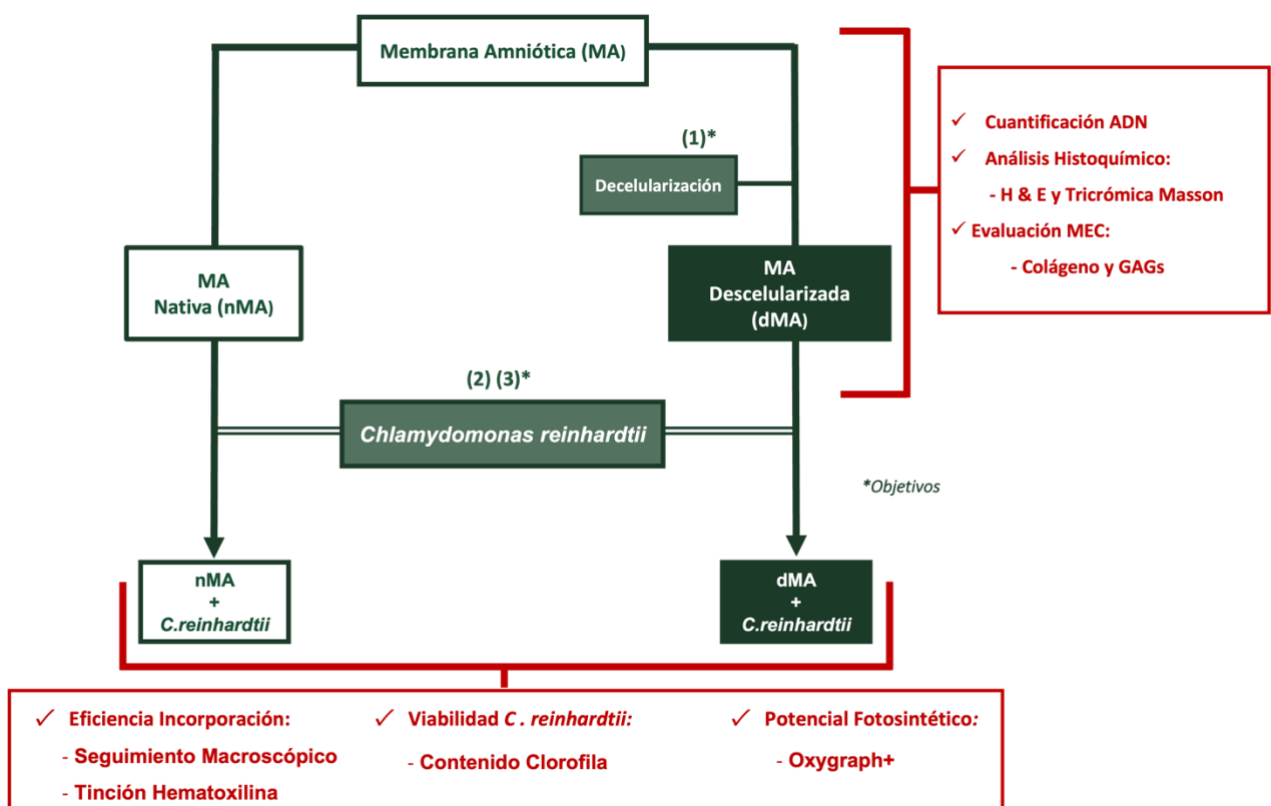


Figura 7. Esquema representativo del diseño experimental a seguir durante el desarrollo del proyecto de investigación

2. Determinar la eficiencia de la decelularización y su efecto sobre los componentes de la matriz extracelular de la membrana amniótica humana mediante tinciones histológicas y cuantificación de ADN, colágeno y

glicosaminoglicanos sulfatados (sGAG) .

2.1. Recolecta de membrana amniótica humana (MA)

Se trabajó en conjunto con profesionales del servicio de maternidad de Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso, donde se obtuvo la donación y colecta de una placenta vía cesárea electiva desde una madre sana, previa su autorización y firma del correspondiente consentimiento informado por escrito (Anexo 1). Los profesionales del servicio fueron los encargados de la colecta de la placenta y de posterior almacenamiento en frío hasta su retiro. La placenta fue trasladada a las dependencias de la Universidad de Valparaíso, con un triple embalaje de seguridad para muestras biológicas y con unidades refrigerantes para mantener las condiciones óptimas del tejido. Luego de la recolección del tejido desde el hospital, trabajando bajo gabinete de bioseguridad, se procedió a la separación de la capa coriónica de la membrana amniótica, mediante disección roma. Posteriormente la MA fue sometida a lavados con solución salina estéril, para la eliminación de restos de corion y de coágulos de sangre (Figura 7 A). A continuación, se cortó la membrana en cuadrados de aproximadamente 5 cm x 5 cm y fueron almacenadas individualmente en 10% DMSO en PBS (pH 7,4 – 7,6) suplementado con 10 mg·mL⁻¹ de penicilina-estreptomicina (BI Biological Industries) y 0,25 mg·mL⁻¹ de anfotericina B (BI Biological Industries) a -80°C, para evitar la degradación del tejido por los ciclos de congelación y descongelación.

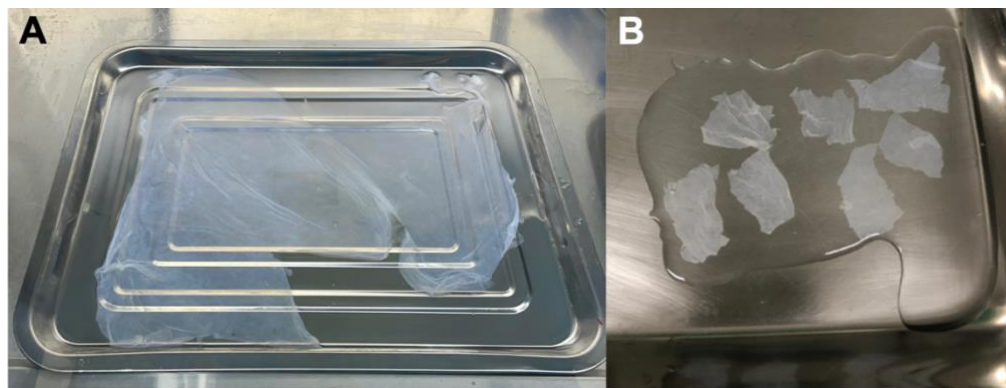


Figura 8. Procesamiento membrana amniótica humana (MA). (A) Limpieza y dimensiones originales de MA (B) Cortes de 1 cm² de MA.

2.2. Descelularización de la membrana amniótica humana

En este estudio, se utilizaron diferentes protocolos descritos en la literatura para la descelularización de la MA y de esta manera poder seleccionar el método óptimo para este proceso. A partir de la MA almacenada en cuadrados de 5 cm x 5 cm, se procedió a cortar el tejido en cuadrados de aproximadamente 1 cm² (Figura 7 B), los cuales fueron separados al azar y organizados en 4 grupos, con un n=10 para cada método de descelularización a realizar. La distribución de los grupos fue la siguientes: grupo A (MA nativa (nMA) como control), grupo B (NaOH 0,5M) (57), grupo C (0,2% p/v EDTA, NaOH 0,5M y 5% p/v NH₄Cl (58) y grupo D (0,02% p/v EDTA) (59).

2.2.1. Grupo A

Membrana amniótica humana sin ningún tratamiento, la cual fue utilizada como grupo control.

2.2.2. Grupo B /dMAB

La MA fue tratada con uno hisopo embebido en una solución de NaOH 0,5M, con el cual se realizaron pasajes delicados por la cara epitelial de la membrana amniótica durante 30 segundos, repitiendo el proceso para la cara coriónica y finalizando con 3 lavados con PBS por 15 minutos cada uno y siendo almacenadas en 10% DMSO en PBS (pH 7,4 – 7,6) estéril suplementado con cóctel de antibióticos y antimicóticos a -80°C.

2.2.3. Grupo C / dMAC

La membrana amniótica fue tratada con una solución de 0,2% p/v EDTA en PBS (pH 7,4 – 7,6) por 30 minutos a 37°C, luego fue transferida a una solución de NaOH 0,5M por 30 segundos, continuando con el tratamiento con una solución de 5% p/v NH₄Cl en agitación vigorosa por 10 minutos a temperatura ambiente, finalizando con 3 lavados de PBS por 15 minutos cada uno. La MA descelularizada (dMA) fue almacenada en 10% DMSO en PBS (pH 7,4 – 7,6) estéril suplementado con 10 mg·mL⁻¹ de penicilina-

estreptomicina (BI Biological Industries) y $0,25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de anfotericina B (BI Biological Industries) a -80°C .

2.2.4. Grupo D / dMAD

Se realizó la descelularización de la MA con una solución de 0,02% p/v EDTA en PBS (pH 7,4 – 7,6) por 1 hora a 37°C , continuando con 3 lavados con PBS (pH 7,4 – 7,6) por 15 minutos con ligera agitación a temperatura ambiente. Finalizando con el almacenamiento de la membrana descelularizada en 10% DMSO en PBS (pH 7,4 – 7,6) a -80°C .

2.3.Extracción y cuantificación ADN

Para corroborar la eficiencia del proceso de descelularización y por lo tanto la eliminación de los núcleos celulares y el ADN presente en la membrana amniótica, se realizó la extracción de ADN total a todas las muestras procesadas, utilizando el kit comercial de extracción de ADN (E.Z.N.A Tissue DNA Kit, Omega Bio-Tek) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se realizó la cuantificación del ADN total de doble hebra a todas las muestras por triplicado ($n=10$), mediante el sistema de fluorescencia QuantiFlour® dsDNA (E2670, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y detectándose mediante el uso de Fluorómetro Quantus™ (E6150, Promega) a $504\text{nm}_{\text{Ex}}/531\text{nm}_{\text{Em}}$.

2.4.Extracción y cuantificación de colágeno y glicosaminoglicanos sulfatados (sGAG)

El análisis de la mantención de la integridad de los componentes de la matriz extracelular de la MA, posterior a los diferentes protocolos de descelularización, se realizó la extracción de colágeno con pepsina (Sigma-Aldrich, Cod. P7012) ácida y de los sGAG totales con papaína (Sigma-Aldrich, Cod. P3125) a todas las muestras procesadas. A continuación, se realizó la determinación del colágeno y de los sGAG totales, a través de la utilización de los kits comerciales Sircol™

(Soluble Collagen Assay Sircol™, Biocolor) y Blyscan™ (Glycosaminoglycan Assay Blyscan™, Biocolor), correspondientemente y siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se determinó la cuantificación de las concentraciones de colágeno y sGAG totales a todas las muestras por duplicado (n= 12), mediante un espectrofotómetro a 556nm y 656nm, respectivamente (Spectrophotometer GENESYS™ 10S UV-Vis, Thermo Scientific).

2.5. Estudio histológico

Los diferentes grupos de MA fueron fijados con Methacarn (metanol, cloroformo, ácido acético en la proporción 6:3:1) a 4°C por 4 horas. A continuación, las muestras fueron deshidratadas en baterías de alcoholes y luego incluidas en parafina. Se realizaron cortes de 5µm de espesor mediante la utilización de un micrótopo (Accu-Cut® SRM™ 200, Sakura Finetek). Finalmente, se realizaron las tinciones histológicas correspondientes para la evaluación de la eficiencia del proceso de descelularización mediante la tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E) y de la integridad de los componentes de la matriz extracelular, específicamente se realizó la tinción tricrómica de Masson para el análisis del colágeno y la tinción con azul de Alcian a pH 1,0 y 2,5 para la observación de los glicosaminoglicanos. Todos los análisis y la captura de imágenes fueron realizados utilizando un microscopio óptico Olympus CX43RF acoplado con cámara digital Euromex 4K Sony Ultra HD VC.3040. Todas las imágenes fueron capturadas con zoom óptico en objetiva a 40X.

2.6. Evaluación cuantitativa de tricrómica de Masson y Azul de Alcian a pH 1,0 y 2,5

Con respecto a la cuantificación de la intensidad de la densidad óptica de las tinciones histológicas realizadas, se obtuvieron microfotografías de por lo menos 10 campos de 40x no superpuestos, para cada placa histológica correspondiente a cada grupo de tratamiento. Se realizó la evaluación de las imágenes previamente obtenidas utilizando tres algoritmos escritos en lenguaje IJMarco de ImageJ; uno para la evaluación de la tinción tricrómica de Masson y los otros

dos para la tinción con azul de alcian a pH 1,0 y 2,5 (Anexo 2). Estos algoritmos permitieron la evaluación semiautomática de la intensidad de la densidad óptica y el área del tejido para cada grupo.

Cabe destacar que previo al análisis semiautomático, se generaron vectores de deconvolución de colores específicos para cada tinción histológica analizada. Brevemente, con la utilización del plugin de deconvolución de colores de ImageJ, se procedió a realizar la deconvolución de colores en base a las regiones de interés (Region Of Interest ROI). Para la tinción tricrómica de Masson se seleccionó como color 1 el azul (colágeno), color 2 el rojo (epitelio) y color 3 el morado (núcleos celulares). Por otra parte, para la tinción con azul de alcian tanto como para pH 1,0 y 2,5, se seleccionó como color 1 el cian (GAG sulfatados como no sulfatados), color 2 el cian pálido (epitelio) y color 3 como blanco (fondo). A continuación, se realizó la deconvolución de colores, obteniéndose los valores para cada color seleccionado. Finalmente, utilizando nuevamente el plugin de deconvolución de colores en base a valores de usuario. Se procedió a ingresar los valores específicos para cada color, previamente obtenidos, finalizando con la realización de la deconvolución de colores. De esta manera, se logró obtener un vector de deconvolución de colores específico para cada tinción histológica

Con la obtención de los vectores de deconvolución de colores, se procedió a la evaluación semiautomática de las imágenes histológicas, la cual se puede describir en tres pasos:

1. Fase de preparación: se duplicó la imagen y a una copia se le realizó la deconvolución de colores en base a los vectores específico de la tinción y se seleccionó la imagen correspondiente al color 1 (azul para tricrómica de Masson y cian para azul de alcian).
2. Selección área de interés: con la imagen correspondiente al color 1, se seleccionó la ventana del plugin threshold (o umbral) para la selección

de las intensidades de interés (Intensity Of Interest IOI) para cada tinción. Se procedió a aplicar el threshold correspondiente, generando la binarización de la imagen (blanco y negro, 0 o 1).

Nota: el análisis de todas las imágenes fue realizado con el mismo valor de threshold establecido previamente para cada técnica: tricrómica de Masson (134), azul de alcian a pH 1,0 (237) y pH 2,5 (230).

3. Fase análisis: a la segunda copia de la imagen original se convirtió a escala de grises (8 bit). A continuación, se procedió a la generación de un stack con la imagen en escala de grises y con la binarizada, permitiendo seleccionar el área del tejido a analizar con la imagen en escala de grises y llevar esta selección a la imagen binaria para la medición de la intensidad de la señal específicamente en el tejido. El resultado exportado es el área total del tejido e intensidad promedio de la señal. Las unidades de medición fueron pixeles al cuadrado para el área e intensidad en 8 bits (0-255).

3. Comparar histológica y fisiológicamente la integración de cultivos de *C.reinhardtii* en la membrana amniótica nativa (nMA) y descelularizada (dMA)

3.1. Cultivo celular de *C. reinhardtii*

La cepa de *C. reinhardtii* deficientes de pared celular UVM4, fueron cultivadas en medio sólido de Tris fosfato acetato (TAP) en placas de cultivo de 90 x 15 mm (SPL Life Sciences) y se mantuvieron bajo exposición continua a luz blanca (1500 lux). Para la realización de los experimentos se colectó una pequeña cantidad de microalgas desde los cultivos sólidos y se procedió a cultivarlas en medio TAP líquido suplementado con 10 mg·mL⁻¹ de penicilina-estreptomicina (BI Biological Industries) y 0,25 mg·mL⁻¹ de anfotericina B (BI Biological Industries), y se mantuvieron bajo agitación (Agitador orbital, SK-0180-PRO, DLAB) y exposición

constante a luz blanca (1500 lux). La concentración de microalgas se determinó mediante el uso de una cámara de neubauer (Hirschmann-HBG). Se destaca que, para los dos tipos de cultivo, sólido o líquido, la iluminación se realizó utilizando 3 luces led tipo canoa (LED T8, 9 Watt, DRL® Lighting) ubicadas a una distancia de 50 cm y 40 cm desde los cultivos sólido y líquidos respectivamente (Figura 8).

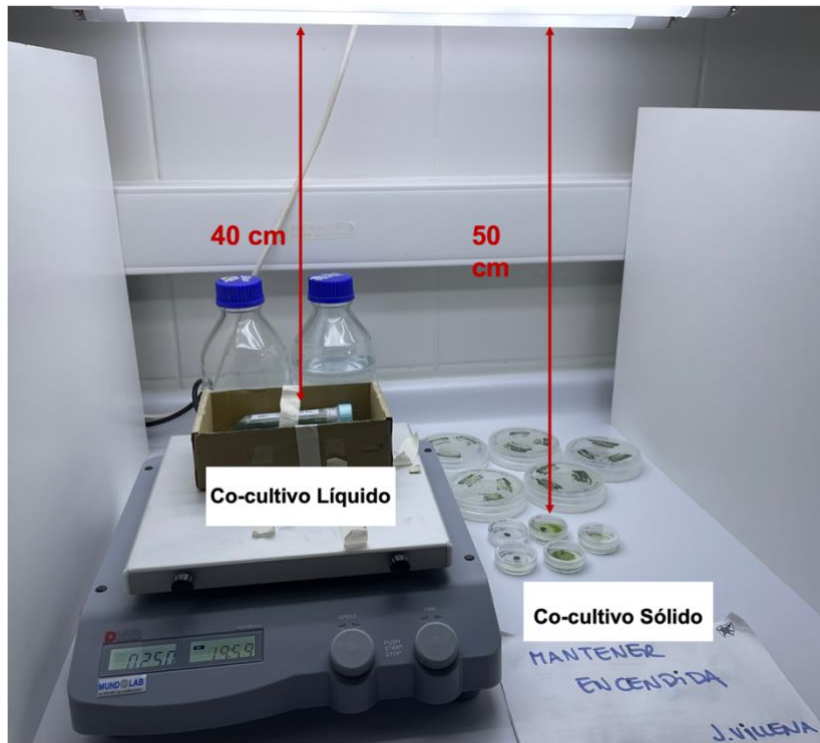


Figura 9. Equipamiento y condiciones experimentales para realización de los co-cultivos de *C. reinhardtii* con membrana amniótica humana. Sistema de iluminación y distancia representativa para cada método de co-cultivo.

3.2. Co-cultivo de *C. reinhardtii* en membrana amniótica nativa y descelularizada

Con el propósito de responder a la interrogante de la posibilidad de la incorporación de *C. reinhardtii* en la MA, se realizaron dos propuestas de co-cultivo: sólido y líquido. Brevemente, para la realización del co-cultivo líquido, se procedió a cultivar la nMA y dMA, respectivamente en una suspensión de 20 millones de microalgas en medio TAP (36); incubándose durante 0, 7 y 14 día a

19°C con agitación y exposición continua a luz blanca (1500 lux) (Figura 9 A).

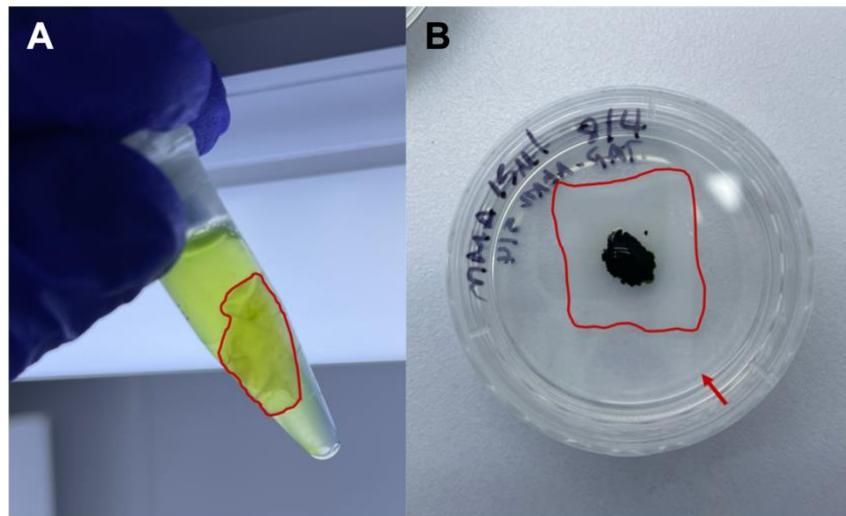


Figura 10. Métodos experimentales de co-cultivos de *C. reinhardtii* con membrana amniótica humana. (A) Co-cultivo líquido; (B) Co-cultivo sólido, flecha indica capa de TAP-Agar que impide adhesión del tejido al material. Recuadro delimita la ubicación de la MA en cada método.

Por otro parte, para la realización del co-cultivo sólido, se procedió a estirar la membrana en sus dos condiciones, nativa como descelularizada, en placas de cultivo de 35 x 10 mm (SPL Life Sciences), las cuales previamente fueron recubiertas en su base con una capa de Agar-TAP (Sigma-Aldrich Cod. A1296), previniendo de esta manera la adhesión del tejido al plástico. En paralelo, se procedió a tomar el volumen necesario del cultivo líquido de *C. reinhardtii* para lograr obtener una concentración de 5 millones de microalgas·mL⁻¹ (36); se centrifugó a 2000 rpm por 2 minutos y se descartó el máximo volumen de sobrenadante posible evitando la disrupción del pellet. A continuación, se realizó el cultivo del pellet de microalgas sobre la MA estirada, incubándose por 20 minutos, previo a la adición por la pared de la placa del medio de cultivo TAP necesario para cubrir el tejido. Finalmente, las placas fueron incubadas durante 0, 7 y 14 días a 19°C sin agitación y con exposición continua a luz blanca (1500 lux) (Figura 9 B). Cabe señalar que para ambos métodos de co-cultivo, se trabajó con el mismo sistema de iluminación descrito anteriormente para los cultivos de *C. reinhardtii* (Figura 8). Todos los experimentos se realizaron con un n=3 de

nMA y dMA de 1 cm² para cada día de cultivo correspondiente (0,7 y 14 días).

3.3. Seguimiento macroscópico de co-cultivo sólido de *C. reinhardtii* en nMA y dMA

Para determinar la capacidad de sobrevivencia de *C. reinhardtii* en las condiciones otorgadas por la membrana amniótica, además, de analizar si el tejido descelularizado contiene alguna característica que sea favorable para las microalgas en comparación con el tejido nativo, se realizó el seguimiento macroscópico de la integración de *C. reinhardtii* en co-cultivos sólidos de nMA y dMA mediante la captura de imágenes a los días 0, 7 y 14 días de incubación con el uso de un estéreo microscopio Motic SMZ-171 BLED. Todas las imágenes fueron capturas con zoom óptico de 1x.

3.4. Estudio Histológico

Las muestras de MA co-cultivadas con *C. reinhardtii* por los método líquido y sólido fueron incluidas en O.C.T (Tissue-Tek® O.C.T Compound, Sakura) y congeladas a -20°C. Procediendo a realizar cortes de 12µm de espesor mediante la utilización de uno criostato. A continuación, las muestras fueron fijadas en una solución de formalina al 10% en solución salina. Posteriormente se realizó la tinción con Hematoxilina a las muestras procesadas, para la visualización del epitelio en contraste con las microalgas. Adicionalmente se realizó el montaje directo de las muestras sin una tinción asociada, para la visualización de las microalgas sin el daño que le pueden provocar las técnicas inherentes de las tinciones. Para ambos protocolos histológicos, las muestras fueron montadas con medio hidrofílico (Aquatex®, Sigma-Aldrich). Todos los análisis y la captura de imágenes fueron realizadas utilizando un microscópico óptico Olympus CX43RF acoplado con cámara digital Euromex 4K Sony Ultra HD VC.3040. Todas las imágenes fueron capturadas con zoom óptico en objetivo a 40X.

4. Evaluar la capacidad fotosintética de la nMA y dMA cultivadas con *C. reinhardtii* mediante las determinaciones de clorofila y oximetría.

4.1.Cuantificación de clorofila y determinación del potencial fotosintético.

Con el fin de examinar si las microalgas *C. reinhardtii* son capaces de sobrevivir y proliferar en las condiciones otorgadas por la MEC de la membrana amniótica, se realizó la determinación del contenido de clorofila a los días 0, 7 y 14 de los co-cultivos en las dos condiciones de la membrana. A través de la extracción con DMSO (Sigma-Aldrich, Cod. D4540) se extrajo la clorofila total de todas las muestras y a los días correspondientes de co-cultivo, las cuales previamente fueron congeladas a -20°C. Luego, se realizó la cuantificación de la clorofila a todas las muestras por triplicado (n=3) mediante un Nanodrop a 435 nm (NanoPhotometer NP80, IMPLEN). A continuación, se procedió a evaluar el potencial fotosintético de las membranas co-cultivadas con las microalgas a los días 0, 7 y 14. Mediante el uso de un oxímetro (Oxygraph+, Hansatech Instruments), en el cual, la membrana correspondiente al día a evaluar fue introducida dentro de la cámara interior del instrumento con 1,5 ml de medio TAP, se procedió a sellarla a través de un embolo, permitiendo la eliminación de todo el oxígeno atmosférico presente en la cámara. Finalmente, se comenzó a detectar las concentraciones de oxígeno disuelto en el medio durante 10 minutos a temperatura ambiente, de los cuales 5 minutos fueron en oscuridad y 5 minutos con la exposición de las membranas a una luz azul (455nm) acoplada al instrumento (Figura 16 A-B). Todas las muestras fueron analizadas por triplicado con un n=3 de nMA y dMA para cada método y días correspondientes de co-cultivo (0, 7 y 14 días).

Análisis estadístico

Para la determinación de la prueba estadística a aplicar, se realizó el análisis de la distribución normal a través de la prueba de Shapiro-Wilk, igualdad de varianza, homocedasticidad e independencia de los datos. Se estableció un grado de confianza del 95% y un error alfa del 5% para la comparación entre las distintas condiciones experimentales. En base a la distribución de los datos se realizó la comparación de los datos a través de las pruebas Kruskal-Wallis o de Modelos de Efectos Mistos con corrección de Geisser-Greenhouse, seguido de la prueba para comparación múltiple de

Dunn o Tukey, correspondientemente. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software GraphPad 9.3 y se consideraron valores de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

A continuación, se detallan los resultados obtenidos en este estudio, los cuales se encuentran asociados al registro de patente de invención titulada *"ANDAMIO BIOLÓGICO HUMANO FOTOSINTÉTICO PARA EL TRATAMIENTO Y REGENERACIÓN DE HERIDAS"* No.202202970 Solicitud de Patente No. 202202970/Pat Pending: 202202970.

1. Determinar la eficiencia de la descelularización y su efecto sobre los componentes de la matriz extracelular de la membrana amniótica humana.

1.1. Análisis histológico del proceso de descelularización

Como primera aproximación para establecer cuál de las técnicas de descelularización utilizadas logró eliminar de forma efectiva todos los componentes celulares desde la membrana amniótica nativa, se procedió al análisis histológico mediante la tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E) a todas las muestras de MA tratadas con los diferentes protocolos de descelularización. Los resultados de la técnica de H&E permitieron demostrar que todos los tratamientos lograron la remoción de células o fragmentos de ellas (Figura 10). Sin embargo, se advirtió que en los grupos B y D (Figura 10 B y D), la descelularización no fue completa, observándose aún la presencia de núcleos celulares tanto en el epitelio de la MA como en la porción del tejido conjuntivo bajo el epitelio. En contraste, en el grupo C tratado con soluciones de 0,2% p/v EDTA, 0,5M NaOH y 5% p/v NH₄Cl (Figura 10 C), se observó una remoción completa de todos los componentes celulares de la MA, siendo corroborado por la ausencia de núcleos celulares tanto en el epitelio como en el tejido conjuntivo de la membrana. Adicionalmente, en este grupo se observó la remoción de las células desde el epitelio, sin una aparente disrupción de la matriz extracelular de la MA, evidenciándose por la mantención intacta de la capa epitelial del tejido, lográndose observar los espacios vacíos, previamente ocupados por las células (Figura 10 Flechas).

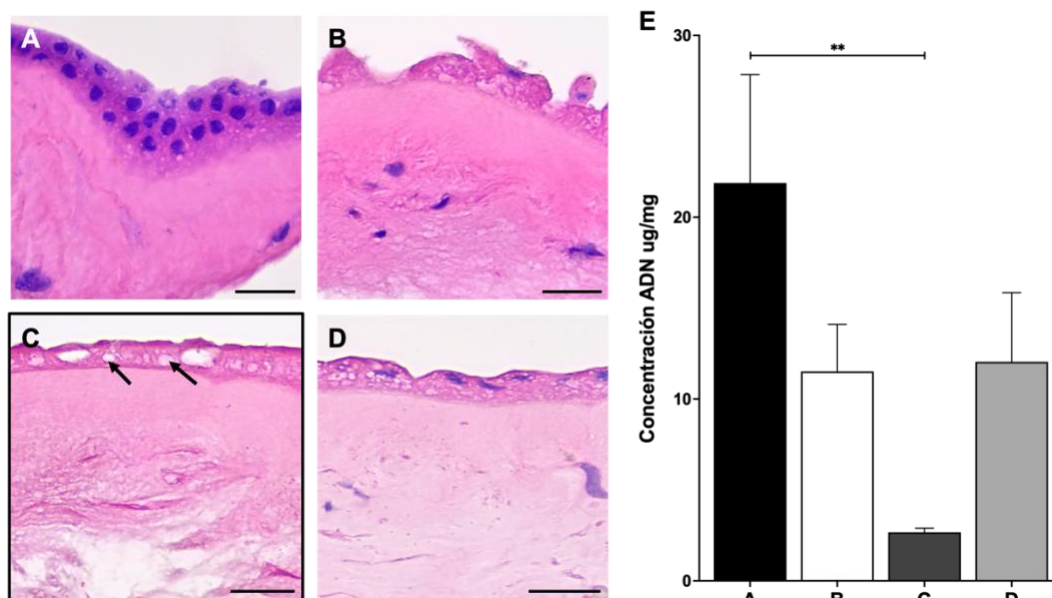


Figura 11. Evaluación de la eficiencia de descelularización de los distintos métodos utilizados mediante la tinción histológica H&E y cuantificación de la concentración de ADN. (A) MA nativa (nMA); (B) NaOH 0,5M (dMAB); (C) 0,2% p/v EDTA, NaOH 0,5M y 5% p/v NH₄Cl (dMAC); (D) 0,02% p/v EDTA (dMAD); (E) Grafico concentración de ADN. Flechas indican espacios ocupados previamente por las células. Barra de escala representa 20um. ** $p \leq 0,01$; $n = 10$.

1.2.Cuantificación de ADN

Al realizar el análisis de la cuantificación de ADN de la MA nativa y de las muestras tratadas, se evidenció que todos los protocolos realizados lograron reducir el contenido de ADN en el tejido en comparación con la MA nativa. En la Figura 10 E, se evidenció que la concentración de ADN del grupo control (nMA) previo al tratamiento resultó ser de $21,88 \pm 14,61 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$. Posterior a los correspondientes tratamientos de descelularización realizados, se observó que en los grupos B ($11,52 \pm 6,33 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) y D ($12,05 \pm 9,32 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$), no existieron diferencias significativas ($p > 0.9999$) en comparación con la nMA. Sin embargo, se observó una disminución significativa ($P = 0,0014$) de la concentración de ADN en el grupo C tratado con soluciones de 0,2% p/v EDTA, 0,5M NaOH y 5% p/v NH₄Cl ($2,67 \pm 0,55 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) en comparación con el grupo control. Disminución equivalente a la remoción del 87,79% de los componentes celulares presentes en la MA nativa, en comparación con los otros protocolos de

descelularización, grupo B con un 47,38% y grupo D con un 44,93%.

1.3. Evaluación de los componentes de la matriz extracelular de la membrana amniótica

1.3.1. Análisis histológico

Al día de hoy, existen pocos reportes que den cuenta de los efectos específicos que tiene el proceso de descelularización sobre los componentes de la MEC de la MA. Para responder a la interrogante anterior, como primera aproximación, se procedió a realizar el análisis histológico mediante la tinción tricrómica de Masson y azul de Alcian a pH 1,0 y 2,5 a todas las muestras de MA tratadas con los diferentes protocolos de descelularización (Figura 11 A-L). Al analizar los resultados obtenidos con la tinción tricrómica de Masson, se logró observar que todos los tratamientos realizados afectaron significativamente ($p < 0,05$) la integridad del colágeno del tejido, demostrándose en una notoria disminución en la intensidad de la tinción en las muestras tratadas, en comparación con la intensidad obtenida para la nMA (Figura 11 A,D,G,J Y M).

Específicamente, se advierte una mayor diferencia significativa en la disminución de la intensidad de la tinción en el grupo C ($p = 0,0001$) en comparación con las diferencias obtenidas para los otros grupos de descelularización, grupo B ($p = 0,0071$) y D ($p = 0,0314$) (Figura 11 M). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos de descelularización.

Por otro lado, al analizar los resultados obtenidos con la tinción azul de Alcian, se observó una disminución significativa en la intensidad de la tinción a pH 1,0 en todos los grupos de descelularización en comparación con el tejido nativo (Figura 11 B, E, H y K).

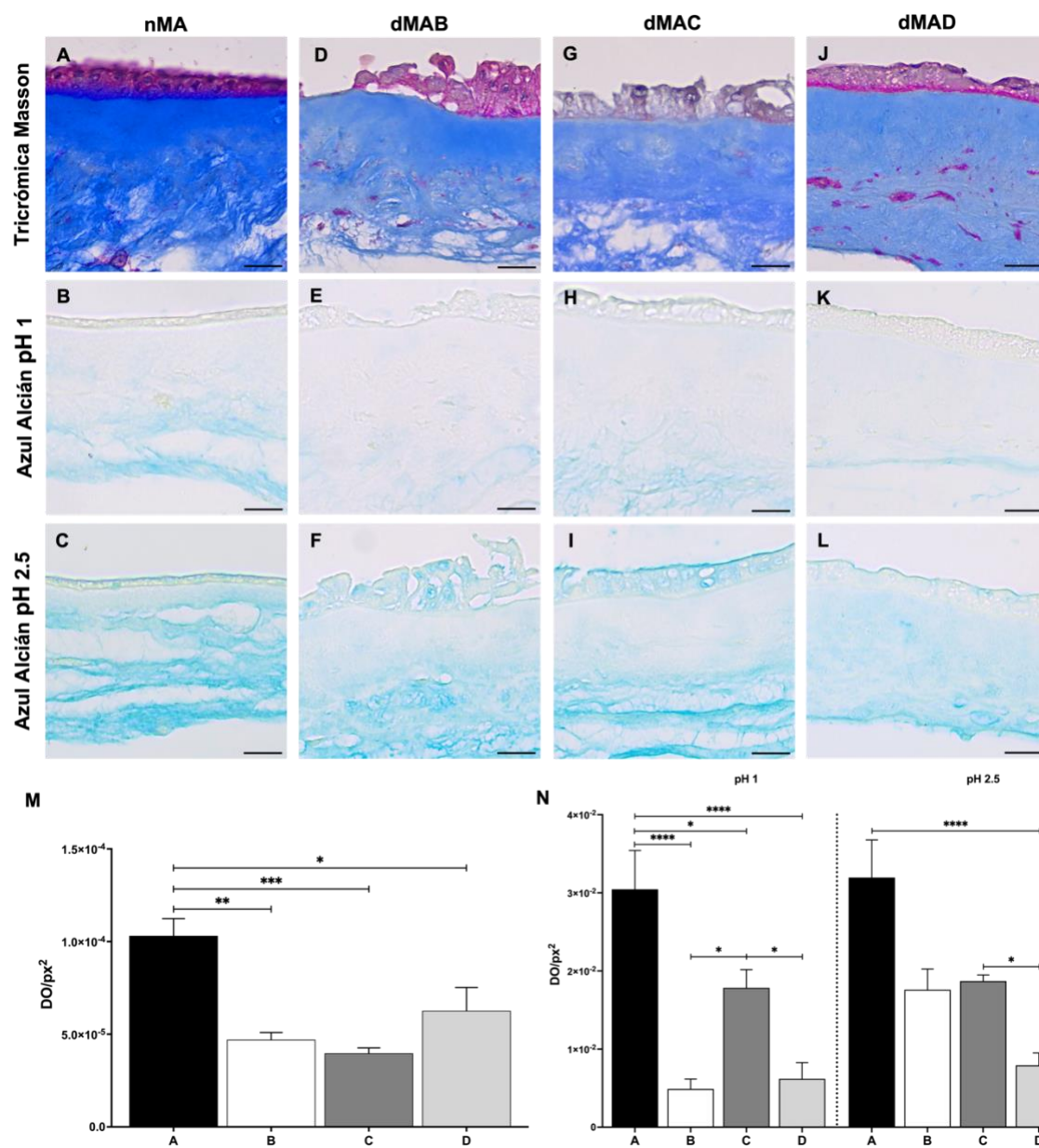


Figura 12. Análisis histológico de la integridad de la matriz extracelular de la MA mediante la tinción tricrómica Masson y azul de alcian posterior a los distintos métodos de descellularización. (A-C) MA nativa; (D-F) dMAB; (G-I) dMAC; (J-L) dMAD; (M-N) Gráfico de la densidad óptica de la tinción tricrómica de Masson y azul de alcian. Barra de escala representa 20 μ m. Se indican sólo las diferencias significativas * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$. $n = 12$.

Particularmente, se evidenció una mayor disminución significativa en los grupos

B y D ($p < 0,0001$) en contraste con el grupo C ($p = 0,0256$) y en relación con el tejido nativo. Por el contrario, solo se observó una disminución significativa ($p < 0,0001$) en la intensidad de la tinción a pH 2,5 con el tratamiento del grupo D, en comparación con la nMA (Figura 11 N). Adicionalmente al realizar un análisis entre los grupos de descelularización realizados, con la tinción azul de Alcian a pH 1,0, se advirtió una diferencia significativa en la intensidad de la tinción entre el grupo C en comparación con los grupos B ($p = 0,021$) y D ($p = 0,0438$). Finalmente, solo se evidenció diferencias significativas entre los grupos de descelularización C y D ($p = 0,0221$) con la tinción a pH 2,5 (Figura 11 N).

1.3.2. Cuantificación de colágeno y glicosaminoglicanos sulfatados

Con respecto a la integridad de los componentes de la MEC de la MA posterior al proceso de descelularización, al analizar los resultados obtenidos para la cuantificación de la concentración de colágeno de la nMA y de las muestras de dMA, se comprobó que todos los protocolos utilizados disminuyeron la concentración de colágeno en el tejido. Lo anterior se corrobora en la Figura 12 A, en donde se demuestra que la concentración de colágeno en la nMA previo al tratamiento resultó ser de $3,290 \pm 0,719 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. Posterior a los correspondientes protocolos de descelularización realizados, se obtuvo que el grupo del experimento D ($2,192 \pm 0,514 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) fue el que tuvo la menor disminución de la concentración de colágeno, aun así, no se evidenció una diferencia significativa ($p = 0,0657$) en comparación con el tejido nativo. Sin embargo, se observó una disminución significativa ($p < 0,001$) de la concentración de colágeno en los grupos B ($1,666 \pm 0,333 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) y C ($1,515 \pm 0,333 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), en comparación con la nMA. Diferencias equivalentes a la disminución de la concentración de colágeno en el tejido del 49,36% para el grupo B, 65,02% para el grupo C y un 33,37% para el grupo D en comparación con la nMA. Además, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,9999$) entre los grupos de descelularización.

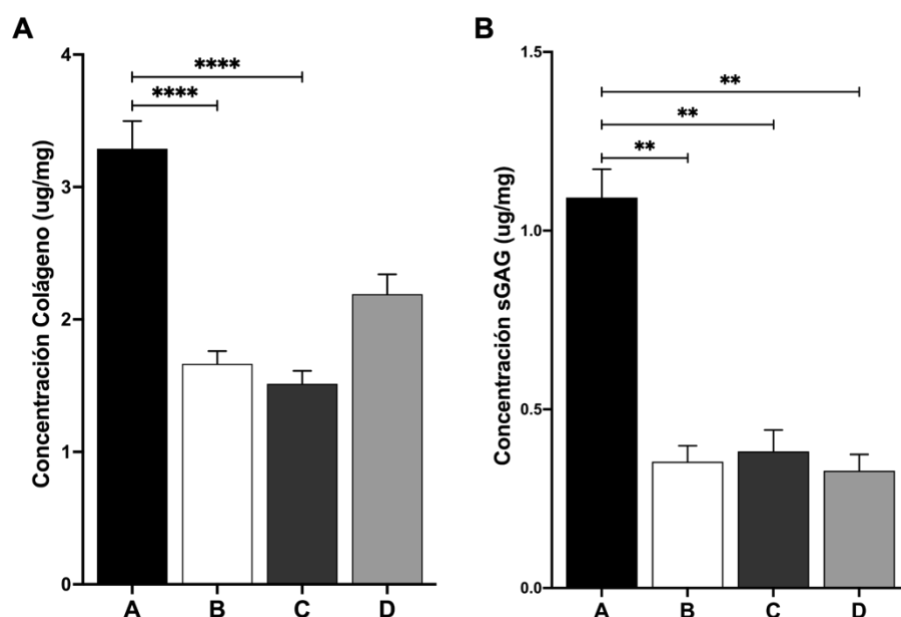


Figura 13. Cuantificación de los componentes de la MEC de la MA posterior a los distintos métodos de descelularización. (A) Gráfico concentración de colágeno; (B) Gráfico concentración de glicosaminoglicanos sulfatados (sGAG). Se indican sólo las diferencias significativas $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$. $n = 12$.

Por otra parte, con los resultados obtenidos para la cuantificación de los glicosaminoglicanos sulfatados, se observó que todos los protocolos de descelularización utilizados disminuyeron significativamente ($p < 0,01$) la concentración de sGAG en comparación con la nMA ($1,093 \pm 0,224 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) (Figura 12 B), sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de descelularización. A pesar de lo anterior, se logró evidenciar una menor disminución en la concentración sGAG en el grupo C ($0,383 \pm 0,168 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$), en comparación con el grupo B ($0,354 \pm 0,126 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$) y D ($0,328 \pm 0,129 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$). Equivalente a una disminución del 64,87% de la concentración de sGAG presente en el tejido posterior a la descelularización con el protocolo del grupo C, en comparación con los otros grupos de tratamiento, en donde se observa una disminución del 67,61% para el grupo B y una del 70,45% para el grupo D.

2. Comparar la integración de cultivo de *C. reinhardtii* en la membrana

amniótica nativa (nMA) y descelularizada (dMA).

2.1. Análisis del seguimiento macroscópico de co-cultivos sólidos y líquidos de C. reinhardtii en nMA y dMA

En base a los resultados anteriormente descritos, se determinó que el protocolo de descelularización del experimento C fue el más apropiado para cumplir con el objetivo principal de este proyecto. Logrando obtener una matriz descelularizada de MA con la mantención intacta de la capa epitelial y con la concomitante mantención de los componentes principales de la MEC. Lo que se espera que permita, de esta manera, una mejor integración de las microalgas a la MEC de la MA es su estado descelularizado en comparación con la condición nativa. Por lo tanto, los experimentos subsiguientes fueron realizados con la membrana descelularizada con el protocolo C (dMAC) en comparación con el tejido nativo.

Con los resultados obtenidos para el seguimiento macroscópico de los co-cultivos, se logró observar en primera instancia la viabilidad de la microalga en el tejido biológico, transcurrido los 14 días de incubación e independiente del tipo de co-cultivo realizado (Figura 13). Específicamente, se evidenció en los co-cultivos sólido un aumento progresivo del color verde en el sector donde se realizó el cultivo del pellet de microalgas en el día 0 (Figura 13 G Y H), en comparación con el día 14 (Figura 13 K Y L). Sin embargo, se logró advertir una diferencia en la distribución de las microalgas dependiendo de las condiciones de la membrana. Observándose en la nMA las microalgas se integraban mayoritariamente en el sector donde se realizó la inoculación inicial, evidenciándose por una pequeña cantidad de microalgas creciendo por fuera del tejido (Figura 13 K).

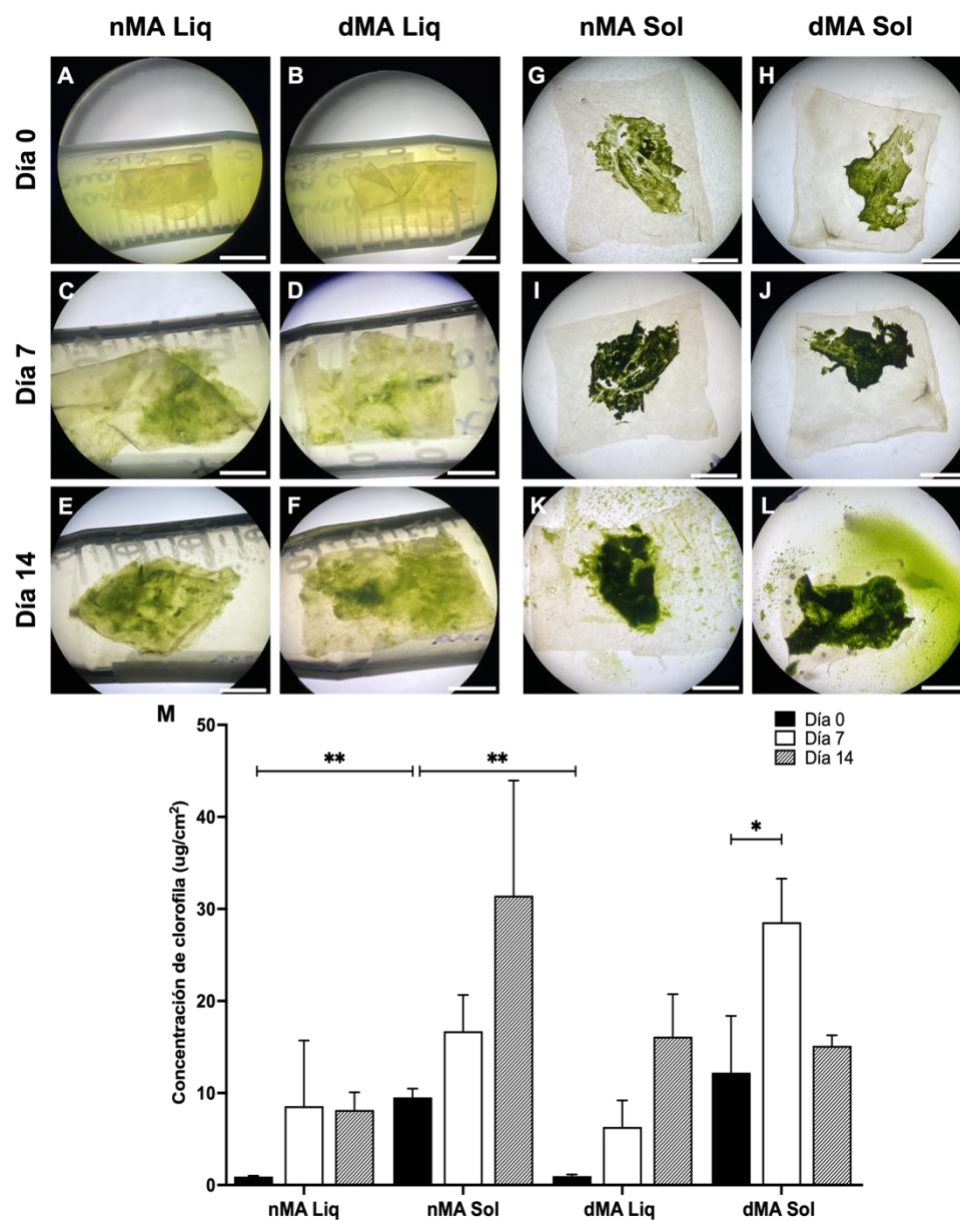


Figura 14. Viabilidad y capacidad proliferativa de *C. reinhardtii* en co-cultivos líquido y sólido con membrana amniótica humana nativa y descelularizada. Seguimiento macroscópico de co-cultivos líquidos (A-F) y sólidos (G-L); Gráfico de densidad de clorofila a los distintos tiempos de los co-cultivos. Se indican sólo las diferencias significativas * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; $n = 3$.

Caso contrario se logró advertir en el tejido descelularizado, en donde la integración de las microalgas fue hacia los extremos del tejido hasta proliferar

fuera de la membrana (Figura 13 L). En relación con los co-cultivos líquidos, se logró observar que las microalgas en suspensión son capaces de adherirse a la membrana, demostrándose por una disminución del color verde del medio TAP con el concomitante aumento de este color en las membranas (Figura 13 E Y F). Sin embargo, no se logró observar diferencias en la integración de las microalgas entre las dos condiciones de la membrana.

2.2. Evaluación de la capacidad proliferativa de *C. reinhardtii* en los co-cultivos sólidos y líquidos en nMA y dMA

En base a los resultados obtenidos de la determinación del contenido de clorofila en el tejido, se demostró la capacidad proliferativa de *C. reinhardtii* en las dos condiciones de la membrana amniótica y en los dos métodos de co-cultivo realizados. Evidenciándose por un aumento progresivo del contenido de clorofila a medida que transcurrieron los días de cultivo. Sin embargo, los resultados mostraron diferencias entre los métodos de co-cultivos, en donde se evidenció una mayor capacidad proliferativa de las microalgas en los co-cultivos sólido en comparación con el líquido (Figura 13 M). Específicamente, se obtuvo diferencias significativas en el contenido de clorofila entre los co-cultivo líquido de nMA ($p = 0,0028$) y de dMA ($p = 0,0025$), respectivamente, en comparación con el co-cultivo sólido de nMA al día 0 de cultivo. Adicionalmente, los resultados mostraron una tendencia a un aumento del contenido de clorofila en los co-cultivos sólidos al día 14, tanto para tejido nativo como el descelularizado, en comparación con el método líquido de co-cultivo.

Con respecto a la condición de la membrana amniótica, no se observaron diferencias significativas, aun así, los resultados mostraron una tendencia a una mayor capacidad proliferativa de las microalgas en la nMA en comparación con la dMA. Siendo corroborado por la obtención de un 74,1% más del contenido de clorofila para el día 14 en los co-cultivos sólido con la nMA ($31,5 \pm 2,13 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), en comparación con la dMA ($15,1 \pm 10,7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) y con los co-cultivos líquido de nMA ($8,16 \pm 0,175 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) y dMA ($16,1 \pm 0,287 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$).

2.3. Análisis histológico de co-cultivos sólido y líquido de *C. reinhardtii* en nMA y dMA

Con los resultados obtenidos para las técnicas histológicas realizadas, se observaron diferencias en la distribución de las microalgas en el tejido. Principalmente se observó que en el co-cultivo sólido de nMA (Figura 14), las microalgas se acumulaban en la superficie de la membrana sin lograr integrarse al tejido. Siendo corroborado por la ausencia del color verde característico de la microalga en el epitelio del amnios (Figura 14 A-C). Adicionalmente, con la tinción de Hematoxilina, se logró apreciar que, no obstante, las microalgas se encuentren en contacto con las dos caras de la membrana nativa, aun así, no consiguieron integrarse al tejido, siendo corroborado por la visualización de la coloración azul de la tinción, correspondiente al epitelio y a la capa esponjosa de la membrana, por debajo del color verde y no una combinación de colores (Figura 14 G-I). Por el contrario, al analizar los resultados histológicos para el co-cultivo sólido de dMA, se logró evidenciar la integración de las microalgas al tejido. Observándose el color verde de las microalgas en el interior de la región epitelial de la dMA (Figura 14 D-F). Demostrándose claramente en la Figura 14 J-K, con la tinción de Hematoxilina, el ingreso de las microalgas a la región epitelial del amnios, específicamente en los espacios anteriormente pertenecientes a las células.

Por otra parte, al analizar los resultados obtenidos para los co-cultivos líquidos de *C. reinhardtii* (Figura 15), se evidenciaron resultados similares a los obtenidos anteriormente. En donde no se observó la integración de las microalgas al tejido, corroborándose por la ausencia del color verde en la región epitelial de la membrana en sus dos condiciones. Por el contrario, los resultados mostraron que las microalgas quedan adheridas en la capa esponjosa de la nMA (Figura 15 C y I), aun así, luego del proceso de descelularización (Figura 15 F y L).

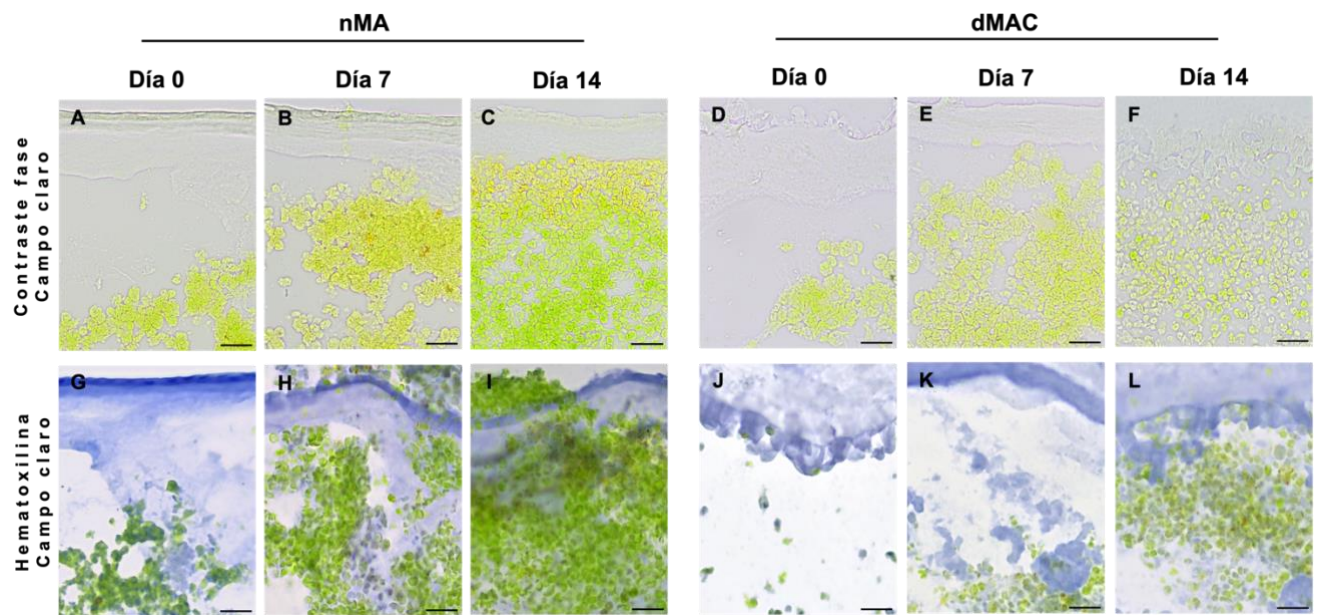


Figura 16. Análisis histológico de co-cultivo sólidos de *C.reinhardtii* en membrana amniótica humana. (A-F) Contraste de fase en campo claro de co-cultivo sólido en MA nativa (A-C) y MA descelularizada (D-F); (G-L) tinción de hematoxilina de co-cultivo sólido en MA nativa (G-I) y MA descelularizada (J-L). Barra de escala representa 20 μ m; $n \geq 3$.

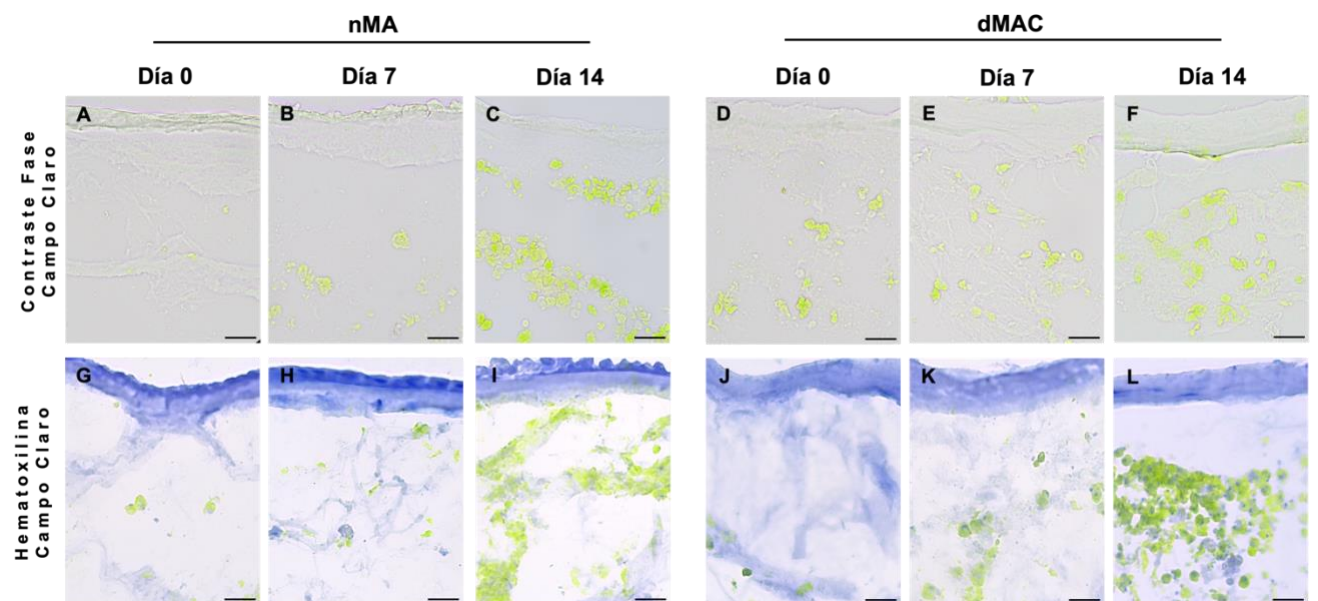


Figura 15. Análisis histológico de co-cultivo líquidos de *C.reinhardtii* en membrana amniótica humana. (A-F) Contraste de fase en campo claro de co-cultivo líquido en MA nativa (A-C) y MA descelularizada (D-F); (G-L) tinción de hematoxilina de co-cultivo líquido en MA nativa (G-I) y MA descelularizada (J-L). Barra de escala representa 20 μ m; $n \geq 3$.

Finalmente, se evidenció una gran diferencia entre los dos métodos de cultivo, específicamente en la cantidad de microalgas que se encuentran sobre o en contacto con la membrana. Se observó que con el método de co-cultivo líquido, una baja cantidad de microalgas se acumulan en las superficies de la nMA y dMA, caso contrario se evidencia con el método sólido, observándose una gran cantidad de microalgas en contacto con el tejido.

3. Comparar la capacidad fotosintética de la nMA y dMA cultivadas con *C. reinhardtii*

3.1. Evaluación del potencial fotosintético de los co-cultivos sólidos y líquidos en nMA y dMA

Con la finalidad de comprobar y comparar el potencial fotosintético de la nMA y dMA co-cultivadas con *C. reinhardtii*, se procedió a la determinación de la concentración de oxígeno en los co-cultivos, durante ciclos de oscuridad y luz, a los distintos tiempos de incubación. Evidenciándose, en el día 0, una nula variación en la concentración de oxígeno en los dos métodos de co-cultivos al momento de ser expuesto a la fuente lumínica (Figura 16 C y D), sin diferencias significativas entre la nMA y dMA. Aun así, se advirtió una mínima producción de oxígeno en los co-cultivos sólidos, demostrándose por un leve aumento en la tasa metabólica de producción de oxígeno en los co-cultivos sólidos de nMA ($0,486 \pm 2,00 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) y dMA ($1,61 \pm 4,89 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$), al momento del estímulo lumínico. No obstante, este aumento no logró ser significativo en comparación con la tasa de consumo de oxígeno, nMA ($-1,84 \pm 0,615 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) y dMA ($1,94 \pm 3,11 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$), por parte de las microalgas en los ciclos de oscuridad (Figura 16 E). En cambio, en relación con el método líquido, únicamente se observó un leve aumento en la tasa de producción de oxígeno en los co-cultivos con dMA ($0,0776 \pm 0,741 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) en comparación con la nMA ($-0,649 \pm 2,31 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$). Aun así, este aumento no fue significativo en comparación con la tasa de consumo de oxígeno en los ciclos de oscuridad, dMA ($-0,506 \pm 0,397 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) y nMA ($-0,232 \pm 0,608 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) (Figura 16 F)

Por otra parte, en los co-cultivos sólidos de nMA y dMA en el día 14 de incubación, mostraron una variación en la concentración de oxígeno al momento de ser expuesto al estímulo lumínico. Evidenciándose por un cambio en la pendiente de la curva de concentración de oxígeno versus tiempo al momento de aplicar luz (Figura 16 C). Corroborándose por un aumento de la tasa de producción de oxígeno en los co-cultivos de nMA ($6,51 \pm 7.96 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) y dMA ($3,07 \pm 2,86 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) durante los ciclos de luz, en comparación con el día 0 de cultivo. Adicionalmente, los resultados mostraron un aumento del 52,85% de la tasa de producción de oxígeno en los co-cultivos con la nMA en comparación con la dMA. No obstante, este aumento no logró ser significativo, en relación con la tasa de consumo de oxígeno obtenido por parte de las microalgas durante los ciclos de oscuridad, nMA ($-7,20 \pm 3,85 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) y dMA ($-6,14 \pm 3,36 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) (Figura 16 E).

Con respecto a los co-cultivos líquidos, se evidenció un comportamiento similar a lo observado el día 0 de incubación. En donde, al momento de la exposición al estímulo lumínico, no se observó una variación evidente de la pendiente de la curva (Figura 16 D). Corroborándose por una mínima variación de la tasa de producción de oxígeno por este método de cultivo, nMA ($-0,113 \pm 2,19 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) y dMA ($-0,113 \pm 0,394 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$), en comparación con el día 0 de cultivo. Además, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de producción de oxígeno entre la nMA y dMA.

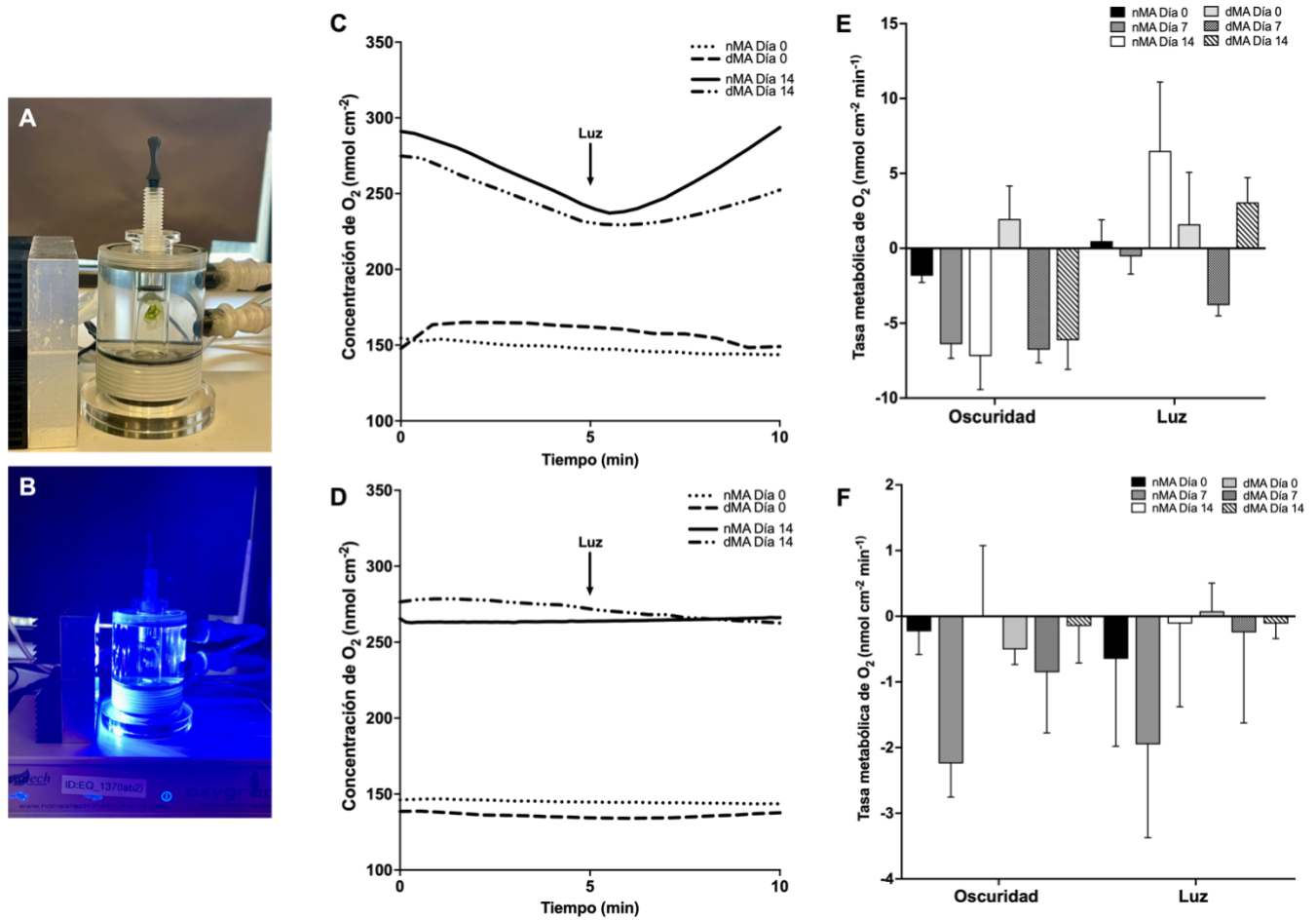


Figura 17. Determinación de la capacidad fotosintética de membrana amniótica humana co-cultivada con microalgas *C. reinhardtii*. (A) Condiciones experimentales para la medición de la concentración de oxígeno, MA co-cultivada con *C.reinhardtii* al interior del oxígrafo y (B) estimulación lumínica a mediante luz azul (455nm); (C-D) Evolución representativa de la concentración de oxígeno en un ciclo de oscuridad/luz de 5min, representado por flecha superior, de co-cultivos sólido (C) y líquido (D); (E-F) Tasa metabólica de consumo y producción de oxígeno de co-cultivos sólido (E) y líquido (F), $n=3$.

DISCUSIÓN

El uso de matrices membranas descelularizada, ha surgido como unas de las estrategias prometedoras en los últimos años para el tratamiento de heridas. Aprovechando de esta manera, la estructura única de la MEC y sus propiedades (29,30,60,61).

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con soluciones de 0,2% p/v EDTA, NaOH 0,5M y 5% p/v NH₄Cl (49), permitió obtener una matriz descelularizada de MA con al menos un 87,79% de remoción celular y con una capa epitelial intacta con una concomitante mantención de las fibras de colágeno y de los sGAG, correspondiente a los principales elementos estructurales y de andamiaje de la MEC de la MA (11,55). Aunque se logró una significativa remoción de los componentes celulares desde la membrana nativa, aun así, no se logró cumplir con el valor estándar descritos en la literatura, en donde, se ha sugerido como estándar para la descelularización de un tejido debe presentar una cantidad de dsADN menor a 50ng por mg de tejido seco, además, de la no visualización de material nuclear con la tinción H&E o DAPI (31). Además, se destaca que existió una evidente disminución en la integridad de los componentes de la MEC luego del proceso de descelularización. Por ejemplo, mediante la tinción con azul alcian, se advierte una disminución significativa en la intensidad de la tinción a pH 1,0 en el tejido descelularizado en comparación con el tejido nativo, disminución que no se logra observar a pH 2,5. Indicándonos, que el proceso de descelularización utilizado afecta principalmente la integridad de los glicosaminoglicanos sulfatados en vez de los no sulfatados. Resultado interesante, debido a que se ha descrito un importante rol de los sGAG en la respuesta inflamatoria y angiogénica durante los procesos de regeneración tisular. Específicamente, se ha demostrado que sGAG al interior de hidrogeles de matrices extracelulares descelularizada son capaces de unir una variedad de factores de crecimientos y citoquinas, tales como, FGF y VEGF, prologando de esta manera la vida media de estos factores y por lo tanto sus efectos terapéuticos (62,63). Adicionalmente, Wang y colaboradores, en el año 2021, comprobaron que a una mayor cantidad de sGAG presente en un hidrogel de matriz extracelular descelularizada derivada de placenta humana, fue más eficaz en la promoción del proceso de cicatrización en comparación

con los hidrogeles con una o nula presencia de sGAG(64). Demostrando la importancia que cumplen los componentes de la MEC durante el proceso de cicatrización tisular.

La remoción significativa de los componentes celulares, además, de la pérdida en la integridad de los componentes de la MEC, se puede deber a las características químicas de las soluciones utilizadas, principalmente, el tratamiento con EDTA, el cual al ser un quelante logra la disrupción de las células a las fibras de colágeno y fibronectinas presentes en el tejido, mediante el secuestro de iones tales como Ca^{+2} y Mg^{+2} . Continuando con la descomposición nuclear e hidrólisis citoplasmáticas de las células, por el tratamiento con una base, en esta instancia, una solución de NaOH. Finalizando con el tratamiento con una solución hipertónica de NH_4Cl , permitiendo la remoción del debris celular del tejido generado en los pasos previos (29,30).

La integración de organismos fotosintéticos en matrices sintéticas ha surgido como una novedosa estrategia para lograr la administración local y controlada de oxígeno en el lecho de una herida (55,56). Sin embargo, el uso de matrices sintéticas conlleva grandes limitaciones, tales como el alto costo de producción y de mantención, posibles rechazos inmunológicos y pobres resultados en la recuperación completa de la piel (24,32). Con la finalidad de proporcionar una alternativa al uso de matrices sintéticas, cultivamos la microalga *C. reinhardtii* en la membrana amniótica humana, en su estado nativo como descelularizado.

Nuestros resultados demuestran por primera vez la viabilidad de la microalga en la membrana amniótica humana, durante los 14 días de incubación. Demostrándose por un aumento progresivo del contenido de clorofila a medida que transcurrió el tiempo de cultivo.

No obstante, a lo anterior, se evidencia una diferencia en la distribución, en la eficiencia de la integración y en la capacidad proliferativa de las microalgas, en relación con la condición de la membrana. Principalmente, en los co-cultivos sólido con la nMA, las microalgas se integraron en la capa esponjosa de la membrana, evidenciando una integración homogénea y amplia para el día 14. Caso contrario se aprecia en los co-cultivos sólidos con la dMA, en donde se observa una integración heterogénea y limitada

en la zona esponjosa de la membrana, demostrado por una menor cantidad de microalgas en contacto con el tejido. Diferencias que se pueden asociar a las condiciones físicoquímicas aportada por la membrana en sus dos condiciones, principalmente por los componentes de la MEC, en donde se han reportado una variedad de bacterias, virus, hongos y parásitos que logran adherirse a las células a través de la interacción con glicolípidos, glicoproteínas y GAGs presentes en la superficie celular (65). Adicionalmente, se han descrito una variedad de proteínas de membrana microbianas con la capacidad de interactuar con glicoconjugados altamente cargados negativamente, tales como heparán sulfato (65). Siendo este identificado como el receptor putativo para la adhesión celular de la bacteria *Helicobacter pylori* (66). Por lo tanto, la baja integración de la *C. reinhardtii* a la membrana descelularizada, se puede deber a la pérdida significativa de GAGs sulfatados luego del proceso de descelularización de la membrana, disminuyendo en sí su capacidad de adhesión a esta.

Por otra parte, los GAGs no sulfatados son componentes claves en arquitectura y remodelación tisular, siendo el ácido hialurónico (AH) su gran representante, el cual se destaca por ser una molécula de gran peso molecular y altamente hidrofílico (67) teniendo una alta capacidad de retención de agua, permitiendo la mantención de la humedad del tejido y la creación de espacios para la migración celular durante el proceso de cicatrización y la morfogénesis embrionaria (68). Adicionalmente, se ha reportado la interacción de AH con proteoglicanos presentes en la MEC, tales como, agregan, nuerocan y versican, generando la formación de una red de conexiones que actúa como un andamio estructural para el tejido (67). Por lo tanto, aunque no se haya observado una disminución significativa de los GAGs no sulfatados, si existió, en cierta proporción, una pérdida durante el proceso de descelularización en comparación con el tejido nativo. Provocando la pérdida del andamio estructural de la MA, lo que generaría que las microalgas integradas no logren quedar atrapadas dentro del tejido descelularizado.

Al enfrentar a los co-cultivos a un estímulo lumínico, nuestros resultados demuestran una mayor tasa de producción de oxígeno en los co-cultivos sólido con la MA nativa, en comparación con la dMA y el método líquido. Diferencias que también se han descrito en el desarrollo de andamios fotosintéticos 3D, en donde se observa una mayor

viabilidad y una actividad metabólica más estable de las microalgas, al ser inmovilizadas al interior de estos andamios, en comparación con los cultivos en suspensión (56). Adicionalmente, en un estudio realizado por Maharjan y colaboradores, en el año 2021, demostraron que la encapsulación de *C. reinhardtii* en una biotinta temporal a base de celulosa, para la fabricación de constructos 3D de tejido vascularizado, mejoraba significativamente su capacidad fotosintética (69).

Por consiguiente y tomando en consideración todo lo descrito anteriormente, se propone que la microalga *C. reinhardtii* se integran eficientemente a la membrana amniótica en su estado nativo, debido a que logran adherirse al tejido mediante la interacción con los sGAG presentes en la MEC. Además, de quedar retenidas en el andamio generado por la interacción de los proteoglicanos con el AH, el cual, por su propiedad de retención de humedad, generará un ambiente favorable para el crecimiento y proliferación de las microalgas. Esta adherencia y retención de las microalgas en la MEC se propone como fundamental para la estabilidad metabólica de esta, lo que se refleja en una mejor capacidad fotosintética frente a un estímulo lumínico.

Una observación interesante, fue que a medida que aumentó el contenido de microalgas en la membrana, en especial en los co-cultivos sólidos, este aumento no fue directamente proporcional a una mayor tasa de producción de oxígeno. Discordancia que se podría explicar por una menor capacidad de penetración de la luz debido a la alta densidad de microalgas, provocando un efecto de sombra (36,56). Por lo tanto, un cambio en la estrategia de la inoculación del pellet de microalgas en la MA podría dar solución a esta problemática, buscando una estrategia que permita una incorporación homogénea, transversal e idealmente de monocapa.

Finalmente, este trabajo proporciona las primeras evidencias de la factibilidad de la incorporación de organismos fotosintéticos a tejidos biológicos humanos. Desarrollándose por primera vez un aloinjerto simbiótico temporal de membrana amniótica humana con microalga *C. reinhardtii*. Permitiendo la conjugación de las propiedades fotosintética y regenerativa en un solo implante. Adicionalmente, este estudio proporciona un método de co-cultivo sólido de membrana amniótica humana en su estado nativo con microalgas

C.reinhardtii, el cual es sencillo, fácil y económico de implementar, en comparación con otras tecnologías de la TE de la piel. Proyectándose a futuro la evaluación de las propiedades regenerativas y de biocompatibilidad de este aloinjerto en el tratamiento de heridas de piel en un modelo murino.

CONCLUSIONES

1. Se demostró que mediante el tratamiento con soluciones de 0.2% p/v EDTA, NaOH 0.5M y 5% NH₄Cl, se logró obtener una matriz descelularizada de membrana amniótica humana, con al menos un 87,79% de remoción celular y con una capa epitelial intacta con la concomitante mantención del 34.98% de colágeno y de un 35.13% de sGAG.
2. Se demostró por primera vez la viabilidad y capacidad proliferativa de la microalga *C. reinhardtii* al ser integrada en la membrana amniótica humana durante 14 días de co-cultivo.
3. Se comprobó que el método de co-cultivo sólido de *C. reinhardtii* con membrana amniótica humana es su condición nativa, es el más adecuado para el desarrollo de un aloinjerto humano simbiótico temporal con capacidad fotosintética.

BIBLIOGRAFÍA

1. Edwards C, Marks R. Evaluation of biomechanical properties of human skin. *Clin Dermatol*. 1995;13(4):375–80.
2. Zhong SP, Zhang YZ, Lim CT. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010;2(5):510–25.
3. Enoch S, David JL. Basic science of wound healing. *Surgery*. 2008;26(2):31–7.
4. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*. 2014;6(265).
5. Diegelmann RF, Evans MC. Wound Healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. Vol. 9, *Frontiers in Bioscience*. 2004.
6. Cortes H, Caballero-Florán IH, Mendoza-Muñoz N, Córdova-Villanueva EN, Escutia-Guadarrama L, Figueroa-González G, et al. Hyaluronic acid in wound dressings. Vol. 66, *Cellular and Molecular Biology*. Cellular and Molecular Biology Association; 2020. p. 191–8.
7. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes: *Cellular Mechanisms of Wound Repair*. Vol. 10, *Open Biology*. Royal Society Publishing; 2020.
8. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. Vol. 19, *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 2011. p. 441–53.
9. Davis FM, Tsoi LC, Wasikowski R, denDekker A, Joshi A, Wilke C, et al. Epigenetic regulation of the PGE2 pathway modulates macrophage phenotype in normal and pathologic wound repair. *JCI Insight*. 2020 Sep 3;5(17).
10. Dhall S, Wijesinghe DS, Karim ZA, Castro A, Vemana HP, Khasawneh FT, et al. Arachidonic acid-derived signaling lipids and functions in impaired healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2015 Sep 1;23(5):644–56.
11. Oh SY, Lee SJ, Jung YH, Lee HJ, Han HJ. Arachidonic acid promotes skin wound healing through induction of human MSC migration by MT3-MMP-mediated fibronectin degradation. *Cell Death Dis*. 2015 May 1;6(5).

12. Gupta S, Mujawdiya P, Maheshwari G, Sagar S. Dynamic Role of Oxygen in Wound Healing: A Microbial, Immunological, and Biochemical Perspective. Vol. 77, Archives of Razi Institute. Razi Vaccine and Serum Research Institute; 2022. p. 513–23.
13. Bowers S, Franco E. Chronic Wounds: Evaluation and Management [Internet]. Vol. 101. 2020. Available from: www.aafp.org/afp
14. Lei J, Priddy LB, Lim JJ, Massee M, Koob TJ. Identification of Extracellular Matrix Components and Biological Factors in Micronized Dehydrated Human Amnion/Chorion Membrane. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2017;6(2):43–53.
15. Raziyeveva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*. 2021;11(5):1–25.
16. Shores JT, Gabriel A, Gupta S. Skin substitutes and alternatives: a review. *Adv Skin Wound Care*. 2007;20(9 Pt 1).
17. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud de Chile. Encuesta Nacional de Salud Chile 2016-2017 Diabetes Mellitus. 2017;
18. Hashemi SS, Mohammadi AA, Kabiri H, Hashempoor MR, Mahmudi M, Amini M, et al. The healing effect of Wharton's jelly stem cells seeded on biological scaffold in chronic skin ulcers: A randomized clinical trial. *J Cosmet Dermatol*. 2019;(February):1–7.
19. Kaur A, Midha S, Giri S, Mohanty S. Functional Skin Grafts: Where Biomaterials Meet Stem Cells. Li TS, editor. *Stem Cells Int* [Internet]. 2019;2019:1286054. Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/1286054>
20. World Health Organization. A WHO plan for burn prevention and care. 2008; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/97852>
21. Eriksson E, Liu PY, Schultz GS, Martins-Green MM, Tanaka R, Weir D, et al. Chronic wounds: Treatment consensus. *Wound Repair and Regeneration*. 2022 Mar 1;30(2):156–71.
22. Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, Dixit S, Sahu R, Pillai S, et al. Advances in skin regeneration using tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4).
23. Kumar A. Optimization of Transgene Expression in. 2011.
24. Murphy S v., Skardal A, Nelson RA, Sunnon K, Reid T, Clouse C, et al. Amnion Membrane Hydrogel and Amnion Membrane Powder Accelerate Wound Healing in

- a Full Thickness Porcine Skin Wound Model. *Stem Cells Transl Med.* 2019;
25. Toniato TV, Stocco TD, Martins D dos S, Santanna LB, Tim CR, Marciano FR, et al. Hybrid chitosan/amniotic membrane-based hydrogels for articular cartilage tissue engineering application. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [Internet]. 2019;0(0):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1636249>
 26. Yan LP, Wang YJ, Ren L, Wu G, Caridade SG, Fan JB, et al. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A.* 2010;95 A(2):465–75.
 27. Snyder DL, Sullivan N, Margolis DJ SK. Skin substitutes for treating chronic wounds. Technology Assessment Program Project [Internet]. 2020;WNTD0818. Available from: <http://www.ahrq.gov/research/findings/ta/index.html>.
 28. Nathoo R, Howe N, Cohen G. Skin Substitutes An Overview of the Key Players in Wound Management. 2014.
 29. Akbari Zahmati AH, Alipoor R, Rezaei Shahmirzadi A, Khor V, Abolhasani MM. Chemical Decellularization Methods and Its Effects on Extracellular Matrix. *Internal Medicine and Medical Investigation Journal.* 2017 Sep 11;2(3):76.
 30. McInnes AD, Moser MAJ, Chen X. Preparation and Use of Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering. Vol. 13, *Journal of Functional Biomaterials.* MDPI; 2022.
 31. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Vol. 32, *Biomaterials.* 2011. p. 3233–43.
 32. Taghiabadi E, Nasri S, Shafieyan S, Firoozinezhad SJ, Aghdami N. Fabrication and characterization of spongy denuded amniotic membrane based scaffold for tissue engineering. *Cell J.* 2015;16(4):476–87.
 33. Wernick B, Nahirniak P, Stawicki SP. Impaired Wound Healing. 2021;1–8.
 34. Burgess JL, Wyant WA, Abujamra BA, Kirsner RS, Jozic I. Diabetic wound-healing science. Vol. 57, *Medicina (Lithuania).* MDPI; 2021.
 35. Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther.* 2017;34(3):599–610.
 36. Hopfner U, Schenck TL, Chávez MN, Machens HG, Bohne AV, Nickelsen J, et al. Development of photosynthetic biomaterials for in vitro tissue engineering. *Acta*

- Biomater [Internet]. 2014;10(6):2712–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.055>
37. Kumar P. Classification of skin substitutes. *Burns*. 2008;34(1):148–9.
 38. Schenck TL, Hopfner U, Chávez MN, Machens HG, Somlai-Schweiger I, Giunta RE, et al. Photosynthetic biomaterials: A pathway towards autotrophic tissue engineering. *Acta Biomater* [Internet]. 2015;15(December 2014):39–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.12.012>
 39. Elkhenany H, El-Derby A, Abd Elkodous M, Salah RA, Lotfy A, El-Badri N. Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):1–19.
 40. Schmiedova I, Dembickaja A, Kiselakova L, Nowakova B, Slama P. Using of amniotic membrane derivatives for the treatment of chronic wounds. Vol. 11, *Membranes*. MDPI; 2021.
 41. Mamede AC, Botelhoeditors MF. Amniotic membrane: Origin, characterization and medical applications. *Amniotic Membrane: Origin Characterization and Medical Applications*. 2015;1–254.
 42. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian A. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2008;7:88–99.
 43. Davis JS. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Medical Journal* [Internet]. 1910;14:307–96. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1407162/pdf/annsurg00889-0033.pdf>
 44. Dragúňová J, Kabát P, Cucorová V, Hajska M, Koller J. Deep frozen amniotic membrane used as a scaffold and/or carrier for different cell types. *Cell Tissue Bank*. 2019;20(1):35–48.
 45. Wilshaw SP, Kearney J, Fisher J, Ingham E. Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(4):463–72.
 46. Sripriya R, Kumar R. Denudation of human amniotic membrane by a novel process and its characterisations for biomedical applications. *Prog Biomater*. 2016 Dec

1;5(3-4):161-72.

47. Zhao B, Zhang Y, Han S, Zhang W, Zhou Q, Guan H, et al. Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. *J Mol Histol.* 2017 Apr 1;48(2):121-32.
48. Friel NA, de Girolamo L, Gomoll AH, Mowry KC, Vines JB, Farr J. Amniotic Fluid, Cells, and Membrane Application. *Oper Tech Sports Med.* 2017 Mar 1;25(1):20-4.
49. Eisenbud DE. Oxygen in Wound Healing. Nutrient, Antibiotic, Signaling Molecule, and Therapeutic Agent. Vol. 39, *Clinics in Plastic Surgery.* 2012. p. 293-310.
50. Russo S, Kwiatkowski M, Govorukhina N, Bischoff R, Melgert BN. Meta-Inflammation and Metabolic Reprogramming of Macrophages in Diabetes and Obesity: The Importance of Metabolites. Vol. 12, *Frontiers in Immunology.* Frontiers Media S.A.; 2021.
51. Lee SH, Park SY, Choi CS. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. Vol. 46, *Diabetes and Metabolism Journal.* Korean Diabetes Association; 2022. p. 15-37.
52. Chávez MN, Schenck TL, Hopfner U, Centeno-Cerdas C, Somlai-Schweiger I, Schwarz C, et al. Towards autotrophic tissue engineering: Photosynthetic gene therapy for regeneration. *Biomaterials.* 2016;75:25-36.
53. Obaíd ML, Camacho JP, Brenet M, Corrales-Orovio R, Carvajal F, Martorell X, et al. A First in Human Trial Implanting Microalgae Shows Safety of Photosynthetic Therapy for the Effective Treatment of Full Thickness Skin Wounds. *Front Med (Lausanne).* 2021 Nov 30;8.
54. Hopf HW, Rollins MD. Wounds: An overview of the role of oxygen. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(8):1183-92.
55. Chávez MN, Moellhoff N, Schenck TL, Egaña JT, Nickelsen J. Photosymbiosis for Biomedical Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(October).
56. Ortega JS, Corrales-Orovio R, Ralph P, Egaña JT, Gentile C. Photosynthetic microorganisms for the oxygenation of advanced 3D bioprinted tissues. *Acta Biomaterialia.* Acta Materialia Inc; 2022.
57. Saghizadeh M, Winkler MA, Kramerov AA, Hemmati DM, Ghiam CA, Dimitrijevic SD, et al. A simple alkaline method for decellularizing human amniotic membrane

- for cell culture. PLoS One. 2013;8(11).
58. Khosravimelal S, Momeni M, Gholipur M, Kundu SC, Gholipourmalekabadi M. Protocols for decellularization of human amniotic membrane [Internet]. 1st ed. Vol. 157, Methods in Cell Biology. Elsevier Inc.; 2020. 37–47 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.11.004>
 59. Milan PB, Amini N, Joghataei MT, Ebrahimi L, Amoupour M, Sarveazad A, et al. Decellularized human amniotic membrane: From animal models to clinical trials. Methods [Internet]. 2020 Jan 15;171:11–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202319301306>
 60. Da LC, Huang YZ, Xie HQ, Zheng BH, Huang YC, Du SR. Membranous extracellular matrix-based scaffolds for skin wound healing. Vol. 13, Pharmaceutics. MDPI; 2021.
 61. Wang X, Yang C, Yu Y, Zhao Y. In Situ 3D Bioprinting Living Photosynthetic Scaffolds for Autotrophic Wound Healing. Research. 2022 Jan 20;2022:1–11.
 62. Freudenberg U, Zieris A, Chwalek K, Tsurkan M V., Maitz MF, Atallah P, et al. Heparin desulfation modulates VEGF release and angiogenesis in diabetic wounds. Journal of Controlled Release. 2015 Dec 28;220:79–88.
 63. Ullah I, Abu-Dawud R, Busch JF, Rabien A, Erguen B, Fischer I, et al. VEGF – Supplemented extracellular matrix is sufficient to induce endothelial differentiation of human iPSC. Biomaterials. 2019 Sep 1;216.
 64. Wang C, Li G, Cui K, Chai Z, Huang Z, Liu Y, et al. Sulfated glycosaminoglycans in decellularized placenta matrix as critical regulators for cutaneous wound healing. Acta Biomater. 2021 Mar 1;122:199–210.
 65. Wadstrom T, Ljungh A. Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity. Vol. 48, J. Med. Microbiol.
 66. Guzman-Murillo MA, Ascencio F. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and Helicobacter pylori to tissue culture cells.
 67. Cohen E, Merzendorfer H. Biologically-Inspired Systems Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices [Internet]. Available from: <http://www.springer.com/series/8430>

68. Juhlin L. Hyaluronan in skin. In: Journal of Internal Medicine. Blackwell Publishing Ltd; 1997. p. 61–6.
69. Maharjan S, Alva J, Cámara C, Rubio AG, Hernández D, Delavaux C, et al. Symbiotic Photosynthetic Oxygenation within 3D-Bioprinted Vascularized Tissues. Matter. 2021 Jan 6;4(1):217–40.

ANEXOS

Anexo 1. *Consentimiento informado para donación de membrana amniótica.*



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MADRES

Solicitud de donación de membrana amniótica (MA) para futuros estudios del uso terapéutico de la MA

El propósito del presente documento es solicitar su colaboración en el estudio titulado ***“AMNIOGREEN: Apósito Simbiótico Fotosintético para el Tratamiento de Heridas Crónicas”***, cuyo investigador principal es la Dr. Sebastián San Martín H y es patrocinado por el Director de Investigación de la Universidad de Valparaíso. Su colaboración consiste en la donación de la membrana amniótica (MA), la cual es generalmente desechada después del parto junto con el cordón umbilical que va adherida a la placenta.

Para que usted pueda tomar una decisión informada le explicaremos a continuación, el fin del porque utilizaremos la MA y los beneficios que nos otorgará su donación.

A pesar de los grandes avances en los tratamientos actuales, las heridas cutáneas extensas, profundas y crónicas son devastadoras para los pacientes. Particularmente en los casos de las heridas crónicas diabéticas, terminando incluso en la necesidad de realizar la amputación de la extremidad afectada. Desde principio del siglo XX se ha utilizado la MA con éxito en el tratamiento de heridas, otorgando una variedad de beneficios, tales como, regenerativas y antiinflamatorias. Sin embargo, el suministro apropiado de oxígeno en la zona afectada continua siendo uno de los grandes problemas en el diseño de sustitutos dérmicos, molécula clave durante el proceso de cicatrización.

Por lo tanto, este estudio tiene como principal objetivo la generación de un apósito temporal de membrana amniótica humana descellularizada integrada por la microalga fotosintética *Chlamydomonas reinhardtii*, permitiendo conjugar la capacidad de producción de oxígeno al ser estimulado por una fuente lumínica con las regenerativas de la MA en un solo implante. Aportando mayores beneficios desde el punto de vista de eficacia del tratamiento y por otro al utilizar la MA derivada de la donación de placentas, una disminución en los costos para la generación de este nuevo apósito.

¿Qué debo hacer para acceder a la donación?

Si usted accede a donar, debe firmar este documento, y comunicárselo a su médico o profesional de la salud tratante. La membrana amniótica, será recolectada por el médico o profesional de la salud tratante para después ser enviados al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Valparaíso. También se obtendrán de su ficha los antecedentes de exámenes de sangre para descartar enfermedades contagiosas (sífilis, hepatitis, HIV y CMV). Una vez en el Centro, las muestras serán procesadas, estudiadas y posteriormente se congelarán.

¿Qué se hará con el tejido donado?

Los tejidos por usted donado (membrana amniótica) serán procesados como se ha indicado anteriormente y congelados en las dependencias del Centro para su posterior estudio sobre futuras aplicaciones terapéuticas de la MA.

Riesgos

La obtención de la membrana amniótica, no implica un mayor riesgo en su parto ni para usted ni para el bebé.

Su donación es voluntaria. Si usted no quiere donar, no se verá afectada en modo alguno en la presente o futura atención médica, ni en los cuidados de salud que usted requiera.

Usted tiene derecho a recibir una copia firmada de esta "HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO" y puede tener la completa seguridad, que en ningún momento se utilizarán ni comunicarán sus datos personales. Su nombre no aparecerá en ningún informe del Centro, ni será revelado a otra persona. Usted puede hacer todas las preguntas que estime convenientes acerca de la donación de membrana amniótica.

Ante cualquier consulta que desee realizar, contáctese con el médico tratante, o con el investigador y académico de la Universidad de Valparaíso, Dr. Sebastián San Martín H.

De acuerdo a lo declarado por mí en este documento, firmo aceptando mi participación en esta investigación.

Nombre, apellidos y firma

Rut:

Nombre y apellido investigadores, firma, fono y mail de contacto.

Valparaíso, ...de 2022

Anexo 2. *Códigos utilizados en ImageJ para el análisis de imágenes histológicas*

Tricrómica de Masson

```
1 rename("X");
2 run("Duplicate...", " ");
3 run("Colour Deconvolution", "vectors=[User values] hide [r1]=14.265393 [g1]=5.897576 [b1]=2.3179543 [r2]=5.2882377 [g2]=5.4575744 [b2]=6.1859345 [r3]=3.3735046 [g3]=3.806698 [b3]=2.3864486");
4 selectWindow("X-1-(Colour_3)");
5 close();
6 close();
7 setAutoThreshold("Default");
8 //run("Threshold...");
9 //setThreshold(0, 237);
10 setOption("BlackBackground", true);
11 run("Convert to Mask");
12 selectWindow("X-1");
13 run("8-bit");
14 selectWindow("X");
15 close();
16 run("Images to Stack", "use");
```

Azul de alcian pH1

```
1 rename("X");
2 run("Duplicate...", " ");
3 run("Colour Deconvolution", "vectors=[User values] hide [r1]=14.265393 [g1]=5.897576 [b1]=2.3179543 [r2]=5.2882377 [g2]=5.4575744 [b2]=6.1859345 [r3]=3.3735046 [g3]=3.806698 [b3]=2.3864486");
4 selectWindow("X-1-(Colour_3)");
5 close();
6 close();
7 setAutoThreshold("Default");
8 //run("Threshold...");
9 //setThreshold(0, 237);
10 setOption("BlackBackground", true);
11 run("Convert to Mask");
12 selectWindow("X-1");
13 run("8-bit");
14 selectWindow("X");
15 close();
16 run("Images to Stack", "use");
```

Azul de alcian pH2.5

```
1 rename("X");
2 run("Duplicate...", " ");
3 run("Colour Deconvolution", "vectors=[User values] hide [r1]=11.22997 [g1]=13.267188 [b1]=4.7068977 [r2]=10.699571 [g2]=7.4755926 [b2]=10.722864 [r3]=8.591532 [g3]=7.2386084 [b3]=5.8065577");
4 selectWindow("X-1-(Colour_3)");
5 selectWindow("X-1-(Colour_3)");
6 close();
7 close();
8 setAutoThreshold("Default");
9 //run("Threshold...");
10 //setThreshold(0, 230);
11 setOption("BlackBackground", true);
12 run("Convert to Mask");
13 selectWindow("X-1");
14 close();
15 selectWindow("X");
16 run("8-bit");
17 run("Images to Stack", "use");
```