

**ESTABILIDAD, SEGURIDAD Y VIABILIDAD DE LA MEMBRANA  
AMNIOTICA PRESERVADA EN EUSOL-C, EN COMPARACIÓN  
CON LA PRESERVADA EN GLICERINA Y LA PRESERVADA EN  
SOLUCIÓN SALINA**

**Investigador  
Santiago Mejía Martínez**

**Asesora  
Elsa María Vásquez Trespalacios  
Magíster en Epidemiología**

**Instituto de Ciencias de la Salud CES  
Facultad de Medicina  
Posgrado de Salud Pública en Epidemiología  
Medellín  
2020**

**ESTABILIDAD, SEGURIDAD Y VIABILIDAD DE LA MEMBRANA  
AMNIOTICA PRESERVADA EN EUSOL-C, EN COMPARACIÓN  
CON LA PRESERVADA EN GLICERINA Y LA PRESERVADA EN  
SOLUCIÓN SALINA**

**Investigador  
Santiago Mejía Martínez**

**Trabajo de investigación para optar por el título de especialista  
en epidemiología**

**Asesora  
Elsa María Vásquez Trespalacios  
Magíster en Epidemiología**

**Instituto de Ciencias de la Salud CES  
Facultad de Medicina  
Posgrado de Salud Pública en Epidemiología  
Medellín  
2020**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>1. Formulación del problema</b> .....	8
1.1 Planteamiento del problema .....	8
<b>1.1. Justificación</b> .....	11
<b>1.2. Pregunta</b> .....	12
<b>2. Marco teórico</b> .....	12
<b>2.1. Historia</b> .....	12
<b>2.2. Definición, usos y características de MAH</b> .....	13
<b>2.3. Propiedades</b> .....	14
2.3.1. Propiedades mecánicas de la MAH .....	14
2.3.2. Propiedades fisiológicas de la MAH .....	15
<b>2.4. Procesamiento de la MAH</b> .....	15
2.4.1. Formas de preservación de MAH.....	16
2.4.2. Comportamiento de la MAH de acuerdo con diferentes medios de preservación .....	17
2.4.3. Regulación normativa en Colombia .....	18
<b>2.5. Eusol-c, cómo medio de preservación para MAH</b> .....	19

<b>3. Objetivos</b> .....	19
<b>3.1. Objetivo general</b> .....	19
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	19
<b>4. Metodología</b> .....	20
<b>4.1. Enfoque metodológico</b> .....	20
<b>4.2. Definición del tipo de estudio</b> .....	20
<b>4.2.1. Finalidad del estudio</b> .....	20
<b>4.2.2. Secuencia temporal</b> .....	20
<b>4.2.3. Direccionalidad del estudio</b> .....	20
<b>4.2.4. Asignación del factor de estudio</b> .....	20
<b>4.3. Población de referencia</b> .....	21
<b>4.3.1. Población de estudio</b> .....	21
<b>4.3.2. Muestra</b> .....	22
<b>4.3.3. Descripción de Variables</b> .....	23
<b>4.3.4. Diagrama de variables</b> .....	23
<b>4.3.5. Tabla de variables</b> .....	24
<b>4.3.6. Técnicas de recolección de la información</b> .....	25
<b>4.3.7. Fuentes de información</b> .....	25
<b>4.3.8. Técnica de recolección de la información</b> .....	25

4.3.9.	Instrumento de recolección de la información .....	30
4.3.10.	Proceso de recolección de la información .....	30
4.3.11.	Criterios de inclusión y exclusión .....	30
4.3.12.	Control de errores y sesgos .....	31
4.3.13.	Técnicas de procesamiento y análisis de los datos .....	32
5.	Consideraciones éticas.....	33
6.	Resultados .....	33
7.	Discusión.....	39
8.	Conclusiones .....	42
9.	Recomendaciones .....	42
10.	Referencias.....	43

## LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1.Diagrama del problema .....	111
Ilustración 2.Cálculo del tamaño muestral .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b> 3
Ilustración 3.Diagrama de variables.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b> 4
Ilustración 4.Distribución del MAH en estado basal	<b>¡Error! Marcador no definido.</b> 7
Ilustración 5.Distribución de MAH en solución salina.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b> 8
Ilustración 6.Distribución de MAH en glicerina.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b> 9
Ilustración 7.Distribución de MAH en Eusol-C .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b> 9
Ilustración 8.Estado basal 10X.....	34
Ilustración 9.Estado basal CK 10X.....	35
Ilustración 10.Membrana amniótica preservada 216 h en Eusol - C.....	36
Ilustración 11.Eusol – C a las 216 h.....	36
Ilustración 12.Glicerina a las 216 h.....	37
Ilustración 13. Solución salina a las 216h .....	37

## RESUMEN

**Introducción:** El presente estudio buscó evaluar la conservación de las propiedades de la membrana amniótica humana (MAH) en cuanto a la estabilidad histológica, seguridad microbiológica y la viabilidad de la monocapa epitelial, comparando tres medios de preservación, el Eusol – c, la glicerina al 98% y la Solución salina al 0,9% en el bando de ojos “Corporación donando vida” de la ciudad de Medellín en el año 2020.

**Materiales y métodos:** Se realizó un estudio preclínico o “In vitro” con un enfoque cuantitativo, de diseño cuasiexperimental y con intención analítica, en dónde se capturaron 2 membranas amnióticas de 2 maternas con parto por cesárea electiva en el hospital Manuel Uribe Ángel de la ciudad de Envigado – Antioquia, con edades entre 20 y 30 años de acuerdo con el protocolo del banco de ojos y en cámara de flujo laminar fueron divididas en 8 segmentos, (4 por cada amniótica donante); de las cuales, se utilizaron 6 para los grupos de preservación (2 para cada grupo) y las otras 2 se usaron como patrón de referencia para la medición de las propiedades en estado basal; es decir, antes de ser sometidas a los medios de preservación. Los grupos fueron divididos de acuerdo con el medio de preservación utilizado, el grupo #1 con Solución salina al 0.9%, el grupo #2 con Glicerina pura al 98% y el grupo #3 con Eusol-c. Para cada una de las 2 membranas amnióticas obtenidas, se realizó el mismo procedimiento y en cada uno de los medios de preservación se hizo seguimiento de las propiedades de la MAH al tercer día, al sexto día y al noveno día. Esta muestra corresponde a la estimada para una variable cuantitativa y debido a situaciones ajenas al estudio, se tuvo que modificar para la evaluación de la viabilidad, la medición de una variable cuantitativa (medición de concentración total de proteínas en el tejido), por una variable cualitativa (tinción inmunohistoquímica del epitelio), afectando el tamaño muestral y por ende el poder estadístico. Las variables dependientes para este estudio fueron 3, la estabilidad histológica que define la presencia o no presencia de las diferentes capas, la seguridad microbiológica que se define el momento de aparición de microorganismos y la viabilidad que se define *a la identificación por la técnica de inmunohistoquímica del grado de tinción de células normales del epitelio de la MAH*. Las variables independientes fueron 2, la evaluación de la MAH en estado basal antes de ser sometida a los medios de preservación en cuanto a los criterios de estabilidad histológica, seguridad microbiológica y viabilidad, y los diferentes medios de preservación evaluados tal cómo Solución salina, Glicerina y Eusol-c. Los métodos estadísticos utilizados para el análisis de los datos fueron en la caracterización el test exacto de Fischer y la prueba de la Q de Cochran para medidas repetidas para analizar las diferencias en los 3 momentos de medición.

**Resultados y discusión:** En condiciones In vitro nuestro estudio sugiere que la membrana amniótica preservada en Eusol-c conserva las propiedades mecánicas y fisiológicas que son necesarias para la reconstrucción y

tratamiento quirúrgico de las patologías de la superficie ocular y los favorables resultados de este estudio soportan la posible superioridad del Eusol – c como medio de preservación, sin embargo, se debe confirmar hallazgos con estudios con mayor potencia que muestren diferencias entre los tres medios de preservación comparados.

**Conclusión:** Este estudio propone un tema fundamental en la conservación de las propiedades de la MAH que se puede aplicar a los bancos de ojos de Colombia, con un medio de preservación conocido como el Eusol - c para la conservación de córneas humanas y debe verificarse con estudios posteriores antes de ser aplicado a seres humanos.

**Palabras clave:** Amniotic membrane, preservation solutions, Eusol, Glycerin, saline solution, viability, microbiological safety, stability.

## 1. Formulación del problema

### 1.1 Planteamiento del problema

El uso de la Membrana Amniótica Humana (MAH) con fines terapéuticos en Medicina se utiliza desde 1910 con David (1) y ha tenido usos exitosos en Dermatología en quemaduras extensas de piel (2), en Ginecología en reconstrucciones vaginales (3), en cirugía en liberación de adherencias peritoneales (4) y en Oftalmología fue Rotth en 1940 quien describe el uso de membranas placentarias incluyendo Corion y Amnios en la reparación de defectos conjuntivales, con éxitos parciales por involucrar posiblemente tejido inmunogénico (Corion)(5). En 1947 Sorsby utiliza MAH seca, como parche temporal para el tratamiento de quemaduras oculares por álcali (6). En 1992 Battle presenta su experiencia en el Bascom Palmer y esto motivó en 1995 a Kim y Tseng a realizar pruebas de reconstrucción de la superficie ocular en conejos con MAH conservada (7) y a Tsubota en 1996 a usar MAH conservada en la reconstrucción de la superficie ocular en pacientes con Penfigoide ocular cicatricial y Stevens Johnson (8)

La membrana placentaria humana posee una capa externa gruesa que está en contacto con la circulación materna llamada Corion, altamente inmunogénica e inductora de rechazo inmunológico por ser de origen materno y una capa interna semitransparente, avascular y altamente resistente que recubre al feto durante la gestación llamada Amnios MAH y por ser de origen fetal, no induce respuesta inmunológica y no desencadena episodios de rechazo (9,10).

La MAH debido a sus características de transparencia, a la composición del colágeno de su membrana basal similar a la conjuntiva y en menor grado a la córnea a la falta de estímulo inmunogénico y de su excelente capacidad de servir como sustrato para permitir el crecimiento, migración y adhesión de las células del epitelio



corneal y conjuntival, permiten que sea utilizada en Oftalmología con fines terapéuticos en la reconstrucción de la superficie ocular en una variedad de patologías que afectan a los componentes anatómicos como la conjuntiva, las células progenitoras del limbo y la córnea, así como su componente funcional constituido por la película lagrimal (9). Además se sabe de sus propiedades como sustrato para cultivo de células del limbo y su uso en reconstrucción de la superficie ocular (11,12).

La MAH está conformada por tres capas histológicas principales, incluyendo una monocapa epitelial funcional que posee diferentes factores de crecimiento que permiten el crecimiento, proliferación y adherencia de las células progenitoras a la superficie ocular, elementos bioquímicos anti cicatrizantes, anti inflamatorios, anti angiogénicos y antimicrobianos, una membrana basal intermedia gruesa que funciona como andamiaje o sustrato para la migración y crecimiento de las células progenitoras, y un estroma esponjoso adherente que atrapa las células inflamatorias de la superficie ocular y favorece su apoptosis apoyando también como efecto antiinflamatorio (13–15). Por tal motivo la membrana amniótica aporta fundamentalmente 2 propiedades, una bioquímica y otra mecánica o de sustrato.

La MAH puede ser utilizada fresca o no preservada, contenida en un recipiente con solución salina para uso casi inmediato para evitar su contaminación (16,17), o preservada en diferentes medios de preservación disminuyendo la posibilidad de contaminación y permitiendo su conservación por más tiempo.

Existen diferentes formas de preservación para la MAH incluyendo la Crio preservación, la Liofilización, la forma seca y en Glicerina, siendo la primera la más utilizada en los Estados Unidos y aprobada por la FDA(Food drugs administration), en la cual el tejido se conserva en un medio compuesto por Glicerina al 86% y una solución patentada por los autores (Eagle modificada de Dulbecco) y conservados a una temperatura de  $-75^{\circ}\text{C}$  a  $-85^{\circ}\text{C}$  permitiendo mantenerlo hasta por 2 años (18–21).

Debido al uso de químicos en los medios de preservación y a los procesos de congelación y descongelación, es posible que los factores de crecimiento que aporta la monocapa epitelial, se vean afectados y pudiera perderse sus bondades fisiológicas para el beneficio de la superficie ocular, aunque se seguiría manteniendo el componente de la membrana basal que su principal función sería servir de soporte o sustrato para permitir el crecimiento y migración de las células epiteliales (22). Esto ha conducido a que algunos autores han preferido el uso de MAH no preservada, buscando conservar sus componentes histológicos y sus propiedades bioquímicas y mecánicas, reportando mejores resultados a largo plazo (23–25).

En Colombia por razones de costos y buscando formas de preservación segura para los tejidos, las más utilizadas son la Glicerina permitiendo conservar el tejido hasta

por 1 año y la liofilización hasta 2 años, siendo esta última menos frecuente, con lo cual se asegura la esterilidad del tejido y se permite mantener su aporte mecánico para mejorar el crecimiento epitelial de la superficie ocular, afectando posiblemente el componente funcional de la monocapa epitelial y sus beneficios en la curación y reparación de la superficie ocular.

Actualmente existen en nuestro país 11 bancos de ojos aprobados por el Invima con certificado de buenas prácticas y en Medellín se cuenta con 3 bancos que suministran tejidos oculares y MAH a 7 instituciones oftalmológicas autorizadas para trasplante de córnea y uso de MAH.

La principal indicación para el trasplante de córnea penetrante es la óptica que busca mejorar la visión, por lo cual los bancos de ojos suministran las córneas humanas en medios de preservación seguros, eficaces manteniendo la morfología y viabilidad de las células endoteliales, para permitir injertos de córnea exitosos y transparentes. El Eusol-c, es un medio utilizado con frecuencia para preservar córneas humanas y está compuesto por ingredientes como el Dextran como agente osmótico, el piruvato de Sodio y glucosa como agente energético, aminoácidos, sales minerales y vitaminas como nutrientes, gentamicina como antibiótico, bicarbonato como estabilizador y rojo fenol como indicador de PH, lo que le permite conservar el tejido corneal hasta 14 días para su uso (26). El Eusol-c es un medio aprobado por la FDA en los Estados Unidos de América y en Colombia tiene registro INVIMA para su uso por los bancos de ojos, y se ha demostrado su capacidad de preservar la córnea humana, se piensa que puede también preservar la MAH, con sus componentes histológicos y sus propiedades fisiológicas y mecánicas, que la hacen un tejido privilegiado para ayudar a reconstruir la superficie ocular en sus diferentes patologías. Se pretende entonces realizar un estudio en el banco de ojos "Donando vida" ubicado en la ciudad de Medellín, en donde se compare la MAH preservada en Eusol-c, con MAH preservada en glicerina y con MAH preservada en solución salina, analizando pruebas histológicas, microbiológicas y bioquímicas para cada grupo, para poder demostrar con los resultados obtenidos que el Eusol-c puede ser útil para preservar la MAH con todas sus propiedades mecánicas y bioquímicas, permitiendo suministrar un tejido más íntegro para su uso en medicina y especialmente en oftalmología, obteniendo posiblemente mejores resultados en las cirugías de pacientes que requieren de este tejido para ayudar a restaurar la salud ocular, ver figura 1

Ilustración 1. Diagrama del problema



Ilustración 1: Santiago Mejía M

### 1.1. Justificación

La importancia de poder utilizar la MAH para el tratamiento quirúrgico de las patologías de la superficie ocular ha sido demostrada en varias publicaciones médicas oftalmológicas y sus beneficios se deben a que este tejido es privilegiado al ser semitransparente, con una composición del colágeno en la membrana basal similar a la conjuntiva y a la córnea, que permite servir de sustrato para el crecimiento, diferenciación y migración celular (9), además de contener factores de crecimiento, citoquinas y sustancias inhibitorias de las metaloproteinasas en su monocapa epitelial, que favorecen la curación y regeneración de la superficie ocular (13). El poder suministrar este tejido con todas sus propiedades mecánicas y bioquímicas como lo ofrece la MAH no preservada, pero con un medio de preservación que asegure esterilización y conservación de estas propiedades, hace que el Eusol-c como medio de preservación de córneas humanas (26), pueda también ser utilizado por los bancos de ojos para preservar la MAH, con los beneficios para los pacientes afectados que requieran de este tejido para mejorar la salud ocular. Si el Eusol-c demuestra con este estudio ser un medio de preservación que conserva estos beneficios de la MAH, será distribuido para su uso regularmente para las cirugías que benefician a todos los pacientes en nuestra ciudad y para todo el país.

Actualmente la MAH que se distribuye en nuestro país es preservada en Glicerina o mediante la liofilización y no disponemos de estudios que confirmen que estos métodos conserven las propiedades de la MAH para su uso en oftalmología, este estudio busca demostrar que el medio de preservación en Eusol-c conserva sus propiedades.

La viabilidad del estudio está asegurada porque se dispone del banco de ojos con buenas prácticas aprobado por el INVIMA, con convenios que autorizan la captación de placentas humanas en el Hospital Manuel Uribe Ángel, con protocolo de procesamiento del tejido y convenios institucionales para los estudios microbiológicos, histológicos y bioquímicos que permiten ver la estabilidad histológica, la seguridad microbiológica y viabilidad de la MAH. Los recursos son obtenidos del banco de ojos, dentro de sus políticas de investigación y desarrollo científico, contando con el tiempo y el personal para su ejecución.

Este proyecto es importante ejecutarlo, debido a que sería innovador en nuestro país, y se podría suministrar un tejido con todas las propiedades fisicoquímicas a los oftalmólogos que lo necesiten para sus pacientes, a unos costos razonables que beneficiaría a los usuarios.

Es un estudio preclínico, in vitro, que los beneficios son mayores que los riesgos y con problemas éticos de poca importancia, en relación con la captación de placentas en las maternas y su autorización.

## **1.2. Pregunta**

¿Existen diferencias en la conservación de la MAH en cuanto a la estabilidad histológica, la seguridad microbiológica y la viabilidad entre los diferentes medios de preservación como el Eusol-c, la Glicerina y la Solución salina?

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Historia**

El uso de la Membrana Amniótica Humana (MAH) con fines terapéuticos en Medicina se utiliza desde 1910 con David (1) y ha tenido usos exitosos en Dermatología en quemaduras extensas de piel (2), en Ginecología en reconstrucciones vaginales (3), en cirugía en liberación de adherencias peritoneales (4) y en Onfalocela (27). En Oftalmología fue Rotth quien describe el uso de membranas placentarias incluyendo Corion y Amnios en la reparación de defectos conjuntivales, con éxitos parciales por involucrar posiblemente tejido inmunogénico (Corion)(5). Posteriormente en 1946 Sorsby y Simons utilizan MAH seca, como parche temporal para el tratamiento de quemaduras oculares por álcali(6). En 1992

Battle presenta su experiencia en el Bascom Palmer y esto motivó en 1995 a Kim y Tseng a realizar pruebas de reconstrucción de la superficie ocular en conejos con MAH conservada (7) y a Tsubota en 1996 a usar MAH conservada en la reconstrucción de la superficie ocular en pacientes con Penfigoide ocular cicatricial y Stevens Johnson(8). Se han mostrado posteriormente diferentes reportes sobre el uso de MAH en úlceras de córnea que no cierran y como ayudante a la curación fisiológica de úlceras(9).

## 2.2. Definición, usos y características de MAH

La placenta humana posee una capa externa gruesa que está en contacto con la circulación materna llamada Corion, altamente inmunogénica e inductora de rechazo inmunológico por ser de origen materno y una capa interna semitransparente, avascular y altamente resistente que recubre al feto durante la gestación llamada Amnios o Membrana Amniótica humana (MAH), que, por ser de origen fetal, no induce respuesta inmunológica y no desencadena episodios de rechazo inmunológico(9,10).

Estas características únicas de la membrana amniótica y de su excelente capacidad de servir como sustrato para permitir el crecimiento, migración y adhesión de las células del epitelio corneal y conjuntival, permiten que sea utilizada en Oftalmología con fines terapéuticos en la reconstrucción de la superficie ocular en una variedad de patologías que afectan a la Conjuntiva, la Córnea, y otras misceláneas (9), ver tabla 1.

*Tabla 1: Usos más frecuentes de MAH en oftalmología*

Usos más frecuentes de MAH en Oftalmología
Reconstrucción Cornea Deficiencia de células progenitoras del limbo -Parcial -Total Autoinjerto de células progenitoras del limbo o aloinjerto Células progenitoras del limbo cultivadas y MAH como sustrato para su crecimiento Úlceras o perforaciones Queratopatía bullosa
Reconstrucción Conjuntival Pterigión Tumores Simbléfaron

Misceláneas Injerto Condiciones inflamatorias agudas Queratopatía en banda Conjuntivochalasis Conjuntivitis Vernal Cirugía de glaucoma y complicaciones
---

*Tabla 1 (9)*

Se describe una nueva estrategia para el tratamiento de deficiencia de las células del limbo progenitoras y consiste en el cultivo de estas células ex vivo sobre MAH en el laboratorio, ya que este tejido es un sustrato biológico ideal que ayuda al crecimiento y expansión de las células, permitiendo obtener un tejido con células progenitoras vivas para ser trasplantado a la superficie ocular (11,12).

Histológicamente la Membrana Amniótica Humana (MAH) está compuesta de 3 capas:

Monocapa de células epiteliales cuboidales con abundantes microvellosidades, metabólicamente activa, que producen sustancias importantes como el Factor de crecimiento epitelial (FCE), Factor de crecimiento Básico fibroblástico (FCbF), Factor de Crecimiento del Queratinocito (FCQ) y su receptor, Factor de Crecimiento del Hepatocito (FCH) y su receptor, Factor de Crecimiento tumoral (y sus isoformas FCT a, FCT b-1, b-2 y b-3), Interleukinas 6 y 8 (IFN-c) e inhibidores tisulares de la metaloproteinasa 1,2 y 4 y péptidos vasoactivos (13).

Membrana basal gruesa compuesta por colágeno IV y VII, fibronectina, lamininas y ácido hialurónico, muy similares a la composición de las membranas basales de la conjuntiva y con diferencias a la de la córnea sólo en las sub cadenas del colágeno IV y laminina(14).

Estroma avascular y esponjosa, compuesta por fibroblastos y colágeno I, II, III, V and VI(15).

## **2.3. Propiedades**

### **2.3.1. Propiedades mecánicas de la MAH**

Por su similitud con la conjuntiva y la córnea en la estructura del colágeno y por su transparencia se utiliza en Oftalmología, ya que la membrana basal de la MAH sirve como sustrato o andamiaje ideal que favorece el crecimiento de las células progenitoras del epitelio ayudando a la regeneración epitelial de la superficie ocular(14,28).

### 2.3.2. Propiedades fisiológicas de la MAH

- Favorece la migración epitelial, la diferenciación, la adhesión de las células basales y previene la apoptosis celular, mediante la producción de FCE, FCH y FC(12,29–31).
- Efecto anti cicatrizante mediante la inhibición de la proliferación de fibroblastos conjuntivales, corneales y limbares y su diferenciación a miofibroblastos, por la supresión del Factor de Crecimiento tumoral Beta(32,33).
- Efecto antiinflamatorio propuesto por diferentes mecanismos, cómo la modulación de la producción de activina(34), la MAH contiene lactoferrina como proteína antibacteriana y antioxidante que suprime la producción de Interleukina 6(35), también posee antagonistas a los receptores de Interleukina 1 bloqueando su acción inflamatoria(36), así como la inhibición de otras citoquinas proinflamatorias como la IL-2, IL-8, IL-10, Factor de crecimiento fibroblástico beta, factor de necrosis tumoral y factor de crecimiento derivado de las plaquetas(37), posee inhibidores de las proteinasas y metaloproteiniasas(38) y el ácido hialurónico y los glucosaminoglicanos abundantes en el estroma de MAH, juegan un papel importante en la adhesión de células inflamatorias de la superficie ocular y linfocitos, en dónde quedan atrapadas y sufren el proceso de apoptosis celular(39).
- Efecto anti angiogénico debido a que la MAH tiene compuestos anti angiogénicos que incluyen la Trombospodina -1, la Endostatina y la Metaloproteiniasas inhibitoras de tejido (MPIT – 1,2,3 y 4)(11,40).
- Efecto antimicrobiano atribuible a la presencia de Lactoferrina, Bactricidina, Beta – Lisina, Lisozima, Transferrina y 7-S Inmunoglobulina en el Líquido amniótico en contacto con la MAH, además la MAH actúa como barrera mecánica que aísla la superficie ocular de posibles infecciones que puedan alcanzarla (41).

### 2.4. Procesamiento de la MAH

Existen diferentes protocolos que varían en cada país, para el estudio de la materna donante de placenta, la preparación y la preservación de la MAH, pero las recomendaciones básicas están dictadas por la “Guía para la calidad y seguridad de los tejidos y células para aplicación humana”, implementada por el Council de Europa a través del directorio Europeo para la calidad de la Medicina & el cuidado de la salud(42). En Colombia es captada por los técnicos previamente entrenados de los diferentes bancos de ojos existentes en las principales ciudades del país y es obtenida bajo condiciones de asepsia en cesáreas electivas para reducir el riesgo de contaminación microbiana por la ruptura de membranas y el paso a través del canal del parto(41–43). Se obtiene de maternas sanas y que previamente hayan firmado el consentimiento informado para autorizar la donación de la placenta y para la toma de muestras de sangre para realizar las pruebas infecciosas, con un control prenatal adecuado que descarte la presencia de enfermedades malignas, genéticas o transmisibles y con estudios serológicos negativos para HIV, Sífilis, Hepatitis B y C, Chagas, Toxoplasma, Citomegalovirus y HTLV 1 y2 (44,45).

La MAH procesada se mantiene en cuarentena hasta que el informe de las pruebas infecciosas sea negativo, posteriormente se libera para ser utilizada en cirugía y si alguna de las pruebas da positiva, se descarta la MAH procesada para su uso(23).

Durante la obtención en quirófano, la placenta con sus membranas es irrigada con solución salina 0.9% y se introduce en una bolsa con un poco de solución salina con antibiótico para evitar que se seque durante el transporte y se sella, para luego ser llevada rápidamente a las instalaciones del banco de ojos, en donde bajo condiciones de asepsia y bajo cámara de flujo laminar y con lavado abundante con solución salina 0.9% más una mezcla de antibióticos contra bacterias Gram + y Gram -y antimicótico, el coctel que más se recomienda consiste de penicilina 50 mcg/ml, estreptomina 50mcg/ml, neomicina 100 mcg/ml y anfotericina B 2.5 mcg/ml(44,46).

Se separa el Amnios del Corion por la técnica de pelamiento como cuidadoso para no dañar componente epitelial delicada de la MAH(24) y se obtiene una cantidad suficiente de MAH que se deja durante 3 horas en Solución salina con antibiótico. Posteriormente con tijera se corta cuidadosamente y se obtienen en promedio dependiendo del tamaño de la placenta unos 15 segmentos de 5 x 5 cm cada uno y se colocan sobre papel de nitrocelulosa con el estroma adherido al papel y la superficie epitelial hacia arriba y se introducen en recipientes de depósito que generalmente son cajas de Petri o frascos estériles. Luego de este proceso se puede distribuir la Amniótica fresca, en la cual solo se conserva con solución salina sin antibiótico para su uso inmediato(16,17) o preservada con diferentes técnicas que buscan minimizar el riesgo de contaminación del tejido donante y permiten su uso con un mayor tiempo de preservación.

Si bien el uso de MAH no preservada y preservada son igualmente efectivas cuando se utilizan sobre la superficie ocular(41), posiblemente la vitalidad de las células epiteliales de MAH y su capacidad proliferativa se pueden ver afectadas en los diferentes procesos de preservación, perdiendo las propiedades fisiológicas y de curación, pero conservando la membrana basal fuerte como sustrato y la matriz estromal(22,25), por esto algunos autores prefieren el uso de MAH no preservada con mejores resultados(23,24,47).

#### **2.4.1. Formas de preservación de MAH**

Existen diferentes formas de Preservación de MAH y a continuación se describen las más comúnmente utilizadas:

- **Crío preservada:** Es forma aprobada por la FDA (Food drug administration) en USA(48) y es la más utilizada, es basada en la metodología descrita por Tseng, en donde a los segmentos de MAH que están en los recipientes se les introduce una solución compuesta por Glicerina al 86% en un medio Eagle modificado de



Dulbecco (En inglés DMEM) con una proporción 1:1(18,32,46) y preservadas a una temperatura de -75 a -85° centígrados, con lo que se permite conservar el tejido hasta por 2 años(19).

- **Liofilizada:** Los segmentos obtenidos son congelados a -50 a -80° C y son deshidratados al vacío disminuyendo la concentración de agua a máximo un 5 a 10%, luego usualmente se irradia con rayos Gamma para su esterilización(20,21). Se describe que puede someterse antes de la liofilización, a lio protectores de sacarosa para reducir el daño celular y mejorar su estabilidad bioquímica(20).
- **Forma seca:** Los segmentos son dejados a temperatura ambiente y cubierto por una campana permeable que permiten que sean expuestos al aire durante 24 horas y luego se esterilizan utilizando rayos gamma(18,20,21).
- **Glicerina:** Dentro de los recipientes que contienen los segmentos se les adiciona Glicerina pura no diluida al 98%, con lo cual permite que la MAH pueda ser preservada hasta por 1 año para su uso, y con propiedades antivirales y antibacterianas(49). Esta forma de preservación está certificada y es comercialmente disponible por Laboratorios Alchimia en Italia, y es útil clínicamente como vendaje biológico(50).

#### **2.4.2. Comportamiento de la MAH de acuerdo con diferentes medios de preservación**

En el estudio de Rodríguez-Ares en donde se investigó la influencia de la liofilización y la crio preservación en comparación con MAH no preservada, valuando las características histológicas y los niveles de factores de crecimiento, se encontró que la liofilización mantiene la estructura histológica de la MAH, aunque con más alteraciones que la crio preservación y el nivel de proteínas y factores de crecimiento son mejor conservados por la crio - preservación. En cuanto a la comparación entre la concentración total de proteínas entre la MAH no preservada la crio preservada, se encontró una diferencia con significación estadística a favor de la MAH no preservada y la liofilizada ( $p=0,009$ ), con un valor de referencia de 0.30 (0.003 – 1.19) en la MAH no preservada ver tabla y en cuanto al FCE, encontraron cifras menores en la MAH no preservada en comparación con la liofilizada y la preservada, con significación estadística, hallazgo posiblemente explicado la destrucción celular y liberación de proteínas al estar sometida la MAH a los medios de preservación, ver tabla 2(51). Las citoqueratinas son proteínas estructurales del citoesqueleto de las células epiteliales y su identificación mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra estas queratinas, producen una reacción antígeno - anticuerpo que generan una tinción útil en casi todos los tejidos epiteliales sanos y enfermos, presentando tinciones moderadas o débiles en epitelios con compromiso de la viabilidad e integridad fuertes en epitelios sanos y viables (52). La técnica de inmunohistoquímica se utiliza en la búsqueda de antígenos de células o tejidos que van desde aminoácidos y proteínas a agentes infecciosos y poblaciones celulares específicas(53).

La técnica comprende dos fases: 1. Preparación del portaobjetos (fijación de muestra y procesamiento de tejidos) y etapas desarrolladas para la reacción (en orden: recuperación de antígeno, bloqueo de sitio no específico, bloqueo de peroxidasa endógena, incubación primaria de anticuerpos, empleo de sistemas de detección revelación, contra tinción, montaje y almacenamiento). 2. Interpretación y cuantificación de la expresión obtenida (54).

*Tabla 2:* Concentración total de proteínas MAH

	NP-HAM	L-HAM	C-HAM
Total protein amount* (mg/ml)	0.30 (0.003–1.19)	0.13 (0.00–0.30)	0.12 (0.00–0.92)
EGF* <sup>†</sup> (ng/mg)	0.00 (0.00–0.48)	0.24 (0.00–0.91)	0.47 (0.00–1.11)
bFGF* <sup>‡</sup> (ng/mg)	0.92 (0.00–1.61)	0.11 (0.00–0.74)	1.44 (0.00–2.83)
KGF* <sup>†</sup> (ng/mg)	0.13 (0.00–0.64)	0.00 (0.00–0.17)	0.04 (0.00–0.17)
HGF (ng/mg)	7.22 (0.00–26.5)	0.09 (0.00–12.9)	3.87 (0.00–10.9)
NGF (ng/mg)	0.44 (0.00–2.03)	0.31 (0.00–03.12)	0.69 (0.00–2.08)
TGF- $\beta$ 1 (ng/mg)	0.003 (0.00–0.59)	0.10 (0.00–1.91)	0.03 (0.00–0.29)

\* P < 0.05 for differences between the NP-HAM and L-HAM groups.

<sup>†</sup> P < 0.05 for differences between the NP-HAM and C-HAM groups.

<sup>‡</sup> P < 0.05 for differences between the L-HAM and C-HAM groups.

HAM = human amniotic membrane; NP-HAM = non-preserved-HAM; L-HAM = lyophilized HAM; C-HAM = cryopreserved HAM; EGF = epidermal growth factor; bFGF = fibroblast growth factor basic; KGF = keratinocyte growth factor; HGF = hepatocyte growth factor; NGF = nerve growth factor; TGF- $\beta$ 1 = transforming growth factor- $\beta$ 1.

*Tabla 2:* (51)

Debido a la posibilidad de contaminación con bacterias aeróbicas, anaeróbicas y hongos, el uso de MAH no preservada, puede portar microorganismos altamente virulentos y patogénicos, describiéndose también el riesgo de transmisión de enfermedades(43), por lo que no se recomienda su liberación para uso terapéutico, pues se han descrito aun realizando muestras microbiológicas previas y con un adecuado proceso del tejido en condiciones asépticas, reportes de contaminación postquirúrgica que varían de 1.6%-8% con bacterias Gram +(26,55), por tal motivo se utiliza más frecuentemente el uso de MAH preservada en el mundo.

### 2.4.3. Regulación normativa en Colombia

En Colombia actualmente el uso de MAH no preservada o fresca no se permite por regulación del INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos) y las formas de preservación más utilizadas, son en Glicerina y liofilizadas, dependiendo del banco de ojos que suministre el tejido, sabiendo de ante mano que estos procesos de preservación conservan la membrana basal y sus propiedades como sustrato para favorecer la regeneración epitelial, pero que posiblemente limitan sus propiedades farmacológicas y bioquímicas que favorecen el proceso de curación de la superficie ocular (23).

## **2.5. Eusol-c, cómo medio de preservación para MAH**

En la actualidad el medio de preservación para córneas humanas más utilizado en Colombia en los diferentes Bancos de ojos es el Eusol-c, un medio producido por Laboratorios Alkimia en Italia, totalmente sintético que permite la conservación del tejido a 4°C hasta por 14 días, existiendo un reporte por Yüksel de la pérdida del 24,5% del conteo de células endoteliales en el día 8° de preservación(56). Este producto tiene autorización para su venta en USA por la FDA y permite antes de su uso almacenarse a la temperatura ambiente, y con el indicador de rojo fenol se pueden ver variaciones en el PH para su utilización. Sus ingredientes son el Dextran como agente osmótico, glucosa y piruvato como fuente energética, gentamicina como antibiótico, bicarbonato como estabilizador y rojo fenol como indicador de PH.

Conociendo las bondades confirmadas del uso de la MAH en Oftalmología, se piensa a través de los Bancos de Ojos procesar y distribuir un tejido preservado que mantenga sus propiedades mecánicas de membrana basal y bioquímicas de Factores de crecimiento, utilizando el medio de preservación de Eusol-c, el cual demuestra sus bondades en la preservación del tejido corneal con sus células endoteliales que son altamente especializadas y sumamente delicadas, pensamos que si su beneficio está demostrado para córnea humanas, también se puede demostrar para preservar MAH, con un tiempo límite para su utilización.

Debido a que por razones de reglamentación del INVIMA en Colombia sólo se permite distribuir MAH preservada con posibilidad de afectación de las células epiteliales y sus beneficios terapéuticos.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo general**

“Evaluar la estabilidad, seguridad y viabilidad de la membrana amniótica preservada en Eusol-c, en comparación con la preservada en Glicerina al 98% y la preservada en Solución salina al 0,9%”.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar los componentes histológicos, microbiológicos y de viabilidad de MAH antes de ser sometida a los esquemas de preservación.
- Analizar la estabilidad histológica, la seguridad microbiológica y la viabilidad de la MAH en los días 3, 6, y 9, para cada uno de los medios de preservación como el Eusol-c, la Glicerina y la solución Salina.”

- Comparar los resultados en cuanto a estabilidad histológica, seguridad microbiológica y viabilidad entre los grupos de preservación en cada uno de los días de evaluación.

#### **4. Metodología**

##### **4.1. Enfoque metodológico**

Se realizó un Estudio en dónde se formula la hipótesis de que la MAH preservada en Eusol-c conserva las características mecánicas y fisiológicas para su uso en oftalmología, y para esto se hizo el diseño de un estudio con un Enfoque Cuantitativo, porque se evaluó a través de los datos a analizar.

##### **4.2. Definición del tipo de estudio**

###### **4.2.1. Finalidad del estudio**

Es un estudio en fase preclínica o In vitro porque se hizo en tejidos humanos, de diseño cuasiexperimental porque se manipulo intencionalmente la membrana amniótica humana con 3 diferentes medios de preservación (Eusol-c, Glicerina al 98% y Solución salina al 0.9%), sin utilizar el proceso de aleatorización, con intención analítica porque se hará una comparación de los efectos que produce en la MAH cada uno de los medios en cuanto a la estabilidad, seguridad y viabilidad.

###### **4.2.2. Secuencia temporal**

Es un estudio Longitudinal, porque se evaluó en diferentes momentos de tiempo, la estabilidad, seguridad y viabilidad de la MAH para cada uno de los esquemas de preservación evaluados.

###### **4.2.3. Direccionalidad del estudio**

Es un estudio prospectivo de fuente de información primaria, porque los datos son nuevos y se obtuvieron por el investigador durante el tiempo que tardó la investigación.

###### **4.2.4. Asignación del factor de estudio**

Es un estudio cuasiexperimental puesto que se sometió la MAH a 3 medios de preservación y se evaluaron como cambian los parámetros de estabilidad, seguridad y viabilidad en el tejido, de acuerdo a cada medio de preservación. La definición de las propiedades de la MAH se define claramente a continuación:

- **Estabilidad histológica:** se procesó un fragmento de cada pieza de MAH en bloque y con tinción de hematoxilina – eosina para diferenciar las diferentes

estructuras celulares y capas, definiéndose el concepto de estabilidad histológica cuando hay presencia de las 3 capas en el tejido evaluado.

- **Seguridad Microbiológica:** se tomó un fragmento de cada pieza de MAH para cultivo de bacterias anaerobias en medios de cultivo Tioglicolato, para bacterias aeróbicas en Agar sangre y para hongos en medio de Saboraud. Se define el concepto de seguridad microbiológica hasta cuando se detecta crecimiento de algún microorganismo en las muestras evaluadas, luego de lo cual se considera que no hay seguridad.
- **Viabilidad:** se tomó un fragmento de cada pieza de MAH, se procesó en bloque de parafina y se realizaron cortes en forma de láminas, para la detección de las células epiteliales normales de la MAH. Se define el concepto de viabilidad *a la identificación por la técnica de inmunohistoquímica de células normales del epitelio antes de ser sometidas a los diferentes medios de preservación, esta técnica utiliza anticuerpos monoclonales que reaccionan contra las citoqueratinas del epitelio generando una reacción antígeno – anticuerpo y produciendo una tinción que se hace fuerte en células del epitelio viables y moderada o débil en células menos viables.* En la interpretación se usó una técnica cualitativa la cual consiste en realizar una comparación entre la población celular en estudio con un tejido control positivo que se monta en un extremo de la misma placa y permite verificar que la marcación se localice en el sitio adecuado de la localización del antígeno (membrana, citoplasma o núcleo) y se graduó la intensidad de la misma teniendo en cuenta que la expresión por el control se considera la máxima expresión en una escala previamente definida como fuerte, moderada o leve o como : +, ++, +++; el dato obtenido fue obtenido como parámetro de comparación para las medidas posteriores en cada uno de los grupos de exposición a los medios de preservación.

### 4.3. Población de referencia

La membrana amniótica humana (MAH).

#### 4.3.1. Población de estudio

Membrana amniótica humana MAH captada del hospital Manuel Uribe Ángel de Envigado de 2 maternas con parto por cesárea electiva que donan su placenta y esta se procesa en el Banco de ojos “Corporación Donando Vida” para la obtención de la MAH. El banco de ojos está ubicado en la ciudad de Medellín, cuenta con autorización del INVIMA y cuenta con la infraestructura necesaria para la realización, incluyendo 2 técnicos, director médico, director técnico, cámara de flujo laminar, insumos y dispositivos y convenios con laboratorios para el análisis histopatológico, microbiológico y bioquímico.

### 4.3.2. Muestra

Se obtuvieron 2 membranas amnióticas que fueron divididas en 8 segmentos, esta muestra corresponde a la estimada para una variable cuantitativa, que finalmente no se pudo obtener por dificultades que se detallan más adelante, inicialmente se realizó el cálculo del tamaño de la muestra con en el programa G\*Power versión 3.1; el cual, se hizo para estimar una ANOVA de medidas repetidas de un factor. Se tomó como referencia el estudio (Bora Yüksel, Umut Duygu Uzunel, Tuncay Küsbeci) (56), en el cual se toma el reporte de la preservación de células endoteliales de la córnea en Eusol- c al octavo día, donde se espera una preservación del 75,5% ( $1,658 \pm 373$ ), y para obtener la media con el método de solución salina, nos basamos en la experiencia del investigador; la cual, sugiere que se conserva el 30% de células endoteliales al octavo día; es decir, la media es el 30% (658) de la media basal (1,658).

La desviación estándar que se usa es la media basal al octavo día de medición en Eusol- c (373), ver tablas 2 (56) y 3. La estimación del tamaño de muestra con una confianza del 90% ( $\alpha 0,1$ ) es de 6 unidades de MAH, asignando 2 unidades experimentales por método de preservación, ver tablas 3 (56) y 4.

*Tabla 3: Medidas diarias del Eusol-c*

Table 1. Daily Mean ECD of the Donor Corneas From the Beginning Until the Eighth Day of Storage			
N = 27	Mean Endothelial Cell Density (cells/mm <sup>2</sup> ) ± SD	The Percentage of Endothelial Cell Loss	P Value*
Baseline	2195 ± 383	-	
First day	2066 ± 378	.9	.000
Second day	2007 ± 355	8.6	.005
Third day	1953 ± 330	11.0	.019
Fourth day	1919 ± 333	12.6	.000
Fifth day	1908 ± 356	13.1	.409
Sixth day	1865 ± 350	1.1	.000
Seventh day	1791 ± 374	18.4	.000
Eighth day	1658 ± 373	24.5	.000

\*Paired *t* tests.

*Tabla 3: (56)*

*Ilustración 2: Cálculo de tamaño muestral*

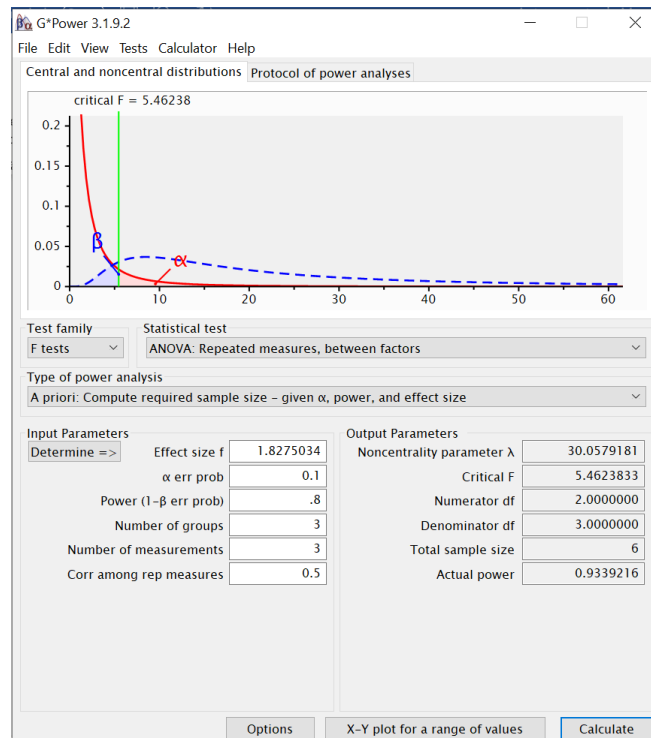


Ilustración 2: Santiago Mejía M.

Se considera un error  $\alpha$  de 0,1 debido a que errores más precisos del 0,05 implican un tamaño de muestra de 9 unidades, 3 para cada grupo de experimentación, con lo cual se aumentaría el número de mediciones de 60 con tamaño de muestra de 6 a 90, lo cual por costos haría el estudio no viable.

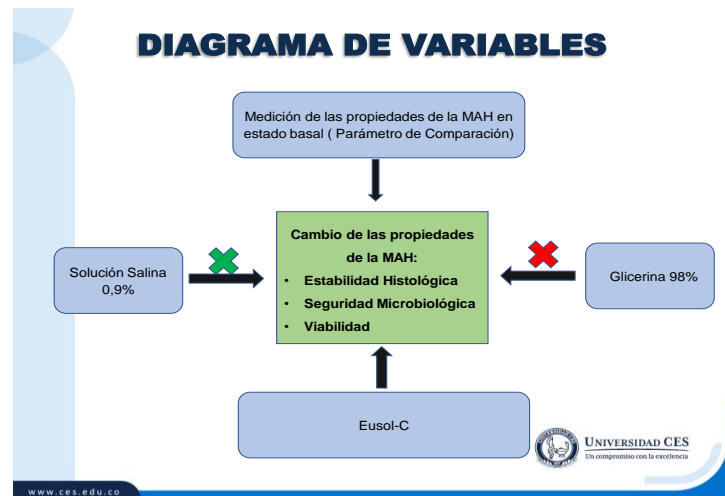
#### 4.3.3. Descripción de Variables

Las variables dependientes para este estudio fueron 3, la estabilidad histológica que define la presencia o no presencia de las diferentes capas, la seguridad microbiológica que se define el momento de aparición de microorganismos y la viabilidad que se define a la identificación por la técnica de inmunohistoquímica del grado de tinción de células normales del epitelio de la MAH. Las variables independientes fueron 2, la evaluación de la MAH en estado basal antes de ser sometida a los medios de preservación en cuanto a los criterios de estabilidad histológica, seguridad microbiológica y viabilidad, y los diferentes medios de preservación evaluados tal cómo solución salina, glicerina y Eusol-c.

#### 4.3.4. Diagrama de variables

En la figura 2 se describen cada una de las variables del estudio, tanto las dependientes como las independientes, indicando su nombre y respectiva definición.

*Ilustración 3: Diagrama de variables*



*Ilustración 3: Santiago Mejía M.*

#### 4.3.5. Tabla de variables

Para su presentación se utilizó una tabla, en la cual se relacionan cada una de ellas especificando su definición, naturaleza, nivel de medición, unidad de análisis y categorías de valores, ver tabla 4.

*Tabla 4: Tabla de variables*



VARIABLE		DEFINICIÓN	NATURALEZA	NIVEL DE MEDICIÓN	CATEGORÍA	VALORES O UNIDAD DE MEDIDA	
<b>VARIABLES DEPENDIENTES</b>							
Estabilidad Histológica	Presencia de monocapa epitelial	Capa superficial celular con propiedades bioquímicas	Cualitativa	Nominal dicotómica	1 (Si) 2 (No)	Na	
	Presencia de membrana basal	Capa intermedia acelular con propiedades de sustrato	Cualitativa	Nominal dicotómica	1 (Si) 2 (No)	Na	
	Presencia de estroma	Capa esponjosa profunda con glucosaminoglicanos	Cualitativa	Nominal dicotómica	1 (Si) 2 (No)	Na	
Seguridad microbiológica		Presencia de crecimiento microbiológico	Cualitativa	Nominal dicotómica	1 (Si) 2 (No)	Na	
Viabilidad	Marcadores inmunohistoquímicos	Grado de tinción de las células epiteliales de la MAH por reacción de anticuerpos monoclonales contra los antígenos de las citoqueratinas del epitelio	Cualitativa	Nominal dicotómica	Na	Na	
<b>VARIABLES INDEPENDIENTES</b>							
Grupos de preservación de MAH		Diferentes medios de preservación para conservar MAH	Cualitativa	Nominal politómica	1(Glicerina) 2(Eusol) 3(Solución salina)	Na Na Na	
Propiedades MAH en estado basal	Histológica	Monocapa epitelial	Capa superficial celular con propiedades bioquímicas	Cualitativa	Nominal dicotómica	1(Si) 2(No)	Na
		Membrana basal	Capa intermedia acelular con propiedades de sustrato	Cualitativa	Nominal dicotómica	1(Si) 2(No)	Na
		Estroma	Capa esponjosa profunda con glucosaminoglicanos	Cualitativa	Nominal dicotómica	1(Si) 2(No)	Na
	Microbiológica	Presencia de crecimiento microbiológico	Cualitativa	Nominal dicotómica	1(Si) 2(No)	Na	
	Viabilidad	Marcadores inmunohistoquímicos	Grado de tinción de las células epiteliales de la MAH por reacción de anticuerpos monoclonales contra los antígenos de las citoqueratinas del epitelio	Cualitativa	Nominal dicotómica	1 (Si) 2 (No)	Na

Tabla 4: Santiago Mejía M.

#### 4.3.6. Técnicas de recolección de la información

A continuación, se describen todos los aspectos relacionados con la recolección de la información.

#### 4.3.7. Fuentes de información

La captación de MAH se hizo de acuerdo al protocolo establecido por el banco de ojos Donando Vida con autorización para obtener las placentas humanas en el Hospital Manuel Uribe Ángel de Envigado, de 2 maternas sanas en un rango de edades entre los 20 y 30 años buscando el control de posibles variables de confusión, con partos electivos por cesárea sin complicaciones, que previamente hayan firmado el consentimiento informado correspondiente, en el que se autoriza la donación de la placenta y la obtención de sangre por venopunción ante cubital por el técnico, para realizar pruebas infecciosas para HIV, Sífilis, Hepatitis B y C, Chagas, Toxoplasma, Citomegalovirus y HTLV 1 y2 mediante la técnica de Quimioluminiscencia y la captación se hará de acuerdo con la disponibilidad que se tenga de las donantes.

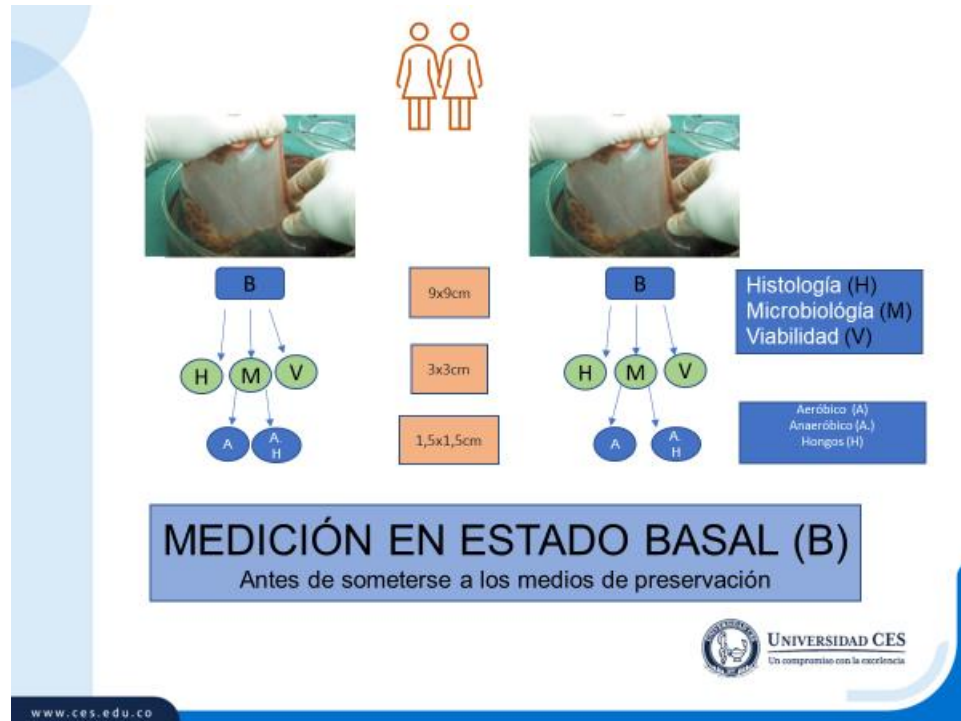
#### 4.3.8. Técnica de recolección de la información

La placenta se captó en el quirófano en un ambiente aséptico, se lavará con abundante solución salina, tratando de quitar coágulos y se introducirá en una bolsa plástica estéril con solución salina y antibiótico de gentamicina, para evitar su desecación y poderla transportar eficazmente a las instalaciones del banco de ojos. La placenta queda en cuarentena en el banco de ojos, almacenada entre 2 y 8°C, hasta que se dé el reporte del laboratorio sobre las pruebas infecciosas y serológicas a las 12 horas, y si alguna de las pruebas da positiva, se descarta la MAH almacenada enviándose por la ruta de desechos biológicos. Al finalizar el periodo de cuarentena, se extrae la bolsa del refrigerador y se saca la placenta, luego se lleva a la cámara de flujo laminar, donde en condiciones de asepsia, se separa el amnios del corion para desechar este último, posteriormente se lava el amnios (MHA) con una solución que contiene cloruro de Sodio 500cc al 0.9% y gentamicina 80 mg 2 ml, luego se divide con tijera de tejido (Metzenbaun) en 4 piezas iguales de 9 x 9 cm, siendo en total 8 piezas (4 por cada placenta donante); de las cuales, según el cálculo de tamaño de muestra, se utilizaron 6 para los grupos de preservación (2 para cada grupo) y las otras 2 se usaron como patrón de referencia para la medición de las propiedades (estabilidad histológica, seguridad microbiológica, viabilidad) en estado basal; es decir, antes de ser sometidas a los medios de preservación. Los grupos fueron divididos de acuerdo con el medio de preservación utilizado, el grupo #1 con solución salina al 0.9%, el grupo #2 con Glicerina pura al 98% y el grupo #3 con Eusol-c.

Para cada una de las 2 membranas amnióticas obtenidas, se realizó el mismo procedimiento, con la siguiente distribución:

Se tienen 4 piezas de membrana amniótica por donante, de las cuales, una pieza de membrana amniótica de cada donante fue dividida con tijera de tejido en segmentos iguales de 3x3 cm, la primera se introduce en un frasco de borosilicato estéril con 5 ml de formol, para el estudio de la estabilidad histológica en la sección de patología, buscando conservar las estructuras histológicas de la MAH; Para evaluar la seguridad microbiológica, la segunda de las piezas se dividió a su vez en 2 segmentos cada uno con 1,5 x 1,5 cm, de los cuales una se introdujo en 1 frasco de borosilicato estéril con 2,5 ml de cloruro de sodio al 0,45% para el estudio de gérmenes aeróbicos y hongos, el otro segmento de 1,5 x 1,5 cm se introdujo en un frasco de borosilicato con caldo de preservación para el estudio de gérmenes anaeróbicos, ambos frascos se enviaron a la sección de microbiología. La tercera pieza se introdujo en un frasco de borosilicato estéril con 5ml de cloruro de sodio al 0,45% y se envió a la sección de inmunohistoquímica para analizar la viabilidad de la MAH, sin haber sido sometidas ninguna de las piezas a los medios de preservación que se quieren evaluar en el presente estudio. Sólo un laboratorio con las diferentes secciones se utilizó para este estudio y el análisis histológico e inmunohistoquímico fue realizado por un médico patólogo único. Los resultados que se derivaron de este análisis fueron tomados como patrón de referencia, ver Ilustración 4

*Ilustración 4:* Distribución de MAH en estado basal

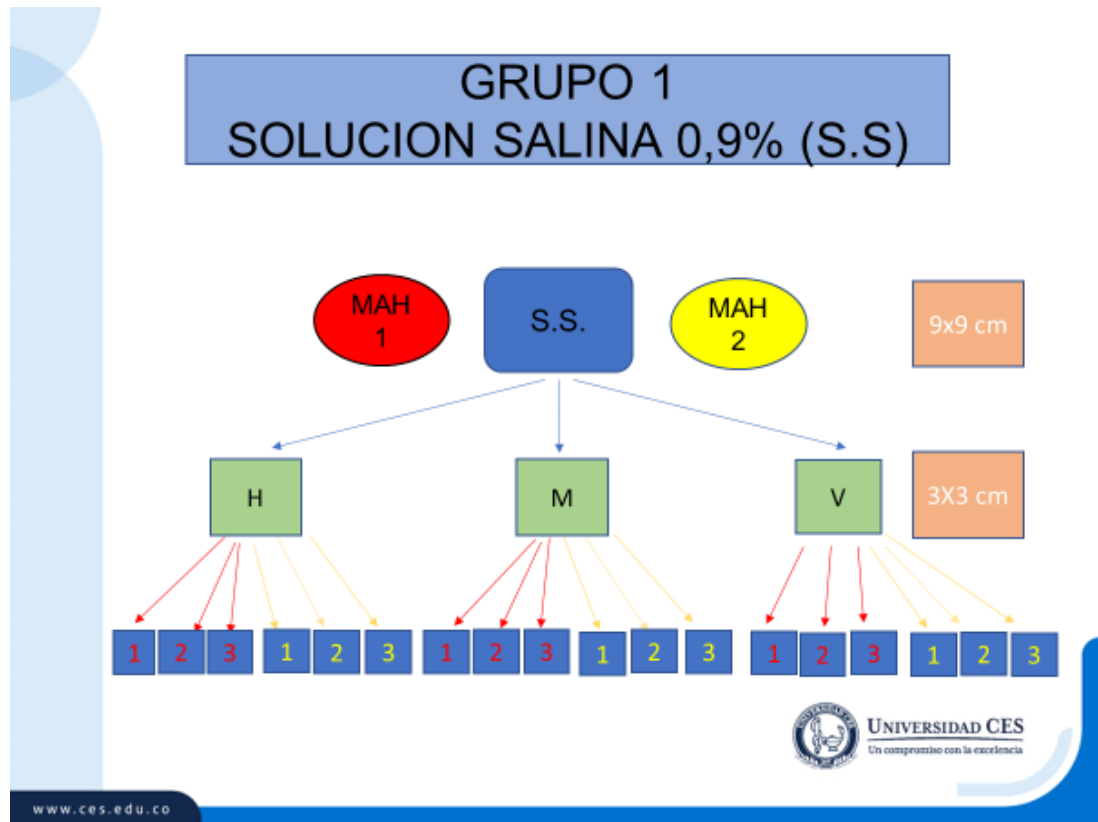


*Ilustración 4:* Santiago Mejía M.

Cada una de las 3 piezas de membrana amniótica resultantes de 9 x 9 cm de cada donante (6 piezas), fue asignada a un grupo de preservación específico, ósea 2 piezas en cada grupo; a su vez, cada pieza de membrana amniótica de 9x9 cm correspondiente a cada donante se dividió en 3 piezas de 3x3 cm en cada grupo de preservación, contando entonces cada grupo con 6 piezas de 3 x 3 cm cada una, que fueron usadas así, 2 para evaluar la estabilidad histológica, 2 para evaluar la seguridad microbiológica y 2 para evaluar la viabilidad por inmunohistoquímica. En cada uno de los medios de preservación se hizo seguimiento de las propiedades de la MAH al tercer día, al sexto día y al noveno día.

Las membranas amnióticas fueron introducidas en los frascos de borosilicato estériles de acuerdo con la distribución explicada anteriormente. El grupo1 contenía 6 frascos de borosilicato con (5ml) solución salina al 0.9% y sus respectivas membranas, El grupo 2 contenía 6 frascos de borosilicato con (5ml) Glicerina pura al 98% y sus respectivas membranas, el grupo 3 contenía 6 frascos de borosilicato con (5ml) Eusol-c y sus respectivas membranas, ver Ilustraciones 5, 6 y 7.

*Ilustración 5:* Distribución de MAH en Solución salina



*Ilustración 5:* Santiago Mejía M.

*Ilustración 6:* Distribución de MAH en glicerina.

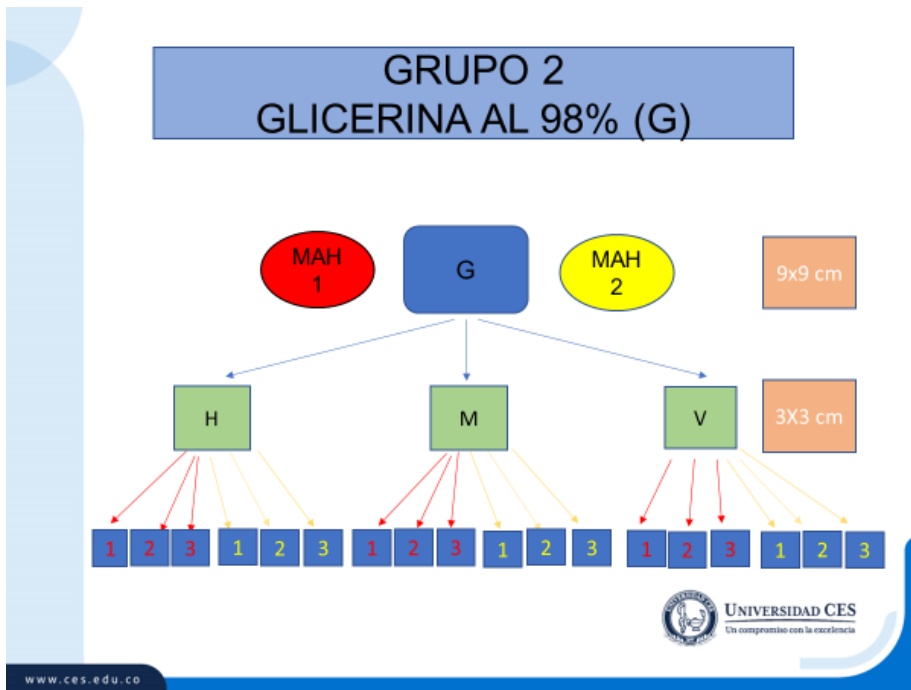


Ilustración 6: Santiago Mejía M.

Ilustración 7: Distribución de MAH en Eusol-c

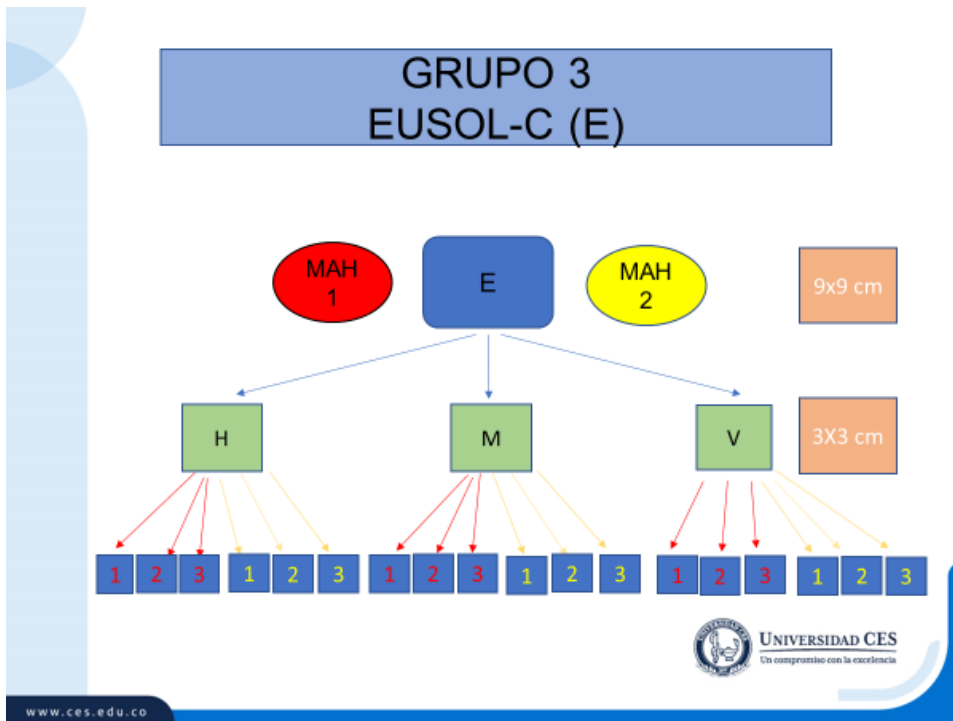


Ilustración 7: Santiago Mejía M.

En cada grupo de preservación, cada uno de los 6 frascos que lo componen, fueron enviados en la siguiente forma, 2 a la sección de patología para analizar la estabilidad histológica, 2 a la sección de microbiología para analizar la seguridad microbiológica y 2 a la sección de inmunohistoquímica para analizar la viabilidad de la MAH, comprendiendo un total de 60 mediciones durante todo el desarrollo del estudio.

**4.3.9. Instrumento de recolección de la información**

La información sobre los datos fue recolectada en una tabla de Excel, en dónde se ubican las variables dependientes en las columnas y las variables independientes en las filas, teniendo en cuenta los parámetros a medir y los seguimientos en el tiempo para permitir posteriormente su comparación y análisis, ver ilustración 8

**Tabla 5:** Instrumento para la recolección de los datos

MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA MAH														
PROPIEDAD/ PRESERVACIÓN	Piezas	Estabilidad histológica				Seguridad microbiológica				Viabilidad				
		Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	
A. Estado basal	1	Epitelio 1( ) 2( )	X	X	X	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	X	X	X	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	X	X	X	
		Mbasal 1( ) 2( )								Mbasal 1( ) 2( )				Mbasal 1( ) 2( )
		Estroma 1( ) 2( )								Estroma 1( ) 2( )				Estroma 1( ) 2( )
A. Estado basal	2	Epitelio 1( ) 2( )	X	X	X	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	X	X	X	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	X	X	X	
		Mbasal 1( ) 2( )								Mbasal 1( ) 2( )				Mbasal 1( ) 2( )
		Estroma 1( ) 2( )								Estroma 1( ) 2( )				Estroma 1( ) 2( )
B. Solución salina	1	X	Epitelio 1( ) 2( )	Epitelio 1( ) 2( )	Epitelio 1( ) 2( )	X	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	X	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	
		Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )		Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )					
		Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )		Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )					
B. Solución salina	2	X	Epitelio 1( ) 2( )	Epitelio 1( ) 2( )	Epitelio 1( ) 2( )	X	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	X	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	
		Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )		Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )					
		Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )		Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )					
C. Glicerina	1	X	Epitelio 1( ) 2( )	Epitelio 1( ) 2( )	Epitelio 1( ) 2( )	X	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	X	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	
		Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )		Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )					
		Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )		Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )					
C. Glicerina	2	X	Epitelio 1( ) 2( )	Epitelio 1( ) 2( )	Epitelio 1( ) 2( )	X	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	X	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	
		Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )		Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )					
		Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )		Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )					
D. Eusol-C	1	X	Epitelio 1( ) 2( )	Epitelio 1( ) 2( )	Epitelio 1( ) 2( )	X	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	X	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	
		Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )		Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )					
		Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )		Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )					
D. Eusol-C	2	X	Epitelio 1( ) 2( )	Epitelio 1( ) 2( )	Epitelio 1( ) 2( )	X	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	Crecimiento microbiológico 1( ) 2( )	X	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	Marcadores inmunohistoquímicos 1( ) 2( )	
		Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )		Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )	Mbasal 1( ) 2( )					
		Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )		Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )	Estroma 1( ) 2( )					

**Tabla 5:** Santiago Mejía M.

**4.3.10. Proceso de recolección de la información**

El director técnico del banco de ojos Donando Vida (JCO) fue la persona encargada del procesamiento de los tejidos, embasamiento y envío a cada uno de los laboratorios de patología, microbiología y bioquímica, así como de la recepción de los datos de interés por cada laboratorio para introducirlos en el instrumento de recolección de datos diseñado previamente, para hacer el análisis y la interpretación de los resultados de acuerdo con lo establecido en la pregunta de investigación.

**4.3.11. Criterios de inclusión y exclusión**

Criterios de inclusión:

- Maternas sanas con un rango de edades entre 20 a 30 años
- Captación de placentas para la obtención de MAH de partos electivos por cesárea sin complicaciones en la IPS descrita anteriormente.
- Firma de consentimiento informado que acepte la donación del tejido y que se tomen muestras por venopunción para estudios de pruebas infecciosas.

#### **4.3.12. Control de errores y sesgos**

Para efectos de validez interna de los resultados de esta investigación, fueron tenidos en cuenta los posibles errores y sesgos del estudio y se siguieron las siguientes estrategias con el fin de minimizarlos:

##### **Sesgos de Selección**

La captación se hizo de 2 maternas sanas que donaron sus placentas, de las cuales se obtuvo 2 membranas amnióticas que fueron divididas en 4 piezas iguales de 9 x 9 cm, siendo en total 8 piezas (4 por cada placenta donante); de las cuales, según el cálculo de tamaño de muestra, fueron utilizadas 6 para los grupos de preservación (2 para cada grupo) y las otras 2 se usaron como patrón de referencia para la medición de la tinción del epitelio mediante la técnica de inmunohistoquímica en estado basal. Los grupos fueron divididos de acuerdo con el medio de preservación utilizado, el grupo #1 con Solución salina al 0.9%, el grupo #2 con Glicerina pura al 98% y el grupo #3 con Eusol-c. Para cada una de las 2 membranas amnióticas obtenidas de cada materna, se realizó el mismo procedimiento, con lo cual se limita los posibles errores de selección, sin tener que recurrir a un proceso de aleatorización.

##### **Sesgos de Información**

El laboratorio en donde se hicieron las mediciones para las propiedades de la MAH, en cuanto a estabilidad histológica, seguridad microbiológica y viabilidad, garantiza que todos los equipos utilizados estén calibrados, para asegurarse de que registran resultados precisos (Buenas prácticas de laboratorio (BPL)), para la obtención de datos que permitan su análisis y conclusiones confiables. Sólo una persona se encargó del procesamiento, embasamiento, envío al laboratorio y recolección de los datos para ser ingresados en el instrumento para su posterior análisis e interpretación de los resultados obtenidos, esto permitió controlar desde el diseño del estudio los sesgos de información.

##### **Sesgo de Confusión**

En la selección de los tejidos se captaron de 2 maternas sanas con un rango de edad entre 20 a 30 años, lo cual hace que la variable de edad del donante se controle desde el diseño del estudio para no influir en los resultados.

#### **4.3.13. Técnicas de procesamiento y análisis de los datos**

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó el software de G\*Power versión 3.1 y para el procesamiento y análisis estadístico de los datos se usó el paquete estadístico SPSS v 21 (Licencia Universidad CES) y el software de Microsoft Office 2019 para el diseño del instrumento de recolección de los datos.

Objetivo 1. Caracterización de las variables Estabilidad histológica, seguridad microbiológica y viabilidad. Para la estabilidad histológica se analizaron la presencia de sus componentes como la monocapa epitelial, la membrana basal y la capa esponjosa de manera independiente como variables cualitativas dicotómicas, presencia de todos los componentes (1) no presencia (2), para las cuales se calcularon medidas de frecuencia absolutas. Para la seguridad microbiológica se informó la presencia o ausencia de crecimiento microbiológico y se analizó como variable cualitativa dicotómica, presencia (1) no presencia (2) y para la información también se calcularon medidas de frecuencia absolutas. Para la viabilidad se *identificó por la técnica de inmunohistoquímica la tinción fuerte o la tinción moderada o débil como indicador de las células viables del epitelio de la MAH* y se analizó como variable cualitativa dicotómica, siendo tinción fuerte (1) y tinción moderada o débil (2) y se calcularon medidas de frecuencia absolutas utilizando la prueba estadística de test exacto de Fischer.

Objetivo 2. Se hicieron mediciones de las propiedades en cuanto a la estabilidad histológica, seguridad microbiológica y viabilidad en 3 momentos, días 3, 6 y 9 para cada uno de los medios de preservación, lo que define muestras relacionadas. Las variables de estabilidad histológica, seguridad microbiológica y viabilidad son cualitativas, para las cuales se calcularon medidas de frecuencia absolutas; para su análisis estadístico, se aplicó la prueba de la Q de Cochran para medidas repetidas para analizar las diferencias en los 3 momentos de medición. Es una prueba no paramétrica de comparación de proporciones para tres o más muestras relacionadas y su función es comparar el cambio en la distribución de proporciones entre más de dos mediciones de una variable dicotómica y determinar que la diferencia no se deba al azar (que la diferencia sea estadísticamente significativa).

Objetivo 3. Se hizo comparación entre los tres grupos de preservación en cada uno de los tres momentos de medición, días 3, 6 y 9, lo que define muestras relacionadas, usando frecuencias absolutas y comparación descriptiva, inicialmente se había propuesto hacer un modelo de efectos mixtos en el que se pudiera evaluar el efecto de los medios de conservación sobre el cambio de los parámetros, pero este modelo no se logró estimar debido a:

1. Tamaño de muestra por tratamiento
2. No se observan cambios significativa en el tiempo para los parámetros evaluados
3. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos



Los hallazgos se presentan en tablas y gráficos de acuerdo con el tipo y nivel de medición de las variables.

## 5. Consideraciones éticas

Este estudio se acoge a la resolución 8430 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud en Colombia y cuenta con la aprobación del comité de investigaciones de la Universidad C.E.S. Al ser un estudio en fase preclínica o in vitro, en dónde la unidad de análisis es la MAH y sin asignación de intervenciones directamente sobre seres humanos, permite que los beneficios sean mayores que los riesgos y sus posibles problemas éticos se resuelven al disponer de un consentimiento informado por parte de cada materna de aceptar donar su placenta para fines de investigación en medicina.

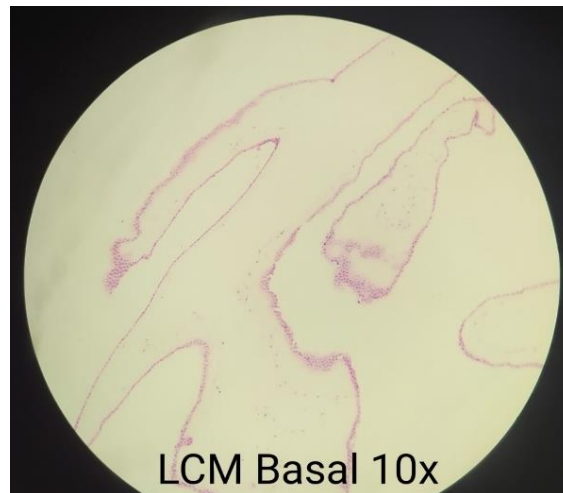
## 6. Resultados

Inicialmente el cálculo del tamaño de la muestra fue basado en una variable cuantitativa representada por el porcentaje de la preservación de células endoteliales de la córnea en Eusol- c al octavo día, donde se espera una preservación del 75,5% ( $1,658 \pm 373$ ), y para obtener la media con el método de solución salina, nos basamos en la experiencia del investigador; la cual, sugiere que se conserva el 30% de células endoteliales al octavo día; es decir, la media es el 30% (658) de la media basal (1,658). La desviación estándar que se usa es la media basal al octavo día de medición en Eusol- c (373), la estimación del tamaño de muestra con una confianza del 90% ( $\alpha 0,1$ ) fue de 6 unidades de MAH utilizando el programa estadístico G- Power, sin embargo, debido a la Pandemia originada por el Covid-19, se paralizó la toma de muestras que debido al protocolo debieron ser todas al mismo tiempo y el laboratorio para el análisis de conteo total de proteínas en MAH que inicialmente fue la variable independiente que se tenía para el análisis de los datos, no se pudo realizar debido a que el laboratorio asignado cerró sus servicios durante el tiempo en que se pudo recolectar los tejidos y las muestras, motivo por el cual se debió cambiar esta variable cuantitativa por una variable cualitativa que consiste en *la identificación por la técnica de inmunohistoquímica de células normales del epitelio de la MAH; esta modificación ocasiona que el cálculo del tamaño de la muestra que inicialmente se hizo para una variable cuantitativa, no fuera suficiente para el análisis de los datos obtenidos en la realidad, no arrojando la potencia necesaria para encontrar diferencias entre los medios de preservación y poder obtener cálculos de porcentajes y medidas de asociación, lo que sólo permite hacer un análisis descriptivo de los datos, que se presentan a continuación.*

*Se analizaron 2 membranas amnióticas obtenidas por cesárea electiva de 2 maternas de 21 y 30 años con pruebas infecciosas y serológicas negativa y con adecuado control prenatal; cada amniótica se divide en 4 piezas iguales de 9 x 9*

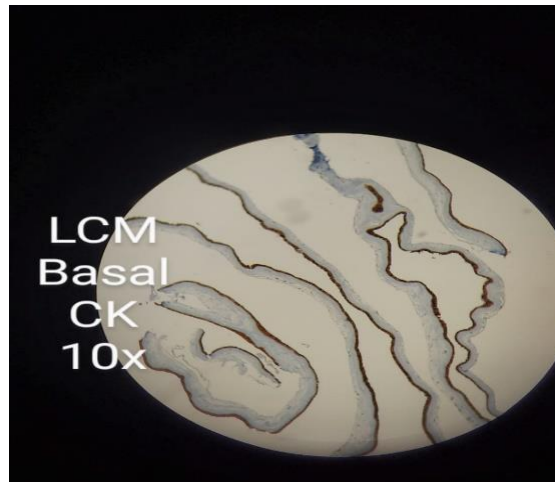
cm, siendo en total 8 piezas (4 por cada placenta donante); de las cuales, según el cálculo de tamaño de muestra, se utilizaron 6 para los grupos de preservación (2 para cada grupo) y las otras 2 se usaron como patrón de referencia para la medición de las propiedades en estado basal inmersas en Solución salina al 0,45%, *buscando la estabilidad histológica mediante la presencia del epitelio, la membrana basal y el estroma antes de ser sometidas a los medios de preservación, encontrándose íntegras las tres estructuras en ambas membranas amnióticas, ilustración 8. Se evaluó también la seguridad microbiológica y no se encontró crecimiento microbiano en su estado basal y en cuanto a la viabilidad, la identificación del epitelio mediante la inmunohistoquímica mostró tinción fuerte en ambas membranas amnióticas, ilustración 9 y tabla 6.*

*Ilustración 8: Estado basal: Se observan cortes de membrana amniótica con revestimiento epitelial conservado, membrana basal íntegra y corion presente laxo.*



*Ilustración 8: Santiago Mejía M.*

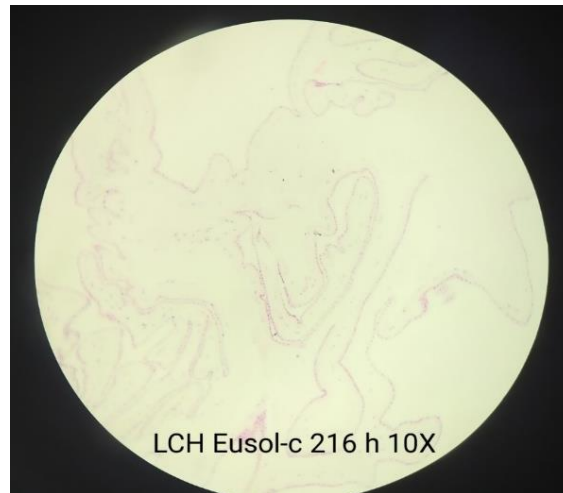
*Ilustración 9: Estado Basal: Tinción con marcación de inmunohistoquímica Citoqueratina Coctel, positiva fuerte en células epiteliales*



*Ilustración 9:* Santiago Mejía M.

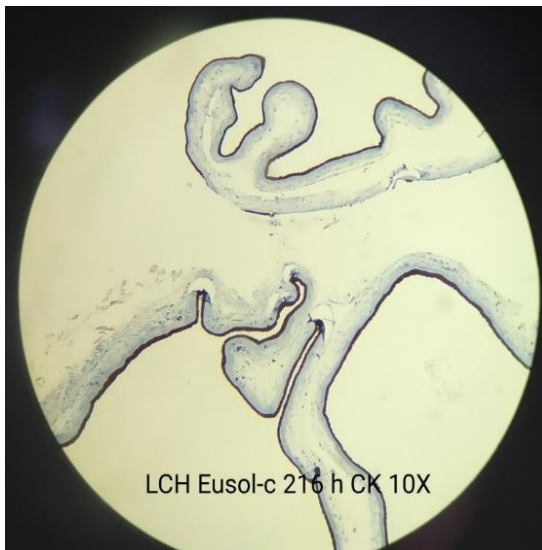
Al comparar la conservación de las propiedades o parámetros de la MAH según el medio de preservación, no se encontró significación estadística  $p < 0,05$  con el uso del test exacto de Fischer en los diferentes componentes de la estabilidad histológica (epitelio, membrana basal y estroma), seguridad microbiológica y viabilidad del epitelio, debido al tamaño de muestra insuficiente para mostrar diferencias, sin embargo el medio de preservación de Eusol-c presentó una conservación del 100% (6 segmentos) de las de los componentes de la estabilidad histológica Ilustración 10, sin crecimiento microbiológico en el 100% (6 segmentos) y con el 100% (6 segmentos) de tinción fuerte para marcadores inmunohistoquímicos del epitelio Ilustración 11, la glicerina conservó en un 83.3% (5 segmentos) el epitelio, en un 100% la membrana basal (6 segmentos) y en un 83.3% (5 segmentos) el estroma, sin crecimiento microbiológico en el 100% (6 segmentos) y con el 100% (6 segmentos) de tinción fuerte para marcadores inmunohistoquímicos del epitelio Ilustración 12 y la solución salina fue el medio con más variabilidad, conservando el 66.6% (4 segmentos) el epitelio, en un 100% (6 segmentos) la membrana basal y en un 83.3% (5 segmentos) el estroma, en el 50% (3 segmentos) hubo crecimiento microbiológico y en el 83.3% (5 segmentos) se conservó la tinción fuerte para marcadores inmunohistoquímicos del epitelio Ilustración 13, tabla 6

*Ilustración10: Membrana amniótica preservada durante 216 horas en EUSOL-C: membrana amniótica representada por revestimiento epitelial cúbico simple sin atipia sobre una membrana basal delgada y corion laxo presente*



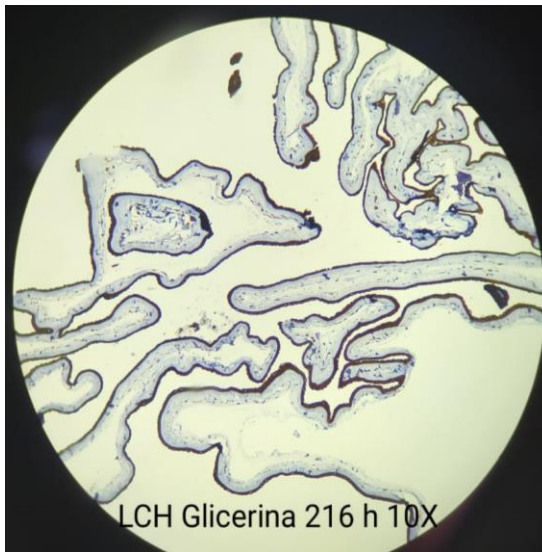
*Ilustración 10:* Santiago Mejía M.

*Ilustración 11:* EUSOL – C a las 216 horas Tinción con marcación de inmunohistoquímica Citoqueratina Coctel, positiva fuerte en células epiteliales representadas



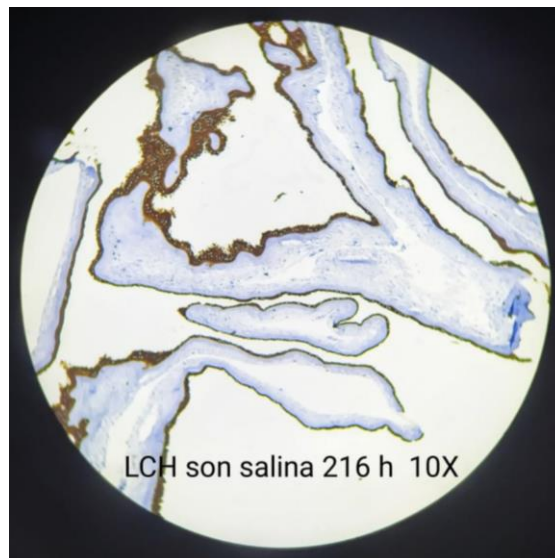
*Ilustración 11:* Santiago Mejía M.

*Ilustración 12:* Glicerina a las 216 horas Tinción con marcación de inmunohistoquímica Citoqueratina Coctel, positiva fuerte en células epiteliales representadas



*Ilustración 12:* Santiago Mejía M.

*Ilustración 13:* Solución salina a las 216 horas Tinción con marcación de inmunohistoquímica Citoqueratina Coctel, positiva fuerte en células epiteliales representadas



*Ilustración 13:* Santiago Mejía M.

*Tabla 6.* Conservación de propiedades de la MAH según el medio de preservación

Parámetro		Tratamiento				Valor p
		Estado basal	Solución salina	Glicerina	Eusol-C	
Epitelio	Si	2	4	5	6	0,811
	No	0	2	1	0	
M basal	Si	2	6	6	6	>0,999
	No	0	0	0	0	
Estroma	Si	2	5	5	6	>0,999
	No	0	1	1	0	
Crecimiento microbiológico	Si	0	3	0	0	0,068
	No	2	3	6	6	
Marcadores inmunohistoquímicos	Si	2	5	6	6	>0,999
	No	0	1	0	0	

*Tabla 6:* Santiago Mejía M.

Para comparar la conservación de las propiedades o parámetros según el día de medición, se utilizó la prueba de la Q de Cochran para medidas repetidas para analizar las diferencias en los 3 momentos de medición, sin encontrar significación estadística  $p < 0.05$  entre los diferentes medios de preservación debido a tamaño muestral insuficiente, sin embargo al analizar los tres medios de preservación, la solución salina muestra más variabilidad en los datos, con alteración de la estabilidad histológica por alteración epitelial al día 3 de seguimiento y del estroma al día 9, con compromiso en la seguridad microbiológica al evidenciar crecimiento microbiológico desde el día 6 y con compromiso de la viabilidad al mostrar tinción débil a moderada en los marcadores inmunohistoquímicos del epitelio de la MAH; la glicerina mostró solo compromiso de la estabilidad histológica, por alteración del estroma al día 3 de seguimiento y del epitelio al día 9, mientras que el Eusol – c no presentó variabilidad, conservando las propiedades de estabilidad histológica, seguridad microbiológica y viabilidad en todos los días de seguimiento, tabla 6

*Tabla 7.* Presencia de parámetros según día de la medición

		Dia				Valor p
		0	3	6	9	
Epitelio	Si	2	5	5	5	>0,999
	No	0	1	1	1	
M basal	Si	2	6	6	6	>0,999
	No	0	0	0	0	
Estroma	Si	2	5	6	5	>0,999
	No	0	1	0	1	
Crecimiento microbiológico	Si	0	0	1	2	0,500
	No	2	6	5	4	
Marcadores inmunohistoquímicos	Si	2	5	6	6	>0,999
	No	0	1	0	0	

*Tabla 7:* Santiago Mejía M.

## 7. Discusión

En Oftalmología el uso de la MAH ha mostrado ser útil para el manejo de patologías que afectan la superficie ocular en cuanto a sus componentes anatómicos y fisiológicos como la conjuntiva, las células progenitoras del limbo, la córnea y la película lagrimal, debido a sus características de transparencia, a la composición del colágeno de su membrana basal similar a la conjuntiva y a la córnea, a la falta de estímulo inmunogénico y a su excelente capacidad de servir como sustrato para permitir el crecimiento, migración y adhesión de las células del epitelio corneal y conjuntival (9). A demás se sabe de sus propiedades como sustrato para cultivo de células del limbo y su uso en reconstrucción de la superficie ocular (11,12). Estas propiedades mecánicas (14,28) y fisiológicas (11,12,40,41,29,31–33,36–39) de la MAH se contienen en sus componentes histológicos como el epitelio, membrana basal y estroma (13–15), por lo cual es muy importante su conservación en medios de preservación adecuados para su uso en oftalmología.

La MAH puede ser utilizada fresca o no preservada, conservando posiblemente la vitalidad de las células epiteliales y su capacidad proliferativa al no estar sometida a los diferentes procesos de preservación (23,24,47), pero con mayor posibilidad de contaminación microbiológica y la posibilidad de transmisión de enfermedades(43) o preservada con diferentes técnicas que buscan minimizar el riesgo de contaminación del tejido donante y permiten su uso con un mayor tiempo de preservación.

Existen diferentes medios de preservación para la MAH, dentro de los cuales se tiene la Crío preservación, en dónde se introduce los segmentos de MAH en una solución compuesta por glicerina con un medio Eagle modificado de Dulbecco a una

temperatura de -75 a -85°C (18,23,32), siendo la forma más utilizada en USA (43), la Liofilización en donde se deshidrata el tejido y se irradia con rayos gamma para su esterilización (20,21), la forma seca (18) y el medio en glicerina con propiedades antivirales y antibacterianas (49,50).

*En Colombia* el medio de preservación más utilizado es la Glicerina, con el cual se conserva la membrana basal y sus propiedades como sustrato favorecer la regeneración epitelial, pero que posiblemente limita sus propiedades farmacológicas y bioquímicas que favorecen el proceso de curación de la superficie ocular (23) y el uso de membrana amniótica fresco es permitida en la actualidad debido a su posibilidad de contaminación, a pesar de conservar posiblemente todas sus propiedades.

El Eusol-c es un medio de preservación producido por laboratorios Alkimia de Italia y es el más utilizado por los bancos de ojos de Colombia, para conservación de córneas humanas a 4° C hasta por 14 días y se ha reportado que el endotelio de la córnea se conserva hasta un 75,5% al octavo día (56).

Este estudio compara tres medios preservación, la Solución salina al 0.9%, la glicerina al 98% y el Eusol-c en cuanto a la conservación de las propiedades de la membrana amniótica como la estabilidad histológica, seguridad microbiológica y viabilidad del epitelio en 3 momentos de medición y se hace un análisis descriptivo en donde el Eusol-c fue el medio en donde no se encontró alteración de las propiedades, sugiriendo este medio como un método de preservación útil en la conservación de las propiedades mecánicas y bioquímicas de la MAH.

Rodríguez-Ares MT, hace un estudio similar en donde evaluó la conservación de las características histológicas de la membrana basal en tres medios diferentes, MAH no preservada fresca, Liofilizada y crio preservada, teniendo como referencia los datos de la MAH fresca, en cuanto a la presencia del epitelio y la membrana basal mediante el uso de microscopía de luz con tinción de hematoxilina - eosina y ácido periódico de Shift (PAS), microscopía electrónica y medición de concentración total de proteínas en MAH mediante técnica de Elisa, encontrándose que la Liofilización y la crio preservación conservan las características histológicas la MAH, aunque con mayor alteración en la liofilización sin encontrar significación estadística, pero en cuanto a la concentración total de proteínas, el medio que más contiene las proteínas es la MAH fresca que muestra significación estadística en comparación con la liofilizada y al comparar la crio preservada con la liofilizada, hay mayor concentración en la crio preservada, aunque sin mostrar significación estadística, lo cual sugiere como la crio preservación conserva mejor las características histológicas y concentración de proteína en comparación con la liofilización (51).

En nuestro estudio, comparamos tres medios de preservación, no encontrando variabilidad en las características histológicas en el Eusol-C, con cambios leves en la Glicerina y con mayores cambios en la Solución salina, aunque sin diferencias



estadísticas significativas debido al tamaño de muestra insuficiente, sugiriendo el medio de Eusol-C como el método de preservación más adecuada entre los tres.

Hasta dónde conocemos, este es el primer estudio en comparar el Eusol-c medio de preservación de córneas humanas, con la Glicerina y la Solución salina, en tres momentos de medición (días 3, 6 y 9), mostrando cómo el Eusol -C no presentó variabilidad, conservando las propiedades de estabilidad histológica, seguridad microbiológica y viabilidad en todos los días de seguimiento, la Glicerina mostró solo compromiso de la estabilidad histológica, por alteración del estroma al día 3 de seguimiento y del epitelio al día 9, sin presentar alteración de la seguridad microbiológica ni en la viabilidad por tinción inmunohistoquímica durante los 3 momentos y la Solución salina obtuvo mayor variabilidad en los datos, con alteración de la estabilidad histológica por alteración epitelial al día 3 de seguimiento y del estroma al día 9, con compromiso en la seguridad microbiológica al evidenciar crecimiento microbiológico desde el día 6 y con compromiso de la viabilidad en los marcadores inmunohistoquímicos del epitelio desde el día 3.

La Glicerina mostró ser un medio seguro en cuanto a la seguridad microbiológica, corroborado por estudios previamente citados (49,50), a la viabilidad y con alteraciones leves de la estabilidad histológica anteriormente descritos.

Para el control de sesgos de selección, a las 2 membranas amnióticas se les aplicó el mismo procedimiento si realizar aleatorización, para el control de los sesgos de información sólo un laboratorio fue utilizado para la evaluación microbiológica, histológica e inmunohistoquímica y sólo 1 persona fue la encargada de procesar los tejidos, enviarlos al laboratorio y recolectar la información para su análisis. La edad como variable de confusión se controló desde el diseño al incluir maternas entre los 20 y 30 años solamente. Una fuente posible de sesgos de información se puede presentar en este estudio, debido a que el análisis de los tejidos en cuanto a la histología e inmunohistoquímica fue realizado por 1 sólo médico patólogo, sin la evaluación de un par que confirmara sus reportes.

Los favorables resultados de este estudio *In vitro* soportan la posible superioridad del Eusol – c como medio de preservación en comparación con la Glicerina y la Solución salina en la conservación de las propiedades de la MAH y sirve como base para seguir una línea de investigación con estudios con mayor tamaño de muestra, que permitan encontrar las diferencias entre los tres medios y poder así afirmar que el Eusol – c es mejor, antes de su uso para la MAH utilizada en seres humanos.

Debido a situaciones ajenas al estudio, se tuvo que modificar la evaluación de una variable cuantitativa (medición de concentración total de proteínas en el tejido) por una variable cualitativa (tinción inmunohistoquímica del epitelio), afectando el tamaño muestral y por ende el poder estadístico sin encontrar diferencias entre los medios de preservación, por lo cual este estudio nos muestra hallazgos preliminares que deben ser verificados con otro estudio *In vitro* con mayor tamaño de muestra.

para la prueba de hipótesis, que pueda demostrar diferencias y poder aplicar los resultados a los diferentes bancos de ojos del país, para poder distribuir la MAH preservada con todas sus propiedades que aseguren mejores resultados en las cirugías utilizadas para las patologías de la superficie ocular.

## **8. Conclusiones**

En condiciones In vitro nuestro estudio sugiere que la membrana amniótica preservada en Eusol-c conserva las propiedades mecánicas y fisiológicas que son necesarias para la reconstrucción y tratamiento quirúrgico de las patologías de la superficie ocular, sin embargo, se debe confirmar hallazgos con estudios con mayor potencia que muestren diferencias entre los tres medios de preservación comparados, para esto entonces se continúa con esta línea de investigación en dónde se pueda probar las diferencias.

La distribución de membrana amniótica humana en un medio de preservación de córnea puede tener mucha aplicabilidad a los bancos de ojos del país, para su distribución de forma segura y conservando sus propiedades.

## **9. Recomendaciones**

Este estudio propone un tema fundamental en la conservación de las propiedades de la MAH que se puede aplicar a los bancos de ojos de Colombia, con un medio de preservación conocido como el Eusol - c para la conservación de córneas humanas. y puede servir como referencia para futuros estudios con un diseño metodológico similar, adicionando la medición de una variable cuantitativa como la concentración total de proteínas en el tejido como evaluación de la viabilidad epitelial, comparando los tres medios de preservación analizados en este estudio.

## 10. Referencias

1. Davis JS. II. Skin grafting at the Johns Hopkins hospital. *Ann Surg.* 1909;50(3):542.
2. Gruss JS, Jirsch DW. Human amniotic membrane: A versatile wound dressing. *Can Med Assoc J.* 1978 Jun 1;118:1237–46.
3. Trelford JD, Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol.* 1979 Aug;134(7):833–45.
4. Rennekampff H, Dohrmann P, Föry R, Fändrich F. Evaluation of Amniotic Membrane as Adhesion Prophylaxis in a Novel Surgical Gastroschisis Model. *J Invest Surg.* 1994 May 1;7:187–93.
5. De Rötth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol.* 1940;23(3):522–5.
6. Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye:(Burns of the second degree). *Br J Ophthalmol.* 1946;30(6):337.
7. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea.* 1995;14(5):473–84.
8. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, et al. Surgical Reconstruction of the Ocular Surface in Advanced Ocular Cicatricial Pemphigoid and Stevens-Johnson Syndrome: Author Reply. *Am J Ophthalmol.* 1996 Aug 1;122:38–52.
9. Gomes J, Romano A, Santos M, Dua H. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol.* 2005 Sep 1;16:233–40.
10. Charles A, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of Human Amniotic Epithelial Cells After Transplantation into Volunteers. *Lancet.* 1981 Dec 1;2:1003–5.
11. Grueterich M, Espana E, Tseng S. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: Amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol.* 2003 Nov 1;48:631–46.
12. Meller D, Pires R, Tseng S. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol.* 2002 May 1;86:463–71.
13. Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, Fullwood N, Quantock A, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000 Apr 1;20:173–7.
14. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential Distribution of Subchains of the Basement Membrane Components Type IV Collagen and Laminin Among the Amniotic Membrane, Cornea, and Conjunctiva. *Cornea.* 1999 Feb 1;18:73–9.
15. Jirsova K, Jones GLA. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting-a review. *Cell Tissue Bank.* 2017 Jun;18(2):193–204.
16. Uçakhan O, Köklü G, Firat E. Nonpreserved Human Amniotic Membrane Transplantation in Acute and Chronic Chemical Eye Injuries. *Cornea.* 2002 Apr 1;21:169–72.

17. Mejía L, Santamaría J, Acosta C. Symptomatic Management of Postoperative Bullous Keratopathy With Nonpreserved Human Amniotic Membrane. *Cornea*. 2002 Jun 1;21:342–5.
18. Tseng S. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Biosci Rep*. 2001 Sep 1;21:481–9.
19. Thomasen H, Pauklin M, Noelle B, Geerling G, Vetter J, Steven P, et al. The effect of long-term storage on the biological and histological properties of cryopreserved amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2011;36(3):247–55.
20. Allen C, Clare G, Stewart E, Branch M, Mcintosh O, Dadhwal M, et al. Augmented Dried versus Cryopreserved Amniotic Membrane as an Ocular Surface Dressing. *PLoS One*. 2013 Oct 30;8:e78441.
21. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood N, Ito W, Inatomi T, et al. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: A useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Feb 1;45:93–9.
22. Dua HS, Maharajan VS, Hopkinson A. Controversies and limitations of amniotic membrane in ophthalmic surgery. In: *Cornea and External Eye Disease*. Springer; 2006. p. 21–33.
23. Dua H, Gomes JAP, King A, Maharajan S. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2004 Jan 1;49.
24. Mejía L, Acosta C, Santamaría J. Use of Nonpreserved Human Amniotic Membrane for the Reconstruction of the Ocular Surface. *Cornea*. 2000 Jun 1;19:288–91.
25. Kruse FE, Jousseaume AM, Rohrschneider K, You LT, Sinn B, Baumann J, et al. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2000 Feb 1;238:68–75.
26. Marangon TB, Alfonso E, Miller D, Remonda NM, Muallem M, Tseng S. Incidence of microbial infection after amniotic membrane transplantation. 2004. 264–269 p.
27. Yokomori K, Ohkura M, Kitano Y, Hori T, Nakajo T. Advantages and pitfalls of amnion inversion repair for the treatment of large unruptured omphalocele: Results of 22 cases. *J Pediatr Surg*. 1992 Aug 1;27:882–4.
28. Baradaran-rafii A, Aghayan HR, Arjmand B JM. Amniotic membrane transplantation. *Japanese J Clin Ophthalmol*. 2017;71(2):188–93.
29. Guo M, Grinnell F. Basement Membrane and Human Epidermal Differentiation In Vitro. *J Invest Dermatol*. 1989 Oct 1;93(3):372–8.
30. Keene D, Sakai LY, Lunstrum G, Morris N, Burgeson R. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J Cell Biol*. 1987 Apr 1;104:611–21.
31. Boudreau N, Sympson C, Werb Z, Bissell M. Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267: 891–893. *Science*. 1995 Mar 1;267:891–3.
32. Lee SB, Li DQ, Tan DTH, Meller D, Tseng SCG. Suppression of TGF- $\beta$  signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2000 May 1;20(4):325–34.
33. Tseng S, Liu W, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol*. 1999 Nov 30;179:325–35.
34. Keelan JA, Mitchell MD. Placental cytokines and preeclampsia. *Front Biosci*.

- 2007;12(605):2706–27.
35. Kanyshkova T, Buneva V, Nevinsky G. Lactoferrin and Its Biological Functions. *Biochem Biokhimiia*. 2001 Feb 1;66:1–7.
  36. Romero R, Gomez R, Galasso M, Mazor M, Berry S, Quintero R, et al. The natural interleukin-1 receptor antagonist in the fetal, maternal, and amniotic fluid compartments: The effect of gestational age, fetal gender, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol*. 1994 Oct 1;171:912–21.
  37. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SCG. Suppression of interleukin 1  $\alpha$  and interleukin 1  $\beta$  in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol*. 2001 Apr 1;85(4):444–9.
  38. Kim J, Kim J, Na B, Jeong J-M, Song C. Amniotic Membrane Patching Promotes Healing and Inhibits Proteinase Activity on Wound Healing Following Acute Corneal Alkali Burn. *Exp Eye Res*. 2000 Mar 1;70:329–37.
  39. Higa K, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Hyaluronic Acid-CD44 Interaction Mediates the Adhesion of Lymphocytes by Amniotic Membrane Stroma. *Cornea*. 2005 Apr 1;24:206–12.
  40. Hao Y, Ma DH-K, Hwang DG, Kim W-S, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*. 2000;19(3):348–52.
  41. Adds PJ, Hunt CJ, Dart JKG. Amniotic membrane grafts, “fresh” or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(8):905–7.
  42. Mayr W. Guide to Safety and Quality Assurance for the Transplantation of Organs, Tissues and Cells, 3rd edition. *Vox Sang - VOX SANG*. 2007 Oct 1;93:279.
  43. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol*. 1999 May 1;83(4):399–402.
  44. Kim J, Kim J, Hahn T, Park W. Amniotic Membrane Transplantation in Infectious Corneal Ulcer. *Cornea*. 2001 Nov 1;20:720–6.
  45. Meller D, Pauklin M, Thomasen H, Westekemper H, Steuhl K-P. Amniotic Membrane Transplantation in the Human Eye. *Dtsch Arztebl Int*. 2011 Apr 1;108:243–8.
  46. Malhotra C, Jain A. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. *World J Transplant*. 2014 Jun 24;4:111–21.
  47. Panda A. Amniotic membrane transplantation in ophthalmology (fresh v preserved tissue). *Br J Ophthalmol*. 2000 Jan 1;83:1410–1.
  48. Fernandes M, Sridhar M, Sangwan V, Rao G. Amniotic Membrane Transplantation for Ocular Surface Reconstruction. *Cornea*. 2005 Sep 1;24:643–53.
  49. Maral T, Borman H, Arslan H, Demirhan B, Akinbingol G, Haberal M. Effectiveness of human amnion preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns*. 1999 Dec 1;25:625–35.
  50. Zidan S, Eleowa S, Nasef M, Abdalkareem M, Elbatawy A, Borhamy A, et al. Maximizing the safety of glycerol preserved human amniotic membrane as a biological dressing. *Burns*. 2015 Jan 4;41.
  51. Rodríguez-Ares MT, López-Valladares MJ, Touriño R, Vieites B, Gude F, Silva MT, et al. Effects of lyophilization on human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol*. 2009;87(4):396–403.
  52. Moll R, Franke W, Schiller D, Geiger B, Krepler R. The Catalog of Human

- Cytokeratins: Patterns of Expression in Normal Epithelia, Tumors and Cultured Cells. *Cell*. 1982 Dec 1;31:11–24.
53. Brandtzaeg P. The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. *J Immunol Methods*. 1998 Aug 1;216:49–67.
  54. Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de imuno-histoquímica. São Paulo Soc Bras Patol. 1999;57.
  55. Das S, Ramamurthy B, Sangwan V. Fungal keratitis following amniotic membrane transplantation. *Int Ophthalmol*. 2007 Dec 1;29:49–51.
  56. Yüksel B, Uzunel UD, Küsbeci T. Endothelial Cell Viability of Donor Corneas Preserved in Eusol-C Corneal Storage Medium. *Exp Clin Transplant Off J Middle East Soc Organ Transplant*. 2016 Aug;14(4):441–4.