



**FACULTAD DE MEDICINA**  
**Departamento de Cirugía**  
**Área de Oftalmología**

**ESTUDIO DE TRES DIFERENTES MÉTODOS DE  
PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA MEMBRANA  
AMNIÓTICA PARA USOS OFTALMOLÓGICOS**

**Memoria para acceder al grado de doctor por la Universidad de Santiago de  
Compostela, presentada por MARÍA JESÚS LÓPEZ VALLADARES**

**Directores:**

**Profesora M. Teresa Rodríguez Ares**

**Profesor Manuel Sánchez Salorio**

**Santiago de Compostela 2008**



**Dña. M. Teresa Rodríguez Ares**, Profesora Titular de Oftalmología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y **D. Manuel Sánchez Salorio**, Catedrático de Oftalmología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela,

**CERTIFICAN:**

Que Dña. María Jesús López Valladares, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección su trabajo de Tesis Doctoral “Estudio de tres diferentes métodos de preparación y conservación de la membrana amniótica para usos oftalmológicos”.

Que dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido como Tesis Doctoral para poder optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Santiago de Compostela a 14 de febrero de 2008.

Fdo: Prof. M. Teresa Rodríguez Ares

Fdo: Prof. Manuel Sánchez Salorio



**Trabajo de Investigación subvencionado con una ayuda del Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III - Ministerio de Sanidad y Consumo), expediente PI021608**



## **AGRADECIMIENTOS:**

Ahora que he llegado al final, debo confesar que cuando miro atrás me doy cuenta de que comencé este camino en parte por inercia, como el siguiente paso de algo que hoy no podría precisar. Pero al final, aunque el camino ha sido largo (algunos dirían larguísimo...) y a veces hubiese renunciado, ha valido la pena. Y no sólo por todo lo que he aprendido, sino especialmente por toda la gente que me ha acompañado en este tiempo ayudándome. Por ello quiero agradecer:

En primer lugar, a los dos directores de este trabajo, sin los cuales no habría sido posible. Al Profesor Sánchez Salorio, por su sabiduría y sus consejos, y por estar ahí siempre que lo necesité. Con mucho cariño, a la Profesora Rodríguez Ares, por su infinita paciencia, su ilusión y apoyo y esa capacidad de ver el lado positivo de las cosas que a mi me falta. Sin ella me hubiese rendido hace tiempo.

A todo el personal del Instituto de Ortopedia y Banco de Tejidos, representados por el Profesor Couceiro, por acogerme como una más y enseñarme a moverme entre pipetas, centrifugadoras, eppendorf y demás aparatos extraños. Especialmente quiero agradecer el tiempo dedicado a la Dra. Maite Silva. Sin ella no habría sido capaz de zambullirme en estructuras proteicas y ELISAs varios, y desde luego no habría podido desarrollar gran parte del trabajo.

A la Dra. Begoña Vieites, del Servicio de Anatomía Patológica del CHUS, que me apoyó en la realización de todo el estudio estructural y aguantó todas mis dudas e interrupciones en su trabajo con paciencia y buen humor, dándome sabios consejos para la elaboración de una tesis doctoral.

Al Dr. Gude, por mostrarme la luz en todo el análisis estadístico.

A la Dra. Touriño, por sus consejos y sus ánimos, y por ser ante todo una amiga.

A los Profesores Capeáns y Gómez-Ulla, por prestarme tiempo para poder convertir este trabajo en una prioridad.

A todos aquellos que se han pasado alguna tarde procesando placentas conmigo, ayudándome y haciendo que ese tiempo, que puede llegar a ser muy aburrido, estuviera lleno de bromas y buen humor.

A mi familia y amigos, a los que he tenido que dejar a un lado en algún momento para dedicar tiempo a este trabajo, y a todos aquellos que han escuchado mis lamentos, que han sido muchos.

A mi madre y a mi hermano, por acompañarme siempre, pese a todo. A Raquel y Manuela, por soportar mis ausencias, y por su amistad incondicional.

<b>ÍNDICE:</b>	<i>Pág.</i>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>13</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>15</b>
<b>JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>25</b>
1. Antecedentes históricos del uso de la membrana amniótica .....	27
2. Características de la membrana amniótica .....	29
2.1 Embriología .....	29
2.2 Estructura histológica .....	31
2.3 Características inmunológicas .....	33
3. Propiedades y mecanismos de acción de la membrana amniótica .....	34
3.1 Protección mecánica .....	35
3.2 Estímulo de la epitelización y de la migración de células epiteliales .....	35
3.3 Propiedades antiinflamatorias .....	36
3.4 Propiedades antifibróticas .....	37
3.4 Propiedades antiangiogénicas .....	38
3.5 Propiedades antimicrobianas .....	39
4. Utilización de la membrana amniótica en otras especialidades médicas .....	40
4.1 Cirugía Plástica .....	40
4.2 Ginecología .....	40
4.3 Cirugía General y del Aparato Digestivo .....	40
4.4 Endocrinología .....	41
4.5 Otorrinolaringología .....	41
4.6 Neurología .....	41
4.7 Otros usos .....	42
5. Utilización de la membrana amniótica en Oftalmología .....	42
5.1 Reconstrucción de la superficie conjuntival .....	43

5.2 Reconstrucción de la superficie corneal .....	45
5.3 Cirugía de filtración .....	47
5.4 Insuficiencia de limbo .....	47
6. Técnicas quirúrgicas de reconstrucción de la superficie ocular con membrana amniótica .....	48
6.1 Injerto .....	48
6.2 “Parche” .....	49
6.3 Técnica multicapa .....	49
6.4 Soporte para cultivo y trasplante celular .....	50
7. Obtención de la membrana amniótica .....	50
7.1 Selección de donantes .....	50
7.2 Proceso de obtención .....	51
8. Conservación de la membrana amniótica .....	51
8.1 Conservación por frío .....	53
8.2 Conservación por desecación: liofilización .....	58
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
1. Selección de las donantes .....	65
1.1 Criterios de inclusión .....	65
1.2 Criterios de exclusión .....	66
2. Obtención de la membrana amniótica .....	67
3. Desarrollo del programa de liofilización .....	68
4. Técnicas de conservación: grupos de estudio .....	69
5. Evaluación morfológica .....	71
5.1 Estudio histológico .....	71
5.2 Estudio inmunohistoquímico .....	71
5.3 Estudio ultraestructural .....	72
6. Cuantificación de proteínas y factores de crecimiento .....	73
7. Análisis estadístico .....	74
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
1. Desarrollo del programa de liofilización .....	79
2. Características de las donantes .....	81

3. Evaluación morfológica en los grupos de estudio .....	82
3.1 Aspecto macroscópico .....	82
3.2 Estudio histológico .....	83
3.3 Estudio inmunohistoquímico .....	88
3.4 Estudio ultraestructural .....	90
4. Cuantificación de proteínas y factores de crecimiento .....	93
4.1 Concentración de proteína total .....	93
4.2 Niveles de factores de crecimiento .....	97
5. Influencia de las características de las donantes en la concentración de proteínas y factores de crecimiento .....	103
5.1 Edad de la donante .....	103
5.2 Tiempo de gestación .....	106
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>109</b>
1. Características de las donantes .....	111
2. Obtención y preparación de la membrana amniótica. Métodos de conservación .....	111
3. Evaluación morfológica en los grupos de estudio .....	116
4. Cuantificación de proteínas .....	119
5. Influencia de las características de las donantes en la concentración de proteínas y factores de crecimiento .....	126
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>129</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>133</b>



## ABREVIATURAS:

bFGF	Factor de crecimiento del fibroblasto básico
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
H&E	Hematoxilina y eosina
HGF	Factor de crecimiento hepático
IL	Interleuquina
KGF	Factor de crecimiento de los queratinocitos
MAC	Membrana amniótica criopreservada
MAL	Membrana amniótica liofilizada
MAN	Membrana amniótica conservada en nitrógeno líquido
MA-NP	Membrana amniótica no preservada
MMPs	Metaloproteinasas
NGF	Factor de crecimiento neural
PAS	Ácido periódico de Schiff
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEDF	Factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario
RT-PCR	transcripción inversa – reacción en cadena de la polimerasa
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TGFalfa	Factor de crecimiento transformante alfa
TGFbeta	Factor de crecimiento transformante beta
TIMPs	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas

TMA	Transplante de membrana amniótica
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS:

<b>TABLAS:</b>		<i>Pág.</i>
<i>Tabla 1</i>	Test serológicos aplicados a las donantes .....	66
<i>Tabla 2</i>	Concentración de proteínas totales y factores de crecimiento en los grupos de estudio (mediana (rango)) .....	95
<i>Tabla 3</i>	Concentración de proteínas totales y factores de crecimiento en los grupos de estudio (media $\pm$ desviación estándar) .....	96

<b>FIGURAS:</b>		<i>Pág.</i>
<i>Figura 1</i>	Cavidad amniótica .....	29
<i>Figura 2</i>	Blastocisto humano a los 9 días de gestación .....	30
<i>Figura 3</i>	Membrana amniótica y placenta humana .....	31
<i>Figura 4</i>	Estructura histológica de la membrana amniótica humana .....	33
<i>Figura 5</i>	Transplante de membrana amniótica: técnica multicapa .....	49
<i>Figura 6</i>	Evolución del proceso de liofilización .....	60
<i>Figura 7</i>	Obtención de la membrana amniótica .....	67
<i>Figura 8</i>	Membrana amniótica criopreservada a $-80^{\circ}$ C .....	70
<i>Figura 9</i>	Membrana amniótica conservada en nitrógeno líquido .....	71
<i>Figura 10</i>	Membrana amniótica liofilizada. Desarrollo del programa de liofilización. Programa 5 .....	79
<i>Figura 11</i>	Estructura histológica de la membrana amniótica liofilizada mediante distintos programas .....	80
<i>Figura 12</i>	Distribución de la muestra (%) según la edad de las donantes ....	81

<i>Figura 13</i>	Distribución de la muestra (%) según la causa de indicación de cesárea .....	82
<i>Figura 14</i>	Aspecto macroscópico de la membrana amniótica conservada con diferentes métodos .....	83
<i>Figura 15</i>	Estructura histológica de la membrana amniótica no preservada	84
<i>Figura 16</i>	Estructura histológica de la membrana amniótica liofilizada .....	84
<i>Figura 17</i>	Estructura histológica de la membrana amniótica liofilizada: epitelio .....	85
<i>Figura 18</i>	Estructura histológica de la membrana amniótica criopreservada a – 80° C .....	86
<i>Figura 19</i>	Estructura histológica de la membrana amniótica conservada en nitrógeno líquido .....	86
<i>Figura 20</i>	Tinción de la membrana basal con PAS .....	87
<i>Figura 21</i>	Inmunorreactividad para colágeno IV .....	88
<i>Figura 22</i>	Expresión de laminina .....	89
<i>Figura 23</i>	Expresión de fibronectina .....	89
<i>Figura 24</i>	Ultraestructura de la membrana amniótica (TEM) .....	90
<i>Figura 25</i>	Ultraestructura de la membrana amniótica liofilizada y criopreservada .....	91
<i>Figura 26</i>	Membrana amniótica liofilizada. Estudio con SEM .....	92
<i>Figura 27</i>	Distribución de la cantidad de proteínas totales .....	94
<i>Figura 28</i>	Distribución de la concentración de bFGF .....	97
<i>Figura 29</i>	Distribución de la concentración de EGF .....	98
<i>Figura 30</i>	Distribución de la concentración de HGF .....	99
<i>Figura 31</i>	Distribución de la concentración de KGF .....	100
<i>Figura 32</i>	Distribución de la concentración de NGF .....	101
<i>Figura 33</i>	Distribución de la concentración De TGFbeta1 .....	102

<i>Figura 34</i>	Relación entre la edad de la donantes y la concentración de proteínas totales .....	103
<i>Figura 35</i>	Relación entre la edad de las donantes y los niveles de factores de crecimiento .....	105
<i>Figura 36</i>	Relación entre el tiempo de gestación y la concentración de proteínas totales .....	106
<i>Figura 37</i>	Relación entre el tiempo de gestación y los niveles de factores de crecimiento .....	108



***JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y  
OBJETIVOS***



**JUSTIFICACIÓN:**

El uso de la membrana amniótica en Medicina es muy antiguo <sup>1-3</sup>. La primera referencia en la literatura en relación a su empleo en Oftalmología data de 1940, año en que de Röth publica los resultados de la aplicación de la membrana amniótica, junto con el corion, en la reparación de defectos conjuntivales <sup>4</sup>. Algunos años más tarde, Sorsby *et ál.* la utilizan en el tratamiento de causticaciones oculares <sup>5-6</sup>. Dados los resultados poco prometedores, su uso prácticamente se abandonó hasta que en 1995 Kim y Tseng describen el éxito del trasplante de membrana amniótica (TMA) criopreservada en la reconstrucción de la superficie ocular de conejos con insuficiencia limbar inducida <sup>7</sup>. Desde entonces, la membrana amniótica se ha indicado en el tratamiento de gran número de enfermedades de la superficie ocular <sup>2, 8-14</sup>, además de usarse como soporte para el cultivo *in vitro* de células limbares, corneales o conjuntivales, entre otras, y como vehículo para su trasplante sobre la superficie ocular <sup>15-19</sup>. La experiencia clínica a lo largo de estos años ha llevado a precisar sus indicaciones, aunque aún existen interrogantes en relación al tejido que pueden traducirse en limitaciones en su uso y en dificultades en la interpretación de los resultados.

Se le han atribuido varios mecanismos de acción, deducidos de sus efectos clínicos y de estudios sobre su composición estructural y bioquímica <sup>2,20</sup>. La membrana basal facilita la migración de células epiteliales, aumenta la adhesión del epitelio basal, promueve la diferenciación celular y previene la apoptosis, proporcionando así un sustrato para el crecimiento celular <sup>2,13-14,20-23</sup>. Además, el tejido ejerce un efecto mecánico de protección frente a factores inflamatorios presentes en la lágrima y a la acción mecánica del parpadeo <sup>2,24</sup>, y tiene propiedades antimicrobianas <sup>25-28</sup>. También inhibe la cicatrización y la vascularización y reduce la inflamación <sup>13,29-33</sup>. Contiene además factores de crecimiento, enzimas y citoquinas cuyas acciones pueden explicar algunos de los efectos clínicos de la membrana amniótica, como son promover la epitelización o inhibir la vascularización <sup>29,34-39</sup>.

La membrana amniótica fresca se sigue utilizando, especialmente en países en vías de desarrollo, en los que es difícil disponer del material y la tecnología necesarios para aplicar métodos de conservación <sup>40-44</sup>. Pero en nuestro medio, la

legislación vigente impide su uso ya que exige descartar contaminación microbiológica del tejido, que en el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus hepatotropos debe ser confirmada a los 3 ó 6 meses de la donación o mediante pruebas de detección de ácidos nucleicos <sup>45-47</sup>. Además, el tejido fresco conlleva un mayor riesgo de infecciones postoperatorias <sup>48</sup>. Por todo ello, es necesario aplicar algún procedimiento de conservación a la membrana amniótica.

Se han descrito varios métodos de preservación y almacenamiento de la membrana amniótica, como son la liofilización <sup>49-51</sup>, la deshidratación <sup>51</sup> o la conservación en glicerol <sup>52</sup> y glutaraldehído <sup>53</sup>, pero no suelen aplicarse a la membrana amniótica para uso oftalmológico. La criopreservación en solución de glicerol y medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) es el procedimiento generalmente empleado para la conservación del tejido <sup>2,7,54-55</sup>. Recientemente se han comercializado preparaciones de membrana amniótica liofilizada para uso oftalmológico: AmbioDry<sup>2</sup>® (IOP Inc, Costa Mesa, California, Estados Unidos - [www.iopinc.com](http://www.iopinc.com)) y Acelagraft™ Amniotic Membrane Allograft (Oasis Medical, Glendora, California, Estados Unidos - [www.oasismedical.com](http://www.oasismedical.com)) <sup>52</sup>. En la Comunidad Económica Europea no se dispone de preparaciones de membrana amniótica liofilizada para usos oftalmológicos y tampoco de membrana amniótica liofilizada con epitelio.

Las características morfológicas y biológicas de la membrana amniótica dependen de su composición y estructura, que se ven alteradas durante los procesos de conservación a los que se somete el tejido. Estas alteraciones no han sido determinadas totalmente, aunque varios trabajos han demostrado que el método de conservación puede producir cambios importantes en los constituyentes de la membrana amniótica <sup>20,34,50-51,55-56</sup>. Estudios recientes han mostrado una influencia del procesamiento en la concentración de factores de crecimiento en la membrana amniótica, así como una importante variabilidad entre membranas amnióticas procedentes de distintas donantes <sup>39,56</sup>. El tiempo de gestación, embarazos y partos previos, enfermedades gestacionales, la edad o el fenotipo de la donante son variables que también pueden influir en la estructura y composición de la membrana amniótica <sup>20</sup>.

Todas estas variaciones pueden tener una consecuencia directa sobre las propiedades y mecanismos de acción de la membrana amniótica, y por tanto en los resultados clínicos del uso del tejido. Con este estudio, se pretende desarrollar una membrana amniótica liofilizada que mantenga las propiedades del tejido y comparar las alteraciones que provocan en la estructura y composición de la membrana amniótica que va a ser empleada en la reconstrucción de la superficie ocular tres diferentes métodos de conservación.

**HIPÓTESIS:**

Diferentes métodos de conservación de la membrana amniótica humana podrían afectar de forma distinta al tejido, provocando cambios que alterarían sus propiedades y podrían influir en su acción terapéutica en la superficie ocular.

**OBJETIVOS:**

1. Diseñar un programa de liofilización óptimo para la membrana amniótica humana.
2. Describir los cambios estructurales producidos en la membrana amniótica humana tras ser sometida a tres procesos de conservación: liofilización, criopreservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y conservación en nitrógeno líquido.
3. Determinar la concentración de proteínas y factores de crecimiento en la membrana amniótica liofilizada, criopreservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  y en nitrógeno líquido, y evaluar el efecto del método de conservación al compararla con las concentraciones en el tejido no preservado.
4. Estudiar la influencia de las características de la donante en la membrana amniótica humana.

# ***INTRODUCCIÓN***



## **1- ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL USO DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA:**

La membrana amniótica humana es un tejido fino, translúcido y avascular que tapiza la placenta en su parte más interna. Su fácil manejo y obtención, y sus propiedades terapéuticas han convertido el TMA en una importante técnica en la reconstrucción de la superficie ocular en los últimos años. Además de ésta, la membrana amniótica tiene y ha tenido numerosas aplicaciones en Medicina, y está presente en muchos mitos en los que se le atribuyen propiedades curativas y milagrosas <sup>1-3,57</sup>.

La primera referencia que aparece en la literatura médica en relación a su uso terapéutico se remonta a principios del siglo pasado. En 1910, Davis publica un trabajo sobre la aplicación de la membrana amniótica en el trasplante de piel en 550 pacientes <sup>1-2,57</sup>. El objetivo del tratamiento era favorecer la granulación de las úlceras cutáneas y acelerar su curación, pero también observó que se producía una disminución de la incidencia de infecciones y una marcada reducción del dolor.

Sus propiedades antiinfecciosas, su baja antigenicidad y su capacidad para facilitar la epitelización e inhibir la fibrosis la convirtieron pronto en un injerto ideal para el tratamiento de diversas afecciones. Así, en los años siguientes se publicaron nuevos trabajos sobre el uso de la membrana amniótica en varias especialidades médicas <sup>1</sup>.

El uso de tejidos placentarios en Oftalmología fue descrito en primer lugar por Filatov, como una de las técnicas de lo que el autor ruso denominaba “terapia tisular” o “método Filatov” <sup>3,57-58</sup>. Su objetivo era hacer llegar a tejidos enfermos sustancias contenidas en tejidos sanos, que denominaba “estimulinas”, para que los ayudasen a combatir la enfermedad. Así, colocaban fragmentos de placenta bajo la conjuntiva en el tratamiento de diversas enfermedades oculares.

En 1940, de Röth publicó los resultados de la aplicación de la membrana amniótica, junto con el corion subyacente, en la reparación de defectos conjuntivales <sup>4</sup>. Éstos no fueron satisfactorios, sólo un éxito en 7 pacientes, probablemente debido a la reacción de rechazo generada por la alta inmunogenicidad del corion. Esta es la primera referencia que aparece en la

literatura científica sobre el uso de la membrana amniótica en Oftalmología. Unos años después, Sorsby *et ál.* utilizan la “amnioplastina”, sustancia desarrollada a principios de la década de los 40 por Chao *et ál.* <sup>1</sup>, en el tratamiento de quemaduras oculares en fase aguda <sup>5-6</sup>. Los resultados de estos últimos estudios tampoco fueron los esperados, quizás a causa de la pérdida de propiedades que sufría la membrana amniótica al ser sometida al proceso que la convertía en amnioplastina (introducción en alcohol al 70%, desecación en horno y conservación posterior en alcohol al 70% <sup>1</sup>).

En los años siguientes, el uso de la membrana amniótica en Oftalmología se abandonó, probablemente debido al escaso éxito obtenido en su aplicación. A principios de los años 90, J. Batlle y F. J. Perdomo presentan en un congreso de la Sociedad Dominicana de Oftalmología los buenos resultados obtenidos en cirugía de conjuntiva y Oculoplástica con la aplicación de un tejido de origen desconocido que era comercializado desde la Unión Soviética <sup>2,57</sup>. Tras varios análisis histológicos, concluyen que el tejido es de origen placentario. A partir de estos trabajos, se inician una serie de estudios en el Hospital Bascom Palmer de Miami que van a desarrollar las bases de lo que se convertirá en una de las técnicas más importantes de los últimos diez años en la cirugía de la superficie ocular: *el trasplante de membrana amniótica*. En 1995, Kim y Tseng publican los resultados de la aplicación de membrana amniótica criopreservada en el tratamiento del déficit de limbo total inducido en conejos <sup>7</sup>. En 5 de los 13 ojos que recibieron el TMA observaron una completa epitelización en 2 – 4 semanas y la recuperación de la transparencia estromal en ausencia de vascularización. Los análisis fenotípicos mostraron que las córneas expresaban queratinas k3 y k12, propias del epitelio corneal, mientras que no se detectaron mucinas conjuntivales. Los autores concluyeron que los resultados demuestran la capacidad de la membrana amniótica de restaurar la superficie ocular gravemente dañada.

A partir de este momento, el uso de la membrana amniótica en Oftalmología fue extendiéndose. Numerosos trabajos han ido precisando sus propiedades, indicaciones y limitaciones en los años siguientes. En estos momentos, su aplicación ha traspasado el terreno clínico y la membrana amniótica se emplea como soporte para cultivos de diversas líneas celulares <sup>15-19</sup>.

## 2- CARACTERÍSTICAS DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA:



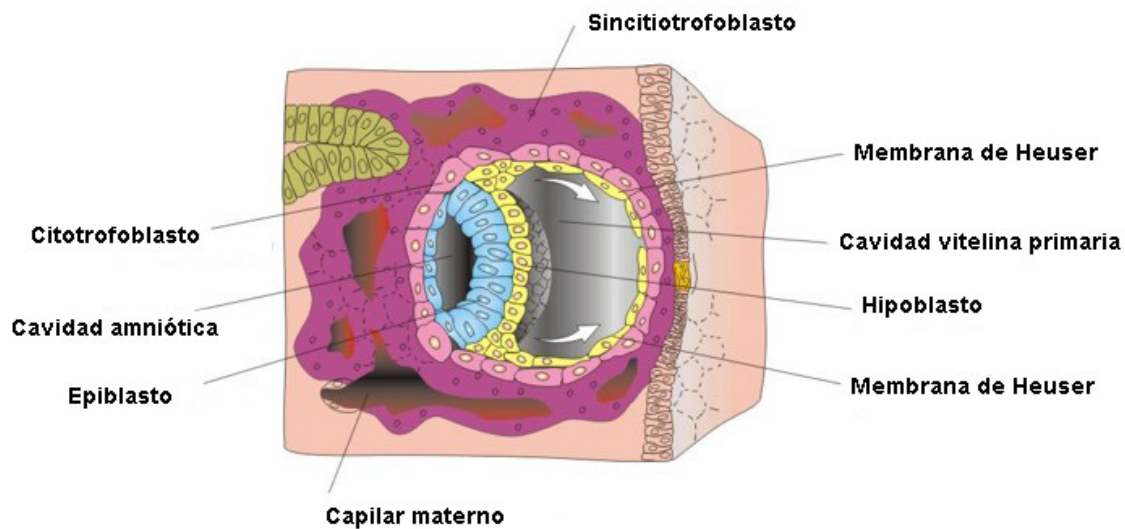
**Figura 1:** Cavidad amniótica, que contiene el feto y el líquido amniótico.

[www.billcasselman.com/dictionary\\_of\\_medical\\_derivations/dmd\\_eight.htm](http://www.billcasselman.com/dictionary_of_medical_derivations/dmd_eight.htm)

La placenta es un órgano altamente especializado, característico de los mamíferos hembras, que se desarrolla durante la gestación sobre la pared uterina y que garantiza la nutrición del feto y regula su crecimiento y metabolismo<sup>59</sup>. La membrana amniótica es un tejido que se encuentra recubriendo la cara fetal de la placenta, en contacto con el corion. Por su otra cara envuelve al feto y al líquido amniótico, formando la cavidad amniótica y contribuyendo a la protección del feto al amortiguar el efecto de los traumatismos y actuar como una barrera que lo protege del exterior (Figura 1). Su función principal es contribuir a la homeostasis del líquido amniótico<sup>60</sup>.

### 2.1 Embriología:

La formación de la membrana amniótica comienza aproximadamente a los 7 – 8 días de gestación, con el paso del estadio de mórula a blastocisto<sup>61</sup>. En este momento, se produce la separación de las células más internas de la vesícula germinal en la periferia del ectodermo para así formar la cavidad amniótica. Alrededor del día 8º tras la fecundación, las células del embrioblasto o masa celular interna se dividen en dos capas: hipoblasto y epiblasto. Al mismo tiempo, dentro de las células que forman parte del epiblasto comienza a formarse *la cavidad amniótica*. Las células del epiblasto adyacentes a dicha cavidad se denominan *amnioblastos*<sup>61</sup>. (Figura 2)



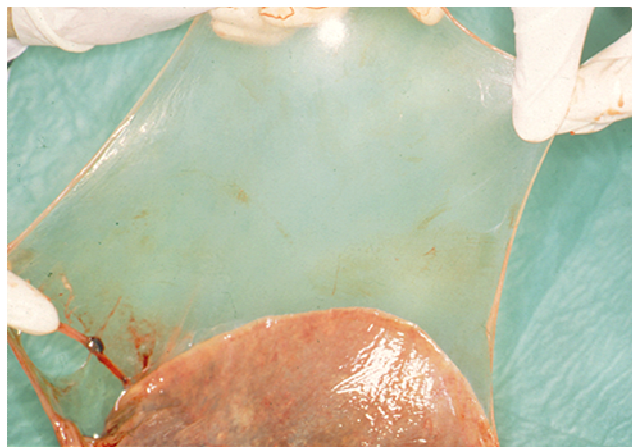
**Figura 2:** Blastocisto humano a los 9 días de gestación. Cavidad amniótica iniciando su formación dentro del epiblasto. De [www.forp.usp.br/mef/embriologia/geral.htm](http://www.forp.usp.br/mef/embriologia/geral.htm).

El estroma amniótico se deriva del mesodermo extraembrionario primario, que es empujado contra la capa amniótica formando una capa simple de células mesoteliales aplicada sobre el epitelio amniótico<sup>1-2</sup>. Alrededor del segundo mes de gestación, las células mesenquimales son separadas del epitelio amniótico por una capa de tejido que contiene fibras de colágeno con células con características de fibroblastos activos entremezcladas<sup>1</sup>.

A término, la membrana amniótica está formada por una monocapa de células epiteliales firmemente ancladas a un estroma rico en colágeno y poco adherido al corion subyacente, de forma que las dos capas se separan fácilmente mediante disección roma<sup>1-2</sup>.

## 2.2 Estructura histológica:

*Macroscópicamente*, la membrana amniótica es un tejido delgado (0,02 – 0,5 mm), semitransparente, brillante y liso, de fácil manejo y carente de vasos sanguíneos (Figura 3). Tiene una cara estromal, fuertemente adherente, y una cara epitelial.



**Figura 3:** Membrana amniótica y placenta humanas.

En ella se distinguen tres capas histológicas: epitelio, membrana basal y estroma <sup>2,62</sup>, que algunos autores describen como cinco al dividir el estroma en lámina compacta, capa de fibroblastos y lámina esponjosa <sup>63</sup>. (Figura 4)

**2.2.1** El **epitelio** está formado por una única capa de células epiteliales de morfología poligonal (Figura 4, a), columnares en la zona que se encuentra sobre la placenta y cuboidales en la que delimita la bolsa amniótica <sup>2,62</sup>. El núcleo es ligeramente irregular y el nucleolo aparece grande y homogéneo, lo que sugiere importante actividad celular <sup>62</sup>. El citoplasma contiene con frecuencia vacuolas paranucleares, que al examen con microscopía electrónica de transmisión (TEM) parecen contener sustancias lipídicas <sup>62</sup>.

En su superficie, las células epiteliales tienen numerosos microvilli que en la membrana amniótica de la placenta a término están cubiertos por un material amorfo de composición desconocida <sup>2</sup>. Este material se extiende hacia los laterales de las células formando un laberinto de canales intercelulares <sup>2,62</sup> que parecen participar en mecanismos de transporte de macromoléculas <sup>62</sup>.

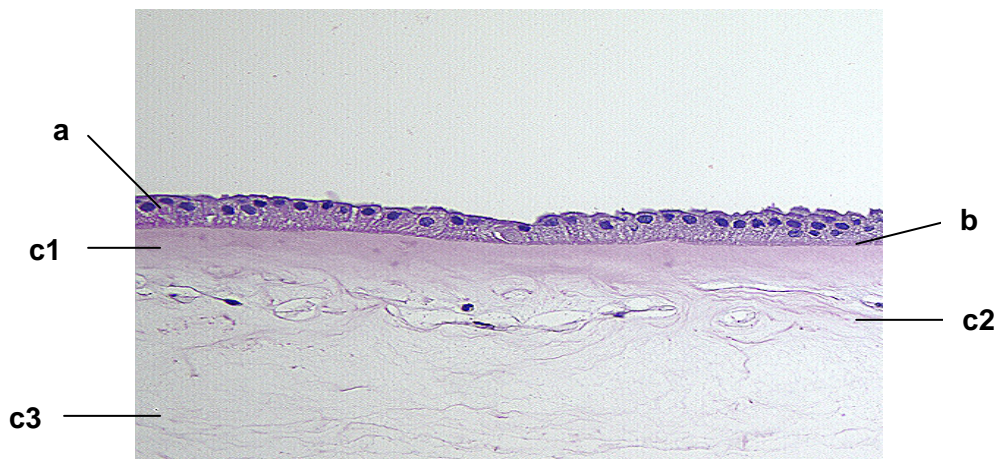
Las células epiteliales se unen entre sí mediante desmosomas, que también forman parte de la red de canales intercelulares <sup>62</sup>. El epitelio emite prolongaciones hacia la membrana basal, a la que se encuentra firmemente

unido mediante hemidesmosomas, mecanismo que ayuda a compensar la tensión a la que se ve sometida la membrana amniótica con los movimientos fetales <sup>2,62</sup>. Estas interdigitaciones del epitelio, similares a podocitos, parecen participar en mecanismos de transporte activo <sup>62-63</sup>.

**2.2.2** La **membrana basal** es una de las más gruesas que se encuentran en los tejidos humanos <sup>64</sup> (Figura 4, b). Está compuesta por fibras reticulares y sustancia amorfa <sup>2,63</sup>. Mediante inmunofluorescencia se ha detectado la presencia en ella de colágeno IV <sup>65-67</sup> (cadenas 2 $\alpha$  y 5 $\alpha$  <sup>66</sup>), lamininas 1 y 5 <sup>65,67</sup>, colágeno VII <sup>65</sup>, fibronectina <sup>65</sup> y entactina <sup>66</sup>. La laminina 5 se encuentra asociada en su mayor parte a laminina 6 y a otra isoforma denominada laminina 7 <sup>68</sup>. Tanto el colágeno IV como la laminina influyen en la adhesividad celular a la membrana basal y en la migración, proliferación y diferenciación epitelial <sup>22,65</sup>.

**2.2.3** El **estroma** presenta 3 zonas diferenciadas (Figura 4). La capa inmediatamente por debajo de la membrana basal está formada por una densa red fibrilar carente de células denominada *lámina compacta* <sup>63</sup> (Figura 4, c1). A continuación, se encuentra un *estrato de fibroblastos* incluidos en una matriz reticular poco densa (Figura 4, c2); y, por debajo de ella, la *lámina esponjosa* (Figura 4, c3), en contacto con el corion, y compuesta por haces de fibras reticulares en una matriz con mucina y alto contenido en hialuronato <sup>2,63,69</sup>. Mediante técnicas de inmunofluorescencia se ha demostrado la presencia en el estroma amniótico de fibronectina y colágenos I, III y V <sup>2,65,67</sup>.

**2.2.4** La **matriz extracelular** proporciona soporte mecánico y da elasticidad y resistencia a la ruptura a la membrana amniótica <sup>39,69</sup>. Formando parte de ella, junto con el colágeno, se han detectado varios compuestos de la familia de los proteoglicanos: decorin <sup>69</sup>, biglican y mimecan <sup>39</sup>. También se han encontrado glucosaminoglicanos como el keratán sulfato y el condroitín sulfato en el estroma amniótico y el heparán sulfato en la membrana basal <sup>67</sup>. Algunos factores de crecimiento se unen a componentes de la matriz extracelular, que actúan regulando su actividad <sup>68-69</sup>.



**Figura 4:** Estructura histológica de la membrana amniótica humana. Monocapa de células epiteliales (a), membrana basal (b), estroma (c1: lámina compacta, c2: capa de fibroblastos, c3: lámina esponjosa) H&E, 20x.

La membrana amniótica que recubre el cordón umbilical tiene una organización distinta, con un epitelio de morfología escamosa con hasta 4 capas celulares, en las que las células más superficiales aparecen aplanadas y carecen de núcleo <sup>62</sup>.

### 2.3 Características inmunológicas:

La experiencia clínica en la aplicación de la membrana amniótica ha demostrado que pese a tratarse de un tejido extraño para el receptor, no parece provocar una reacción de rechazo. Akle *et ál.* no detectaron signos locales ni marcadores serológicos de rechazo tras el implante subcutáneo de membrana amniótica en voluntarios <sup>70</sup>. Tampoco se observó reacción de rechazo tras implantar membrana amniótica en el estroma corneal de animales de laboratorio, y sólo una escasa reacción inmunológica en el tejido circundante cuando el implante se realizó en la zona limbar o bajo la cápsula renal, regiones especialmente inmunógenas <sup>71</sup>.

Sin embargo, se ha demostrado la expresión en las células amnióticas de antígenos de histocompatibilidad de clase Ib, los HLA-E y HLA-G, pequeñas cantidades de HLA tipo Ia y también positividad para HLA clase II en fibroblastos del estroma amniótico <sup>71-72</sup>. Las razones que pueden explicar su escasa

inmunogenicidad pese a la expresión de moléculas implicadas en los mecanismos de rechazo son varias.

En primer lugar, los HLA tipo Ib, los que expresa fundamentalmente, tienen un escaso polimorfismo genético, por lo que las probabilidades de que generen rechazo son muy escasas<sup>71-72</sup>. Además, las células amnióticas secretan factores inmunosupresores que tienen efectos inhibitorios sobre la inmunidad innata y adaptativa. Se ha demostrado también que el sobrenadante de células amnióticas en cultivo tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación de neutrófilos y la migración de macrófagos, además de inducir la apoptosis de linfocitos B y T activados, ya que contiene factor inhibidor de macrófagos y Fas ligando, también expresados en las células epiteliales amnióticas<sup>73</sup>.

Pese a lo señalado, Gabler *et ál.* describieron un caso de hipopion tras trasplantes repetidos de membrana amniótica procedente de un mismo donante, que exponen podría deberse a una reacción inmune por sensibilización a antígenos no determinados del tejido y producida tras el primer trasplante<sup>74</sup>. Posteriormente, Wang *et ál.* demostraron que el trasplante alogénico de células amnióticas frescas es susceptible de provocar rechazo inmune en receptores sensibilizados, aunque no parece tener memoria adquirida para hipersensibilidad tardía<sup>75</sup>.

### **3- PROPIEDADES Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA:**

Varios mecanismos de acción han sido propuestos para explicar las acciones clínicas de la membrana amniótica. Muchos de ellos se deducen de ellas y algunos se han propuesto tras análisis de su composición y contenido, sin haber sido confirmados con estudios experimentales.

Probablemente, la combinación de factores de crecimiento, neurotrofinas y citoquinas inmersos en una membrana basal similar a la de la córnea, y fuertemente unida a una matriz extracelular, es la responsable de las propiedades

antiinflamatorias, antifibroblásticas y antiangiogénicas del tejido, lo que unido a su escasa inmunogenicidad la hace útil en múltiples aplicaciones clínicas.

### **3.1 Protección mecánica:**

La aplicación de la membrana amniótica sobre la superficie ocular dañada ejerce en primer lugar una protección mecánica frente a la fricción del parpadeo, similar al que perseguimos con la oclusión o la colocación de una lente de contacto terapéutica. Una de sus primeras consecuencias es una marcada reducción del dolor, que parece deberse al efecto mecánico, ya que la aplicación de fluido amniótico sobre la superficie corneal de conejos tras láser excimer acelera la regeneración nerviosa y la recuperación de la sensibilidad corneal <sup>76</sup>.

### **3.2 Estímulo de la epitelización y de la migración de células epiteliales:**

En las primeras aplicaciones médicas de la membrana amniótica en el tratamiento de úlceras cutáneas que no respondían a otros tratamientos, se observó como principal efecto una aceleración de la epitelización <sup>1</sup>. Además, una de las principales indicaciones oftalmológicas del TMA es el tratamiento de úlceras corneales refractarias a otros tratamientos, en las que acelera el proceso de reparación <sup>8,10,77-79</sup>. También se ha demostrado que estimula la reepitelización en modelos animales de causticaciones oculares y láser excimer <sup>33,80</sup>.

Varios pueden ser los mecanismos que contribuyen a la estimulación del proceso de epitelización. En primer lugar, la membrana amniótica aporta una membrana basal sana que sirve como sustrato para el crecimiento y regeneración de las células dañadas, ya que facilita la migración de células epiteliales <sup>14-15</sup>, refuerza la adhesión de las células basales <sup>21-22</sup>, favorece la diferenciación celular <sup>22</sup> y previene la apoptosis <sup>23</sup>. En segundo lugar, durante su reabsorción podría liberar sobre la superficie ocular diversos factores de crecimiento y citoquinas que estimulan el proceso de reparación e inhiben los procesos de destrucción tisular. En este sentido, se ha demostrado la expresión y se han cuantificado niveles de varios factores de crecimiento en la membrana amniótica: el factor de crecimiento epitelial

(EGF), de los hepatocitos (HGF), de los queratocitos (KGF), el factor de crecimiento básico del fibroblasto (bFGF) y los factores de crecimiento transformante alfa (TGFA) y beta1 (TGFbeta1) <sup>34,37</sup>. Otro factor de crecimiento presente en la membrana amniótica es el factor de crecimiento neural (NGF), que acelera la reparación corneal <sup>38</sup>. Todos ellos tienen acciones estimulantes sobre la proliferación epitelial y participan en los procesos de reparación celular <sup>81-83</sup>.

Na *et ál.* comprobaron *in vitro* la acción inhibitoria de extractos de membrana amniótica sobre proteasas como la colagenasa. En estos extractos, detectaron concentraciones de inhibidores de proteasas endógenas que se activan durante la queratitis y los procesos de lisis corneal como son alfa-antitripsina, alfa1-antiquimiotripsina, el inhibidor de la alfa1-tripsina, la alfa2-macroglobulina y la alfa2-antiplasmina <sup>35</sup>.

Además, la expresión en la membrana amniótica de las 4 moléculas que integran la familia de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs) <sup>36</sup> así como la detección de niveles de TIMP 1, 2 y 3 en el tejido <sup>36,84</sup>, demuestran una potencial acción inhibitoria sobre las metaloproteinasas (MMPs). Éstas son un grupo de endopeptidasas zinc dependientes <sup>85</sup> al que pertenecen la MMP-2, implicada en procesos de perforación corneal tras úlceras estériles, y la MMP-9, detectada en la superficie ocular tras causticaciones <sup>86</sup>.

### 3.3 Propiedades antiinflamatorias:

Otro de los efectos clínicos observados en los días siguientes a la realización de un TMA es una importante disminución de la inflamación. Las razones que explican este efecto antiinflamatorio son varias.

La membrana amniótica contiene moléculas con un efecto antiinflamatorio directo. En ella se ha detectado la expresión del antagonista del receptor de la interleuquina (IL) - 1 y de la IL-10 <sup>36</sup>, ambas citoquinas antiinflamatorias. También parece tener un efecto inhibitorio sobre la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias, ya que la secreción de IL-8 y del factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos, ambos mediadores en la respuesta inflamatoria alérgica, disminuyen en el sobrenadante de fibroblastos cultivados sobre membrana

amniótica desnuda<sup>32</sup>. Se ha observado una disminución de la concentración de IL-1alfa y 1beta, ambas con efectos proinflamatorios, en el sobrenadante de células epiteliales limbares cultivadas sobre membrana amniótica desnuda en comparación con las cultivadas sobre plástico, acompañada de un aumento de la concentración del antagonista del receptor de la IL-1<sup>87</sup>.

Varios estudios sugieren que otro de los mecanismos antiinflamatorios de la membrana amniótica es actuar como una barrera frente a las células inflamatorias presentes en la lágrima, capturando parte de ellas y disminuyendo así sus efectos sobre la superficie ocular<sup>24,88</sup>. Así, se ha demostrado que la aplicación de membrana amniótica reduce la infiltración del estroma corneal por células inflamatorias tras fotoqueratectomía refractiva<sup>89</sup> y tras causticaciones oculares<sup>33</sup>, ambos estudios sobre modelos animales.

Kim *et ál.* proponen que la aceleración de la epitelización que produce el TMA disminuye la infiltración del estroma corneal por células inflamatorias, reduciendo así la respuesta inflamatoria<sup>33</sup>.

### 3.4 Propiedades antifibróticas:

El recubrimiento con membrana amniótica sobre la superficie de ablación corneal tras la realización de fotoqueratectomía refractiva en modelos animales se tradujo en una disminución del “haze” postoperatorio estadísticamente significativa en comparación con un grupo control<sup>80,89-90</sup>. La aplicación de membrana amniótica sobre la superficie corneal tras la realización de una queratomileusis subepitelial asistida por láser (LASEK) en 94 ojos de 54 pacientes aceleró el proceso de reepitelización y disminuyó el grado de “haze” postoperatorio, mejorando los resultados refractivos<sup>91</sup>. Estos son ejemplos de la influencia de la membrana amniótica sobre el proceso de cicatrización, aunque los mecanismos a través de los cuales se produce esta modulación no son bien conocidos.

El tejido causa una marcada supresión sobre todas las isoformas del TGFbeta, citoquina profibrótica por excelencia, en la superficie ocular, lo que explica la disminución de la cicatrización resultante<sup>31</sup>. El TGFbeta posee 3 isoformas que promueven la fibrosis tisular mediante la estimulación de la

proliferación de fibroblastos y que tienen un efecto modulador sobre la matriz extracelular<sup>81-83,92</sup>. Tseng *et ál.* observaron que en fibroblastos corneales y limbares humanos cultivados sobre membrana amniótica se produce una importante disminución en la expresión y concentración de varios componentes del sistema de señales del TGFbeta, lo que conduce a la reducción de su diferenciación a miofibroblastos, fase que completa la cicatrización en el proceso de reparación de las heridas<sup>30</sup>. Los autores proponen que esta inhibición es debida al contacto directo de las células en cultivo con la matriz extracelular de la membrana amniótica, ya que el efecto es mucho mayor en estas condiciones, y que no puede ser atribuida a un único componente de la matriz extracelular. Un año después, Lee *et ál.* obtuvieron resultados similares en cultivos de fibroblastos conjuntivales normales y otros procedentes de tejido de pterigium sobre membrana amniótica<sup>31</sup>. Además, el cultivo de fibroblastos conjuntivales sobre membrana amniótica desnuda se traduce en unos índices de proliferación más bajos y una importante disminución de los niveles de TGF-beta1 en comparación con controles sobre plástico<sup>32</sup>.

### 3.4 Propiedades antiangiogénicas :

En 1995, Kim y Tseng describieron en un modelo animal de daño ocular inducido que tras el TMA se producía una disminución de la neovascularización corneal<sup>93</sup>, efecto confirmado con posterioridad en la aplicación clínica del tejido<sup>2,64</sup>. Este efecto puede deberse a que la membrana amniótica expresa varios factores antiangiogénicos: colágeno a1 (XVIII), precursor de la angiostatina, trombospondina<sup>36</sup> y TIMPs 1, 2, 3 y 4<sup>36,84</sup>. También se ha detectado la expresión de factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), que además presenta niveles cuantificables en el tejido, localizándose fundamentalmente en la membrana basal<sup>29</sup>. El extracto de membrana amniótica tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células endoteliales vasculares cultivadas *in vitro*<sup>29, 94</sup>, que no es completamente inhibido por el anticuerpo anti-PEDF, lo que supone que tienen que existir otros factores de efecto antiangiogénico en la membrana amniótica<sup>29</sup>. Además, el propio efecto antiinflamatorio y acelerador de la reparación corneal provoca probablemente una disminución de los estímulos angiogénicos<sup>29,36</sup>.

### 3.5 Propiedades antimicrobianas:

La cavidad amniótica se considera un compartimento estéril, en el que la membrana amniótica actúa como una barrera física que impide el paso de microorganismos. Esta función de barrera podría explicar al menos en parte el efecto protector frente a infecciones que se le atribuyó desde el comienzo de su uso <sup>1</sup>, pero existen otras características que contribuyen a sus propiedades antimicrobianas.

Se han detectado varios factores antimicrobianos en el líquido amniótico, lo que hace suponer que la membrana amniótica puede ser la encargada de producirlos, secretarlos y, entretanto, contenerlos. Espinoza *et ál.* demostraron la presencia en líquido amniótico de calprotectina, proteína incrementada de la permeabilidad y 3 subtipos de defensinas, las  $\beta$ -defensinas humanas 1, 2 y 3 <sup>28</sup>, que también han sido localizadas en células amnióticas mediante inmunohistoquímica y transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) <sup>95</sup>. Kim *et ál.* evidenciaron la expresión de histonas H2A y H2B en células del epitelio amniótico y en la superficie extracelular, comprobando posteriormente que tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento in vitro de *Escherichia coli* y *Streptococcus* del grupo B y sobre la actividad de la endotoxina de los lipopolisacáridos bacterianos <sup>27</sup>.

Kjaergaard *et ál.* describieron la capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano in vitro de fragmentos de membranas corioamnióticas, efecto más pronunciado sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* del grupo A y *Streptococcus saprophyticus* <sup>25</sup>, resultados similares a los obtenidos por Talmi *et ál.* en 1991 <sup>26</sup>. En ambos casos, la inhibición del crecimiento bacteriano aparecía en las zonas de contacto directo entre la membrana amniótica y el cultivo, por lo que Talmi *et ál.* concluyeron que el efecto antibacteriano podría deberse a la gran capacidad de adhesión de este tejido al sustrato subyacente. Sin embargo, en el estudio realizado por Kjaergaard *et ál.* la inhibición también se producía cuando se interponía un fragmento de papel de filtro entre el tejido y el cultivo, por lo que probablemente existe algún factor antimicrobiano presente en la membrana amniótica capaz de traspasar el papel.

## **4- UTILIZACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA EN OTRAS ESPECIALIDADES MÉDICAS:**

### **4.1 Cirugía plástica:**

La primera aplicación médica publicada de la membrana amniótica fue en el ámbito de la Cirugía Plástica: su uso como recubrimiento temporal o transplante de piel para el tratamiento de úlceras cutáneas <sup>1</sup>. En la actualidad, su principal indicación en esta especialidad sigue siendo el tratamiento de úlceras cutáneas que no responden a tratamientos convencionales, especialmente en pacientes con patologías sistémicas como la Diabetes Mellitus, que dificultan la curación. Puede ser usada en solitario o en combinación con microinjertos de piel <sup>96-99</sup>. También se emplea como recubrimiento temporal en grandes quemados, en los que al favorecer una rápida epitelización disminuye la pérdida de líquidos, proteínas y electrolitos <sup>1</sup>. En pacientes con heridas profundas que no pueden ser cerradas de forma inmediata por el riesgo de contaminación, como las mordeduras, la membrana amniótica actúa como protección para las estructuras profundas <sup>100</sup>.

### **4.2 Ginecología:**

La membrana amniótica se usa en la cirugía de atresias y malformaciones vaginales para la reconstrucción de vagina y cérvix, así como para la prevención de la formación de adherencias tras cirugía vaginal <sup>101-102</sup>.

### **4.3 Cirugía General y del Aparato Digestivo:**

Gharib *et ál.* emplearon injertos de membrana amniótica para la reparación de grandes defectos abdominales en recién nacidos con gastrosquisis, observando una menor incidencia de adherencias peritoneales postoperatorias <sup>103</sup>, lo que ya había sido descrito anteriormente en modelos animales <sup>104</sup>. También en modelos experimentales, se ha demostrado que la membrana amniótica favorece la formación de una nueva mucosa tras resecciones intestinales, facilitando la recuperación funcional <sup>105</sup>.

#### 4.4 Endocrinología:

En los últimos años, varios estudios en modelos animales experimentales han propuesto la utilidad de la membrana amniótica como material de encapsulación para el trasplante de islotes de Langerhans en el tratamiento de la Diabetes Mellitus <sup>106-107</sup>. La membrana amniótica actuaría como barrera inmunológica previniendo el rechazo del tejido transplantado y permitiendo además su rápida vascularización. Wei *et ál.* probaron la normalización de los niveles sanguíneos de glucosa tras el implante de células amnióticas en ratones diabéticos <sup>108</sup>.

Las células epiteliales amnióticas se han empleado para el tratamiento de la mucopolisacaridosis, ya que son capaces de producir *in vitro* beta-glucuronidasa, enzima deficitaria en esta enfermedad <sup>109-110</sup>.

#### 4.5 Otorrinolaringología:

La membrana amniótica se ha empleado en la reconstrucción timpánica y del pabellón auricular <sup>111</sup>, para cubrir grandes áreas tras necrosis del flap en cirugía de cabeza y cuello <sup>112</sup>, y como sustitución de la mucosa nasal en casos de epistaxis severas y telangiectasias hereditarias <sup>113</sup>.

#### 4.6 Neurología:

La demostración de la capacidad de las células epiteliales amnióticas para sintetizar y liberar catecolaminas en cultivo <sup>114</sup> llevó a postular la hipótesis de que tuviesen capacidad para transformarse en células neurona-like, transformación confirmada en un modelo experimental sobre ratas en el que las células amnióticas cultivadas se convirtieron en células nerviosas en el cerebro isquémico <sup>115</sup>. La membrana amniótica también se ha empleado como material para la construcción de tubos titulares para la regeneración de nervios periféricos <sup>116</sup>.

#### 4.7 Otros usos:

Se han realizado reconstrucciones quirúrgicas de la vejiga urinaria con membrana amniótica y otros tejidos placentarios en modelos animales <sup>53,117</sup>. También se han aplicado capas de membrana amniótica en cirugía ortopédica como tejido de interposición en las artroplastias de cadera en la artritis tuberculosa <sup>118</sup>.

### 5- UTILIZACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA EN OFTALMOLOGÍA:

En los últimos años, la Oftalmología ha sido la especialidad médica en la que más se ha desarrollado el uso de este tejido. El TMA está indicado en el tratamiento quirúrgico de numerosas enfermedades de la superficie ocular. Con la experiencia acumulada en este tiempo, hoy podemos precisar las indicaciones más adecuadas y conocer mejor sus limitaciones.

#### 5.1 Reconstrucción de la superficie conjuntival:

La membrana amniótica se integra perfectamente en la conjuntiva, quizás porque poseen una membrana basal similar, con la misma distribución de colágeno IV y lamininas <sup>65</sup>. Los resultados estéticos son excelentes, especialmente si se comparan con los obtenidos con otros tejidos como la mucosa bucal. Además, evita las complicaciones derivadas de obtener tejido donante del mismo paciente, tanto de la conjuntiva del ojo contralateral como de otras mucosas.

**5.1.1 Pterigium primario y recurrente:** Aunque los resultados del TMA asociado a la exéresis de pterigium no son superiores al autoinjerto de conjuntiva, puede ser una alternativa útil cuando el defecto conjuntival creado tras la exéresis es de gran tamaño, o en casos de pterigiums recurrentes intervenidos en varias ocasiones que están asociados a simbléfaron o restricción de movimientos oculares <sup>119-120</sup>. Prabhasawat *et ál.* encontraron una menor tasa de recurrencia de pterigiums primarios y recurrentes en pacientes sometidos a exéresis seguida de TMA que en aquellos a los que se le realizó una exéresis simple (14,8% y 45% respectivamente) <sup>11</sup>. Sin embargo, el menor índice de recurrencias se

produjo en el grupo de pacientes a los que se les realizó un autoinjerto de conjuntiva (4,9%). Estudios posteriores obtienen resultados similares <sup>64</sup>, aunque Ma *et ál.* no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la exéresis de pterigium seguida de TMA y el autoinjerto de conjuntiva, y tampoco con el grupo de pacientes al que se le aplicó mitomicina C tras la exéresis de pterigium <sup>121</sup>.

Solomon *et ál.* proponen en el 2001 una técnica de exéresis de pterigium tanto primario como recurrente, con resecciones de tejido conjuntival que alcanzan la carúncula, y posterior reconstrucción de los defectos creados con membrana amniótica dispuesta en dos capas. Los resultados de la tasa de recurrencia obtenidos fueron similares a los de otras técnicas e incluso cercanos a los del autoinjerto de conjuntiva <sup>119</sup>. Shimazaki *et ál.* han descrito la combinación de autoinjerto de conjuntiva y autoinjerto de limbo con TMA tras la exéresis de pterigiums recurrentes <sup>122</sup>.

Por último, se ha empleado la membrana amniótica como soporte para el cultivo de células epiteliales conjuntivales *in vitro* y posterior vehículo para el trasplante de dichas células en la superficie ocular tras la exéresis del pterigium <sup>123-124</sup>.

**5.1.2 Reconstrucción de la superficie ocular severamente dañada:** La recuperación de una superficie conjuntival no inflamada en pacientes con enfermedades que provocan fibrosis y cicatrización del tejido puede mejorar el pronóstico de procedimientos posteriores como la queratoplastia penetrante o el trasplante de limbo <sup>12,125-127</sup>.

Tsubota *et ál.* aplicaron el trasplante de limbo y membrana amniótica para el tratamiento de estadios avanzados de penfigoide ocular y síndrome de Stevens-Johnson en 14 ojos (11 pacientes); en 12 ojos consiguieron la reconstrucción de la superficie ocular con mínima recurrencia del simbléfaron <sup>12</sup>.

En el año 2000, Honavar *et ál.* realizaron un TMA tras la liberación de simbléfarons y la remoción de tejido fibroso subconjuntival en 10 pacientes con el diagnóstico de síndrome de Stevens-Johnson como preparación para

procedimientos posteriores <sup>125</sup>. En 9 (10) pacientes, se consiguió una superficie ocular adecuada, con recuperación de fondos de saco y resolución de la fibrosis. También se ha realizado TMA para la reconstrucción de la superficie ocular en niños con síndrome de Stevens-Johnson, con el resultado de éxito en 2 de 4 pacientes <sup>126</sup>. Barabino *et ál.* realizaron un TMA tras la exéresis del tejido cicatricial en 9 ojos de pacientes con penfigoide ocular avanzado, consiguiendo un epitelio conjuntival normal con células caliciformes en 6 ojos a las 4 semanas y en 4 ojos a las 28 semanas <sup>127</sup>.

El TMA realizado en la fase aguda de la necrólisis epidérmica tóxica reduce la inflamación y previene la cicatrización excesiva, además de favorecer la epitelización de los defectos conjuntivales y corneales <sup>128-129</sup>.

Actualmente el TMA se considera el tratamiento de elección en el síndrome laringo-ónico-cutáneo, una alteración genética que lleva a la formación de importantes cicatrices que invaden toda la conjuntiva y afectan a la córnea. La extirpación de ese tejido de granulación y su sustitución por membrana amniótica consigue la estabilidad de la superficie ocular y la disminución de las recidivas por un tiempo, aunque no detiene el progreso de la enfermedad y no es un tratamiento definitivo <sup>130-131</sup>.

**5.1.3 Simbléfaron:** Solomon *et ál.* demostraron la eficacia del TMA en la reconstrucción del fondo de saco tras la exéresis de simbléfaron <sup>132</sup>, con éxito en 12 de los 19 ojos sobre los que aplicaron la técnica. Los mejores resultados fueron obtenidos con el simbléfaron secundario a traumatismos y los peores en pacientes con enfermedades de origen autoinmune, algo ya señalado por estudios anteriores <sup>14</sup>. Con la aplicación intraoperatoria de mitomicina C tras la exéresis del simbléfaron <sup>133-134</sup>, se produce una menor tasa de recurrencia, con limitaciones en los pacientes afectados de penfigoide cicatricial ocular o síndrome de Stevens-Johnson <sup>133</sup>.

**5.1.4 Conjuntivochalasia:** Meller *et ál.* utilizaron la membrana amniótica para la reparación del defecto creado tras la exéresis de la conjuntiva redundante en 47 ojos con conjuntivochalasia refractaria a tratamiento médico <sup>135</sup>. En un 98% de los pacientes se consiguió una superficie

conjuntival lisa y no inflamada y en un 83,3% la epífora ocasional desapareció, resultados similares a los de estudios posteriores <sup>136</sup>.

**5.1.5 Otras aplicaciones:** La membrana amniótica ha sido empleada para la reparación de defectos conjuntivales creados tras grandes exéresis conjuntivales en diferentes neoplasias conjuntivales: melanoma maligno <sup>137-138</sup>, melanosis adquirida primaria y neoplasias intraepiteliales conjuntivales <sup>138</sup>. También se ha utilizado para la reparación de dehiscencias conjuntivales tras cirugía de estrabismo con suturas ajustables <sup>139</sup> y para recubrimiento tarsal en cirugía de entropión <sup>140</sup>.

## 5.2 Reconstrucción de la superficie corneal:

**5.2.1 Defectos epiteliales persistentes y úlceras corneales:** Lee *et ál.* aplicaron por primera vez el TMA amniótica para el tratamiento de defectos epiteliales corneales persistentes de diferentes etiologías, y refractarios a otros tratamientos, consiguiendo en 10 de los 11 ojos una completa epitelización en pocas semanas <sup>9</sup>. Azuara-Blanco *et ál.* obtuvieron resultados similares, con una menor tasa de éxito en el grupo de pacientes con úlceras profundas <sup>8</sup>. En los años siguientes, varios estudios han confirmado que el TMA acelera la epitelización. Kruse *et ál.* aplicaron varias capas de membrana amniótica sobre el lecho de úlceras neurotróficas en 11 pacientes <sup>78</sup>. En 9 pacientes consiguieron una gran reducción de la inflamación y una completa epitelización en 4 semanas, con un engrosamiento estromal que se mantuvo estable durante todo el seguimiento. Estudios posteriores obtuvieron resultados similares con el TMA multicapa para úlceras corneales profundas, observando que la insuficiencia de limbo total era la principal limitación para el éxito la técnica, al igual que la presencia de una enfermedad autoinmune subyacente <sup>10,77,141</sup>. También se ha usado la membrana amniótica en el tratamiento de úlceras corneales infecciosas <sup>79,142-143</sup>. En 23 ojos de pacientes con queratitis fúngica, Chen *et ál.* observaron que la mejor respuesta al TMA se producía en el grupo con infección inactiva (cultivo negativo), y que el riesgo de

infección persistente sigue presente después del transplante, por lo que recomendaron continuar con una adecuada terapia antifúngica <sup>144</sup>.

**5.2.2 Perforaciones corneales y descematoceles:** El TMA ayuda a una rápida epitelización con engrosamiento estromal y permite retrasar la necesidad de una queratoplastia penetrante, que en fase aguda tendría un alto riesgo de rechazo del injerto <sup>77,145-146</sup>. Rodríguez-Ares *et ál.* aplicaron varias capas de membrana amniótica en 15 pacientes con perforaciones corneales de diferentes tamaños, concluyendo que el TMA es efectivo en el tratamiento de perforaciones de diámetro inferior a 1,5 mm <sup>147</sup>.

También se ha utilizado la membrana amniótica junto con adhesivo tisular para el tratamiento de perforaciones oculares <sup>147-148</sup>. Hick *et ál.* afirman que las perforaciones corneales de hasta 3 mm de diámetro pueden ser tratadas mediante la asociación de TMA y adhesivo de fibrina <sup>150</sup>, tratamiento que aumenta la tasa de éxito a un 92,9% frente al 73,7% del grupo de perforaciones corneales en las que sólo se aplicó membrana amniótica.

También se ha realizado el TMA para el tratamiento de la queratitis herpética necrotizante <sup>151</sup>, demostrándose posteriormente en estudios *in vitro* que tras el TMA se produce una reducción de la expresión y actividad de las MMP-8 y MMP-9 y un aumento en la expresión de TIMP-1 en corneas de ratón con queratitis herpética inducida <sup>152</sup>.

**5.2.3 Queratopatía bullosa:** Varios autores han propuesto el TMA como tratamiento alternativo para el dolor intratable en la queratopatía bullosa en pacientes con pobre potencial visual en los que el transplante de córnea no estuviera indicado <sup>42,153-154</sup>. La membrana amniótica parece proporcionar una membrana basal más resistente a la formación de bullas epiteliales, sirviendo como sustrato para el crecimiento de un epitelio corneal más estable <sup>153</sup>.

**5.2.4 Queratopatía en banda:** Anderson *et ál.* realizaron un TMA en 16 ojos (15 pacientes) tras una queratectomía superficial para la extirpación del depósito de calcio, observando una rápida epitelización con una menor inflamación y dolor <sup>155</sup>.

### 5.3 Cirugía de filtración:

En 1998, Fujishima *et ál.*, realizaron sobre 14 ojos (13 pacientes) con glaucoma severo no controlado con medicación una trabeculectomía con aplicación de mitomicina intraoperatoria y la colocación de un fragmento de membrana amniótica criopreservada entre la esclera y el tapete escleral, con el objetivo de disminuir la reacción cicatricial y la adhesión del tapete <sup>156</sup>. En 10 pacientes lograron un control de la presión intraocular sin medicación y en 2 pacientes fue necesario asociar medicación tópica y oral. En 2003, Willoch y Nicolaissen desarrollaron un técnica similar, en la que la mitomicina C se aplicaba previamente sobre los fragmentos de membrana amniótica que eran colocados entre la esclera y el tapete escleral, y bajo el tejido subconjuntival <sup>157</sup>. Con ella, en 9 pacientes con glaucoma refractario sometidos a cirugías previas se logró un control de la presión intraocular postoperatoria durante un tiempo medio de seguimiento de 9,8 meses, con reducción de la medicación preoperatoria <sup>158</sup>. El empleo del TMA para la reparación de fugas en ampollas de filtración ha obtenido resultados inferiores al avance conjuntival <sup>159-161</sup>.

### 5.4 Insuficiencia de limbo:

Tseng *et ál.* aplicaron el TMA, solo o combinado con autotransplante de limbo y/o queratoplastia penetrante, tras la resección de tejido cicatricial y pannus corneal, para el tratamiento de varios grados de insuficiencia de limbo de diversas etiologías en 30 ojos de 26 pacientes <sup>162</sup>. Tras el estudio, los autores concluyen que la membrana amniótica restaura una superficie ocular no inflamada adecuada para la reconstrucción de la superficie corneal. En la insuficiencia de limbo parcial el TMA es suficiente, lo que corroboran estudios posteriores <sup>163-164</sup>, ya que proporciona una membrana basal sana que ayuda a la expansión de las células limbares no dañadas, disminuye la fibrosis y acelera la epitelización. En los casos de insuficiencia limbar total o severa, la membrana amniótica asociada a transplante de limbo y en ocasiones a queratoplastia penetrante, proporciona una superficie ocular no inflamada que aumenta las probabilidades de éxito de los procedimientos asociados <sup>19,165-166</sup>. Sin embargo, ningún estudio ha demostrado que la membrana amniótica mejore los resultados o disminuya el riesgo de rechazo

cuando se asocia al trasplante de limbo, y tampoco evita el uso de inmunosupresores orales como la ciclosporina <sup>167</sup>.

El TMA, solo o en combinación con trasplante de limbo, se ha empleado también en la reconstrucción de la superficie ocular en fases crónicas de quemaduras oculares químicas o térmicas <sup>13,41,162,165,168-169</sup>. Aplicada en las fases agudas, la membrana amniótica favorece la epitelización y disminuye la inflamación y la cicatrización <sup>169</sup>. En los casos de causticaciones oculares de gravedad moderada, ayuda a recuperar la integridad de las superficies corneal y conjuntival <sup>13,41,166,169</sup>, ya que proporciona un microambiente adecuado para la expansión de las células limbares no dañadas y así favorece la resolución de la insuficiencia de limbo parcial. Sin embargo, en las causticaciones oculares graves, con insuficiencia de limbo total o casi total, la membrana amniótica disminuye la inflamación y evita la formación de simbléfaron pero no es capaz de prevenir el desarrollo o resolver la insuficiencia limbar, ya que el daño de las células madres es tan importante que no son capaces de proliferar <sup>166,168-169</sup>.

## **6- TÉCNICAS QUIRÚRGICAS DE RECONSTRUCCIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR CON MEMBRANA AMNIÓTICA:**

Existen varias formas de aplicación de la membrana amniótica sobre la superficie ocular, que según la patología a tratar y los objetivos perseguidos pueden combinarse entre ellas.

### **6.1 Injerto:**

En este caso, la membrana amniótica se orienta con la cara estromal hacia la superficie ocular cubriendo la zona dañada y se fija a los bordes sanos del tejido circundante, bien con suturas, reabsorbibles o no, bien con adhesivos titulares <sup>2,170</sup>. De esta forma se proporciona una membrana basal sana para la regeneración del tejido a partir de las células no dañadas del borde del defecto. Esta técnica estaría indicada en el tratamiento de úlceras corneales con destrucción estromal y daño de la membrana basal del epitelio corneal <sup>10</sup>.

## 6.2 “Parche”:

La membrana amniótica se coloca orientando su cara epitelial hacia la superficie ocular dañada, y es suturada a la córnea sana o a la conjuntiva sobre la zona limbar <sup>2,170</sup>. De esta forma, actúa como una barrera física que protege la superficie ocular de las agresiones externas como el parpadeo y además retiene las células y mediadores inflamatorios que están presentes en la lágrima <sup>145</sup>. Al irse reabsorbiendo, proceso que puede durar de 3 a 4 semanas, la membrana amniótica libera citoquinas y factores de crecimiento a la superficie ocular que favorecen el proceso de reparación.

## 6.3 Técnica multicapa:



**Figura 5:** Trasplante de membrana amniótica: técnica multicapa. Disposición de la membrana amniótica sobre la superficie ocular.

En las perforaciones corneales y en las úlceras de gran profundidad, aplicar un solo fragmento de membrana amniótica no es suficiente. Con esta técnica, el lecho de la úlcera se rellena con varias capas de membrana amniótica (según la profundidad del defecto a reparar) orientadas con su cara estromal hacia el lecho de la úlcera (Figura 5). Sobre ellos se coloca habitualmente un fragmento de membrana amniótica a modo de parche <sup>77,145-147</sup>.

#### 6.4 Soporte para cultivo y trasplante celular:

La membrana amniótica se emplea como soporte para el cultivo de diversas líneas celulares y como vehículo de trasplante de esas células a la superficie ocular. En el año 2000, Tsai *et ál.* publican un trabajo sobre reconstrucción de la superficie ocular mediante trasplante autólogo de células epiteliales limbares cultivadas sobre membrana amniótica en 7 pacientes con diagnóstico de insuficiencia limbar parcial o completa <sup>18</sup>. Las células fueron obtenidas mediante biopsia limbar en el ojo sano contralateral. De esta forma, el tejido extraído es tan poco que el riesgo de inducir una insuficiencia limbar parcial en el ojo sano es mínimo. Todas estas ventajas se añaden a las proporcionadas por la membrana amniótica: estimulación de la epitelización y disminución de la inflamación y la fibrosis. Técnicas similares se han aplicado posteriormente, también con otras líneas celulares, con buenos resultados, siendo la principal incógnita el tiempo de supervivencia de las células transplantadas en la superficie ocular <sup>123-124,171-175</sup>.

### 7- OBTENCIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA:

La obtención de la membrana amniótica es un paso común y previo a todos los métodos de conservación que se le apliquen. Comprende la selección de donantes y el propio proceso de obtención del tejido.

#### 7.1 Selección de donantes:

La placenta de la que se obtiene la membrana amniótica debe proceder de una donante en la que se cumplan los siguientes criterios, recogidos en la literatura y basados en las leyes en vigor en España en relación al trasplante de órganos y tejidos:

- Ser mayor de edad y estar en posesión de plenas facultades mentales <sup>46</sup>.
- Haber dado su consentimiento, por escrito, tras ser informada previamente de la naturaleza y finalidad de la donación <sup>46,176</sup>.
- Tener serologías negativas para virus de la inmunodeficiencia humana, tipos 1 y 2; virus de las hepatitis B y C y sífilis <sup>47</sup>. Las mismas serologías deben

repetirse pasados 180 días. Si se realiza la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar ácidos nucleicos de los virus mencionados puede evitarse la realización de pruebas sanguíneas<sup>47</sup>.

- Embarazos a término sin patología gestacional, tanto fetal como materna<sup>2,54-55,177</sup>.

## **7.2 Proceso de obtención:**

Las placentas deben proceder de cesáreas, para disminuir los riesgos de infección. Adds *et ál.* demostraron una mayor contaminación microbiológica en placentas procedentes de parto que en las obtenidas de cesáreas, aunque detectaron actividad microbiológica en ambas<sup>178</sup>.

La cesárea debe ser electiva, no urgente, y estar indicada por causas anatómicas o riesgos de distocias del parto<sup>2,54,177</sup>.

Tras la extracción de la membrana amniótica, ésta es lavada en solución con antibióticos en dilución. Los habitualmente empleados son penicilina G, estreptomycin y anfotericina B. De esta forma, se cubre el espectro de Gram (+) y Gram (-) y se previenen sobreinfecciones fúngicas.

## **8- CONSERVACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA:**

En el momento en que un tejido es separado del ser vivo del que forma se inician las reacciones que conducen a la muerte celular, y que llevan a su destrucción. La detención de estas reacciones conduciría a la conservación del tejido por tiempo indefinido. La naturaleza del material a conservar y el uso que se le va a dar determinan las condiciones óptimas para la conservación de cada tejido y de las funciones que es imprescindible mantener.

Como ya hemos señalado, las primeras referencias sobre el uso de la membrana amniótica en Medicina se remontan a principios del siglo XX<sup>1-3,57</sup>. Desde entonces y hasta nuestros días, los métodos empleados para su procesamiento y conservación han sido varios.

En 1913 Sabella aplicó la membrana amniótica como sustituto de implantes cutáneos tras conservarla en solución salina durante 72 horas <sup>1,57</sup>.

De Röth, primer autor en publicar un trabajo sobre la aplicación de la membrana amniótica en Oftalmología, conservó amnion y corion en solución de Locke (compuesta por cloruro sódico 0,9%, cloruro de calcio 0,0024%, bicarbonato de sodio 0,01% y glucosa 0,1%), durante unas horas antes de su aplicación sobre defectos conjuntivales <sup>4</sup>.

En la década de los 40 del siglo pasado, Chao *et ál.* desarrollaron la *amnioplastina* <sup>1</sup>, producto empleado por Sorsby *et ál.* en el tratamiento de causticaciones oculares <sup>5-6</sup>. Tras su obtención, la membrana amniótica se mantenía en una solución con alto contenido en sal durante 12 horas para, después de varios lavados, ser esterilizada a 150° C en autoclave durante 1 hora y almacenada estéril en alcohol de 70° <sup>1</sup>.

En 1995, Kim y Tseng publicaron los primeros trabajos sobre membrana amniótica criopreservada a – 80° C, conservada en una solución compuesta por DMEM y glicerol a concentraciones de 1:1 <sup>7</sup>. Posteriormente, Tsubota *et ál.* emplearon como crioprotector el dimetilsulfóxido (DMSO) <sup>12</sup>. La temperatura de conservación fue en estos casos de – 80° C. También se ha descrito la conservación en nitrógeno líquido, es decir, temperaturas que alcanzan los – 196° C <sup>55</sup>.

Al mismo tiempo que se aplicaban al tejido métodos de conservación basados en la disminución de temperatura, se desarrollaron formulaciones de membrana amniótica deshidratada por distintos mecanismos. En 1981, Rao y Chandrasekharan utilizaron membrana amniótica deshidratada a temperatura ambiente, y posteriormente esterilizada con radiación gamma, sobre lesiones cutáneas, en su mayor parte secundarias a quemaduras <sup>179</sup>. En 1983, Burgos y Sergeant comunican el uso de membrana amniótica humana liofilizada y esterilizada con radiación en la reconstrucción quirúrgica del pabellón auditivo <sup>111</sup>. También se ha empleado membrana amniótica liofilizada en Oftalmología <sup>180-182</sup> y existen comercializadas preparaciones del tejido deshidratado para uso oftalmológico.

También puede emplearse el tejido fresco, sin ser sometido a ningún proceso especial de conservación<sup>40-44</sup>. Sin embargo, su uso comporta más riesgos sin demostrar ventajas clínicas.

En la actualidad, existen dos grandes grupos de métodos de conservación para la membrana amniótica: los basados en la disminución de la temperatura y los basados en la deshidratación del tejido.

## 8.1 Conservación por frío:

La conservación por frío es uno de los métodos más antiguos que se conoce. El descenso de temperatura conduce a un enlentecimiento progresivo de las reacciones químicas. A mayor descenso de temperatura, mayor enlentecimiento, por lo que el tiempo de conservación máximo para un material va a depender de la temperatura a la que se conserve.

**8.1.1 Membrana amniótica no preservada:** En los trabajos publicados sobre el empleo de membrana amniótica no preservada, el tejido es en realidad conservado hasta su uso a bajas temperaturas, en condiciones de *hipotermia*. Algunos autores mantienen la membrana amniótica en suero salino, con o sin antibióticos en dilución, a 4° C<sup>40-44</sup>. También se ha empleado como líquido de conservación una solución hipercalcémica con condroitín sulfato al 2,5%, usada para la conservación de córneas (CPTES – solución cornea-potasio-TES), y almacenamiento a 4° C durante 12 días<sup>183</sup>.

La conservación de células y tejidos a temperaturas por encima de 0° C se basa en el hecho de que el descenso de temperatura reduce la velocidad de las reacciones químicas y así la demanda de oxígeno del tejido, retrasando los procesos que conducen a su degeneración. Habitualmente, la temperatura de conservación empleada es de 4° C.

La hipotermia es la técnica empleada para la *conservación de órganos* desde su extracción hasta el momento del trasplante. En este caso, el mantenimiento de la viabilidad celular es imprescindible, así que

temperaturas inferiores, aunque conseguirían un mayor tiempo de conservación, provocarían la muerte celular por la formación de cristales de hielo <sup>184-186</sup>. El uso de crioprotectores, sustancias que protegen el material biológico del daño por frío, no es aplicable en la actualidad a órganos sólidos debido a su complejidad celular y a su tamaño, que dificulta la llegada del crioprotector a todas las células <sup>187</sup>.

Los órganos se mantienen en una solución de conservación específica para minimizar el edema celular y disminuir el funcionamiento de las bombas de transporte de la membrana celular, y se cubren de hielo para mantenerlos a bajas temperaturas <sup>187-189</sup>. Ejemplos son la solución de Wisconsin, la más empleada en la actualidad para la conservación de riñones <sup>189-190</sup> e hígado <sup>188,191</sup>.

También es el método utilizado para la *conservación de córneas* hasta su trasplante <sup>192-194</sup>. El líquido de preservación más empleado en este caso es el Optisol®, desarrollado por Kaufman *et ál.* en 1991 <sup>193</sup>, que contiene condroitín sulfato, vitaminas, dextrano y precursores de adenosina. El tiempo de conservación recomendado es hasta 7 días, aunque hay estudios que han demostrado el mantenimiento de la función endotelial hasta 21 días <sup>194</sup>.

a. Características del tejido conservado en hipotermia: A temperaturas superiores a 0° C, el metabolismo se enlentece pero no se detiene, por lo que las reacciones químicas que conducen a la destrucción del tejido pueden tener lugar. Por ello, la conservación de células y tejidos a estas temperaturas por tiempos prolongados no es posible. Además, la disminución de temperatura no afecta por igual a la velocidad de las diferentes reacciones químicas, por lo que cadenas metabólicas encadenadas se pueden ver descoordinados <sup>187</sup>. También se produce hiperosmolaridad y edema celular consiguiente por la detención de la bomba de sodio-potasio <sup>187,189,195</sup> y hay cambios de fase en los lípidos de membrana que alteran la velocidad de algunas enzimas <sup>187,196</sup>. A esto hay que añadir que algunos tipos celulares sufren una apoptosis por el shock térmico causado por el rápido descenso de temperatura <sup>187,197</sup>.

La membrana amniótica no preservada es la más parecida al tejido en fresco. Su daño estructural es menor y mantiene la viabilidad del epitelio amniótico, siendo su contenido en factores de crecimiento y citoquinas mayor <sup>2,34,40,42</sup>. El coste total del método es menor y es mucho más fácil disponer de los materiales que se necesitan para su obtención y preparación.

Su principal inconveniente es que con el empleo de la membrana amniótica no preservada existe un mayor riesgo de transmisión de enfermedades. El corto período de tiempo que transcurre entre la obtención del tejido y su implante no permite repetir a la donante los tests serológicos indicados una vez transcurrido el período ventana, de 6 meses <sup>183</sup>. Se han descrito casos de transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana <sup>198</sup> y de virus hepatotropos <sup>199</sup> en transplantes de órganos procedentes de donantes seronegativos testados con los procedimientos ordinarios. El riesgo se reduce significativamente mediante una selección cuidadosa de las donantes y con la realización de pruebas de detección de ácidos nucleicos virales (PCR), que actualmente no se emplean de rutina en el rastreo en donantes de órganos y tejidos <sup>183,198-200</sup>.

Además, se han publicado casos de queratitis infecciosa tras la realización de un TMA no preservada y obtenida de cesáreas electivas en condiciones de esterilidad <sup>48</sup>.

El tiempo de conservación del tejido en estas condiciones es limitado. En el caso de la membrana amniótica, dependiendo del líquido de conservación empleado, puede ir desde 24 horas <sup>40-44</sup> a los 12 días <sup>183</sup>. Esto obliga a la obtención del tejido en el momento en que exista un receptor en el que esté indicado el TMA y además permite un escaso aprovechamiento del tejido. De una sola placenta es posible obtener tejido para usar en más de 20 pacientes. El tejido no empleado en el tiempo de conservación debe ser desechado.

**8.1.2 Membrana amniótica criopreservada:** La criopreservación es la conservación a temperaturas inferiores a 0° C. Cuando la temperatura desciende por debajo de los -140° C el metabolismo celular se detiene, ningún tipo de reacción química celular se produce, y por tanto, tampoco las que conducen a la degeneración del tejido. A partir de esta temperatura se habla de preservación efectiva.

Actualmente, la criopreservación se aplica a suspensiones celulares y tejidos. Es la técnica de elección para la conservación de espermatozoides, óvulos y embriones<sup>201-202</sup>. También se aplica en la conservación de células sanguíneas<sup>203</sup> y sangre de cordón umbilical<sup>204</sup>, y en la conservación de córneas<sup>192,205</sup>. Los estudios estructurales demuestran que tras la criopreservación se mantiene la disposición corneal en capas con escasas alteraciones estructurales pero conseguir una viabilidad endotelial suficiente para el éxito del trasplante es complicado<sup>206</sup>.

- a. Proceso de criopreservación: Este es el método más empleado para la conservación de la membrana amniótica. La temperatura de habitual es de -80° C. Algunos autores conservan la membrana amniótica en nitrógeno líquido, cuya temperatura alcanza los -196° C<sup>55</sup>.

El líquido de conservación está compuesto por una solución formada por un medio de cultivo y un crioprotector. El medio de cultivo más empleado es el DMEM, formado por aminoácidos, vitaminas, sales y glucosa, y el crioprotector más usado el glicerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>), en disolución al 1:1<sup>7,9-10,14,78,135,137,147,162-164,169,207-208</sup>. También se usa como crioprotector el DMSO<sup>8,12-13,77,120,122,130,156</sup>.

Los *crioprotectores* son compuestos químicos que reducen el daño celular durante los procesos de congelación y descongelación<sup>185-187,197</sup>. Los efectos crioprotectores de ciertos compuestos se conocen desde 1949, año en que Polge *et ál.* publicaron el descubrimiento accidental de las propiedades del glicerol, que añadido a la solución de conservación de espermatozoides animales aumentaba dramáticamente su viabilidad

tras el proceso de descongelación <sup>184,197</sup>. En la actualidad se conocen más compuestos con propiedades similares, que se diferencian unos de otros por la capacidad para penetrar en los tejidos y por su grado de toxicidad sobre células vivas. Existen dos grandes grupos: los permeables o intracelulares, compuestos de molécula pequeña capaces de penetrar en la célula, grupo al que pertenecen el DMSO y el glicerol; y los extracelulares, moléculas de mayor tamaño como la fructosa y la sacarosa que no pasan la membrana plasmática <sup>185</sup>.

Los mecanismos por los que estas moléculas ejercen una acción crioprotectora no son bien conocidos. Por un lado, tienen un *efecto osmótico*; aumentan la osmolaridad intracelular al penetrar en la célula y así disminuyen el punto de congelación y la probabilidad de formación de hielo intracelular. Además, al entrar en la disolución un nuevo compuesto, la concentración de electrolitos intracelulares es proporcionalmente menor y por tanto se reduce el riesgo de lisis celular <sup>187</sup>. También *disminuyen la formación de hielo* tanto intra como extracelular, ya que al encontrarse en disolución dificultan la agregación de las moléculas de agua que además bajan proporcionalmente su concentración, y aumentan la viscosidad del medio extracelular, reduciendo así la movilidad molecular y disminuyendo la formación de cristales de hielo <sup>185</sup>.

Los crioprotectores no son compuestos inocuos. Cuando se emplean debe tenerse en cuenta sus potenciales efectos dañinos:

- *Toxicidad*: Son compuestos extraños dentro de la célula y tienen un efecto tóxico cuando entran en ella <sup>186,209</sup>. Sin embargo, como a bajas temperaturas el metabolismo celular se enlentece, este efecto se ve minimizado. La mayor toxicidad se produce a temperaturas alrededor de cero y cuando se emplean altas concentraciones <sup>185</sup>.
- *Efecto osmótico*: El crioprotector se añade al medio extracelular aumentando su osmolaridad, lo que provoca un gradiente que conduce a la deshidratación celular, ya que la velocidad a la que el líquido es capaz de

salir de la célula es mucho mayor que la de la entrada de crioprotector que equilibrará ese gradiente. La deshidratación celular que se produce en este tiempo es de gran extensión y se ha comprobado que es dañina para la célula<sup>209</sup>.

*b. Características del tejido criopreservado:* La criopreservación permite la conservación de células y tejidos, manteniendo sus propiedades a largo plazo, por un tiempo imposible de calcular cuando se trata de temperaturas inferiores a  $-140^{\circ}$  C y que se puede considerar indefinido. Su principal limitación es la criopreservación de órganos sólidos, ya que conseguir una adecuada concentración de crioprotector en todas las células es muy difícil. Además, en los órganos destinados a trasplante es imprescindible mantener la viabilidad celular para no perder su función, lo que por ahora no se ha conseguido con este método de conservación<sup>209</sup>.

El material criopreservado requiere condiciones especiales de transporte que garanticen el mantenimiento de la cadena de frío. Tras su descongelación el tiempo de conservación es limitado y debe estar a bajas temperaturas.

## 8.2 Conservación por desecación: liofilización.

La liofilización es un proceso de conservación que permite almacenar materiales biológicos durante largos períodos de tiempo a temperatura ambiente. En 1890, se publica la primera referencia sobre la deshidratación de un tejido en condiciones de vacío<sup>210-211</sup>. Desde entonces hasta hoy, el proceso se ha ido perfeccionando y la liofilización se ha ido convirtiendo en el método más empleado en la industria farmacológica para la conservación de compuestos químicos, formulaciones de administración parenteral, vacunas y productos diagnósticos<sup>211</sup>. También se utiliza en la preservación de microorganismos para estudios epidemiológicos, controles de calidad de industrias y laboratorios y labores de enseñanza e investigación<sup>212</sup>, pudiendo aplicarse tanto a bacterias como hongos, parásitos y virus<sup>213</sup>. En la conservación de tejidos se ha usado en duramadre<sup>214-216</sup>, pericardio<sup>214</sup>, esclera<sup>217</sup>, hueso<sup>218</sup> y piel<sup>219</sup>.

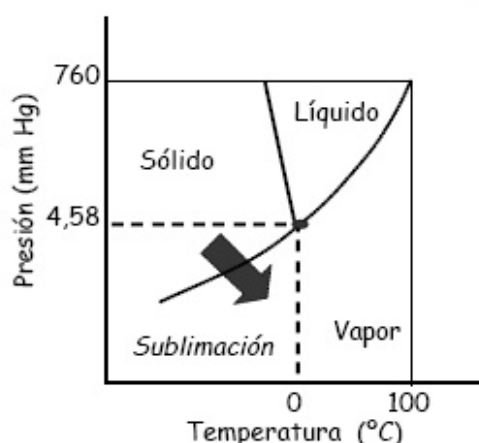
Hace años que se dispone de membrana amniótica liofilizada, aunque son otras especialidades médicas las que más utilizan este tejido así preservado. Se ha descrito su uso en pacientes con úlceras dérmicas crónicas y quemaduras <sup>49</sup> y también para la reconstrucción timpánica <sup>111</sup>, como ejemplos. Existen comercializadas varias preparaciones de membrana amniótica deshidratada para uso oftalmológico: AmbioDry<sup>2</sup>® (IOP Inc, Costa Mesa, California, Estados Unidos - [www.iopinc.com](http://www.iopinc.com)) y Acelagraft™ Amniotic Membrane Allograft (Oasis Medical, Glendora, California, Estados Unidos - [www.oasismedical.com](http://www.oasismedical.com)). En los últimos años, Nakamura *et ál.* han desarrollado membrana amniótica liofilizada, desnuda y esterilizada mediante radiación gamma <sup>181</sup>, que se ha aplicado con éxito en cirugía de la superficie ocular <sup>182</sup>.

**8.2.1 Etapas del proceso de liofilización:** El proceso consiste en la congelación del material y extracción del agua que forma hielo mediante sublimación (paso directo de estado sólido a gaseoso) en condiciones de vacío. Consta de varias etapas (Figura 6):

- a. Congelación previa: El tejido debe ser congelado para así separar los solventes del soluto. Es decir, el agua pasa a formar cristales de hielo y los solutos quedan en el espacio entre ellos. El tiempo y la temperatura de congelación a aplicar dependen de las características del tejido, y deben garantizar una total congelación para una óptima liofilización <sup>210,220</sup>.
- b. Desecación primaria: En esta fase, la mayor parte del agua es extraída del tejido mediante sublimación. Para ello se aumenta progresivamente la temperatura del producto a liofilizar, en condiciones de bajas presiones (vacío). Esta fase depende fundamentalmente de dos parámetros, la temperatura y la presión, que determinan el tiempo que va a durar. El agua que está formando cristales de hielo pasa directamente a estado gaseoso a medida que la temperatura va ascendiendo y el vapor de agua resultante se acumula en el llamado *condensador*, que se encuentra a bajas temperaturas para que el vapor de agua condensado se transforme

en hielo. La velocidad a la que esto tiene lugar depende de la diferencia entre las temperaturas de vapor del producto y la del condensador, ya que el vapor de agua va de la zona de más presión a la de menos presión, de ahí que el proceso se realice en condiciones de vacío <sup>221</sup>.

- c. Desecación secundaria: En esta etapa se reduce el agua residual del tejido hasta niveles incompatibles con el crecimiento biológico y las reacciones químicas. La temperatura se eleva hasta el valor máximo que el tejido pueda tolerar, lo que se determina en función de la cantidad de agua que sea necesario extraer y las características del tejido <sup>222</sup>. Finalmente, se aumenta la temperatura del condensador para eliminar el hielo acumulado.
- d. Envasado y rehidratación: El material liofilizado debe mantenerse cerrado, fuera del alcance de la humedad ambiental ya que, si ésta es superior a la suya, sufrirá un rápido deterioro. Además, el sistema de envasado debe prevenir la contaminación del producto liofilizado. La hidratación es la última fase del proceso, y de ella también dependen las características finales del producto liofilizado y los cambios que en él se producen.



**Figura 6:** Evolución del proceso de liofilización a medida que aumenta la presión y la temperatura.

**8.2.2 Características del tejido liofilizado:** La alteración que puede sufrir un tejido al ser liofilizado es consecuencia de las condiciones a las que es sometido en las distintas etapas del proceso. Durante la congelación, el daño tisular se debe fundamentalmente a la formación de cristales de hielo, como hemos visto en la sección anterior. El aumento de temperatura, la desecación y la rehidratación final puede conducir a alteraciones del volumen del tejido<sup>223</sup>.

La liofilización es capaz de conservar las principales propiedades de muchos tejidos y para su empleo no requiere más que una fase de hidratación. El producto liofilizado se puede conservar a temperatura ambiente, por lo que es de fácil almacenamiento y transporte, y no requiere disponer de infraestructuras especiales para su mantenimiento, aunque la tecnología necesaria para la liofilización de tejidos sí requiere inversiones económicas importantes y raramente está disponible.



# ***MATERIALES Y MÉTODOS***



## 1- SELECCIÓN DE LAS DONANTES:

Se utilizaron placentas procedentes de 19 donantes seleccionadas entre pacientes del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Todos los pasos seguidos para la obtención de las placentas se realizaron siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki<sup>224</sup> y la normativa legal vigente en nuestro país en materia de donación de órganos y tejidos y su uso posterior en labores de investigación<sup>45-47,176</sup>. Las donantes fueron informadas del objetivo del estudio y se requirió la firma del consentimiento informado.

### 1.1 Criterios de inclusión:

Las donantes debían cumplir todos los ***criterios de inclusión*** en el estudio, que fueron los siguientes:

- Edad comprendida entre los 18 y los 42 años.
- Estar en posesión de plenas facultades mentales.
- Seguimiento de todo el embarazo en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.
- Serología negativa para el virus de inmunodeficiencia humana, virus de hepatitis B y C y sífilis. Para confirmar esta negatividad se realizaron en cada donante los tests diagnósticos recogidos en la Tabla 1.
- Embarazo a término (37 a 42 semanas, 259 a 294 días), en ausencia de enfermedades gestacionales y sin anomalías del desarrollo placentario y/o fetal.

**Tabla 1:** Test serológicos empleados en cada donante.

DETECCIÓN DE	DETERMINACIÓN
VIH - 1, VIH – 2	Anti VIH – 1 Anti VIH - 2
Hepatitis B	HBsAg AntiHBc
Hepatitis C	Anti VHC – Ab
Sífilis	VDRL FTA-ABS TP-PA

- Obtención de la placenta tras la realización de una cesárea programada y realizada por alguna de las siguientes indicaciones: distocia por desproporción fetopélvica, presentación anómala del feto (podálica, transversa), y por la realización de cesárea en un embarazo anterior (riesgo de rotura uterina en área de cicatriz).

## 1.2 Criterios de exclusión:

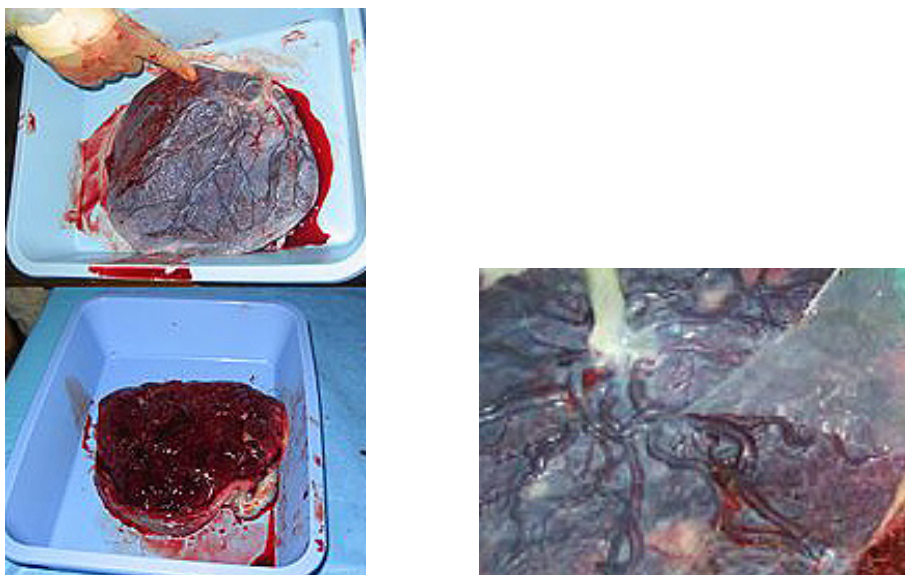
Se consideraron ***criterios de exclusión:***

- Fiebre materna.
- Líquido amniótico meconial.
- Gestaciones múltiples.
- Alteraciones del desarrollo feto-placentario y enfermedades maternas.
- Pérdida de la paciente en algún momento del seguimiento del embarazo.

## 2- OBTENCIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA:

Tras su recolección, las placentas fueron conservadas a 4° C en recipiente estéril hasta su procesamiento, que se realizó dentro de las 6 horas siguientes.

Primero, la placenta fue lavada con solución salina (cloruro sódico 0,9%) para eliminar los restos de sangre. La membrana amniótica fue separada del resto mediante disección roma y, ya en cámara de flujo laminar, fue lavada con una solución de suero fisiológico estéril suplementado con 10000 U/ml de bencilpenicilina, 50  $\mu$ /ml de estreptomicina y 2,5  $\mu$ /ml de anfotericina B. (Figura 7)



**Figura 7:** Obtención de la membrana amniótica. En la foto de la izquierda podemos ver una placenta por su cara fetal (arriba) y por su lado de implantación uterina (abajo). En la foto de la derecha vemos la facilidad con que se despega la membrana amniótica del corion mediante disección roma.

### **3- DESARROLLO DEL PROGRAMA DE LIOFILIZACIÓN:**

La liofilización de la membrana amniótica fue realizada empleando el liofilizador Virtis Genesis (SP Industries Inc, Warminster, Pensilvania, Estados Unidos), del Instituto de Ortopedia y Banco de Tejidos Músculoesqueléticos de la Universidad de Santiago de Compostela.

Para determinar el protocolo de liofilización óptimo para el tejido se siguieron criterios morfológicos; se exigió la conservación de la estructura histológica normal del tejido: epitelio, membrana basal y estroma.

Se utilizó membrana amniótica procedente de 6 placentas. Tras su extracción, el tejido fue colocado sobre papel de nitrocelulosa (Protan BA83, Schleider & Schuell, Dassel, Alemania), en fragmentos de 4 x 4 cm, con su cara estromal adherida a él. A continuación fue congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Varios fragmentos de la membrana amniótica fueron liofilizados siguiendo diferentes protocolos en los que se variaron los parámetros de tiempo, temperatura y presión de la cámara del liofilizador. Tras la liofilización, fueron conservados a temperatura ambiente en recipientes estériles, a salvo de la luz, hasta su procesamiento 1 mes después.

Para el análisis histológico, la membrana amniótica fue rehidratada en suero salino (cloruro sódico 0,9%) durante 15 minutos. Los fragmentos de membrana amniótica fueron fijados en formaldehído al 10% durante 24 horas. Después se incluyeron en parafina y se realizaron secciones de 4  $\mu\text{m}$  de grosor que se colocaron sobre un portaobjetos. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) según técnicas convencionales, y examinados mediante microscopía óptica.

Inicialmente se aplicaron 5 programas de liofilización diferentes que fueron numerados del 1 al 5. Utilizando como base el programa de los 5 primeros que mejor preservó la morfología normal de la membrana amniótica, y haciendo cambios mínimos en los parámetros de liofilización, se aplicaron 3 nuevos programas (A5, B5 y C5), de los cuales se escogió el programa para la liofilización de la membrana amniótica de los grupos de estudio.

#### **4- TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN: GRUPOS DE ESTUDIO.**

Se emplearon membranas amnióticas procedentes de placentas de 13 donantes, cada una de las cuales fue fragmentada y dividida en 4 grupos de estudio:

GRUPO 1: MEMBRANA AMNIÓTICA NO PRESERVADA (MA-NP).

GRUPO 2: MEMBRANA AMNIÓTICA LIOFILIZADA (MAL).

GRUPO 3: MEMBRANA AMNIÓTICA CRIOPRESERVADA A – 80° C (MAC).

GRUPO 4: MEMBRANA AMNIÓTICA CRIOPRESERVADA EN NITRÓGENO LÍQUIDO (MAN).

##### **4.1 Grupo 1: membrana amniótica no preservada.**

La membrana amniótica se conservó en viales estériles inmersa en suero fisiológico a 4° C, para ser procesada en las 24 horas siguientes a la obtención del tejido.

##### **4.2 Grupo 2: membrana amniótica liofilizada.**

Se cortaron fragmentos de 4 x 4 cm que se colocaron sobre papel de nitrocelulosa (Protan BA83, Schleider & Schuell, Dassel, Alemania), apoyados sobre la cara estromal de la membrana amniótica. Después se liofilizaron aplicando el protocolo determinado como óptimo para la membrana amniótica. Tras la liofilización, la membrana amniótica fue almacenada en viales estériles cerrados, protegida de la luz durante un mes. Antes de la realización de los distintos estudios, fue rehidratada en suero salino (cloruro sódico 0,9%) durante 15 minutos.

### 4.3 Grupo 3: membrana amniótica criopreservada a – 80° C:



**Figura 8:** Membrana amniótica criopreservada a – 80° C. Viales de conservación.

Fragmentos de 3 x 4 cm de membrana amniótica se colocaron sobre papel de nitrocelulosa (Protan BA83, Schleider & Schuell, Dassel, Alemania) y se conservaron en viales estériles en una solución compuesta por DMEM (DMEM, Invitrogen Corporation, Estados Unidos) y glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) en concentración 1:1.

Los viales se almacenaron a – 80° C (Ultracongelador Sanyo – 80° C, Osaka, Japón). Tras un mes de conservación, la membrana amniótica fue descongelada a temperatura ambiente, lavada con suero fisiológico y separada del papel de nitrocelulosa como paso previo a la realización de todos los tests. (Figura 8)

### 4.4 Grupo 4: membrana amniótica conservada en nitrógeno líquido (-196° C).

Fragmentos de membrana amniótica de 3 x 3 cm se conservaron en criotubos en solución compuesta por DMEM (DMEM, Invitrogen Corporation, Estados Unidos) y glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) en concentración 1:1. Los viales se congelaron a – 80° C (Ultracongelador Sanyo – 80° C, Osaka, Japón) para, a las 24 horas, ser almacenados en tanque de nitrógeno líquido durante 1 mes. Los criotubos fueron descongelados a temperatura ambiente. La membrana amniótica fue lavada con suero fisiológico antes de realizar todas las pruebas. (Figura 9).

En cada grupo, se conservaron aproximadamente 10-12 fragmentos de membrana amniótica de una misma donante. De éstos, unos se destinaron para la realización del análisis histológico, otros para el estudio inmunohistoquímico y ultraestructural, y los restantes para la cuantificación de proteínas y factores de crecimiento.



**Figura 9:** Membrana amniótica conservada en nitrógeno líquido.

## **5- EVALUACIÓN MORFOLÓGICA:**

### **5.1 Estudio histológico:**

Los fragmentos de membrana amniótica fueron fijados en formaldehído al 10% durante 24 horas. Después fueron incluidos en parafina y cortados en secciones de 4  $\mu\text{m}$  de grosor que fueron teñidas con H&S según métodos convencionales, y ácido peryódico de Schiff (PAS), y examinados mediante microscopía óptica.

La evaluación anatomopatológica fue llevada a cabo por un observador independiente.

### **5.2 Estudio inmunohistoquímico:**

Todos los estudios inmunohistoquímicos se realizaron con el sistema EnVision Plus (Dako Corporation, Glostrup, Dinamarca) que aplica una técnica automatizada de tinción (Tech-Mate). Los anticuerpos primarios empleados fueron:

- Anti-colágeno IV (M785, Dako, Glostrup, Dinamarca), en dilución 1:10. Antes de la inmunotinción, los antígenos fueron expuestos con tripsina y calor.
- Anticuerpo policlonal anti-laminina (Dako Corporation, Glostrup, Dinamarca), en dilución 1:50. Las muestras fueron pretratadas al baño maría para exponer los antígenos.

- Anticuerpo policlonal anti-fibronectina (Dako Corporation, Glostrup, Dinamarca), en dilución 1:10000. Las muestras fueron pretratadas al baño maría para exponer los antígenos.

Las secciones fueron examinadas con microscopía óptica.

### 5.3 Estudio ultraestructural:

**5.3.1 Microscopía electrónica de transmisión:** Los fragmentos de membrana amniótica fueron fijados en glutaraldehído al 2%, lavados en tampón cacodilato de sodio 0,1M (pH 7,4) durante 2 horas y postfijados en tetróxido de osmio 1%. Después de lavarlos en agua destilada durante 10 minutos, el tejido fue deshidratado en acetona en series de concentraciones crecientes e incluido en resina Spurr (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pensilvania, Estados Unidos) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras fueron cortadas en secciones de 200 nm de grosor que se tiñeron con azul de toluidina y en secciones ultrafinas de 70 – 80 nm, que fueron recogidas en rejillas de cobre y teñidas con citrato de plomo. Las secciones fueron examinadas y fotografiadas con microscopio electrónico de transmisión Zeiss 910.

**5.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM):** Las muestras de membrana amniótica fueron fijadas en glutaraldehído al 2% durante 2 horas y lavadas con suero fisiológico. Después fueron deshidratadas en series de concentraciones crecientes de acetona, secadas y cubiertas con oro para ser examinadas y fotografiadas con los microscopios electrónicos de barrido Leica 440 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y LEO-435VP (EDX, Oxford 300).

## 6- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO:

La determinación de proteínas totales y factores de crecimiento se realizó sobre extractos de membrana amniótica de cada uno de los grupos de estudio.

Fragmentos de membrana amniótica fueron homogenizadas en solución refrigerada de cloruro sódico al 0,9% (Polytron PT2100, Kinematica AG, Lucerna, Suiza). Después fueron centrifugadas a 15000 rpm durante 15 minutos a 4° C (microcentrifugadora refrigerada 5415R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Los sobrenadantes fueron almacenados a – 80° C hasta su análisis y descongelados a temperatura ambiente.

La cantidad total de proteínas se midió usando el kit comercial BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, Illinois, Estados Unidos) para cuantificación de proteínas. Este método está basado en la reducción de iones  $\text{Cu}^{++}$  a  $\text{Cu}^+$  por parte de los enlaces peptídicos de las proteínas en un medio alcalino<sup>225</sup>. El  $\text{Cu}^+$  se une a un compuesto ácido dando lugar a una reacción colorimétrica cuya absorción que es proporcional a la cantidad de proteínas de la muestra. Cada muestra fue analizada por duplicado.

Para la determinación de niveles de factores de crecimiento se utilizó una técnica de Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) cuantitativa en sándwich, que consiste en la cuantificación de la reacción colorimétrica mediada por una reacción antígeno-anticuerpo entre el factor de crecimiento detectado y su anticuerpo específico. Las muestras a estudiar se colocan en los pocillos de la placa de ELISA, que están revestidos por un anticuerpo monoclonal específico para el factor de crecimiento. Tras el lavado de los pocillos para eliminar cualquier sustancia que no haya sido fijada por el anticuerpo, se añade un anticuerpo policlonal unido a un enzima. Se vuelve a lavar y se añade una solución sustrato que provoca una reacción colorimétrica de intensidad proporcional a la cantidad de factor de crecimiento que se cuantifica comparando su densidad óptica con la de las muestras de una curva estándar. Se analizaron 7 factores de crecimiento. Para la cuantificación de HGF, EGF, KGF, bFGF, TGFalfa y TGFbeta1 se emplearon kits de ELISA Quantikine (R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de TGFbeta1 debe

realizarse en primer lugar una activación del factor de crecimiento en la muestra, ya que puede encontrarse unido al péptido asociado latente (LAP). Para ello se emplea una solución ácida que después se neutraliza. Para el estudio de niveles de NGF se utilizó el kit para ELISA NGF Emax ImmunoAssay Systems (Promega Corporation, Wisconsin, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El volumen de muestra utilizado en la cuantificación de cada factor de crecimiento contenía la misma cantidad de proteínas totales en todas las muestras, para así expresar el resultado en cantidad por peso de proteína total y hacer posible la comparación. Las muestras en las que no se detectaron niveles de proteína total se consideraron como de concentración 0 para los factores de crecimiento. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Los resultados, en medición de proteínas y factores de crecimiento, fueron leídos con un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, California, Estados Unidos) a una longitud de onda de 550 nm. La concentración de proteína total se expresó en mg/ml y la de factores de crecimiento se expresa en ng/mg de proteína total.

## **7- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Se realizó un estudio descriptivo de las variables, presentando sus valores en tablas y gráficos. Dado que las variables cuantitativas “niveles de proteínas” y “factores de crecimiento” no siguen una distribución normal, se presentaron mediante mediana (rango). Para hacerlas comparables con las de estudios previos, también se expresaron los resultados de concentración en media  $\pm$  desviación estándar. Para la representación gráfica de las variables cualitativas se emplearon gráficos de sectores. Para las variables cuantitativas se usaron gráficos de barras y diagramas de cajas (“boxplots”). En estos últimos, las cajas representan la amplitud intercuartil que contiene el 50% de los valores centrales (percentil75, percentil25), las “patillas o bigotes” (*whiskers*) son las líneas que se extienden desde la caja hasta los valores más altos y más bajos (los valores extremos), excluyendo los valores atípicos (“*outliers*”), que se representan por círculos o asteriscos. La línea que atraviesa la caja indica la situación de la mediana.

Para la comparación de la concentración de proteína total y niveles de factores de crecimiento en membrana amniótica procesada siguiendo los distintos métodos de conservación, se utilizó la prueba de Wilcoxon para datos apareados, con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Para examinar la relación entre las características de la donante (edad, tiempo de gestación) y la concentración de proteínas y factores de crecimiento en membrana amniótica no preservada, se empleó el coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ ). Para la visualización de los resultados se usaron diagramas de puntos.

Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

El análisis estadístico de los datos se ha realizó con el programa estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos).



## ***RESULTADOS***



### 1- DESARROLLO DEL PROGRAMA DE LIOFILIZACIÓN:

En una primera fase se diseñaron 5 programas de liofilización, numerados del 1 al 5. En tres de ellos, la membrana amniótica quedó totalmente desestructurada y fragmentada, siendo imposible realizar análisis posteriores sobre ella. De los programas restantes, la estructura histológica en el numerado como Programa 5 (Figura 10) muestra una monocapa de células epiteliales, con conservación de la membrana basal y estroma con escaso edema, características histológicas correspondientes a la de la membrana amniótica normal. Basándonos en los parámetros de liofilización del programa citado se diseñaron 3 nuevos programas con menores modificaciones sobre los distintos parámetros de temperatura, presión y tiempo de liofilización, nombrados como Programas A5, B5 y C5.

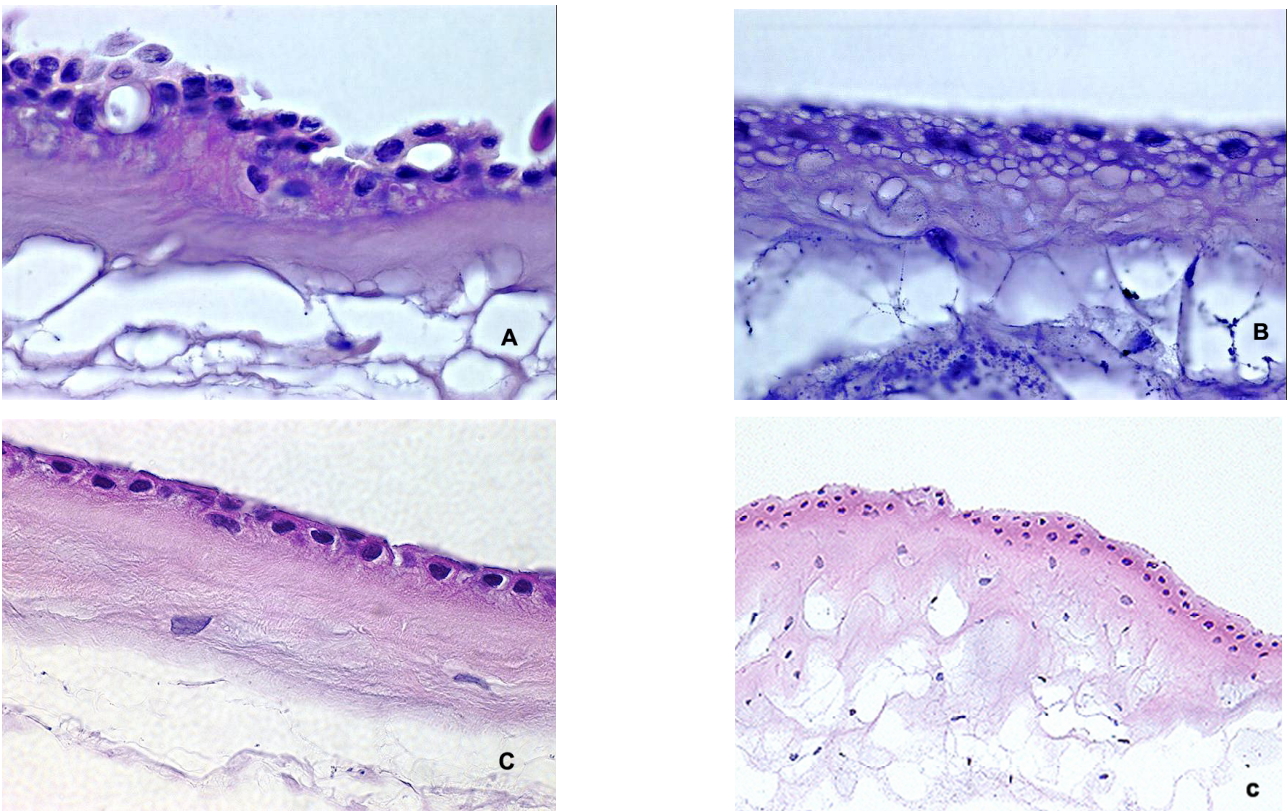


**Figura 10:** Membrana amniótica liofilizada. Desarrollo del programa de liofilización: Programa 5. Estructura histológica normal de la membrana amniótica: monocapa de células epiteliales (a), membrana basal (b) y estroma (c). H&E, 40x

Las muestras del Programa A5 mostraron una importante desestructuración del epitelio, con estratificación de las células epiteliales y edema estromal. La identificación de la membrana basal fue difícil debido a su marcado adelgazamiento y desaparición en algunas zonas (Figura 11, A).

En la membrana amniótica liofilizada con el Programa B5 se observaron numerosas vacuolas intracitoplasmáticas, con desaparición de la membrana basal e importante edema estromal (Figura 11, B).

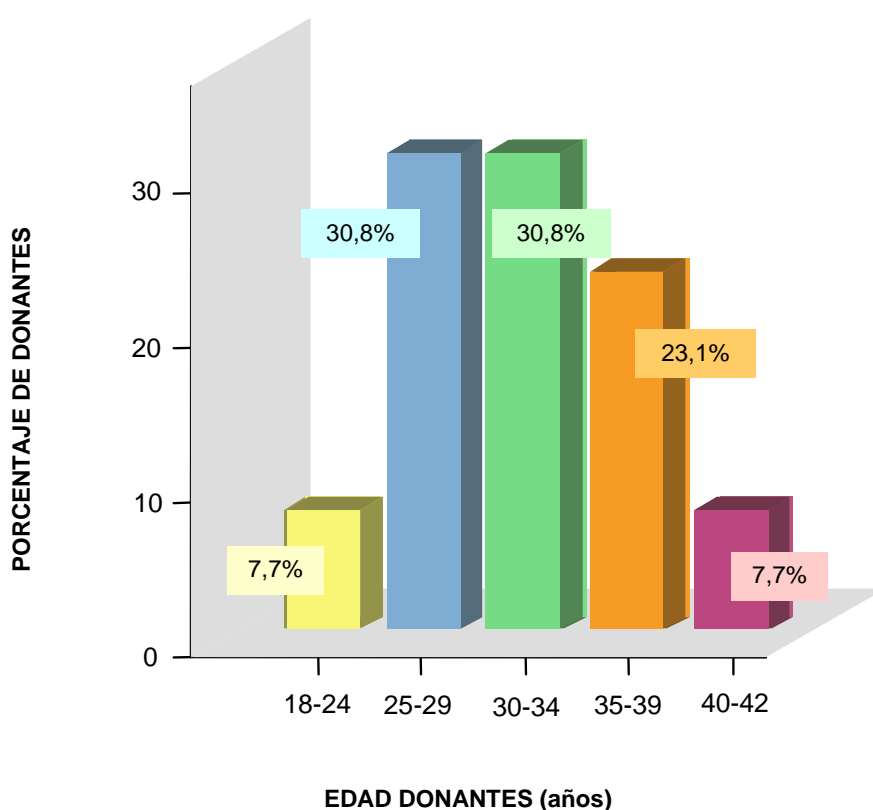
Por último, la membrana amniótica correspondiente al Programa C5 mantuvo una capa única de células epiteliales, con estratificación focal (Figura 11, c), una membrana basal conservada y el estroma subepitelial discretamente edematoso (Figura 11, C). Esta estructura es la de la membrana amniótica normal, por lo que el programa C5 fue el escogido como el idóneo para la liofilización de la membrana amniótica estudiada en el Grupo 2.



**Figura 11:** Estructura histológica de la membrana amniótica liofilizada mediante distintos programas: Programa A5: desestructuración del epitelio, pérdida de la membrana basal (A). Programa B5: se observa un edema marcado de todas las capas del tejido con vacuolización citoplasmática. Programa C5: estructura histológica normal (C), con áreas de estratificación (c). H&E, 100x

## 2- CARACTERÍSTICAS DE LAS DONANTES:

Las 13 placentas de las que se obtuvo la membrana amniótica para conformar los grupos de estudio procedían de donantes con una *edad media* de  $31,2 \pm 6,1$  años (18 a 42 años), con la mayoría de ellas entre los 25 y 34 años (62%). La distribución de las donantes por grupos de edad puede verse en la Figura 12.

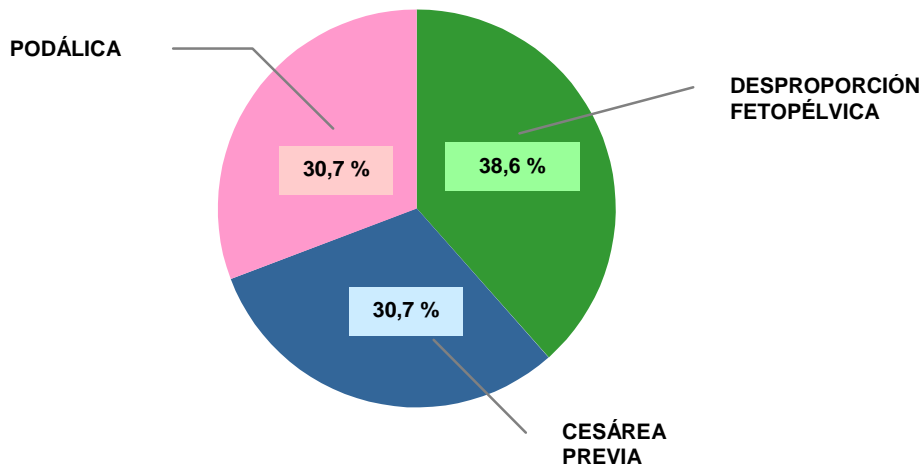


**Figura 12:** Distribución de la muestra (%) según la edad de las donantes (n = 13).

El *tiempo medio de gestación* fue de  $274 \pm 9$  días (de 259 a 274 días), es decir,  $39,3 \pm 1,3$  semanas.

La *indicación para la realización de cesárea* fue la presentación podálica en 4 donantes; en 5 se realizó por desproporción fetopélvica y en las 4 restantes por cesárea en embarazos anteriores, para evitar el riesgo de rotura uterina. En la

Figura 13 puede verse la distribución porcentual de la indicación de cesárea en las 13 donantes.



**Figura 13:** Distribución de la muestra (%) según la causa de realización de cesárea (n = 13).

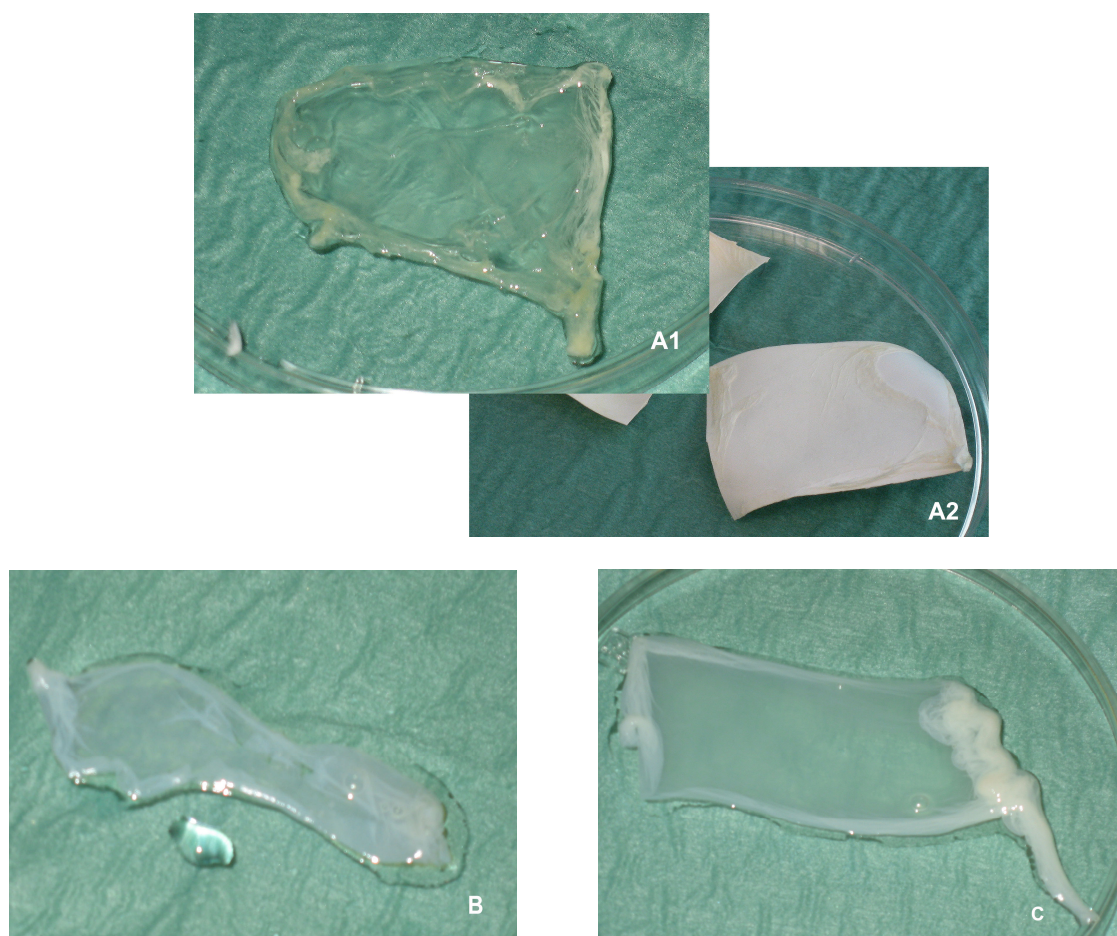
### 3- EVALUACIÓN MORFOLÓGICA EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO:

#### 3.1 Aspecto macroscópico:

La *membrana amniótica no preservada*, perteneciente al *grupo 1* de estudio, es un tejido translúcido y blanquecino, de superficie resbaladiza, y adherente por su cara estromal. Es también elástico y resistente a la rotura.

La *membrana amniótica liofilizada* sin hidratar es rígida, similar a un pergamino, y se fragmenta con facilidad (Figura 14, A2). Tras ser rehidratada, es más fina y transparente que las demás preparaciones. Su coloración es blanco-amarillenta (Figura 14, A1).

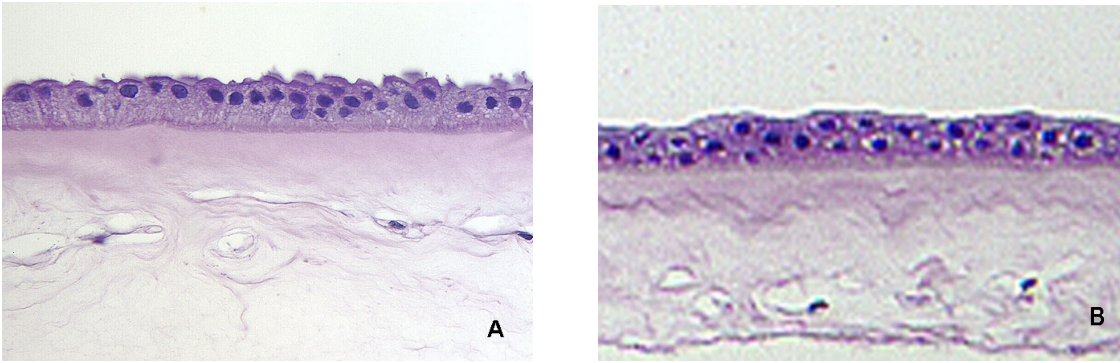
La *membrana amniótica criopreservada* a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Figura 14, B) y la conservada en nitrógeno líquido (Figura 14, C) son similares. Ambas son un tejido translúcido, de coloración blanquecina, semejantes al tejido fresco.



**Figura 14:** Aspecto macroscópico de la membrana amniótica conservada con diferentes métodos. Membrana amniótica liofilizada antes tras ser rehidratada (A1) y antes de la rehidratación, sobre papel de nitrocelulosa (A2). Membrana amniótica criopreservada (B) y conservada en nitrógeno líquido (C).

### 3.2 Estudio histológico:

Las muestras de *membrana amniótica no preservada (Grupo 1)*, muestran una monocapa de células epiteliales sobre una gruesa membrana basal, claramente delimitada en la tinción con H&E (Figura 15, A) y resaltada con la tinción de PAS. El estroma es regular, con fibroblastos aislados en las capas más profundas. En algunas zonas aparecen áreas de estratificación epitelial, con la formación de hasta 3 ó 4 capas de células (Figura 15, B).

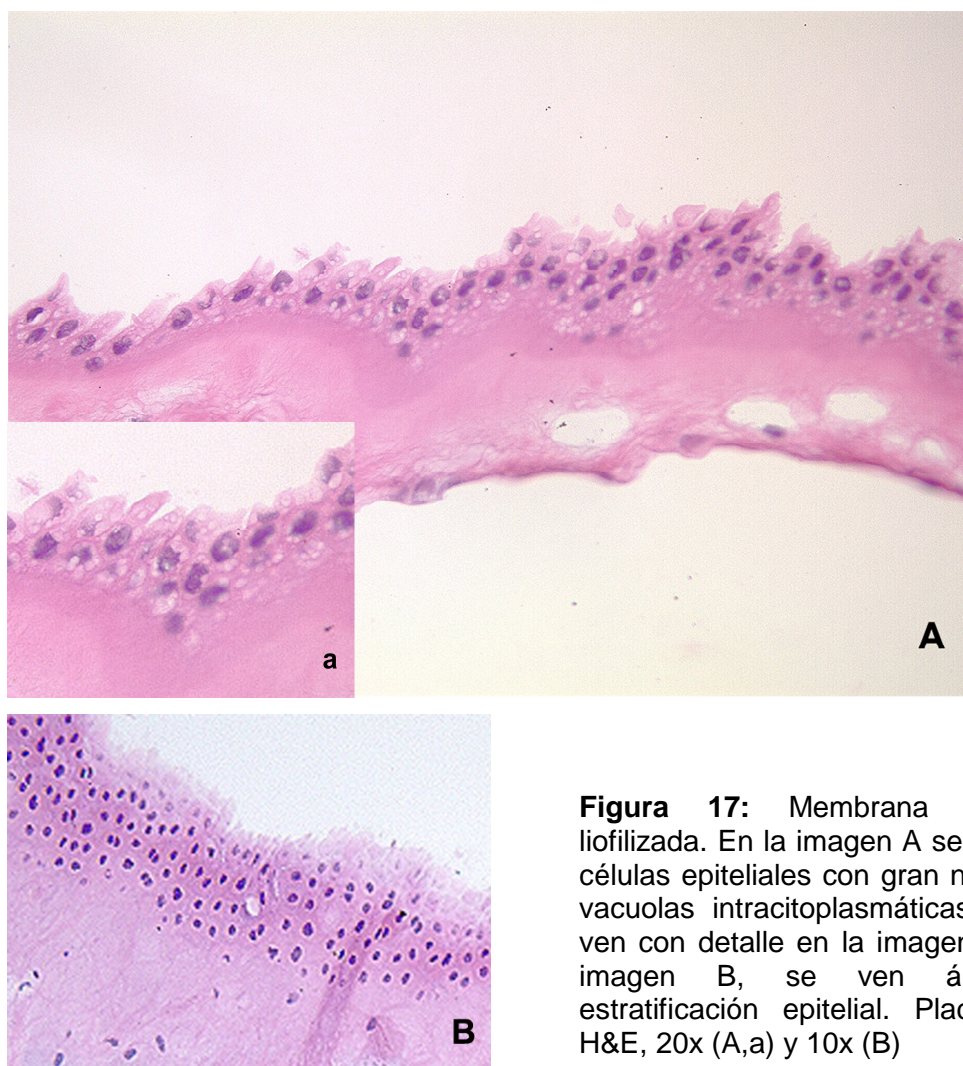


**Figura 15:** Membrana amniótica no preservada. En la imagen A se observan células epiteliales sobre una gruesa membrana basal. En la imagen B, áreas de estratificación epitelial. Placenta 12. H&E, 100x

En el *grupo 2, membrana amniótica liofilizada*, existe una mayor degeneración epitelial. Aumenta el espacio intercelular en diferentes secciones (Figura 16) y el citoplasma tiene gran número de vacuolas paranucleares (Figura 17, A y a). Aparecen numerosas áreas de estratificación, con hasta 5 ó 6 capas celulares (Figura 17, B). La membrana basal se conserva, como se puede observar con tinción de PAS (Figura 20, A).

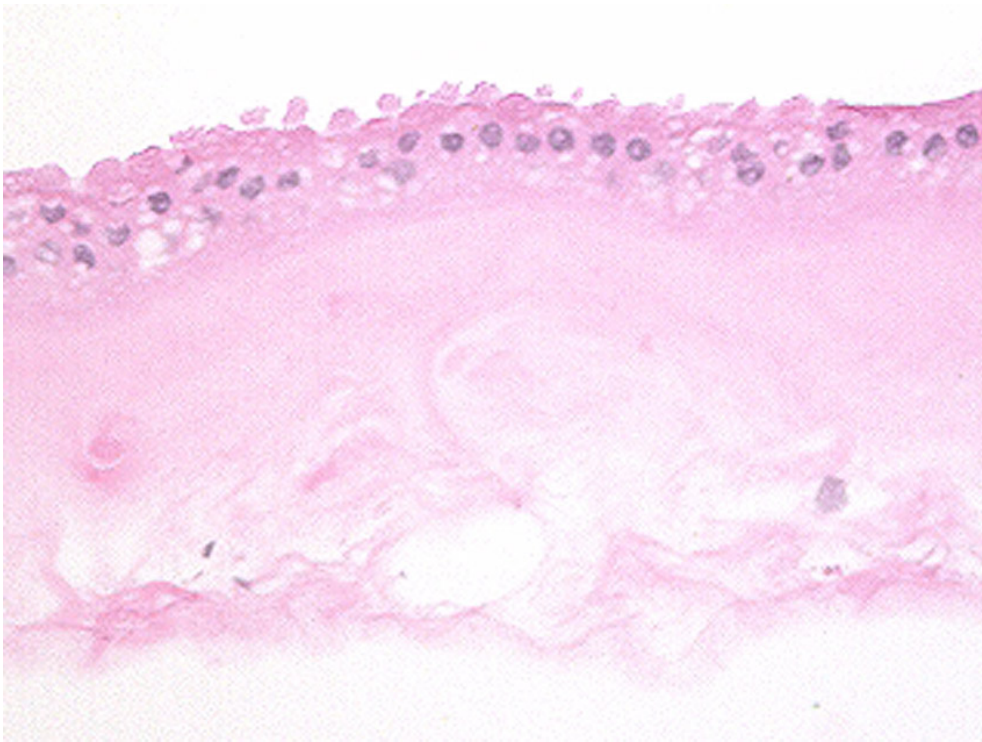


**Figura 16:** Membrana amniótica liofilizada. Se observa el aumento de los espacios intercelulares así como alteración de la morfología celular. H&E, 100x



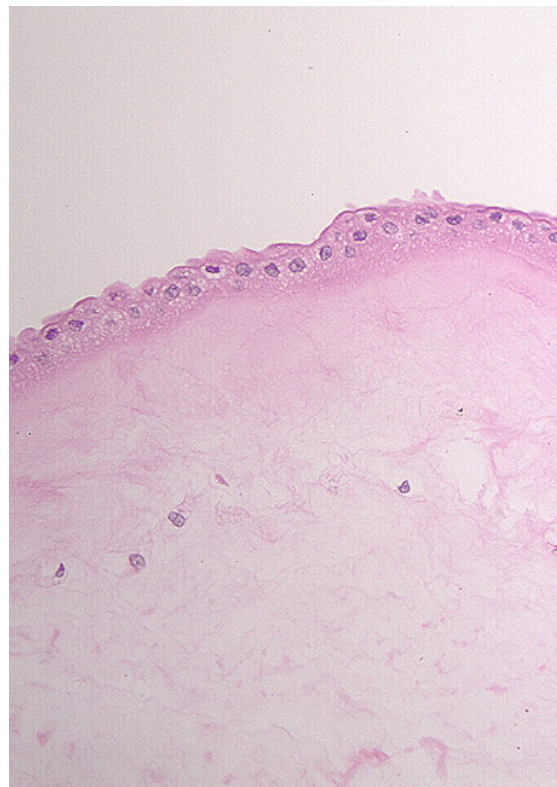
**Figura 17:** Membrana amniótica liofilizada. En la imagen A se observan células epiteliales con gran número de vacuolas intracitoplasmáticas, que se ven con detalle en la imagen a. En la imagen B, se ven áreas de estratificación epitelial. Placenta 12. H&E, 20x (A,a) y 10x (B)

En las muestras de *membrana amniótica criopreservada*, grupo 3, el epitelio amniótico mantiene una mayor conservación de su estructura con estratificación focal (Figura 18). Aparecen también vacuolas intracitoplasmáticas, pero en un número menor (Figura 18). Se conserva la membrana basal, vista con tinción de PAS (Figura 20, B).



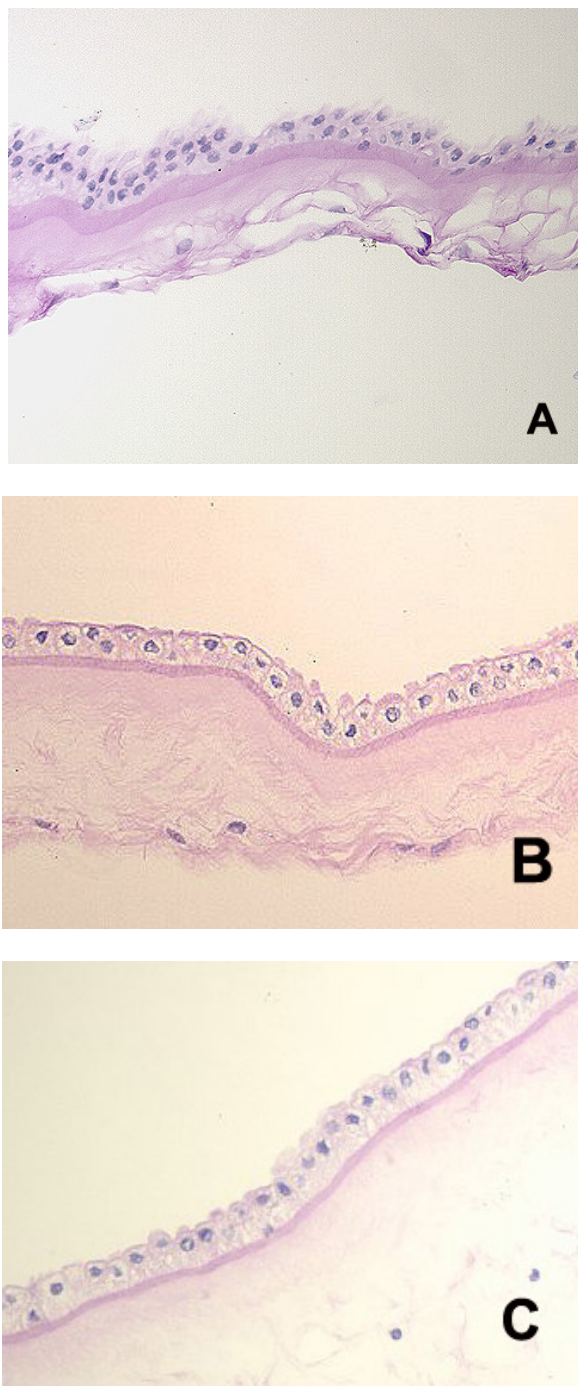
**Figura 18:** Membrana amniótica criopreservada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Estructura histológica normal de la membrana amniótica. Escasas áreas de estratificación. Placenta 12. H&E, 20x

En las muestras de *membrana amniótica conservada en nitrógeno líquido*, la apariencia histológica es muy similar a la de los grupos 1 y 3. Presenta escasas áreas de estratificación, pocas vacuolas intracitoplasmáticas y membrana basal marcada (Figura 19), como se observa en la Figura 20 (C) con tinción de PAS.



**Figura 19:** Membrana amniótica conservada en nitrógeno líquido. Monocapa de células epiteliales, gruesa membrana basal y escasas áreas de estratificación. Placenta 12. H&E, 20x

Con la tinción de PAS se puso de manifiesto la presencia de una membrana basal conservada en todas las muestras, y de grosor similar en todos los grupos (Figura 20, A, B, C).

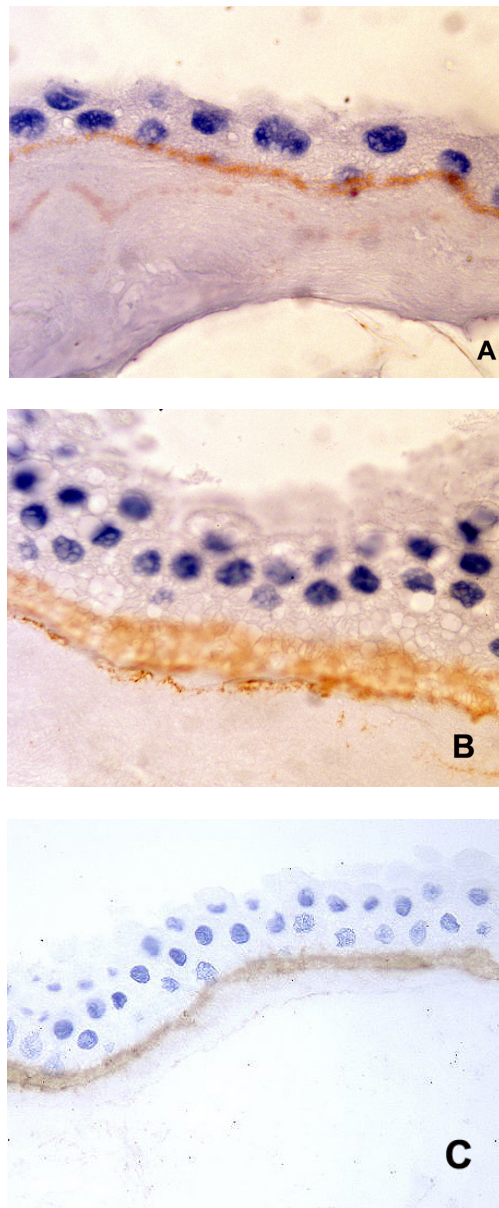


**Figura 20:** Tinción de la membrana basal con PAS: membrana amniótica liofilizada (A), criopreservada (B) y conservada en nitrógeno líquido (C). Placenta 12. PAS, 20x

### 3.3 Estudio inmunohistoquímico:

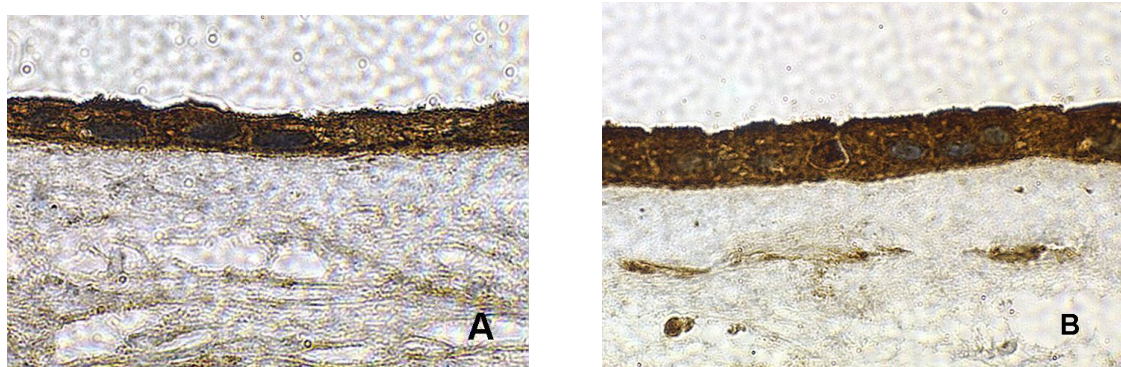
Con respecto al estudio inmunohistoquímico con los diferentes anticuerpos empleados, los resultados fueron los siguientes:

Colágeno IV: Se observó inmunorreactividad para el colágeno IV en la membrana basal de muestras de todos los grupos de estudio. En la membrana amniótica liofilizada ésta demostró un patrón de tinción de menor grosor que en la membrana amniótica criopreservada de los grupos 3 y 4 (Figura 21, imágenes A, B, C).

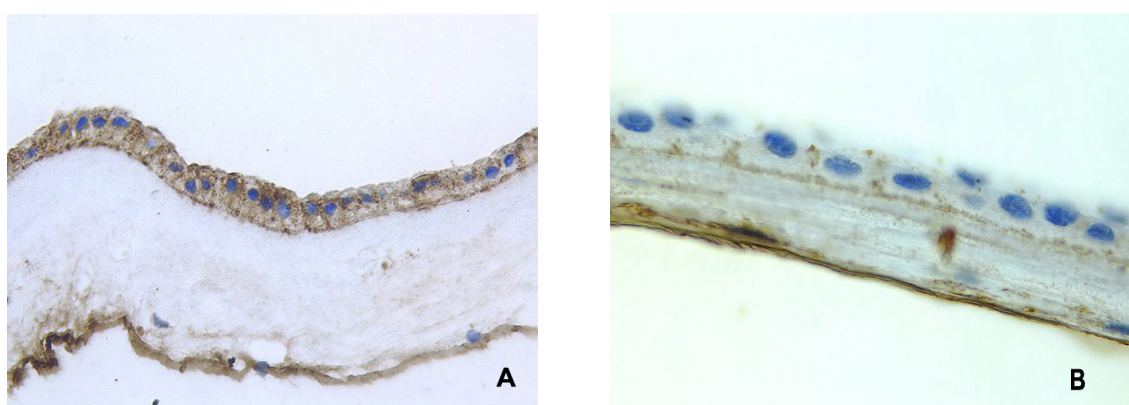


**Figura 21:** Inmunorreactividad para el colágeno IV en la membrana basal en muestras de membrana amniótica liofilizada (A), criopreservada (B) y conservada en nitrógeno líquido (C). Inmunohistoquímica para colágeno IV, 100x

Laminina y fibronectina: La *laminina* mostró una expresión difusa, fundamentalmente en células epiteliales y zona de unión a la membrana basal, con alguna zona de tinción en el estroma (Figura 22 A, B). La *fibronectina* evidenció una tinción difusa en muestras de todos los grupos, con expresión predominante en la membrana y citoplasma de las células epiteliales, incluyendo la zona de anclaje a la membrana basal (Figura 23). No se encontraron diferencias entre los distintos métodos de conservación.



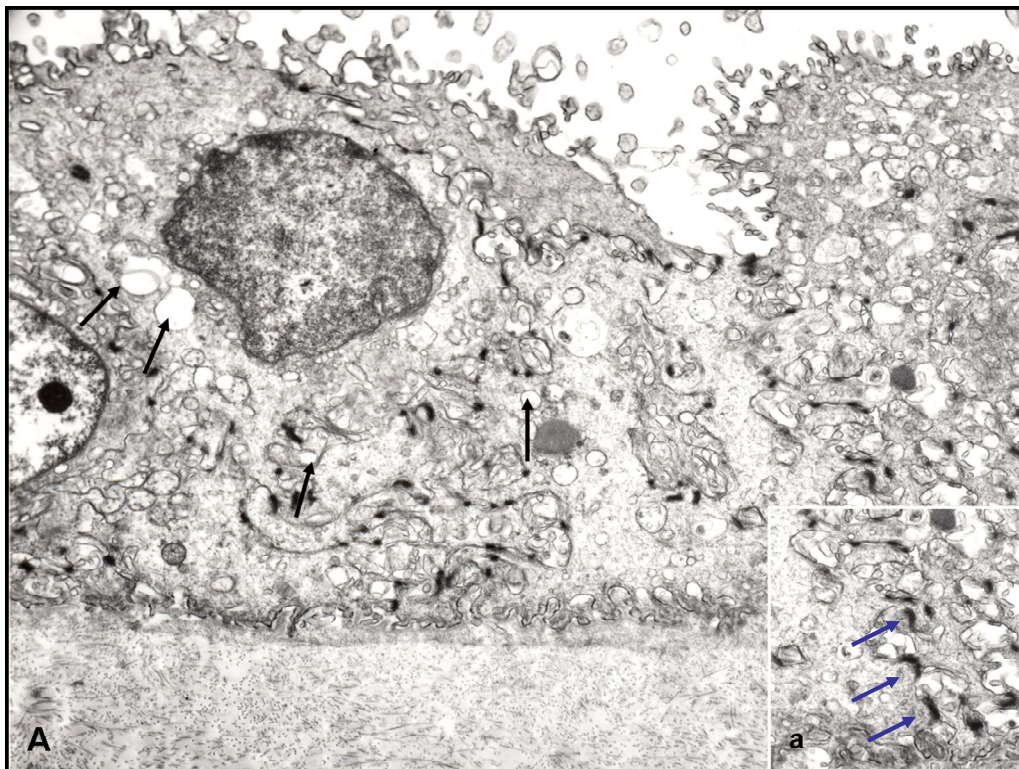
**Figura 22:** Expresión de laminina en epitelio y membrana amniótica liofilizada (A) y criopreservada (B). Inmunohistoquímica para laminina 5, 100x



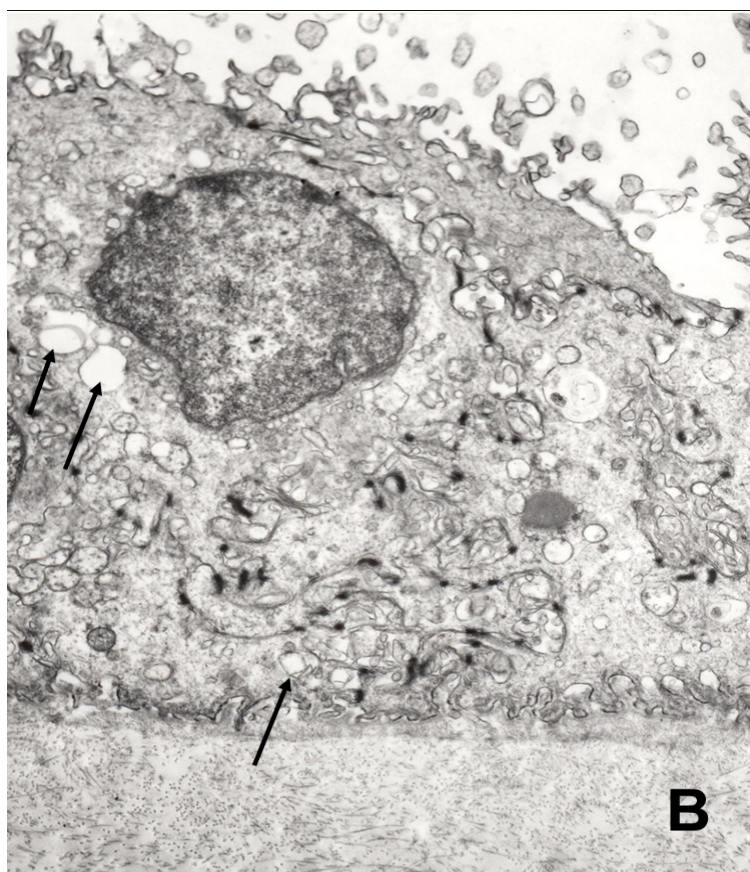
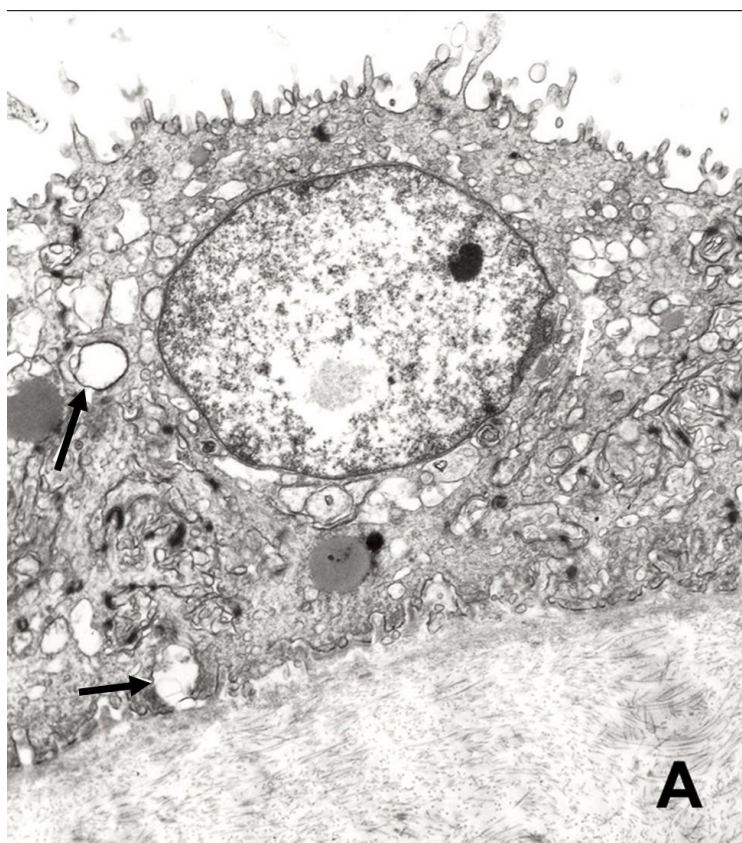
**Figura 23:** Patrón de inmunoreactividad para fibronectina: tinción de membrana y citoplasma epitelial en membrana amniótica criopreservada (A) y liofilizada (B). Inmunohistoquímica para fibronectina, 40x

### 3.4 Estudio ultraestructural:

Microscopía electrónica de transmisión: Con la microscopía electrónica de transmisión se observa más claramente la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas, en posición paranuclear, en muestras de todos los grupos de estudio, aunque en mayor cantidad en las correspondientes a membrana amniótica liofilizada (Figura 24). Se conservan las uniones intercelulares, desmosomas, presentes entre membranas celulares de todos grupos de estudio, así como los hemidesmosomas de fijación epitelial a la membrana basal. En la Figura 25, se muestran imágenes de membrana amniótica criopreservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  (A) y liofilizada (B). En esta última se observa una mayor cantidad de vacuolas paranucleares y un núcleo más irregular. En la Figura 24 se observa la preservación de los desmosomas en membrana amniótica liofilizada.

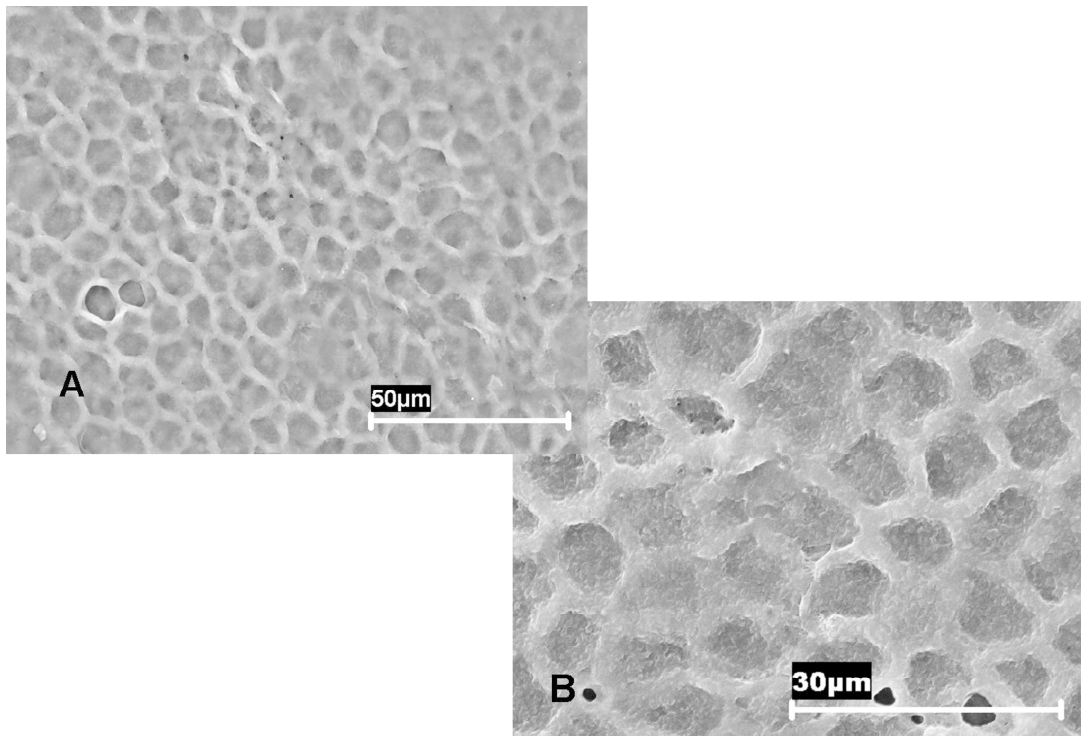


**Figura 24:** Ultraestructura de la membrana amniótica liofilizada (TEM). Abundantes vacuolas paranucleares (flechas negras, A). Desmosomas intercelulares vistos con detalle (flechas azules, a).



**Figura 25:** Membrana amniótica criopreservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  (A) y membrana amniótica liofilizada (B). Se observan vacuolas paranucleares (flechas negras) más numerosas en la membrana amniótica liofilizada (B). El núcleo aparece de forma más irregular en la membrana amniótica liofilizada (B). Las uniones intercelulares se conservan en ambas preparaciones, así como la membrana basal.

Microscopía electrónica de barrido: La microscopía electrónica de barrido muestra la superficie de las células epiteliales, de forma poligonal. Esta disposición se conserva en todos los grupos. En la membrana amniótica liofilizada se observa un aplanamiento de la superficie de las células epiteliales con pérdida de los microvilli (Figura 26, A) que a mayores aumentos aparecen condensados (Figura 26, B).



**Figura 26:** Membrana amniótica liofilizada. Estudio con SEM. Conservación de la morfología epitelial poligonal y aplanamiento de la superficie celular (A), con condensación de microvilli a mayores aumentos (a).

#### **4- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO:**

La concentración total de proteína y los niveles de factores de crecimiento se recogen en las Tablas 2, expresados en mediana (rango), y 3, expresados en media  $\pm$  desviación estándar.

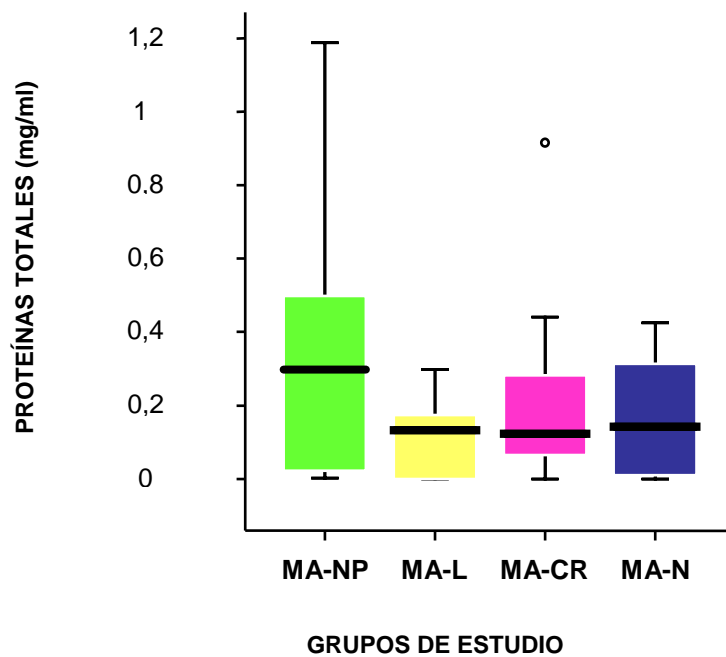
##### **4.1 Concentración de proteínas totales:**

Todas las muestras de membrana amniótica no preservada contenían niveles cuantificables de proteínas. En el grupo 2, membrana amniótica liofilizada, 5 de las 13 membranas amnióticas estudiadas (38,5%) no contenían niveles de proteínas. 12 de las 13 (92,8%) membranas amnióticas criopreservadas a  $-80^{\circ}$  C y 10 de las 13 (84,6%) de las conservadas en nitrógeno líquido tenían niveles detectables de proteínas.

La membrana amniótica procedente de la donante 1 contenía los niveles más bajos de proteínas. No fueron detectables en muestras de los grupos 2, 3 y 4 y en el grupo 1 su nivel fue el más bajo de todas las muestras estudiadas, 0,003 mg/ml.

La concentración total de proteínas fue mayor en las muestras de membrana amniótica no preservada ( $p < 0,05$  al compararla los grupos 2 y 4, membrana amniótica liofilizada y conservada en nitrógeno líquido). La membrana amniótica liofilizada contenía la menor concentración de proteínas.

En el gráfico de la Figura 27 observamos la distribución de la concentración de proteínas totales en los cuatro grupos de estudio.



**Figura 27:** Distribución de la cantidad total de proteínas en los grupos de estudio. La membrana amniótica no preservada contiene mayor cantidad de proteínas que los otros grupos de estudio. Los grupos de membrana amniótica congelada tienen una distribución similar de la concentración de proteínas.

**Tabla 2:** Concentración de proteína total y niveles de factores de crecimiento en los cuatro grupos de estudio (mediana (rango)). Significación estadística.

	<b>PROTEÍNAS TOTALES</b> (mg/ml) ♠ ♥	<b>bFGF</b> (ng/mg) ♠ ♥ ♦ ♪ ♫	<b>EGF</b> (ng/mg) ♠ ♣ ♥	<b>HGF</b> (ng/mg)	<b>KGF</b> (ng/mg) ♠ ♣ ♪	<b>NGF</b> (ng/mg) ♪	<b>TGFalfa</b> (ng/mg)	<b>TGFbeta1</b> (ng/mg)
<b>GRUPO 1 MA-NP</b>	0,30 (0-1,19)	0,92 (0-2,27)	0 (0-0,48)	7,22 (0-26,50)	0,13 (0-0,64)	0,44 (0-2,03)	0 (0-0,0001)	0,003 (0-0,59)
<b>GRUPO 2 MA-L</b>	0,13 (0-0,3)	0,11 (0-1,63)	0,24 (0-2,20)	0,10 (0-12,90)	0 (0-0,17)	0,31 (0-3,12)	0	0,10 (0-1,91)
<b>GRUPO 3 MA-C</b>	0,12 (0-0,91)	1,44 (0-2,83)	0,47 (0-1,10)	3,87 (0-10,93)	0,04 (0-0,17)	0,69 (0-2,08)	0 (0-0,0001)	0,03 (0-1,06)
<b>GRUPO 4 MA-N</b>	0,14 (0-0,42)	1,23 (0-5,37)	0,20 (0-1,07)	3 (0-12,65)	0,08 (0-0,39)	0,34 (0-1,57)	0	0 (0-2,29)

♠ Diferencia estadísticamente significativa entre grupos 1 y 2

♣ Diferencia estadísticamente significativa entre grupos 1 y 3

♥ Diferencia estadísticamente significativa entre grupos 1 y 4

♦ Diferencia estadísticamente significativa entre grupos 2 y 3

♪ Diferencia estadísticamente significativa entre grupos 2 y 4

♫ Diferencia estadísticamente significativa entre grupos 3 y 4

**Tabla 3:** Concentración de proteína total y niveles de factores de crecimiento en los cuatro grupos de estudio (media  $\pm$  desviación estándar).

	<b>PROTEÍNAS TOTALES</b> (mg/ml) ♠♥	<b>bFGF</b> (ng/mg) ♠♥♦♫♬	<b>EGF</b> (ng/mg) ♠♣♥	<b>HGF</b> (ng/mg)	<b>KGF</b> (ng/mg) ♠♣♫	<b>NGF</b> (ng/mg) ♫	<b>TGFalfa</b> (ng/mg)	<b>TGFbeta1</b> (ng/mg)
<b>GRUPO 1 MA-NP</b>	0,39 $\pm$ 0,41	0,87 $\pm$ 0,81	0,09 $\pm$ 0,18	9,33 $\pm$ 10,77	0,20 $\pm$ 0,21	0,67 $\pm$ 0,68	0	0,14 $\pm$ 0,21
<b>GRUPO 2 MA-L</b>	0,11 $\pm$ 0,11	0,43 $\pm$ 0,59	0,54 $\pm$ 0,69	3,23 $\pm$ 4,38	0,04 $\pm$ 0,07	0,72 $\pm$ 0,94	0	0,37 $\pm$ 0,55
<b>GRUPO 3 MA-C</b>	0,22 $\pm$ 0,25	1,09 $\pm$ 0,98	0,47 $\pm$ 0,47	3,74 $\pm$ 3,49	0,06 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,66	0	0,19 $\pm$ 0,34
<b>GRUPO 4 MA-N</b>	0,16 $\pm$ 0,16	1,48 $\pm$ 1,76	0,27 $\pm$ 0,37	4,18 $\pm$ 4,67	0,11 $\pm$ 0,12	0,47 $\pm$ 0,54	0	0,43 $\pm$ 0,7

♠ Diferencia estadísticamente significativa entre grupos 1 y 2

♣ Diferencia estadísticamente significativa entre grupos 1 y 3

♥ Diferencia estadísticamente significativa entre grupos 1 y 4

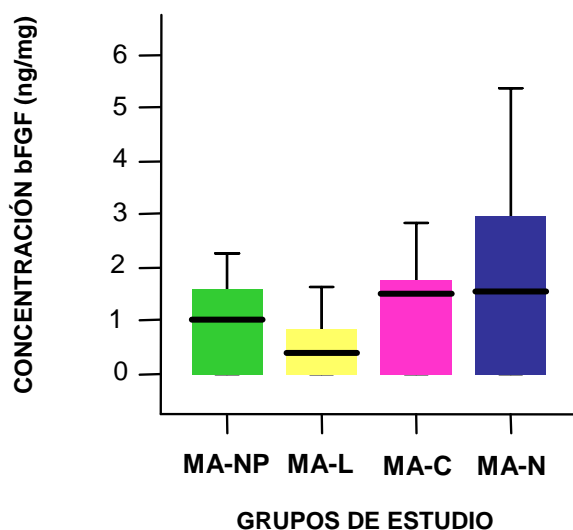
♦ Diferencia estadísticamente significativa entre grupos 2 y 3

♫ Diferencia estadísticamente significativa entre grupos 2 y 4

♬ Diferencia estadísticamente significativa entre grupos 3 y 4

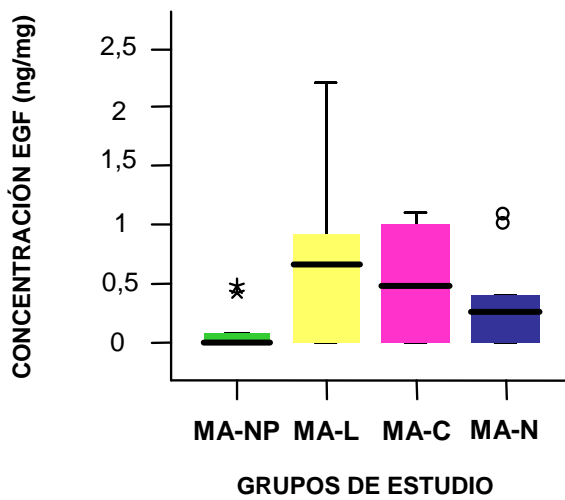
#### 4.2 Niveles de factores de crecimiento:

Las muestras de membrana amniótica conservada en nitrógeno líquido fueron las de mayor concentración de **bFGF** ( $p < 0,05$  en la comparación con todos los grupos). Las menores concentraciones del factor de crecimiento se detectaron en las muestras de membrana amniótica liofilizada ( $p < 0,05$  en la comparación con los grupos 1 y 4). La membrana amniótica criopreservada contenía mayor cantidad de bFGF que la liofilizada ( $p > 0,05$ ). (Tabla 3, Figura 28)



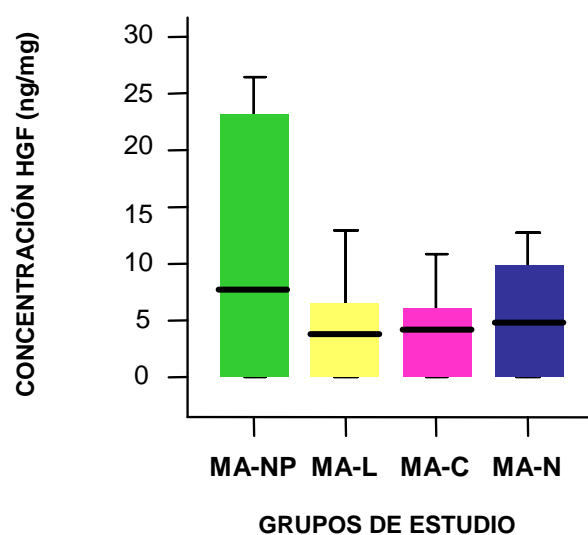
**Figura 28:** Distribución de la concentración de bFGF en los grupos de estudio. La mayor concentración del factor de crecimiento se determinó en la membrana amniótica conservada en nitrógeno líquido.

Los niveles más altos de **EGF** se determinaron en los grupos 2 y 3, membrana amniótica criopreservada y liofilizada. La concentración más baja se encontró en la membrana amniótica no preservada ( $p < 0,05$  al compararlo con los otros grupos de estudio). (Tabla 3, Figura 29)



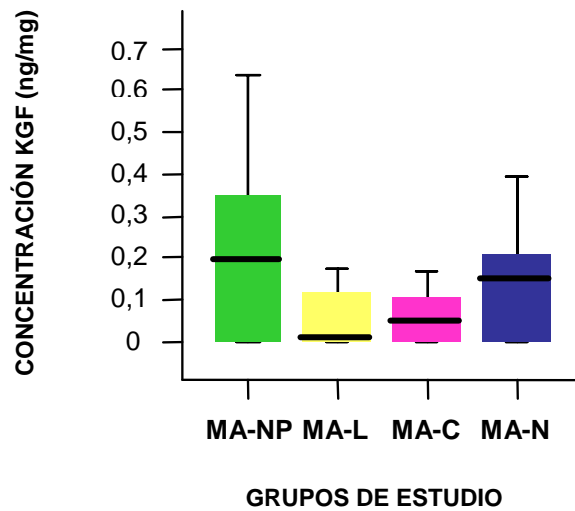
**Figura 29:** Distribución de la concentración de EGF en los grupos de estudio. La membrana amniótica no preservada contenía los niveles más bajos del factor de crecimiento.

El **HGF** fue el factor de crecimiento más abundante en los cuatro grupos de estudio. La mayor concentración se determinó en las muestras de membrana amniótica no preservada. No existieron diferencias estadísticamente significativas al comparar las concentraciones del factor de crecimiento en los cuatro grupos de estudio. (Figura 30)



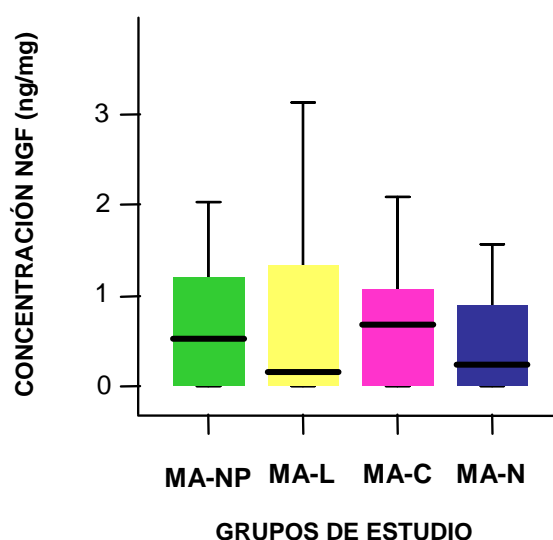
**Figura 30:** Distribución de la concentración de HGF en los grupos de estudio. La membrana amniótica no preservada contenía los niveles más altos del factor de crecimiento.

La mayor concentración de **KGF** se midió en las muestras de membrana amniótica no preservada ( $p < 0,05$  para la comparación con los restantes grupos de estudio). Al comparar la concentración del factor de crecimiento en los demás grupos de estudio no existieron diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 3, Figura 31)



**Figura 31:** Distribución de la concentración de KGF en los grupos de estudio. La membrana amniótica no preservada contenía los niveles más elevados.

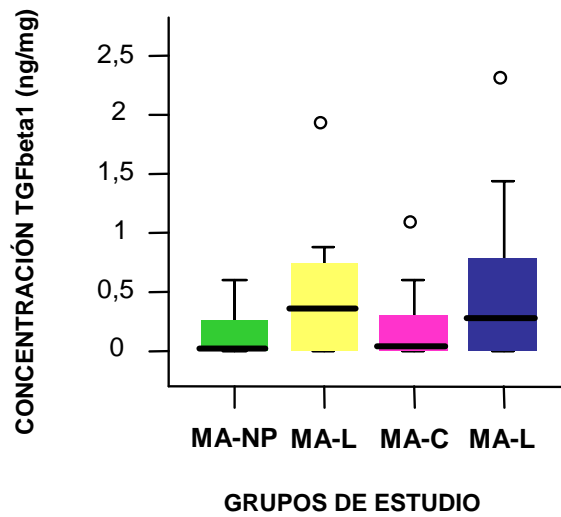
La mayor concentración media de **NGF** se detectó en la membrana amniótica liofilizada (Tabla 3), aunque en este grupo la mediana (Tabla 2) tenía un valor bajo, lo que da idea de la dispersión de esta distribución. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la comparación con otros grupos. La concentración más baja del factor de crecimiento se detectó en la membrana amniótica conservada en nitrógeno líquido ( $p < 0,05$  al compararla con el grupo de membrana amniótica criopreservada a  $-80^{\circ}\text{C}$ ). (Tabla 3, Figura 32)



**Figura 32:** Distribución de la concentración de NGF en los grupos de estudio, similar en todos ellos, con mayor dispersión de los valores en la membrana amniótica liofilizada.

Sólo se encontraron niveles detectables de **TGFalfa** en una muestra del grupo de la membrana amniótica no preservada y en otra del grupo de membrana amniótica criopreservada a  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $0,0001\text{ ng/mg}$  en ambos casos.

Al estudiar el **TGFbeta1**, los niveles más elevados se determinaron en las muestras del grupo 4, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas al comprar los cuatro grupos de estudio. (Tabla 3, Figura 33).



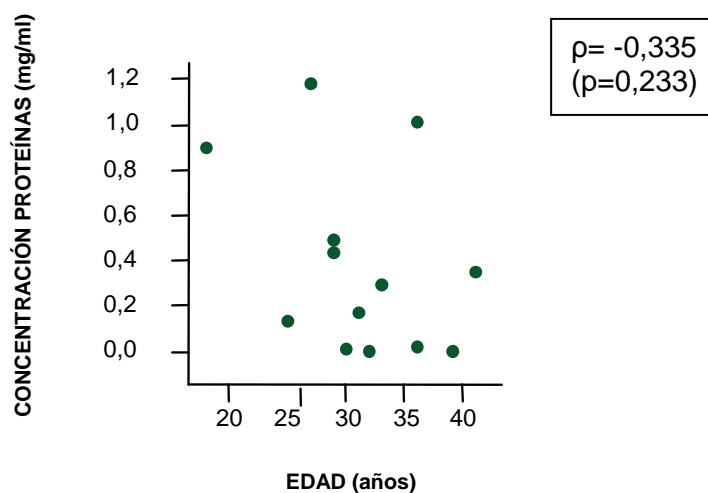
**Figura 33:** Distribución de la concentración de TGFbeta1 en los grupos de estudio. Mayor concentración en la membrana amniótica liofilizada y la conservada en nitrógeno líquido, con mayor dispersión en las mediciones en este último grupo.

## 5- INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS DONANTES EN LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO:

Se estudió la relación entre la edad de la donante y el tiempo de gestación con la concentración de proteínas totales y los niveles de factores de crecimiento en las muestras de membrana amniótica no preservada.

### 5.1 Edad de la donante:

La edad tiene una relación negativa con la **concentración de proteínas totales**, como demuestra el coeficiente de Spearman (Figura 34), aunque esta relación no alcanza significación estadística.



**Figura 34:** Relación entre la edad de la donante y la concentración total de proteínas. Coeficiente de correlación de Spearman negativo.

La concentración de **bFGF** tiende a decrecer a medida que aumenta la edad de la paciente, aunque esta relación no alcanza significación estadística ( $p=0,098$ ). En el Gráfico 1 de la Figura 35 se observa que los puntos correspondientes a la concentración del factor en las donantes de mayor edad están por debajo de la concentración de 1 ng/mg.

No existe relación entre la edad de la donante y los niveles de **EGF**. En la mayoría de las donantes, la concentración del factor de crecimiento es muy baja, independientemente de la edad de la paciente. (Gráfico 2, Figura 35)

Los niveles de **HGF** decrecen con el aumento de la edad de la donante. Esta relación no es estadísticamente significativa ( $p=0,075$ ), pero se observa una clara tendencia negativa en el Gráfico 3 de la Figura 35, en el que vemos que a medida que la edad de la donante aumenta la concentración del factor de crecimiento es menor.

La relación entre la concentración de **KGF** y la edad de la donante es negativa, aunque esta relación no alcanza significación estadística. (Gráfico 4, Figura 35)

Los niveles de **NGF** decrecen al aumentar la edad de la donante, como puede observarse en el Gráfico 5 de la Figura 35 ( $p>0,05$ ).

No parece existir relación entre la edad de la donante y la concentración de **TGFbeta1** en membrana amniótica. Como se observa en el Gráfico 6 de la Figura 35, las muestras tienen una concentración cercana a 0 para muchas donantes, sin influencia de su edad (los puntos se encuentran en la parte inferior del gráfico todo a lo largo del eje de la edad).

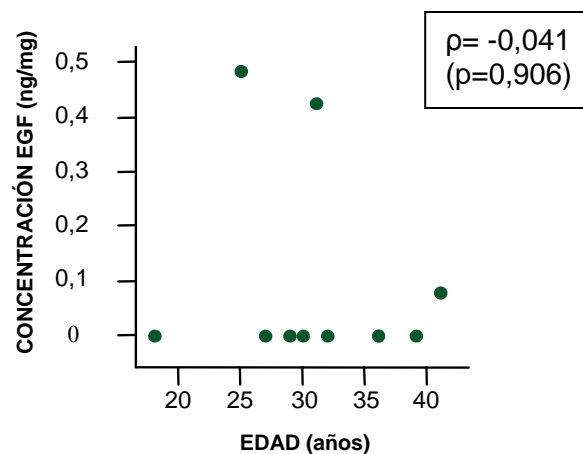
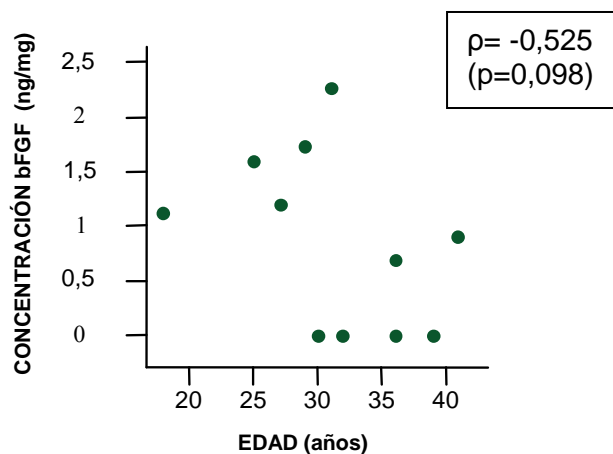


Gráfico 1

Gráfico 2

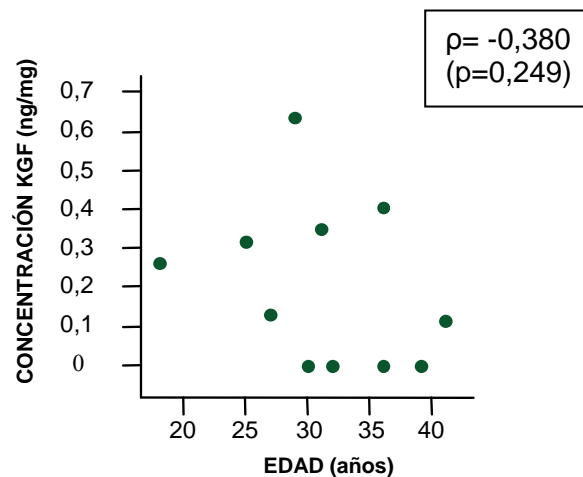
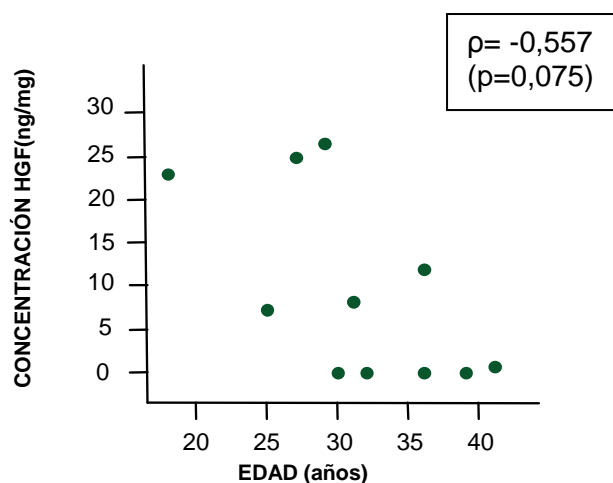


Gráfico 3

Gráfico 4

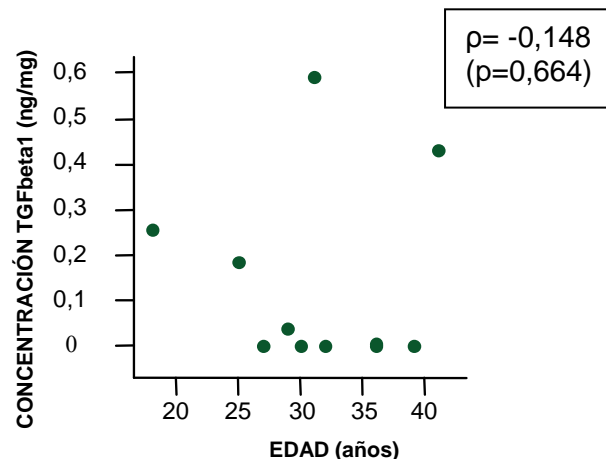
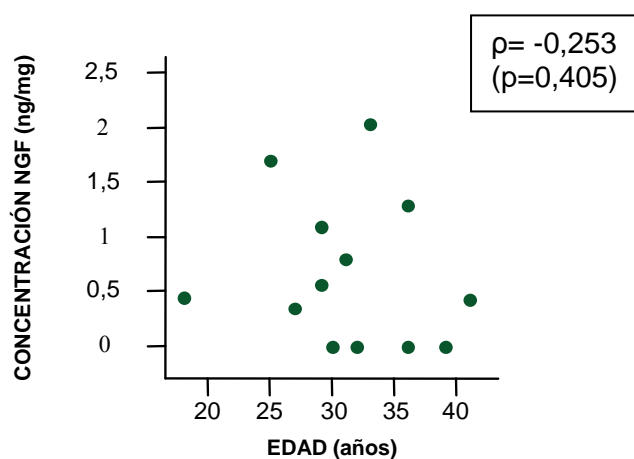


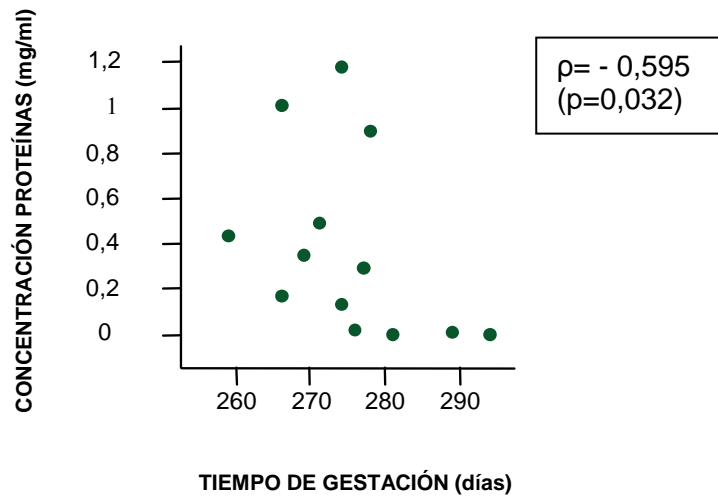
Gráfico 5

Gráfico 6

**Figura 35:** Relación entre la edad de la donante y la concentración factores de crecimiento. Coeficiente de correlación de Spearman negativo.

## 5.2 Tiempo de gestación:

La **concentración de proteínas totales** disminuye a medida que el tiempo de gestación aumenta ( $p < 0,05$ ). (Figura 36)



**Figura 36:** Relación entre la concentración de proteínas y el tiempo de gestación. Coeficiente de correlación de Spearman y significación estadística.

Las concentraciones de **bFGF** decrecen claramente con el tiempo de gestación ( $p < 0,05$ ). Como puede verse en el Gráfico 1 (Figura 37), los puntos correspondientes a concentraciones más cercanas a 0 del factor de crecimiento se encuentran por encima de los 275 días de gestación.

La concentración de **EGF** no está en relación con el tiempo de gestación. Los niveles del factor son en la mayoría de las muestras muy bajos, sin relación con tiempo de gestación correspondiente. (Gráficos 2, Figura 37)

A medida que aumenta el tiempo de gestación, la concentración de **HGF** disminuye, como puede verse en el Gráfico 3 (Figura 37) ( $p < 0,05$ ).

Existe una relación negativa entre el tiempo de gestación y la concentración de **KGF** ( $p < 0,05$ ). Como puede verse en el Gráfico 4 (Figura 37), los niveles del factor corresponden a concentraciones más bajas con el aumento del tiempo de gestación.

Los niveles de **NGF** y el tiempo de gestación tienen una relación negativa que casi alcanza significación estadística ( $p = 0,054$ ). (Gráfico 5, Figura 37)

El **TGFbeta1** decrece a medida que aumenta el tiempo de gestación ( $p < 0,05$ ). Aunque muchas donantes tienen concentraciones cercanas a 0 para casi todo el rango de tiempos de gestación, la tendencia negativa es clara. (Gráfico 6, Figura 37)

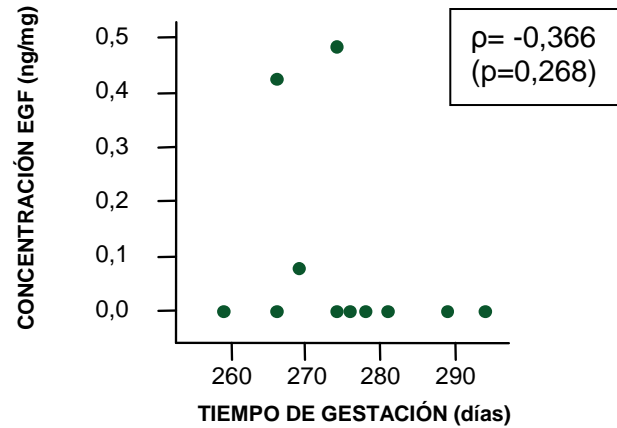
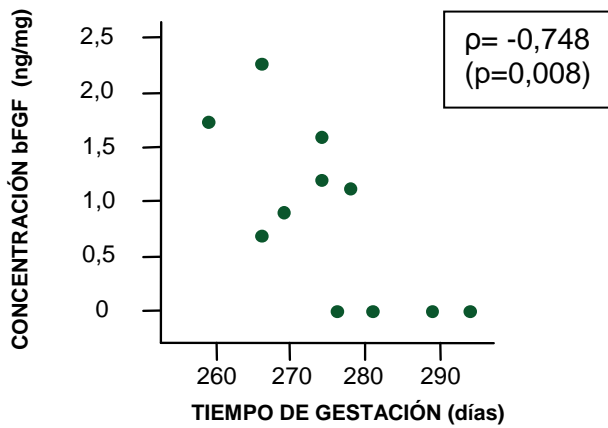


Gráfico 1

Gráfico 2

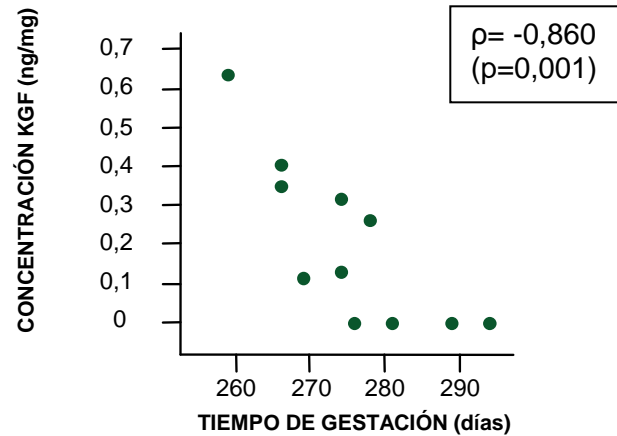
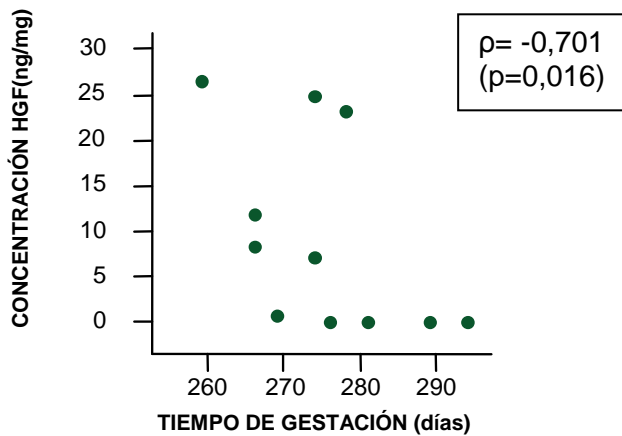


Gráfico 3

Gráfico 4

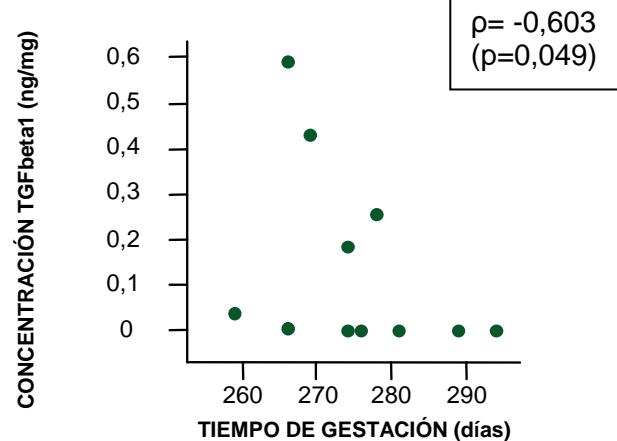
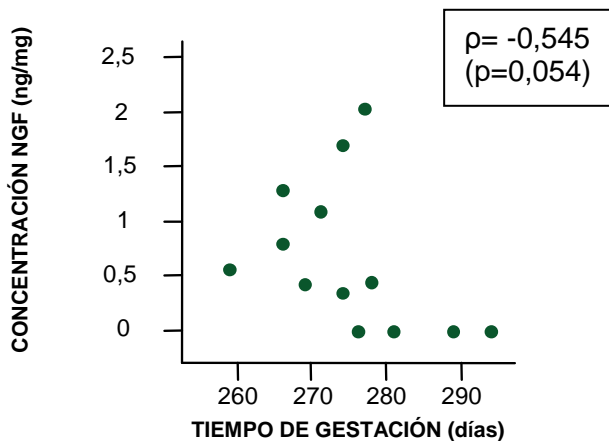


Gráfico 5

Gráfico 6

Figura 37: Relación entre el tiempo de gestación y la concentración de factores de crecimiento. Coeficiente de correlación de Spearman negativo.

## ***DISCUSIÓN***



### **1- CARACTERÍSTICAS DE LAS DONANTES: muestra.**

Los **criterios de selección de las donantes** fueron los aplicados en general para la obtención de membrana amniótica que vaya a ser empleada en cirugía de la superficie ocular, ya recogidos en la literatura <sup>2,55,177</sup>. Se incluyeron también los exigidos por la legislación vigente en España para la regulación de la obtención y uso de tejidos con fines médicos <sup>45-47,176</sup>. Se consideraron criterios de exclusión la existencia de enfermedades gestacionales como la diabetes o la eclampsia y preeclampsia, ya que pueden inducir cambios placentarios que pueden afectar a las características de la membrana amniótica <sup>2,54</sup>.

El tamaño muestral es una de las limitaciones del estudio (n=13). Aunque es cierto que los distintos procedimientos han sido utilizados sobre las mismas placentas, eliminando por tanto la variabilidad inter-donante descrita por otros autores <sup>20,56</sup>, y añadiendo mayor potencia a algunas de las pruebas estadísticas utilizadas, también es cierto que para detectar diferencias con un tamaño muestral pequeño, éstas deben ser importantes. La aplicación de todas las pruebas comparativas que se realizaron en los cuatro grupos requirieron recursos que serían equivalentes a un mayor tamaño muestral en el que los grupos de estudio estuvieran formados por diferentes donantes. Además, no existen referencias para algunos de los parámetros estudiados, por lo que, aunque justificada la hipótesis de estudio, no disponíamos de datos suficientes para un cálculo más ajustado.

### **2- PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN.**

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue determinar la influencia que tiene el método de conservación aplicado sobre las propiedades de la membrana amniótica. Hopkinson *et ál.* demostraron que la manipulación de la membrana amniótica tras su obtención influía en la concentración de factores de crecimiento, debido a que afecta a la viabilidad celular y provoca variaciones en la distribución de la matriz extracelular <sup>56</sup>. En nuestro estudio, todo el procedimiento de obtención y procesamiento de la membrana amniótica fue estandarizado hasta las fases específicas de cada método de conservación. Al conservar membrana

amniótica de una misma donante con los cuatro métodos estudiados, también controlamos la variabilidad inter-donante. De esta forma, es posible concluir que la principal fuente de variación entre las características de las membranas amnióticas estudiadas en cada grupo era el método de conservación que se había aplicado en cada caso.

Para la comparación entre diferentes métodos de conservación, se han utilizado placentas procedentes de 13 donantes. La membrana amniótica de una misma donante fue fragmentada y dividida en cuatro grupos de estudio, según el método de conservación aplicado, y en cada grupo se utilizaron fragmentos para el examen histológico, los estudios inmunohistoquímico y ultraestructural y la cuantificación de proteínas y factores de crecimiento.

Existe una cierta controversia sobre la necesidad del **mantenimiento del epitelio** en la membrana amniótica que se emplea en Oftalmología. Se pueden encontrar en el mercado varias preparaciones de membrana amniótica acelular, deshidratada (AmbioDry<sup>2</sup>®, Acellagraft™), pero los estudios clínicos disponibles sobre membrana amniótica se han realizado con el tejido íntegro en la mayoría de los casos<sup>8-10,14,77-78,130,137-138,146-147,156,159,169,208</sup>. Pocos estudios han aplicado membrana amniótica acelular en patología oftalmológica con buenos resultados<sup>180-182</sup>, aunque sí se ha demostrado que el cultivo de células de diversas estirpes sobre el tejido sin epitelio obtiene mejores resultados<sup>226-227</sup>. Existe por tanto una cierta controversia sobre la necesidad de conservar las células epiteliales en la membrana amniótica que se emplea para la reconstrucción de la superficie ocular.

La mayoría de los procesos de conservación tisular implican una pérdida de la viabilidad celular en escaso tiempo, por tanto, si las células no son viables podrían no tener influencia en la acción de la membrana amniótica. Sin embargo, consideramos que el mantenimiento del epitelio es importante ya que muchas de las citoquinas y factores de crecimiento que contiene el tejido se encuentran en mayor concentración en él en muchos casos. Koizumi *et ál.* demostraron que los niveles de bFGF, EGF, KGF, HGF, TGFbeta1 y TGFalfa son mayores en membrana amniótica con epitelio que en la desnuda, por lo que concluyeron que estos factores de crecimiento se encuentran fundamentalmente en el epitelio

amniótico<sup>37</sup>. Mediante técnicas de inmunohistoquímica, Wolf *et ál.* encontraron una intensa tinción para HGF en el citoplasma de las células del epitelio amniótico, mientras que en el estroma esta tinción era negativa, excepto en algunas células mesenquimales<sup>228</sup>.

El hecho de que una célula no sea viable no implica que los factores de crecimiento que contiene estén dañados y no sean capaces de ejercer su acción, sólo hace que sea imposible la producción de más. Así, un posible mecanismo de acción en el TMA es la liberación de los factores de crecimiento que contiene el tejido durante su reabsorción e integración en la superficie ocular<sup>2,20</sup>. Por tanto, el mantenimiento del epitelio, como una de las principales fuentes de algunos de estos factores de crecimiento, es importante.

Como hemos dicho, la mayoría de los procesos de conservación que se aplican a los tejidos provocan la pérdida de viabilidad celular, bien de forma directa, como la liofilización, o de forma progresiva, a medida que el tiempo de conservación aumenta, como la criopreservación<sup>177,229-230</sup>. La importancia del mantenimiento de la **viabilidad celular** en la membrana amniótica usada para la reconstrucción de la superficie ocular no ha sido determinada. En nuestros resultados, el tejido no preservado tiene un mayor contenido en factores de crecimiento, lo que coincide con estudios previos<sup>34</sup>. Si el tejido se mantiene viable podría ser capaz de seguir sintetizando y secretando factores de crecimiento a la superficie ocular, sin embargo, no existe ninguna evidencia de que esto ocurra así cuando se aplica la membrana amniótica fresca<sup>20</sup>.

Varios estudios han demostrado que tras un tiempo de conservación la viabilidad celular desciende e incluso no se detecta. Kruse *et ál.* encontraron que tras 1 mes de almacenamiento no existían células epiteliales viables en la membrana amniótica criopreservada en medio con glicerol al 50%, lo que confirmaron con la imposibilidad de conseguir su crecimiento en cultivos *in vitro*<sup>55</sup>. Otros autores han observado un mayor porcentaje de células viables en membrana amniótica criopreservada a distintas temperaturas. Hennerbichler *et ál.* consiguieron hasta un 18% de células amnióticas viables tras tres semanas de conservación a temperaturas inferiores a 0° C<sup>229</sup> y Rama *et ál.* un 40%<sup>177</sup>, resultados que pueden

explicarse por el hecho de que en ambos casos el crioprotector empleado fue el DMSO y no el glicerol, como en el estudio de Kruse *et ál.*

No existen estudios publicados sobre la viabilidad celular en membrana amniótica liofilizada. Además, la membrana amniótica liofilizada disponible para usos oftalmológicos ha sido sometida en muchos casos a procedimientos para eliminar el epitelio <sup>181-182</sup>. Teniendo en cuenta que el agua es un componente estructural vital de las membranas citoplasmáticas, y que por ello las células humanas tienen una escasa resistencia a la desecación, es de esperar por tanto que un tejido humano liofilizado no contenga células viables <sup>230</sup>.

En este estudio no hemos realizado un análisis de viabilidad celular en la membrana amniótica, pero en pruebas anteriores sobre membrana amniótica criopreservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  (en DMEM y glicerol) y liofilizada no encontramos células viables tras 1 mes de conservación (técnica empleada calceína-AM), por lo que consideramos que no existen diferencias entre las distintas membranas amnióticas debidas a diferencias en la viabilidad celular.

Recientemente se han comercializado varias preparaciones de membrana amniótica deshidratada y esterilizada con radiación gamma <sup>51</sup>, método empleado por Nakamura *et ál.* para la esterilización de su preparación de membrana amniótica liofilizada <sup>181</sup>. Nosotros no hemos sometido a la membrana amniótica a **procesos de esterilización** como éste, para evitar las alteraciones que produce en la estructura de los tejidos. Se ha descrito que la radiación puede producir daños como destrucción del epitelio amniótico con degeneración vacuolar y disolución de la matriz conectiva en haces de fibras sueltos <sup>50</sup>.

Los **métodos de conservación** que hemos aplicado en este estudio fueron tres: liofilización, criopreservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y conservación en nitrógeno líquido.

Actualmente, no se ha determinado cuál es la *temperatura óptima* de conservación para la membrana amniótica. La criopreservación a  $-80^{\circ}\text{C}$  es la más empleada para la preservación de que es usada en cirugía de reconstrucción de la superficie ocular. La mayoría de los estudios estructurales y de composición

bioquímica se han realizado sobre membrana amniótica criopreservada a esta temperatura <sup>7-10,12-14,77-78,120,122,125,130,135,137-138,146-147,153,156,159,162-164,169,208</sup>, por lo que está aceptado que éste es el único método de conservación que garantiza el mantenimiento de las propiedades del tejido.

Algunos autores conservan la membrana amniótica en nitrógeno líquido, cuya temperatura alcanza los  $-196^{\circ}\text{C}$  <sup>55,177</sup>. Teniendo en cuenta que en Criobiología se considera que la temperatura de congelación que se alcanza con el nitrógeno líquido es la que consigue una preservación efectiva, creímos importante estudiar también los efectos que esta temperatura producía en la membrana amniótica.

Se ha usado como *crioprotector* el glicerol, el empleado en el método de criopreservación descrito por Kim y Tseng en 1995 <sup>7</sup>. Este es el compuesto con el que tenemos una mayor experiencia y el empleado en la mayor parte de los estudios con membrana amniótica criopreservada <sup>7,9-10,14,78,134,137,147,162-164,169,208</sup>. Estudios recientes han demostrado mediante análisis ultraestructurales que la membrana amniótica conservada en DMSO sufre un mayor daño tisular que la conservada en glicerol, con pérdida de la integridad celular <sup>231</sup>.

El tercer método de conservación estudiado fue la liofilización. Aunque, como ya hemos señalado, hay varias preparaciones de membrana amniótica deshidratada y liofilizada, existen muy pocos trabajos publicados sobre sus características y su utilidad clínica <sup>180-182</sup>.

La membrana amniótica liofilizada desarrollada específicamente para uso oftalmológico, disponible en el mercado en Estados Unidos, Acelagraft <sup>TM</sup> y AmbioDry <sup>®</sup>, ha sido sometida a procedimientos para retirar el epitelio. No se dispone de tejido íntegro liofilizado, por ello hemos incluido una primera fase en este trabajo para **desarrollar un protocolo de liofilización** para membrana amniótica íntegra destinada a usos oftalmológicos. De sus probables mecanismos de acción, la función de la membrana amniótica como un trasplante de membrana basal sana sobre la que se produce la reparación tisular es uno de los que se

dispone mayores evidencias clínicas <sup>2,20,55</sup>. Por ello, consideramos que la conservación de la estructura histológica de la membrana amniótica debía ser el criterio fundamental para determinar óptimo un protocolo de liofilización. Tras realizar varios *programas de liofilización* sobre el tejido, fue seleccionado por tanto el que garantizaba el mantenimiento de su estructura normal y de su membrana basal.

Para evaluar directamente los cambios inducidos por los métodos de conservación, se incluyó para la comparación muestras de membrana amniótica no preservada.

### **3- EVALUACIÓN MORFOLÓGICA EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO:**

Varios mecanismos de acción han sido propuestos para explicar los efectos clínicos de la membrana amniótica en la patología de la superficie ocular. La mayoría de ellos han sido deducidos de su estructura y de su composición bioquímica, sin que existan evidencias directas sobre ellos <sup>2,20,55</sup>. El método de conservación que se aplique al tejido debe garantizar el mantenimiento de las propiedades responsables de esos mecanismos de acción. Por ello, la evaluación de la membrana amniótica de los distintos grupos consistió en un estudio estructural y de composición bioquímica.

Las muestras de membrana amniótica de todos los grupos de estudio preservaron la estructura normal del tejido: epitelio, membrana basal y estroma con fibroblastos aislados. En el *análisis histológico*, se observaron áreas de estratificación epitelial en todos los grupos. Estas zonas de estratificación celular pueden ser propias del tejido, y corresponder a zonas de epitelio reparativo debidas a su "actividad" durante la gestación. Sin embargo, la membrana amniótica no preservada mostró menos estratificación epitelial que los demás grupos, siendo en la membrana amniótica liofilizada en la que se observaron más zonas de estratificación. La aparición de varias capas en el epitelio amniótico de membrana preservada puede deberse al método de conservación, que podría debilitar las uniones intercelulares y provocar la formación de zonas de estratificación causadas durante el procesamiento histológico. Rama *et ál.* describieron también

estratificación epitelial en muestras de membrana amniótica conservada en nitrógeno líquido <sup>177</sup>.

También se observó una mayor degeneración epitelial, con disminución del número de células epiteliales y aumento del espacio intercelular en algunas áreas en la membrana amniótica liofilizada. Cambios parecidos fueron descritos para muestras de membrana amniótica preservada y esterilizada con radiación gamma <sup>50</sup>.

En todos los grupos de estudio se observan áreas de vacuolización del citoplasma de células epiteliales, más numerosas en las muestras de membrana amniótica liofilizada. Esto se aprecia más claramente en las muestras analizadas con el microscopio electrónico de transmisión, y ya fue descrito por von Versen-Höynck *et ál.* en membrana amniótica criopreservada y liofilizada <sup>50</sup>. La vacuolización citoplasmática podría deberse al procedimiento de conservación del tejido, tanto a los procesos de congelación-descongelación en la membrana amniótica criopreservada, como a la fase de rehidratación en la membrana amniótica liofilizada.

La *microscopía electrónica de barrido* muestra la superficie de las células poligonales, que en las muestras de membrana amniótica liofilizada aparece aplanada, con estructuras más densas que pueden corresponder a fusión de los microvilli, cambios similares a los descritos por von Versen-Höynck *et ál.* en el año 2004 <sup>50</sup>.

La conservación de la membrana basal y del estroma subepitelial son indicativos de una preservación de la arquitectura tisular, pues ambos son elementos de anclaje y de estructuración del tejido.

La continuidad de la membrana basal se mantiene en muestras de los cuatro grupos de estudio, tanto con H&E como con tinciones específicas de la membrana basal (PAS), lo que es compatible con estudios previos sobre la histología de membrana amniótica preservada por distintos métodos <sup>50,181</sup>.

El estroma amniótico se preserva tras todos los procedimientos de conservación, con una mayor desestructuración y edema en el grupo de la membrana amniótica liofilizada. El proceso de liofilización puede alterar

discretamente la disposición del colágeno estromal, que tras la fase de rehidratación parece romperse en haces de fibras sueltas.

La expresión de colágeno IV se detectó siguiendo una distribución lineal a lo largo de la membrana basal en muestras de todos los grupos de estudio, como ya se ha descrito en trabajos sobre membrana amniótica preservada mediante distintos métodos<sup>50,65,181,232</sup>. Esta disposición lineal de la expresión de colágeno IV aparece con menor grosor en las muestras de membrana amniótica liofilizada, adelgazamiento ya visto en la tinción con H&E y PAS, lo que ya se recoge en estudios anteriores<sup>50</sup>. La distribución del colágeno IV en la membrana basal de la membrana amniótica es similar a la de la conjuntiva; y la expresión de laminina y fibronectina también es similar a la de la superficie ocular<sup>65</sup>, por ello y por su estructura histológica parecida, se considera que puede ser usada como reemplazo de la conjuntiva.

Otros autores han descrito cambios de grosor en la membrana amniótica según el método de conservación aplicado<sup>50,181</sup>. Nosotros no hemos realizado estudios de grosor ni tests biomecánicos sobre el tejido. Chuck *et ál.* aplicaron pruebas biomecánicas a diferentes preparaciones de membrana amniótica, incluyendo criopreservadas y deshidratadas, demostrando que las criopreservadas presentaban una mayor elasticidad y requerían una mayor fuerza para la ruptura<sup>51</sup>.

En resumen, todos los métodos de conservación mantienen la estructura histológica normal de la membrana amniótica, pero las muestras liofilizadas presentan una mayor degeneración tisular, confirmada en estudios ultraestructurales.

#### **4- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:**

Para la cuantificación de proteínas y factores de crecimiento no hemos empleado inhibidores de proteasas en ninguna de las etapas del procesamiento del tejido y las muestras. Hopkinson *et ál.* demostraron que la concentración de

TGFbeta1 era mayor en membrana amniótica en la que se incluyeron inhibidores de proteasas en la solución de lavado, suponiendo entonces que durante la descongelación y el lavado posterior se producía una liberación de este factor de crecimiento al medio de lavado <sup>39</sup>. Sin embargo, en pocos de los estudios sobre la concentración de factores de crecimiento en membrana amniótica se ha descrito el empleo de inhibidores de proteasas <sup>37-38,231</sup>. Nuestro objetivo era analizar la influencia de los métodos de conservación estandarizados para la membrana amniótica y compararlos con otros nuevos. En los protocolos de conservación y preparación de la membrana amniótica no se incluye añadir inhibidores de proteasas a ninguna solución de lavado <sup>2,54</sup>, como describen Hopkinson *et ál*. La mayor liberación de proteasas se produce con la lisis celular y éstas provocan la desnaturalización de proteínas mediante la ruptura de los enlaces peptídicos. Como alternativa al uso de inhibidores de su acción hemos realizado la homogenización del tejido a bajas temperaturas para disminuir su actividad, como ha sido descrito previamente <sup>37</sup>, manteniendo así la acción de proteasas que pueda existir en la membrana amniótica procesada según los procedimientos habituales.

La **cuantificación de proteínas totales** en el tejido es un paso previo a la medición de niveles de factores de crecimiento mediante ELISA. No se ha publicado ningún estudio sobre los niveles de proteínas totales en membrana amniótica, por lo que no es posible comparar nuestros resultados con otros. Éste es un parámetro importante a tener en cuenta ya que la mayoría de citoquinas y factores de crecimiento que han sido relacionados con la acción de la membrana amniótica poseen una estructura proteica <sup>35,37-38</sup>. Aunque en la cuantificación de todas las proteínas de un tejido el mayor volumen corresponde a proteínas estructurales y otras como la albúmina, que suelen tener una representación similar en todos los individuos, es lógico pensar que a mayor concentración de proteína total habrá una mayor concentración de esos compuestos, si consideramos que suponen una fracción proporcional en todos los seres humanos.

La concentración de proteínas totales fue muy variable entre las distintas donantes, lo que explica el amplio rango entre muestras de diferentes placentas en

cada grupo de estudio, especialmente en la membrana amniótica no preservada. Las muestras del grupo 1 fueron las de mayor concentración de proteínas. Las muestras de membrana amniótica liofilizada tienen un menor contenido en proteínas, diferencia que es estadísticamente significativa al compararla con la concentración del tejido fresco. Incluso en un 38,5 % de las muestras no se encontraron niveles detectables de proteínas. Por tanto, según estos resultados la liofilización provoca una mayor destrucción de proteínas, o una mayor pérdida durante las fases del estudio, que los otros métodos de conservación empleados. De hecho, en la membrana amniótica preservada por cada uno de los tres métodos aplicados se produce una pérdida de proteínas respecto al tejido fresco, aunque no alcance significación estadística para los grupos 3 y 4.

Uno de los mecanismos que puede interferir en la cuantificación de proteínas y sobre todo puede afectar a su función y actividad es la desnaturalización, ya que altera su estructura y por tanto puede dificultar su detección. Se ha demostrado que tanto la liofilización como la criopreservación provocan la desnaturalización de proteínas, llevando a cambios estructurales que resultan en la pérdida de su actividad, en ocasiones de forma irreversible <sup>233-234</sup>.

Cao *et ál.* mostraron que en soluciones acuosas los procesos de congelación y descongelación, en ausencia de compuestos protectores, provocan la desnaturalización del enzima lactato deshidrogenasa, lo que resulta en una recuperación parcial de su actividad tras la descongelación <sup>234</sup>. Esta pérdida de actividad era directamente proporcional a la concentración de la proteína, lo que se explica por el hecho de que las proteínas son menos estables a concentraciones menores. La desnaturalización proteica durante la congelación se debe a los cambios físicos y químicos que se producen en el medio congelado, que conducen a cambios en el pH y en la concentración de solutos <sup>233-234</sup>. Cuando la descongelación es lenta se van produciendo los fenómenos inversos a la congelación y las proteínas sufren un nuevo estrés que puede provocar que no recuperen su conformación nativa, pero la descongelación rápida impide la fase de recristalización y atenúa estos efectos <sup>234</sup>. La adición de glicerol al medio de congelación reduce el porcentaje de desplegamiento de la estructura proteica y su desnaturalización <sup>233</sup>.

La liofilización también provoca la desnaturalización de proteínas al causar cambios en sus estructuras terciaria y cuaternaria <sup>235</sup>. Allison *et ál.* estudiaron los efectos de la deshidratación sobre la función y la estructura de la actina, proteína muscular <sup>236</sup>. En ausencia del uso de compuestos estabilizadores durante el proceso, la actina pierde su estructura y función de forma irreversible tras la rehidratación. Además, al proceso de deshidratación debe sumarse el estrés que causa la congelación del compuesto como primera fase de la liofilización, y que aumenta el daño que se produce sobre las proteínas.

Sin embargo, con el método de determinación que hemos empleado, la concentración de proteínas totales no debería verse alterada por la desnaturalización proteica, ya que cuantifica todas las proteínas presentes, sin depender de su estructura <sup>225</sup>. Este fenómeno podría explicar variaciones en la determinación de factores de crecimiento (realizadas mediante ELISA) pero no la disminución en la concentración de proteínas totales.

Hopkinson *et ál.* describieron la pérdida de factores de crecimiento durante el lavado de membrana amniótica criopreservada tras su descongelación, que se confirmaba por la detección de una concentración aumentada de dichos factores en el líquido de lavado <sup>39</sup>. Desroseirs *et ál.* demostraron un descenso del 50% en la concentración de la proteína de membrana P34H en espermatozoides criopreservados <sup>237</sup>.

Durante los procesos de congelación y descongelación se producen daños en la integridad de la membrana celular, por afectación algunos de sus lípidos y proteínas estructurales. Los daños en la membrana plasmática producen una pérdida de componentes intracelulares, entre ellos proteínas y factores de crecimiento. Estos componentes pueden ser liberados en el líquido de congelación o en los sueros de lavado, y al ser cuantificados su concentración será menor que en el tejido fresco. Los tejidos liofilizados requieren un tiempo de rehidratación, y como hemos visto en el análisis estructural, sufren un mayor daño histológico con degeneración epitelial y aumento del edema estromal, que podría traducirse en un mayor daño en las membranas plasmáticas y en las proteínas estructurales. Esto puede hacer que sean más vulnerables a la pérdida de proteínas solubles que los otros métodos, al ser liberadas en los líquidos de rehidratación y lavado.

La membrana amniótica liofilizada contiene una menor cantidad de proteínas totales, y considerando que la mayoría de los componentes que han sido relacionados con sus efectos clínicos tienen una estructura peptídica<sup>2,35,37-38</sup>, esto puede tener consecuencias en los resultados del TMA en patologías en las que se ha probado la efectividad de la membrana amniótica criopreservada.

En donantes con una cantidad de proteínas menor en la membrana amniótica, su disminución tras la conservación podría conducir a niveles muy bajos y es posible que a una menor acción por una peor “calidad” del tejido, lo que en la membrana amniótica liofilizada tendría un efecto más importante.

Estudiar todos los **factores de crecimiento**, citoquinas y moléculas que contiene la membrana amniótica y que han sido implicados en su acción era muy complicado, pero basándonos en el hecho de que la mayor parte tienen estructuras peptídicas similares consideramos que su respuesta a cualquier método de conservación debería ser parecida a la de los factores estudiados.

Escogimos 7 factores de crecimiento para la cuantificación de niveles: bFGF, EGF, HGF, KGF, NGF, TGFalfa y TGFbeta1. Todos ellos han sido determinados con anterioridad en membrana amniótica<sup>37-39,231</sup>. Koizumi *et ál.* midieron la concentración y demostraron la expresión de bFGF, EGF, HGF, KGF, TGFalfa y TGFbeta1 en membrana amniótica, con y sin epitelio, criopreservada a – 80° C durante 1 mes<sup>37</sup>. El NGF ha sido cuantificado en membrana amniótica criopreservada, demostrándose que su mayor concentración se encuentra en el estroma amniótico<sup>38</sup>. Un estudio reciente ha determinado HGF, TGFbeta, bFGF y EGF en membrana amniótica fresca y criopreservada en glicerol y en DMSO, sin encontrar diferencias reseñables entre los 3 grupos<sup>231</sup>.

La otra razón por la que escogimos estos factores de crecimiento es que entre sus acciones se incluyen algunas que podrían explicar algunas de las principales propiedades atribuidas a la membrana amniótica, como son la estimulación de la epitelización y la regulación del proceso de fibrosis<sup>81-83,92</sup>.

La concentración de factores de crecimiento que hemos obtenido es superior a la de estudios anteriores<sup>34,37-38</sup> (Tabla 3, página 94). Consideramos que la

explicación para estas diferencias está en el empleo de métodos de procesamiento y detección distintos y a la variabilidad entre donantes. Es posible que el sistema empleado para la homogeneización de la membrana amniótica produzca en nuestro caso una mayor rotura celular y por tanto una mayor liberación de moléculas a la fracción soluble, por lo que los niveles de proteínas serían mayores.

Koizumi *et ál.* obtuvieron una distribución similar en la concentración de factores de crecimiento en membrana amniótica criopreservada a la de este estudio <sup>37</sup>. En nuestros resultados, el factor de crecimiento con concentraciones más elevadas fue también el HGF, y los menores niveles correspondieron a los TGFalfa y beta1.

El HGF es el factor de crecimiento más abundante en todas las muestras de membrana amniótica que hemos estudiado, por lo que, es probable que por su alta concentración sea el factor de crecimiento que más influye en el efecto clínico de la membrana amniótica. Se ha detectado la expresión en córnea del receptor del HGF y se ha comprobado que estimula la proliferación de células epiteliales y endoteliales <sup>83</sup>. Este factor de crecimiento está también presente en la glándula lagrimal y en la película lagrimal, por lo que podría contribuir al mantenimiento de la capa epitelial <sup>83</sup>.

El bFGF también mostró niveles importantes en todos los grupos, y ha sido implicado en la regulación de la vascularización corneal <sup>238</sup>, además de ser un potente mitógeno para diversos tipos celulares <sup>81</sup>.

El NGF, con concentraciones significativas en todos los grupos, y sus receptores están presentes en la córnea, donde promueven la proliferación epitelial <sup>83</sup>. En estudios sobre modelos animales se ha demostrado que el NGF estimula la proliferación epitelial <sup>239</sup> y administrado en solución tópica acelera la curación de úlceras corneales <sup>240</sup>.

Koizumi *et ál.* encontraron que el KGF era uno de los factores de mayor concentración en la membrana amniótica <sup>37</sup>. En nuestros resultados fue uno de los factores de concentración proporcionalmente más baja en todas las muestras, aunque con niveles superiores a los obtenidos en el trabajo citado. Este factor

estimula la proliferación de los queratinocitos y podría participar en la modulación de las funciones de las células madre <sup>83</sup>.

Los niveles de casi todos los factores de crecimiento medidos son más elevados en la membrana amniótica no preservada que en los demás grupos, aunque esta diferencia sólo alcanza significación estadística para el bFGF.

Sin embargo, el EGF es más abundante en la liofilizada y presenta unos niveles muy bajos en la no preservada. Este factor de crecimiento está en epitelio corneal y lágrima, y estimula la proliferación de células epiteliales y endoteliales <sup>82-83</sup>.

El EGF es el único factor de crecimiento que presenta una mayor concentración en la membrana amniótica liofilizada que en los otros grupos de estudio, aunque la diferencia no alcanza significación estadística. Esta mayor concentración puede explicarse por el hecho de que al poseer su estructura peptídica dominios transmembrana <sup>81</sup> y ser la membrana plasmática una zona que se ha demostrado sufre daños con la congelación <sup>237</sup>, podría ser liberado en mayores cantidades a la fracción soluble. En la membrana amniótica liofilizada esta liberación debería ser mayor, ya que este método de conservación provoca un mayor daño epitelial. La menor concentración en la membrana amniótica no preservada se explicaría también porque las células del epitelio amniótico sufren una menor degeneración que en las muestras preservadas por los distintos métodos estudiados, con lo que la cantidad de EGF liberado en estas condiciones sería menor. La temperatura de congelación que se consigue con la introducción del tejido en nitrógeno líquido es considerada en criopreservación como la que garantiza una preservación efectiva, así que sería de esperar que la membrana amniótica así conservada se mantenga en condiciones similares a las de la membrana amniótica no preservada. Además, en el análisis histológico, la degeneración epitelial de las membranas amnióticas criopreservadas es menor que en la membrana amniótica liofilizada, y por tanto podrían liberar menor cantidad de EGF a la fracción soluble.

La alteración de la estructura proteica causada por los métodos de conservación <sup>233-237</sup>, que sería mayor para la liofilización como hemos explicado anteriormente, podría inducir la modificación del lugar de reconocimiento del

anticuerpo antiEGF de la técnica de ELISA empleada que podría provocar un aumento de afinidad por el anticuerpo y así haber una mayor cuantificación de niveles de factor de crecimiento. Este mecanismo ha sido propuesto para explicar el aumento de la concentración de alfa-tubulina en espermatozoides criopreservados respecto al fresco, ya que la criopreservación provoca un aumento en la fosforilación de la tirosina de la estructura proteica, lo que podría provocar un aumento de la antigenicidad de la proteína y una mayor detección por los anticuerpos empleados<sup>237</sup>.

Cuando analizamos los niveles de TGFalfa sólo detectamos concentraciones medibles en una donante del grupo 1 y otra del grupo 3, no podemos precisar por qué no obtenemos niveles medibles en las demás muestras. Este factor sólo ha sido analizado por Koizumi *et ál.*, que también encontraron niveles muy bajos, aunque detectables<sup>37</sup>.

Los resultados de Koizumi *et ál.* demostraron una importante variabilidad entre las distintas muestras, expresada en la alta desviación típica obtenida. En nuestro caso, esa variabilidad grande está presente en todos los grupos de estudio, lo que puede verse en el amplio rango obtenido en la concentración tanto de factores de crecimiento como de proteína total, y es especialmente elevada en la membrana amniótica liofilizada. Ésta se podría atribuir a las diferencias entre donantes y la influencia de los diferentes métodos de conservación, ya que el resto del procesamiento fue igual en todos los grupos. Hopkinson *et ál.*, también encontraron variaciones en la concentración de TGFbeta1 y HGF en función del proceso de obtención de la membrana amniótica, que también consideraron debida a la variabilidad inter-donante.

##### **5- INFLUENCIA DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS DONANTES EN LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO:**

El análisis de la relación entre las características de las donantes y la concentración de proteínas se ha realizado sólo sobre muestras de membrana amniótica no preservada, ya que son las que contienen los niveles más semejantes a los del tejido fresco al no haber sufrido daño por ningún método de conservación.

### Tiempo de gestación:

Nuestros resultados indican que existe una relación inversa entre el tiempo de gestación y la concentración de proteínas que contiene la membrana amniótica, relación especialmente importante para la concentración total de proteínas y los niveles de bFGF, KGF, HGF y el TGFbeta1. Las placentas fueron recogidas de donantes con embarazos a término, de 37 a 42 semanas, por tanto la diferencia en el tiempo de gestación entre las distintas donantes no es muy grande, y sin embargo, es suficiente para que esta relación inversa alcance significación estadística.

La principal función de la membrana amniótica es contribuir a la homeostasis del líquido amniótico, por tanto, es lógico pensar que su composición química pueda variar dependiendo del momento de la gestación y en función de las necesidades del feto en ese momento. Kauma *et ál.* demostraron que la expresión de HGF en la placenta a término es menor que en el segundo trimestre de embarazo, datos que son compatibles con el hecho de que la concentración de HGF en líquido amniótico de gestaciones a término es también menor <sup>241</sup>. Este mecanismo podría repetirse en los demás factores que hemos encontrado relacionados con el tiempo de gestación.

Gargiulo *et ál.* encontraron una mayor concentración del receptor de EGF en amnion de pacientes que habían iniciado el trabajo de parto que en aquellas en las que no había comenzado <sup>242</sup>. El EGF estimula la contracción uterina durante las primeras fases del trabajo de parto y la densidad de sus receptores en tejido placentario aumenta, por lo que es lógico pensar que el factor de crecimiento tendrá niveles más elevados en las últimas fases del embarazo <sup>242</sup>. Sin embargo, sus niveles no se relacionan con el tiempo de gestación.

Otras variaciones que se producen en la membrana amniótica humana en el embarazo a término, cuando se acerca el momento del parto, son un aumento en la apoptosis de las células epiteliales justo antes de iniciarse el trabajo de parto y un aumento en la concentración de IL-6 e IL-8 en el líquido amniótico <sup>243</sup>. Es decir, numerosos cambios ocurren en la placenta a término, muchos de los cuales van

dirigidos a preparar el parto, por lo que la influencia del tiempo de gestación en casi todas las determinaciones que hemos realizado es perfectamente lógica.

### **Edad de la donante:**

La **edad** de la donante no parece tener relación con la concentración de proteínas y factores de crecimiento. Sin embargo, para el HGF y el bFGF esta relación tiene una tendencia negativa que no alcanza significación estadística.

Es posible que a mayor edad ciertas proteínas se encuentren en menor concentración, pero con el tamaño muestral de nuestro estudio no ha sido posible ponerlo de manifiesto.

Los tres métodos de conservación que hemos estudiado garantizan la conservación de la estructura de la membrana amniótica y mantienen niveles detectables de factores de crecimiento en el tejido. Sin embargo, la liofilización provoca una mayor degeneración tisular y una pérdida más grande de proteínas y factores de crecimiento.

Aunque no existen estudios que determinen la influencia de la composición bioquímica de la membrana amniótica en su acción clínica, consideramos que el tejido criopreservado, a cualquiera de las temperaturas estudiadas, es el más adecuado para su utilización en cirugía de reconstrucción de la superficie ocular.

La membrana amniótica liofilizada tiene la ventaja de su fácil transporte y almacenamiento, ya que se conserva perfectamente a temperatura ambiente. Esto es especialmente útil en países en vías de desarrollo en los que la infraestructura necesaria para la criopreservación no se encuentra disponible habitualmente por su elevado coste. Además, en patologías de la superficie ocular en las que actúe fundamentalmente como soporte que proporciona una membrana basal sana para la reparación celular, como podría ser la reparación de defectos conjuntivales, el tejido liofilizado puede ser de utilidad.

Futuros estudios serán necesarios para determinar exactamente la influencia de las variaciones bioquímicas y estructurales debidas al procesamiento y a la

variabilidad inter-donante en la acción terapéutica de la membrana amniótica para el tratamiento de las enfermedades de la superficie ocular.

## ***CONCLUSIONES***



1. Se ha desarrollado un programa de liofilización capaz de preservar la estructura de la membrana amniótica.
2. Tanto la membrana amniótica liofilizada como la criopreservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  y la conservada en nitrógeno líquido, mantienen una membrana basal claramente diferenciada y un epitelio amniótico con distintos grados de degeneración.
3. La membrana amniótica liofilizada presenta una mayor degeneración epitelial, observada en un aplanamiento de su superficie y un aumento de las vacuolas paranucleares en el citoplasma de las células epiteliales.
4. La liofilización provoca una mayor pérdida de proteínas en la membrana amniótica y menores niveles de factores de crecimiento, excepto para el EGF, que tiene mayor concentración en membrana amniótica liofilizada.
5. Existe una gran variabilidad en la composición bioquímica de la membrana amniótica procedente de distintas donantes, en relación a los factores de crecimiento estudiados y a la concentración de proteínas.
6. El tiempo de gestación tiene una relación negativa con la concentración de proteínas totales y bFGF, HGF, KGF, y TGFbeta1, que disminuyen al aumentar el tiempo de gestación.
7. Las características de las donantes, la técnica de procesamiento y el método de conservación utilizado influyen de forma importante en la membrana amniótica lo que podría afectar a sus propiedades y a los resultados clínicos.
8. La membrana amniótica liofilizada tiene un menor contenido en proteínas pero mantiene la estructura histológica del tejido, por lo que es posible que sea especialmente útil en el tratamiento de patologías en las que su papel más importante sea el de servir como soporte para el crecimiento de tejido sano.



## ***BIBLIOGRAFÍA***



1. Treldford JD, Treldford – Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 134:833-845.
2. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004; 49:51-77.
3. Peris C, Menezo JL. Antecedentes de la utilización de la membrana amniótica en Oftalmología. En: Peris C, Menezo JL. *Membrana amniótica y superficie Ocular*. Valencia: Mac Line 2004; 53-58.
4. de Röth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol* 1940; 23:522-525.
5. Sorsby A, Symmons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns of second degree). *Br J Ophthalmol* 1946; 30:337-345.
6. Sorsby A, Haythorne J, Reed H. Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br J Ophthalmol* 1947; 31:409-418.
7. Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14:473-484.
8. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:399-402.
9. Lee SH, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997; 123:303-312.
10. Chen HJ, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol* 2000; 84:826-833.
11. Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SC. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997; 104:974-985.
12. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M *et ál*. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996; 122:38-52.

13. Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997; 104:2068-2076.
14. Tseng SC, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997; 124:765-774.
15. Meller D, Tseng SC. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:878-886.
16. He YG, Alizadeh H, Kinoshita K, McCulley JP. Experimental transplantation of cultured human limbal and amniotic epithelial cells onto the corneal surface. *Cornea* 1999; 18:570-579.
17. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ *et ál.* Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:800-806.
18. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000; 343:86-93.
19. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H *et ál.* Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 1999; 340:1697-1703.
20. Dua SH, Maharajan VS, Hopkinson A. Controversies and limitations of amniotic membrane in ophthalmic surgery. En: Reinhard T, Larkin F. *Corneal and external eye disease (Essentials in Ophthalmology)*. Berlín: Springer; 2005. p. 21-33.
21. Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon DR, Dowling JE. Adhesion of regenerating corneal epithelium. The role of basement membrane. *Am J Ophthalmol* 1968; 65:339-348.
22. Guo M, Grinnell F. Basement membrane and human epidermal differentiation in vitro. *J Invest Dermatol* 1989; 93:372-378.

23. Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995; 267:891-893.
24. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001; 20:408-413.
25. Kjaergaard N, Hein M, Hyttel L, Helmig RB, Schønheyder HC, Uldbjerg N *et ál*. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 94:224-229.
26. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 1991; 12:285-288.
27. Kim HS, Cho JH, Park HW, Yoon H, Kim MS, Kim SC. Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta. *J Immunol* 2002; 168:2356-2364.
28. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, Edwin S, Rathnasabapathy C, Gomez R *et ál* . Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003; 13:2 -21.
29. Shao C, Sima J, Zhang SX, Jin J, Reinach P, Wang Z *et ál*. Suppression of corneal neovascularization by PEDF release from human amniotic membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:1758-1762.
30. Tseng SC, Li DQ, 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; 179:325-335.
31. Lee SB, Li DQ, Tan DT, Meller DC, Tseng SC. Suppression of TGF-beta signalling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000; 20:325-334.

32. Solomon A, Wajngarten M, Alviano F, Anteby I, Elchalal U, Pe'er J *et ál.* Suppression of inflammatory and fibrotic responses in allergic inflammation by the amniotic membrane stromal matrix. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:941-948.
33. Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000; 70:329-337.
34. Sato H, Shimazaki J, Shimazaki N *et al.* Role of growth factor factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:S428.
35. Na BK, Hwang JH, Kim JC, Shin EJ, Kim JS, Jeong JM. Analyses of human amniotic membrane components as proteinase inhibitors for development of therapeutic agent of recalcitrant keratitis. *Trophoblast Research* 1999; 13:453-466.
36. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19:348-352.
37. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000; 20:173-177.
38. Touhami A, Grueterich M, Tseng SC. The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:987-994.
39. Hopkinson A, McIntosh RS, Shanmuganathan V, Tighe PJ, Dua HS. Proteomic analysis of amniotic membrane prepared for human transplantation: characterization of proteins and clinical implications. *J Proteome Res* 2006; 5:2226-2235.
40. Mejía LF, Acosta C, Santamaría JP. Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea* 2000; 19:288-291.

41. Uçakahn Ö, Köklü G, Fırat E. Nonpreserved human amniotic membrane transplantation in acute and chronic chemical eye injuries. *Cornea* 2002; 21:169-172.
42. Mejía LF, Santamaría JP, Acosta C. Symptomatic management of postoperative bullous keratopathy with non preserved human amniotic membrane. *Cornea* 2002; 21:342-345.
43. Arora R, Mehta D, Jain V. Amniotic membrane transplantation in acute chemical burns. *Eye* 2005; 19:273-278.
44. Gündüz K, Uçakhan ÖÖ, Kanpolat A, Günalp I. Nonpreserved human amniotic membrane transplantation for conjunctival reconstruction after excision of extensive ocular surface neoplasia. *Eye* 2006; 20:351-357.
45. Real Decreto 411/1996, de 1 de marzo, por el que se regulan las actividades relativas a la utilización de tejidos. Ministerio de Sanidad y Consumo. Boletín Oficial del Estado número 72, 23 de marzo de 1996.
46. Ley 42/1988, de 28 de diciembre, sobre donación y utilización de embriones y fetos humanos o de sus células, tejidos u órganos. Ministerio de Sanidad y Consumo. Boletín Oficial del Estado número 314, de 31 de diciembre de 1988.
47. Directiva 2004/23/CE, de 31 de marzo, de establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos. Consejo del Parlamento Europeo. Diario Oficial de la Unión Europea, número 102, de 7 abril de 2004.
48. Khokhar S, Sharma N, Kumar H, Soni A. Infection after use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea* 2001; 20:773-774.
49. Gajiwala K, Gajiwala AL. Evaluation of lyophilised, gamma-irradiated amnion as a biological dressing. *Cell Tissue Bank* 2004; 5:73-80.
50. von Versen-Höynck F, Syring C, Bachmann S, Möller DE. The influence of different preservation and sterilisation steps on the histological properties of

- amniotic allografts – light and scanning electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank* 2004; 5:45-56.
51. Chuck RS, Graff JM, Bryant MR, Sweet PM. Biomechanical characterization of human amniotic membrane preparations for ocular surface reconstruction. *Ophthalmic Res* 2004; 36:341-348.
  52. Maral T, Borman H, Arslan H, Demirhan B, Akinbingol G, Haberal M. Effectiveness of human amniotic membrane preserved long-term in glycerol as a temporary biological dressing. *Burns* 1999; 25:625-635.
  53. Norris MA, Cohen MS, Warren MM, Becker SN, Baur PS Jr, Seybold HM. Bladder reconstruction in rabbits with glutaraldehyde-stabilized amniotic membranes. *Urology* 1982; 19:631-635.
  54. Franck O, Descargues G, Menguy E, Courville P, Martin J, Brasseur G *et ál.* Technique de prélèvement et de préparation des membranes amniotiques. *J Fr Ophthalmol* 2000; 23:729-734.
  55. Kruse FE, Jousseaume AM, Rohrschneider K, You L, Sinn B, Baumann J *et ál.* Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface transplantation. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238:68-75.
  56. Hopkinson A, McIntosh RS, Tighe PJ, James DK, Dus HS. Amniotic membrane for ocular surface reconstruction: donor variations and the effect of handling on TGF- $\beta$  content. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4316-4322.
  57. Murube J, Rivas L, Rebolledo G, Candela I, Murube I, Sales-Sanz M *et ál.* Placenta, cordón umbilical y membrana amniótica en oftalmología. *Studium Ophthalmologicum* 2006; 2:133-157.
  58. Sánchez Salorio M. Sobre el redescubrimiento de la placenta humana como agente terapéutico ocular. *Studium Ophthalmologicum* 1999; 18:95-98.
  59. Cunningham F, Gant N, Leveno K, et al. Section II - Physiology of pregnancy. The placental and fetal membranes. Organization of placenta. En: *Williams Obstetrics*. McGraw – Hill Professional, 2001.

60. Cunningham F, Gant N, Leveno K, et al. Section II - Physiology of pregnancy. The placental and fetal membranes. The amnion. En: Williams Obstetrics. McGraw – Hill Professional, 2001.
61. Sadler T. Segunda semana de desarrollo. Disco germinal bilaminar. En: Langman's Medical Embriology, 9ª Edición. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott, Williams & Wilkins; 2003. p. 51-63.
62. van Herendael BJ, Oberti C, Brosens I. Microanatomy of the human membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. Am J Obstet Gynecol 1978; 131:872-880.
63. Bourne GL. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. Am J Obstet Gynecol 1960; 79:1070-1073.
64. Gray TB, Tseng SC. Transplante de membrana amniótica. En: Vajpayee RB. Transplante de cornea. Panamá: Highlights of Ophthalmology Int'l 2002. p. 252-261.
65. 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; 18:73-79.
66. Endo K, Nakamura T, Kawasaki S, Kinoshita S. Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the alpha5 chain of type IV collagen. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45:1771-1774.
67. Cooper LJ, Kinoshita S, German M, Koizumi N, Nakamura T, Fullwood NJ. An investigation into the composition of amniotic membrane used for ocular surface reconstruction. Cornea 2005; 24:722-729.
68. Champlaud MF, Lunstrum GP, Rousselle P, Nishiyama T, Keene DR, Burgeson RE. Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. J Cell Biol 1996; 132:1189-1198.

69. Meinert M, Eriksen GV, Petersen AC, Helmig RB, Laurent C, Uldbjerg N *et ál.* Proteoglycans and hyaluronan in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:679-685.
70. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981; 2:1003-1005.
71. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:1539-1546.
72. Houlihan JM, Biro PA, Harper HM, Jenkinson HJ, Holmes CH. The human amnion is a site of MHC class Ib expression: evidence for the expression of HLA-E and HLA-G. *J Immunol* 1995; 154:5665-5674.
73. Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Mayhew E, Word RA, McCulley JP *et ál.* Immunosuppressive factors secreted by human amniotic membrane cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:900-907.
74. Gabler B, Lohmann CP. Hypopyon after repeated transplantation of human amniotic membrane onto the corneal surface. *Ophthalmology* 2000; 107:1344-1346.
75. Wang M, Yoshida A, Kawashima H, Ishizaki M, Takahashi H, Hori J. Immunogenicity and antigenicity of allogeneic amniotic epithelial transplants grafted to the cornea, conjunctiva, and anterior chamber. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:1522-1532.
76. Lee HS, Kim JC. Effect of amniotic fluid in corneal sensitivity and nerve regeneration after excimer laser ablation. *Cornea* 1996; 15:517-524.
77. Hanada K, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. *Am J Ophthalmol* 2001; 131:324-331.
78. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999; 106:1504-1511.

79. Ma DH, Wang SF, Su WY, Tsai RJ. Amniotic membrane graft for the management of scleral melting and corneal perforation in recalcitrant infectious scleral and corneoscleral ulcers. *Cornea* 2002; 21:275-283.
80. Woo HM, Kim MS, Kweon OK, Kim DY, Nam TC, Kim JH. Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodelling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:345-349.
81. Keath JK. Growth factors. En *Growth Factors*. Oxford University Press 1993. Oxford, England (UK).
82. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19:113-129.
83. Klenkler BJ, Sheardown H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res* 2004; 79:677-688.
84. Rowe TF, King LA, MacDonald PC, Casey ML. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in human amnion mesenchymal and epithelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:915-921.
85. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution and diversification. *FASEB J* 1998; 12:1075-1095.
86. Rigal-Sastourné JC, Tixier JM, Renard JP, Maurin JF, Pouliquen Y, Legeais JM. Brûlures cornéennes et métalloprotéases: influence des greffes des membranes amniotiques. *J Fr Ophthalmol* 2002; 25:685-693.
87. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:444-449.

88. Park WC, Tseng SC. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:2906-2914.
89. Choi YS, Kim JY, Wee WR, Lee JH. Effect of the application of human amniotic membrane on rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Cornea* 1998; 17:389-395.
90. Wang MX, Gray TB, Park WC, Prabhasawat P, Culbertson W, Forster R, Hanna K *et ál.* Reduction in corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. *J Cataract Refract Surg* 2001; 27:310-319.
91. Lee HK, Kim JK, Kim SS, Kim EK, Kim KO, Lee IS *et ál.* Effect of amniotic membrane after laser-assisted subepithelial keratectomy on epithelial healing: clinical and refractive outcomes. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30:334-340.
92. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)? *Br J Plast Surg* 2004; 57:215-221.
93. Kim JC, Tseng SC. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol* 1995; 9:32-46.
94. Jiang A, Li C, Gao Y, Zhang M, Hu J, Kuang W *et ál.* In vivo and in vitro inhibitory effect of amniotic extraction on neovascularization. *Cornea* 2006; 25:S36-S40.
95. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 2007; 28:161-169.
96. Ward DJ, Bennett JP. The long-term results of the use of human amnion in the treatment of leg ulcers. *Br J Plastic Surg* 1984; 37:191-193.
97. Bennett JP, Matthews R, Faulk WP. Treatment of chronic ulceration of the legs with human amnion. *Lancet* 1980; 1:1153-1156.

98. Faulk WP, Matthews R, Stevens PJ, Bennett JP, Burgos H, Hsi BL. Human amnion as an adjunct in wound healing. *Lancet* 1980; 1:1156-1158.
99. Subrahmanyam M. Amniotic membrane as a cover for microskin grafts. *Br J Plastic Surg* 1995; 48:477-478.
100. Colocho G, Graham WP 3<sup>rd</sup>, Greene AE, Matheson DW, Lynch D. Human amniotic membrane as a physiologic wound dressing. *Arch Surg* 1974; 109:370-373.
101. Ashworth MF, Morton KE, Dewhurst J, Lilford RJ, Bates RG. Vaginoplasty using amnion. *Obstet Gynecol* 1986; 67:443-446.
102. Mhaskar R. Amniotic membrane for cervical reconstruction. *Int J Gynaecol Obstet* 2005; 90:123-127.
103. Gharib M, Ure BM, Klose M. Use of amniotic grafts in the repair of gastroschisis. *Pediatr Surg Int* 1996; 11:96-99.
104. Rennekampff HO, Dohrmann P, Föry R, Fändrich F. Evaluation of amniotic membrane as adhesion prophylaxis in a novel surgical gastroschisis model. *J Invest Surg* 1994; 7:187-193.
105. Barlas M, Gökçora H, Ereku S, Dindar H, Yücesan S. Human amniotic membrane as an intestinal patch for neomucosal growth in the rabbit model. *J Pediatr Surg* 1992; 27:597-601.
106. Mahgoub MA, Monayeri ME, Mahfouz M. Moghazy capsule as a bioartificial pancreas in xenotransplantation. *Transplant Proc* 1992; 24:659-660.
107. Mahgoub MA, Ammar A, Fayez M, Edris A, Hazem A, Akl M *et ál.* Neovascularization of the amniotic membrane as a biological immune barrier. *Transplant Proc* 2004; 36:1194-1198.
108. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T *et ál.* Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 2003; 12:545-552.
109. Kosuga M, Sasaki K, Tanabe A, Li XK, Okawa H, Ogino I *et ál.* Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal

- storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol Ther* 2001; 3:139-148.
110. Nakama H, Ohsugi K, Otsuki T, Date I, Kosuga M, Okuyama T *et ál.* Encapsulation cell therapy for mucopolysaccharidosis type VII using genetically engineered immortalized human amniotic epithelial cells. *Tohoku J Exp Med* 2006; 209:23-32.
111. Burgos H, Sergeant RJ. Lyophilized human amniotic membranes used in reconstruction of the ear. *J R Soc Med* 1983; 76:433.
112. Zohar Y, Talmi YP, Finkelstein Y, Shvili Y, Sadov R, Laurian N. Use of human amniotic membrane in otolaryngologic practice. *Laryngoscope* 1987; 97:978-980.
113. Rebeiz EE, Bryan DJ, Ehrlichman RJ, Shapshay SM. Surgical management of life-threatening epistaxis in Osler-Weber-Rendu disease. *Ann Plast Surg* 1995; 35:208-213.
114. Elwan MA, Sakuragawa N. Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. *Neuroreport* 1997; 8:3435-3438.
115. Okawa H, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Sato K. Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain. *Neuroreport* 2001; 12:4003-4007.
116. Mohammad J, Shenaq J, Rabinovsky E, Shenaq S. Modulation of peripheral nerve regeneration: a tissue-engineering approach. The role of amnion tube nerve conduit across a 1-centimeter nerve gap. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105:660-666.
117. Fishman IJ, Flores FN, Scott FB, Spjut HJ, Morrow B. Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. *J Urol* 1987; 138:1291-1294.
118. Vishwakarma GK, Khare AK. Amniotic arthroplasty for tuberculosis of the hip. A preliminary clinical study. *J Bone Joint Surg Br* 1986; 68:68-74.

119. Solomon A, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology* 2001; 108:449-460.
120. Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol* 1998; 82:235-240.
121. Ma DH, See LC, Hwang YS, Wang SF. Comparison of amniotic membrane graft alone or combined with intraoperative mitomycin C to prevent recurrence after excision of recurrent pterygia. *Cornea* 2005; 24:141-150.
122. Shimazaki J, Kosaka K, Shimmura S, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation with conjunctival autograft for recurrent pterygium. *Ophthalmology* 2003; 110:119-124.
123. Tan DT, Ang LP, Beuerman RW. Reconstruction of the ocular surface by transplantation of a serum-free derived cultivated conjunctival epithelial equivalent. *Transplantation* 2004; 77:1729-1734.
124. Ang LP, Tan DT, Cajucom-Uy H, Beuerman RW. Autologous cultivated conjunctival transplantation for pterygium surgery. *Am J Ophthalmol* 2005; 139:611-619.
125. Honavar SG, Bansal AK, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 2000; 107:975-979.
126. Tsubota K, Shimazaki J. Surgical treatment of children blinded by Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1999; 128:573-581.
127. Barabino S, Rolando M, Bentivoglio G, Mingari C, Zanardi S, Bellomo R *et al.* Role of amniotic membrane transplantation for conjunctival reconstruction in ocular-cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 2003; 110:474-480.
128. John T, Foulks GN, John ME, Cheng K, Hu D. Amniotic membrane in the surgical management of acute toxic epidermal necrolysis. *Ophthalmology* 2002; 109:351-360.

129. Kobayashi A, Yoshita T, Sugiyama K, Miyashita K, Niida Y, Koizumi S *et ál.* Amniotic membrane transplantation in acute phase of toxic epidermal necrolysis with severe corneal involvement. *Ophthalmology* 2006; 113:126-132.
130. Moore JE, Dua HS, Page AB, Irvine AD, Archer DB. Ocular surface reconstruction in LOGIC syndrome by amniotic membrane transplantation. *Cornea* 2001; 20:753-756.
131. Moore JE, Shah S, Kumar V, Ainsworth JR, Page AB, McLean WH. Follow up of patients with ocular scarring secondary to LOC syndrome treated by amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 2005; 89:939-941.
132. Solomon A, Espana EM, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the conjunctival fornices. *Ophthalmology* 2003; 110:93-100.
133. Nava-Castañeda A, Tovila-Canales JL, Monroy-Serrano MH, Tapia-Guerra V, Tovilla y Pomar JL, Ordóñez-Blanco A *et ál.* Estudio comparativo entre transplante de membrana amniótica con y sin aplicación simultánea de mitomicina C el reconstrucción del fondo de saco conjuntival. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2005; 80:345-352.
134. Tseng SC, Di Pascuale MA, Liu DT, Gao YY, Baradaran-Rafii A. Intraoperative mitomycin C and amniotic membrane transplantation for fornix reconstruction in severe cicatricial ocular surface diseases. *Ophthalmology* 2005; 112:896-903.
135. Meller D, Maskin SL, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for symptomatic conjunctivochalasis refractory to medical treatments. *Cornea* 2000; 19:796-803.
136. Georgiadis NS, Terzidou CD. Epiphora caused by conjunctivochalasis: treatment with transplantation of preserved human amniotic membrane. *Cornea* 2001; 20:619-621.
137. Paridaens D, Beekhuis H, van Den Bosch W, Remeyer L, Melles G. Amniotic membrane transplantation in the management of conjunctival

- malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:658-661.
138. Espana EM, Prabhasawat P, Grueterich M, Solomon A, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for reconstruction after excision of large ocular surface neoplasias. *Br J Ophthalmol* 2002; 86:640-645.
139. Mocan MC, Azar NF. Amniotic membrane transplantation for the repair of severe conjunctival dehiscence after strabismus surgery with adjustable sutures. *Am J Ophthalmol* 2005; 140:533-534.
140. Ti SE, Tow SL, Chee SP. Amniotic membrane transplantation in entropion surgery. *Ophthalmology* 2001; 108:1209-1217.
141. Khokhar S, Natung T, Sony P, Sharma N, Agarwal N, Vajpayee RB. Amniotic membrane transplantation in refractory neurotrophic corneal ulcers: a randomized, controlled clinical trial. *Cornea* 2005; 24:654-660.
142. Kim JS, Kim JC, Hahn TW, Park WC. Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcer. *Cornea* 2001; 20:720-726.
143. Lin HC, Chu PH, Kuo YH, Shen SC. Clinical experience in managing *Fusarium Solani* keratitis. *Int J Clin Pract* 2005; 59:549-554.
144. Chen HC, Tan HY, Hsiao CH, Huang SC, Lin KK, Ma DH. Amniotic membrane transplantation for persistent corneal ulcers and perforations in acute fungal keratitis. *Cornea* 2006; 25:564-572.
145. Prabhasawat P, Tesavibul N, Komolsuradej W. Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:1455-1463.
146. Solomon A, Meller D, Prabhasawat P, John T, Espana EM, Steuhl KP *et ál.* Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocelles and deep ulcers. *Ophthalmolgy* 2002; 109:694-703.
147. Rodríguez-Ares MT, Touriño R, López-Valladares MJ, Gude F. Multilayer amniotic membrane transplantation in the treatment of corneal perforations. *Cornea* 2004; 23:577-583.

148. Su CY, Lin CP. Combined use of an amniotic membrane and tissue adhesive in treating corneal perforation: a case report. *Ophthalmic Surg Lasers* 2000; 31:151-154.
149. Duchesne B, Tahi H, Galand A. Use of human fibrin glue and amniotic membrane transplant in corneal perforation. *Cornea* 2001; 20:230-232.
150. Hick S, Demers PE, Brunnette I, La C, Mabon M, Duchesne B. Amniotic membrane transplantation and fibrin glue in the management of corneal ulcers and perforations: a review of 33 cases. *Cornea* 2005; 24:369-377.
151. Heiligenhaus A, Li H, Hernández Galindo EE, Koch JM, Steuhl KP, Meller D. Management of acute ulcerative and necrotising herpes simplex and zoster keratitis with amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 2003; 87:1215-1219.
152. Heiligenhaus A, Li HF, Yang Y, Wasmuth S, Steuhl KP, Bauer D. Transplantation of amniotic membrane in murine herpes stromal keratitis modulates matrix metalloproteinases in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:4079-4085.
153. Pires RT, Tseng SC, Prabhasawat P, Puangsricharern V, Maskin SL, Kim JC *et ál.* Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol* 1999; 117:1291-1297.
154. Espana EM, Grueterich M, Sandoval H, Solomon A, Alfonso E, Karp CL *et ál.* Amniotic membrane transplantation for bullous keratopathy in eyes with poor visual potential. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29:279-284.
155. Anderson DF, Prabhasawat P, Alfonso E, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation after the primary surgical management of band keratopathy. *Cornea* 2001; 20:354-361.
156. Fujishima H, Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Trabeculectomy with the use of amniotic membrane for uncontrollable glaucoma. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998; 29:428-431.
157. Willoch CM, Nicolaissen B. Amnion-shielded trabeculectomy. *Acta Ophthalmol Scand* 2003; 81:658-659.

158. Drolsum L, Willoch C, Nicolaissen B. Use of amniotic membrane as an adjuvant in refractory glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand* 2006; 84:786-789.
159. Budenz DL, Barton K, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. *Am J Ophthalmol* 2000; 130:580-588.
160. Barton K, Budenz DL, Khaw PT, Tseng SC. Glaucoma filtration surgery using amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:1762-1768.
161. Rauscher FM, Barton K, Budenz DL, Feuer WJ, Tseng SC. Long-term outcomes of amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. *Am J Ophthalmol* 2007; 143:1052-1054.
162. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:431-441.
163. Anderson DF, Ellies P, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem deficiency. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:567-575.
164. Pires RT, Chokshi A, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation or conjunctival limbal autograft for limbal stem cell deficiency induced by 5-fluorouracil in glaucoma surgeries. *Cornea* 2000; 19:284-287.
165. Solomon A, Ellies P, Anderson DF, Touhami A, Grueterich M, Espana EM *et al*. Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002; 109:1159-1166.
166. Shimazaki J, Konomi K, Shimmura S, Tsubota K. Ocular surface reconstruction for thermal burns caused by fireworks. *Cornea* 2006; 25:139-145.

167. Marinho D, Höfling-Lima AL, Kwitko S, Tseng SC. Does amniotic membrane transplantation improve the outcome of autologous limbal transplantation? *Cornea* 2003; 22:338-342.
168. Joseph A, Dua HS, King AJ. Failure of amniotic membrane transplantation in the treatment of acute ocular burns. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:1065-1069.
169. Meller D, Pires RT, Mack RJ, Figueiredo F, Heiligenhaus A, Park WC *et ál.* Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000; 107:980-989.
170. Peris C, Menezo JL. Técnicas quirúrgicas de reconstrucción de la superficie ocular con membrana amniótica. En: Peris C, Menezo JL. *Membrana amniótica y Superficie Ocular*. Valencia: Mac Line 2004; 89-96.
171. Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000; 19:421-426.
172. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001; 108:1569-1574.
173. Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmura S, Tsubota K. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002; 109:1285-1290.
174. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S. Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scand* 2004; 82:468-471.
175. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Yokoi N *et ál.* Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology* 2006; 113:1765-1772.

176. Real Decreto 411/1996, de 1 de marzo, por el que se regulan las actividades relativas a la utilización de tejidos humanos. Artículo 7: Consentimiento previo e informado del donante vivo. Ministerio de Sanidad y Consumo. Boletín Oficial del Estado, número 72; 23 de marzo de 1996.
177. Rama P, Giannini R, Bruni A, Gatto C, Tiso R, Ponzin D. Further evaluation of amniotic membrane banking for transplantation in ocular surface diseases. *Cell Tissue Bank* 2001; 2:155-163.
178. Adds PJ, Hunt C, Hartley S. Bacterial contamination of amniotic membrane. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:228-230.
179. Rao TV, Chandrasekharam V. Use of dry human and bovine amnion as a biological dressing. *Arch Surg* 1981; 116:891-896.
180. Momose A. Lyophilized human amniotic membrane "patching" for ocular surface disorders. *Ocular Surg News* 2000; Octubre:144-146.
181. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T *et ál.* Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:93-99.
182. Nakamura T, Inatomi T, Sekiyama E, Ang LP, Yokoi N, Kinoshita S. Novel clinical application of sterilized, freeze-dried amniotic membrane to treat patients with pterygium. *Acta Ophthalmol Scand* 2006; 84:401-405.
183. Adds PJ, Hunt CJ, Dart JK. Amniotic membrane grafts, "fresh" or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:905-907.
184. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 1963; 47:347-369.
185. Muldrew K, editor. *Cryobiology: a short course* (monografía en Internet). Alberta (Canadá): Universidad de Calgary; 1997, (actualizado en marzo de 1999). Disponible en [www.ucalgary.ca/~kmuldrew/cryo\\_course/course\\_outline.html](http://www.ucalgary.ca/~kmuldrew/cryo_course/course_outline.html). Accedido en julio 2006.
186. Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med* 2002; 20: 5-13.

187. Pegg DE. Long – term preservation of cells and tissues: a review. *J Clin Path* 1976; 29:271-285.
188. McLaren AJ, Friend PJ. Trends in organ preservation. *Transpl Int* 2003; 16:701-708.
189. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ transplantation. *Transplantation* 2007; 83:1289-1298.
190. Moreno Sierra J, Jiménez Penick FJ, Redondo González E, Bocardo Fajardo G, Silmi Moyano A, Resel Estévez L. Conservación de órganos. *Clínicas Urológicas de la Complutense* 1999; 7:209-218.
191. El-Wahsh M. Liver graft preservation: an overview. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6:12-16.
192. Lindstrom RL. Advances in corneal preservation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1990; 88:555-648.
193. Kaufman HE, Beuerman RW, Steinemann TL, Thompson HW, Varnell ED. Optisol corneal storage medium. *Arch Ophthalmol* 1991; 109:864-868.
194. Means TL, Geroski DH, Hadley A, Lynn MJ, Edelhauser HF. Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. *Arch Ophthalmol* 1995; 113:805-809.
195. Leaf A. Maintenance of concentration gradients and regulation of cell volume. *Ann NY Acad Sci* 1959; 72:396-404.
196. Lyons JM. Phase transitions and control of cellular metabolism at low temperatures. *Cryobiology* 1972; 9:341-350.
197. Lovelock JE. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochem J* 1954; 56:265-270.
198. Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ *et ál.* Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med* 1992; 326:726-732.

199. Tugwell BD, Patel PR, Williams IT, Hedberg K, Chai F, Nainan OV *et ál.* Transmission of hepatitis C virus to several organ and tissue recipients from an antibody-negative donor. *Ann Intern Med* 2005; 143:648-654.
200. Rogers MF, Simonds RJ, Lawton KE, Moseley RR, Jones WK. Guidelines for preventing transmission of human immunodeficiency virus through transplantation of human tissue and organs. Centers for disease control and prevention. *MMWR Recomm Rep.* 20 de mayo de 1994; (citado el 21 de septiembre de 2007). (sobre 5 pantallas).  
Disponible en [www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00031670.htm](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00031670.htm)
201. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 2004; 48:146-156.
202. Nawroth F, Rahimi G, Isachenko E, Isachenko V, Liebermann M, Tucker MJ *et ál.* Cryopreservation in assisted reproductive technology: new trends. *Semin Reprod Med* 2005; 23:325-335.
203. Sumida S. Transfusion and transplantation of cryopreserved cells and tissues. *Cell Tissue Bank* 2006; 7:265-305.
204. M. Reboredo N, Díaz A, Castro A, Villaescusa RG. Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26:1263-1270.
205. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Comparison of three methods for human corneal cryopreservation that utilize dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 1999; 39:47-57.
206. Halberstadt M, Böhnke M, Athmann S, Hagenah M. Cryopreservation of human donor corneas with dextran. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:5110-5115.
207. Gris O, del Campo Z, Wolley-Dod C, Güell JL, Bruix A, Calatayud M *et ál.* Amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens for the treatment of epithelial disorders. *Cornea* 2002; 21:22-27.

208. Sridhar MS, Sangwan VS, Bansal AK, Rao GN. Amniotic membrane transplantation in the management of shield ulcers of vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 2001; 108:1218-1222.
209. Pegg DE. The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. *Hum Fertil* 2005; 8:231-239.
210. Mellor JD, editor. *Fundamentals of lyophilization*. Londres: Academic Press Inc; 1978.
211. Jennings TA, editor. *Lyophilization: Introduction and Basic Principles*. Denver, Colorado: Interpharm Press; 1999.
212. Souzu H. Basic aspects and industrial strategies for the preservation of microorganisms by freezing and drying. En Rey L, May JC, editores. *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. Nueva York: Marcel Dekker; 1999. p. 231-265.
213. De Paoli P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol Rev* 2005; 29:897-910.
214. Laun A, Tonn JC, Jerusalem C. Comparative study of lyophilized human dura mater and lyophilized bovine pericardium as dural substitutes in neurosurgery. *Acta Neurochir* 1990; 107:16-21.
215. Root M, Lockhart JL, Vorstman A, Oiticica C, Buckner D. Long-term follow-up with the use of lyophilized dura mater for abdominal wall closure in children: report of 3 cases. *J Urol* 1992; 148:858-860.
216. Waite PD, Clanton JT. Orbital floor reconstruction with lyophilized dura. *J Oral Maxillofac Surg* 1988; 46:727-730.
217. François J, Verbraeken H, Hanssens M. Scleral pockets and lyophilized sclera in retinal detachments. *Ophthalmologica* 1979; 179:153-157.
218. Peidro L, Segur JM, Poggio D, de Retana PF. Use of freeze-dried bone allograft with platelet-derived growth factor for revision of a glenoid component. *J Bone Joint Surg Br* 2006; 88:1228-1231.

219. Yukna RA, Tow HD, Carroll PB, Vernino AR, Bright RW. Evaluation of the use of freeze-dried skin allografts in the treatment of human mucogingival problems. *J Periodontol* 1977; 48:187-193.
220. Jennings TA. The freezing process. En Jennings TA. *Lyophilization: Introduction and Basic Principles*. Denver, Colorado: Interpharm Press; 1999. p. 261-281.
221. Jennings TA. The primary drying process. En Jennings TA. *Lyophilization: Introduction and Basic Principles*. Denver, Colorado: Interpharm Press; 1999. p. 283-354.
222. Jennings TA. The secondary drying process. En Jennings TA. *Lyophilization: Introduction and Basic Principles*. Denver, Colorado: Interpharm Press; 1999. p. 355-392.
223. Mellor JD. Effects of freeze-drying. En: Mellor JD. *Fundamentals of lyophilization*. Londres (Gran Bretaña): Academic Press; 1978. p. 299-313.
224. La Asociación Médica Mundial (página de inicio en Internet). c2003-2007. (citada 17 septiembre 2005). Declaración de Helsinki: principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos (sobre 2 pantallas). Disponible en <http://www.wma.net/s/policy/pdf/17c.pdf> .
225. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD *et ál.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.
226. Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:2506-2513.
227. Grueterich M, Espana E, Tseng SC. Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:63-71.
228. Wolf HK, Zarnegar R, Oliver L, Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor in human placenta and trophoblastic disease. *Am J Pathol* 1991; 138:1035-1043.

- 
229. Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D, Gabriel C, Eibl J, Redl H. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell Tissue Bank* 2007; 8:1-8.
230. Puhlev I, Guo N, Brown DR, Levine F. Desiccation tolerance in human cells. *Cryobiology* 2001; 42:207-217.
231. de Oliveira Pena JD, Barreto de Melo G, Pereira Gomes JA, Freymuller Haapalainen E, Massayuki Komagome C, Clementino Santos N *et ál.* Análise ultraestrutural e de fatores de crescimento de diferentes métodos de preservação da membrana amniótica utilizada em cirurgia ocular. *Arq Bras Oftalmol* 2007; 70:756-762.
232. Yurchenco PD, Ruben GC. Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J Cell Biol* 1987; 105:2559-2568.
233. Strambini GB, Gabellieri E. Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding. *Biophys J* 1996; 70:971-976.
234. Cao E, Chen Y, Cui Z, Foster PR. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol Bioeng* 2003; 82:684-690.
235. Prestrelski SJ, Tedeschi N, Arakawa T, Carpenter JF. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys J* 1993; 65:661-671.
236. Allison SD, Randolph TW, Manning MC, Middleton K, Davis A, Carpenter JF. Effects of drying methods and additives on structure and function of actin: mechanisms of dehydration-induced damage and its inhibition. *Arch Biochem Biophys* 1998; 358:171-181.
237. Desrosiers P, Légaré C, Leclerc P, Sullivan R. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. *Fertil Steril* 2006; 85:1744-1752.

- 238.** Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006; 104:264-302.
- 239.** Lambiase A, Manni L, Bonini S et al. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1063-1069.
- 240.** Lambiase A, Rama P, Bonini S et al. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med* 1998; 338:1174-1180.
- 241.** Kauma S, Hayes N, Weatherford S. The differential expression of hepatocyte growth factor and met in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:949-954.
- 242.** Gargiulo AR, Khan-Dawood FS, Dawood MY. Epidermal growth factor receptors in uteroplacental tissues in term pregnancy before and after the onset of labor. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:113-117.
- 243.** Keelan JA, Sato T, Mitchell MD. Interleukin (IL)-6 and IL-8 production by human amnion: regulation by cytokines, growth factors, glucocorticoids, phorbol esters and bacterial lipopolysaccharide. *Biol Reprod* 1997;57:1438-1444.