

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIRUJANO DENTISTA**



**TÍTULO.**

**MEMBRANA AMNIÓTICA TRATADA CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO CRIOCONSERVADOR Y ANTIBACTERIANO PARA EL MANEJO DE LESIONES DE SUPERFICIE OCULAR.**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR**

**EN EL PROGRAMA DE MAestrÍA-DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:**

**MARÍA DE LOS ÁNGELES LEAL AVILA.**

**JURADO DE EXAMEN:**

**DR. MIGUEL ÁNGEL CADENA ALCÁNTAR (Presidente).  
DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VARGUEZ (Secretario).  
DR. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES (Sinodal).  
DRA. MIRNA DEL CARMEN BRITO PEREA (Sinodal).  
DRA. NINA BOGDANCHIKOVA (Sinodal).**

**TIJUANA, B.C., MÉXICO**

**Febrero, 2018.**




Tijuana Baja California, a 7 de Noviembre del 2017.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE CIRUJANO DENTISTA.**

**ASUNTO:** Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Presidente en el examen de la Tesis titulada **“Membrana amniótica tratada con nanopartículas de plata como criopreservador y antibacteriano para el manejo de lesiones de superficie ocular”** elaborada por el C. María De Los Ángeles Leal Avila, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE

  
\_\_\_\_\_  
**DR. MIGUEL ÁNGEL CADENA ALCÁNTAR**  
Presidente

C.c.p. Archivo

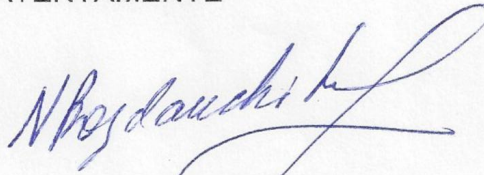
Tijuana Baja California, a 7 de Noviembre del 2017.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE CIRUJANO DENTISTA.**

**ASUNTO:** Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal en el examen de la Tesis titulada "**Membrana amniótica tratada con nanopartículas de plata como crioconservador y antibacteriano para el manejo de lesiones de superficie ocular**" elaborada por el C. María De Los Ángeles Leal Avila, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



---

**DRA. NINA BOGDANCHIKOVA.**

Sinodal

C.c.p. Archivo

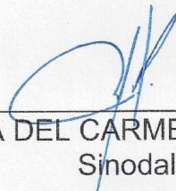
Tijuana Baja California, a 7 de Noviembre del 2017.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE CIRUJANO DENTISTA.**

**ASUNTO:** Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal en el examen de la Tesis titulada "**Membrana amniótica tratada con nanopartículas de plata como criopreservador y antibacteriano para el manejo de lesiones de superficie ocular**" elaborada por el C. María De Los Ángeles Leal Avila, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



\_\_\_\_\_  
DRA. MIRNA DEL CARMEN BRITO PEREA.  
Sinodal

C.c.p. Archivo

Tijuana Baja California, a 7 de Noviembre del 2017.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE CIRUJANO DENTISTA.**

**ASUNTO:** Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal en el examen de la Tesis titulada "**Membrana amniótica tratada con nanopartículas de plata como crioconservador y antibacteriano para el manejo de lesiones de superficie ocular**" elaborada por el C. María De Los Ángeles Leal Avila, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE

*HAReyes*

DR. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES.  
Sinodal

C.c.p. Archivo

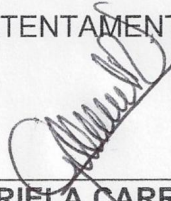
Tijuana Baja California, a 7 de Noviembre del 2017.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE CIRUJANO DENTISTA.**

**ASUNTO:** Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Secretario en el examen de la Tesis titulada "**Membrana amniótica tratada con nano partículas de plata como crioconservador y antibacteriano para el manejo de lesiones de superficie ocular**" elaborada por el C. María De Los Ángeles Leal Avila, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



**DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VARGUEZ.**

Secretario

C.c.p. Archivo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIRUJANO DENTISTA**



**TÍTULO.**

**MEMBRANA AMNIÓTICA TRATADA CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO CRIOCONSERVADOR Y ANTIBACTERIANO PARA EL MANEJO DE LESIONES DE SUPERFICIE OCULAR.**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR**

**EN EL PROGRAMA DE MAESTRÍA-DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:**

**MARÍA DE LOS ÁNGELES LEAL AVILA.**

**JURADO DE EXAMEN:**

**DR. MIGUEL ÁNGEL CADENA ALCÁNTAR (Presidente).  
DRA. ANA GABRIELA CARRILLO VARGUEZ (Secretario).  
DR. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES (Sinodal).  
DRA. MIRNA DEL CARMEN BRITO PEREA (Sinodal).  
DRA. NINA BOGDANCHIKOVA (Sinodal).**

**TIJUANA, B.C., MÉXICO**

**Febrero, 2018**

## **DEDICATORIA**

La realización de la presente tesis, va dedicada a todas aquellas personas que de alguna manera se involucraron y me apoyaron para lograr la culminación de este trabajo y de esta etapa profesional.

A todos aquellos que de manera desinteresada se sumaron al proyecto y me compartieron sus ideas para mejorarlo así como a las autoridades de las instituciones participantes y muy especialmente al Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes mi director de tesis y al Dr. Miguel Ángel Cadena Alcántar por todo su apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo está encaminado a agradecer a todas las personas que directa o indirectamente me apoyaron o se interesaron, por el trabajo que he estado realizando para esta tesis Doctoral, ya que sin su ayuda no sé si hubiese llegado hasta aquí, en especial quisiera agradecer:

A mis Padres, ya que siempre me apoyaron para realizar mis estudios y establecer las bases que me han permitido llegar hasta este gran momento.

A mi esposo que siempre ha estado brindándome todo el amor y el apoyo necesario para cumplir mis deseos y mis metas.

A mis hijas que sin su apoyo no hubiera podido lograr concluir esta última etapa formativa, tan importante en mi vida.

A mi director de tesis, Dr. Horacio Almanza Reyes, por todo su apoyo mostrado de manera desinteresada a lo largo de estos últimos años y que me ha permitido darle sentido a esta última etapa de mi formación profesional, y por todo ese apoyo moral y emocional con el cual me ha acompañado durante todo este tiempo.

A mis Codirectores de Tesis: Muy especialmente al Dr. Miguel Ángel Cadena Alcántar y a su esposa la Dra. Ana Gabriela Carrillo Varguez ya que sin su apoyo no hubiera podido lograr esta etapa formativa.

A la Dra. Nina Bogdanchikova, quien se sumó a este proyecto dándome su apoyo para la culminación de esta última parte de mi proyecto profesional.

A la Dra. Mirna del Carmen Brito Perea, quien se sumó a la culminación de este proyecto.

A la Dra. Vilma Valdez Kim y a la Dra. Irma Zamudio Valderrama, por su apoyo, conocimientos y experiencia en el área de oftalmología para el desarrollo de esta investigación que culminó con la construcción de esta tesis.

A la Dra. Vilma Jacqueline Cervantes, Médico pasante de servicio social de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en vinculación con Universidad Autónoma de Baja California e ISSSTE Fray Junípero Serra de la Cd. De Tijuana B.C.

Agradezco a Dios por permitirme vivir esta experiencia.

## ABREVIATURAS

<b>AE5</b>	Marcadores para dos anticuerpos monoclonales de la queratina.
<b>AgNP<sub>s</sub></b>	Nanopartículas de plata.
<b>AM3</b>	Marcador que identifica la proteína glucosilada de células
<b>Argovit</b>	Molécula rusa, compuesta de nanopartículas de plata con polivinilpirrolidona.
<b>Anticuerpos Anti-VHC</b>	Anticuerpos contra virus hepatitis C.
<b>Anticuerpos Anti-VIH</b>	Anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humana.
<b>Bfge</b>	Factores de crecimiento.
<b>B2 microglobulina</b>	Proteína relacionada con HLA-G
<b>CD34</b>	Molécula de adhesión inmunología receptor de células 34.
<b>CD44</b>	Molécula de adhesión inmunología receptor de células 44.
<b>CMB</b>	Concentración mínima bactericida.
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Bióxido de carbono.
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico.
<b>ELISA</b>	Prueba para detectar cuantitativamente el número de anticuerpos contra un antígeno determinado.
<b>FGFR1</b>	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1.
<b>Hipopión</b>	Inflamación de la cámara anterior del ojo en la que se produce infiltración celular y depósito de pus.
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos.
<b>HLA</b>	Antígenos de Histocompatibilidad.
<b>ISSSTE</b>	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los trabajadores del Estado.
<b>LB</b>	Caldo Luria Bertani.
<b>MA</b>	Membrana amniótica.
<b>MH</b>	Agar Mueller Hinton.
<b>MMP-9</b>	Metaloproteinasa 9.
<b>Mrna</b>	Ácido ribonucleico mensajero.
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana.
<b>Ph</b>	Potencial de hidrogeno.
<b>PRK</b>	Queratectomía fotorrefractiva.
<b>RPM</b>	Ruptura Prematura de membranas.
<b>TGFb</b>	Factor de crecimiento transformante beta.
<b>TMA</b>	Trasplante de membrana amniótica
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonias.
<b>VDRL</b>	Prueba serológica que mide los anticuerpos contra treponema pallidum.

## RESUMEN

El trasplante de membrana amniótica (TMA) con la aplicación de nanopartículas de plata (AgNPs), es un método que pretende establecer la confiabilidad y viabilidad del producto, así como del protocolo de trasplante y su utilización en problemas de la superficie ocular con fracaso a los tratamientos convencionales. En esta investigación se describen las bases científicas para llevar a cabo este procedimiento, así como los cuidados necesarios y pasos seguidos para el reporte de los resultados de esta tesis doctoral, que tiene como objetivo principal el crear una investigación que describa las características y propiedades anatomopatológicas del TMA con la aplicación de AgNPs en modelo animal y evaluar el efecto antibacteriano de la MA recubierta con AgNPs. Se realizaron estudios para evaluar la inhibición del crecimiento bacteriano determinado por el diámetro de los halos de inhibición en agar, utilizando 10 cepas de importancia médica (*Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* del grupo de las Gram negativas, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococo fecalis* del grupo de las Gram positivas y *Cándida albicans* del grupo de los hongos). Posteriormente diferentes fragmentos de MA fueron impregnadas con AgNPs a las siguientes concentraciones 1(5%), 2(2.5%), 3(1.25%), 4(0.625%), 5(0.312%), 6(0.1562%), 7(0.0781%), 8(0.0390%), 9(0.0195%), 10(0.00975), 11(0.004875%) y 12(0.0024375%), para evaluar el efecto antibacteriano por halo de inhibición clasificándolo como sensible, intermedio y resistente. Estas 10 cepas se utilizaron para evaluar la prueba de inhibición microbiológica en fase líquida de la MA recubierta con AgNPs. Cada una de las cepas se utilizaron a una concentración de  $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$  CFU/mL, colocando un blanco (medio LB), control (bacteria sola), bacteria con MA sin AgNPs y bacteria con MA impregnada con AgNPs a diferentes concentraciones; 1(5%), 3(1.25%), 6(0.1562%), 9(0.0195%) y 12(0.0024375%), respectivamente. Por último, se realizó un estudio en 33 conejos que fueron divididos en tres grupos de diez conejos, más un control por grupo, a los cuales se les produjo una úlcera corneal experimentalmente que fue tratada con TMA con AgNPs, una vez concluido los diferentes tiempos (20, 40 y 60 días), los conejos fueron sometidos a eutanasia con la finalidad de realizar enucleación para estudio histológico y evaluar la re-epitelización en

las superficie ocular. El resultado obtenido en las pruebas de inhibición microbiológica en fase líquida de la MA recubierta con AgNPs fueron que a mayor concentración de bacterias  $10^6$ , la cinética de inhibición se mostró mejor a las 3 concentraciones más altas de AgNPs (5%, 1.25% y 0.1562%), en las diez bacterias de importancia médica utilizadas en el estudio. Para evaluar los estudios histológicos y analizar el proceso de cicatrización e inflamación de la lesión se obtuvieron de las 30 piezas tratadas con TMA criopreservada con glicerol más la aplicación de AgNPs al 0.01%, mostraron 13.3% (4 piezas) de inflamación crónica grado 2 y 3.3%(1 pieza) presento inflamación crónica grado 3, tipo cuerpo extraño asociada a la sutura a los 20 días y el resto 83.3% (25 piezas) de las piezas de los 20, 40 y 60 días no se encontraron alteraciones patológicas sugestivas de inflamación, ni de cuerpo extraño.

<b>ÍNDICE.</b>	
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>1</b>
<b>1.1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>2</b>
<b>2.1 ANTECEDENTES</b>	<b>2</b>
2.1.1. Utilización de membrana amniótica	2
2.1.2. Propiedades de la membrana amniótica	4
2.1.2.1. Regula el transporte hidroelectrolítico	4
2.1.2.2. Propiedad de disminuir el crecimiento bacteriano	5
2.1.2.3. Escasa inmunogenicidad	5
2.1.2.4 Permitir una adecuada reepitelización	6
2.1.2.5. Facilita la migración de las células epiteliales	7
2.1.2.6 Evita la vascularización de la superficie corneal	8
2.1.2.7. Favorece la diferenciación de un epitelio conjuntival	8
2.1.2.8. Impide la apoptosis de las células epiteliales	9
2.1.2.9. Actúa como inhibidor de la fibrosis	9
2.1.3. Mecanismos de acción de la Membrana Amniótica	10
2.1.3.1. El epitelio amniótico	10
2.1.3.2. La membrana basal	10
2.1.3.3. La matriz estromal	10
2.1.4. Anatomía de la placenta	11
2.1.5. Estructura macroscópica	11
2.1.6. La membrana amniótica (MA) o Amnios	13
2.1.7. Formas de implantar la membrana amniótica	16
2.1.8. Estudios clínicos en donde se han utilizado la membrana amniótica humana en problemas oculares	19
2.1.9. Pterigión	22
2.1.10. Características morfológicas del ojo de conejo	24
2.2. Justificación	26
2.3. Planteamiento del problema	27
2.4 Hipótesis	27
2.5 Objetivos	28
2.5.1. Objetivo General	28
2.5.2. Objetivos Específicos	28
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>29</b>
<b>3.1 METODOLOGÍA</b>	<b>29</b>
3.1.1. Tipo de Estudio	29
3.1.2. Tamaño de la muestra	29
3.1.3. Periodo de estudio	29
3.1.4. Organización y responsabilidades	29
3.1.5. Seguridad	29
3.1.6. Consideraciones y equipamiento	30
3.1.7. Criterios generales para la selección del donante	30
3.1.8. Criterios generales para la exclusión del donante	30
3.1.9. Obtención de la membrana amniótica	30
3.1.10. Estudios de laboratorio	31

3.1.11. Extracción de la placenta	31
3.1.12. Hoja de recogida de datos	32
3.1.13. Recogida de la membrana	32
3.1.14. Mantenimiento y envío	32
3.1.15. Almacenamiento previo proceso	32
3.1.16. Control de calidad	32
3.1.17. Estudios microbiológicos	33
3.1.18. La manipulación para los procesos de disección y fragmentación	33
3.1.19. Congelación y crioprotectores	33
3.1.20. Almacenamiento de la membrana amniótica	34
3.1.21. Descongelación de la membrana amniótica	34
3.1.22. Envío de la membrana amniótica descongelada	34
3.1.23. Envío de la membrana amniótica congelada	34
3.1.24. Transporte de las muestras	34
3.1.25. Procedimientos histopatológicos	35
3.1.26. Diagrama de flujo del procedimiento	36
3.3. Método de estabulación	36
3.4. Consideraciones éticas	37
3.4.1. Aspectos éticos	37
3.4.2. Conflicto de intereses	37
3.4.3. Bioseguridad o riesgos por la donación de placenta	37
3.4.4. Transporte de las muestras	38
3.5. Preparación prequirúrgica y postquirúrgica en modelo animal	38
3.6. Estandarización de la aplicación de membrana amniótica en superficie ocular de conejo	39
3.7. Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata en MA	39
3.8. Prueba de inhibición microbiológica para cuantificar la eficacia de la membrana amniótica recubierta con nanopartículas de plata	39
3.9. Inhibición del crecimiento bacteriano determinado por el diámetro de los halos de inhibición en agar	40
3.10. Diseño estadístico	41
3.11. Análisis de las variables	41
3.12. Cambios estructurales considerados para la comparación.	42
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>43</b>
<b>4.1. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
4.1.1. Características de las donantes	43
4.1.2. Evaluación morfológica de la membrana amniótica	45
4.1.2.1. Aspectos macroscópicos	45
4.1.2.2. Aspectos microscópicos en cortes de parafina teñidos con hematoxilina-eosina	46
4.1.3. Resultados histológicos del proceso de crioconservación	47
4.1.4. Efecto de las nanopartículas de plata con MA	50
4.1.5. Resultado de la inhibición del crecimiento bacteriano determinado por el diámetro de los halos de inhibición en agar	52

4.1.6. Análisis de resultados de los estudios de halos de inhibición bacteriana	60
4.1.7. Resultados de la prueba de inhibición microbiológica por absorbancia para cuantificar la eficacia de la membrana amniótica recubierta con nanopartículas de plata	62
4.1.8 Resultados del estudio histopatológico de piezas oculares.	77
4.1.9 Resultados histológicos de TMA.	78
4.1.10 Corte histológico de la superficie ocular del control normal.	81
4.1.11 Resultados histopatológicos de la aplicación de MA en superficie ocular	82
4.1.12 Tabla de resultados histopatológicos	82
<b>CAPÍTULO V</b>	<b>85</b>
<b>5.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.</b>	<b>85</b>
5.1.1. Características de las donantes	85
5.1.2. Características macroscópicas y microscópicas de MA	85
5.1.3. Análisis histológico del proceso de crioconservación y evaluación del efecto antibacteriano de las AgNPs en MA.	86
5.1.4. Resultados del crecimiento bacteriano determinado por halo de inhibición.	86
5.1.5. Resultados de las cinéticas en fase líquida de MA recubierta con AgNPs	89
5.1.6. Resultados del TMA en superficie ocular	93
<b>CAPÍTULO VI</b>	<b>95</b>
<b>6.1. CONCLUSIÓN</b>	<b>95</b>
<b>CAPÍTULO VII</b>	<b>96</b>
<b>7.1. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>96</b>
<b>CAPÍTULO VIII</b>	<b>105</b>
<b>8.1 ANEXOS.</b>	<b>105</b>
<b>Anexo I.</b> Consentimiento informado de donación de placenta	<b>105</b>
<b>Anexo II.</b> Hoja de evaluación clínica	<b>111</b>
<b>Anexo III.</b> Historia clínica	<b>113</b>
<b>Anexo IV.</b> Ficha de extracción de tejido	<b>116</b>
<b>Anexo V.</b> Etiqueta provisional de transporte de placenta	<b>119</b>
<b>Anexo VI.</b> Bitácora de procedimiento técnico	<b>120</b>
<b>Anexo VII.</b> Etiqueta definitiva de almacenamiento	<b>121</b>
<b>Anexo VIII.</b> Evidencias fotográficas de las diferentes metodologías	<b>122</b>
<b>Anexo IX.</b> Aprobación del comité de ética e investigación del Hospital Fray Junípero Serra.	<b>132</b>
<b>Anexo X.</b> Aprobación del comité de ética e investigación de la Facultad de Medicina y Psicología de la UABC.	<b>134</b>
<b>8.2. INDICE DE TABLAS</b>	
<b>Tabla I</b> Operacionalidad de las variables según las donantes.	<b>41</b>
<b>Tabla II</b> Operacionalidad de las variables de los cambios estructurales	<b>42</b>
<b>Tabla III</b> Comparativa de halos de inhibición bacteriana.	<b>60</b>

<b>Tabla IV</b> Resultados histopatológicos.	<b>82</b>
<b>Tabla V</b> Resultados histopatológico de piezas oculares TMA con nanopartículas de plata.	<b>83</b>
<b>8.3. INDICE DE FIGURAS.</b>	
<b>Figura 1.</b> Esquema de la cara materna y fetal de la placenta.	<b>12</b>
<b>Figura 2.</b> Esquema de circulación placentaria.	<b>13</b>
<b>Figura 3.</b> Cara fetal y materna de la placenta.	<b>14</b>
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la estructura de la membrana fetal de término.	<b>15</b>
<b>Figura 5.</b> Utilización de la membrana amniótica como injerto.	<b>17</b>
<b>Figura 6.</b> Utilización de la membrana amniótica como recubrimiento.	<b>19</b>
<b>Figura 7.</b> Aspectos macroscópicos de la membrana amniótica no preservada.	<b>45</b>
<b>Figura 8.</b> Aspecto macroscópico de la membrana amniótica rehidratada.	<b>45</b>
<b>Figura 9.</b> Estructura histológica de la membrana amniótica liofilizada, teñida con H-E, vista a 4X con microscopio óptico.	<b>46</b>
<b>Figura 10.</b> Estructura histológica de la membrana amniótica liofilizada, teñida con H-E, vista a 10X con microscopio óptico.	<b>46</b>
<b>Figura 11.</b> Estructura histológica de la membrana amniótica liofilizada, teñida con H-E, vista a 40X con microscopio óptico. En donde se presenta la monocapa de células epiteliales(a), membrana basal(b) y estroma(c).	<b>47</b>
<b>Figura 12.</b> Estructura histológica de la membrana amniótica crio-conservada con glicerol más nanopartículas de plata al 0.01% a -80°C.	<b>50</b>
<b>Figura 13.</b> Membrana amniótica crio-conservada con glicerol más la aplicación de las nanopartículas de plata al 0.01%.	<b>51</b>
<b>Figura 14.</b> Membrana amniótica crio-conservada con glicerol más la aplicación de las nanopartículas de plata al 0.01%. Estudio con microscopio óptico invertido.	<b>52</b>
<b>Figura 15.</b> Membrana amniótica crio-conservada con glicerol más la aplicación de las nanopartículas de plata al 0.01% (A y B). Estudio con microscopio óptico invertido a 10X.	<b>52</b>
<b>Figura 16.</b> Se muestran la figura de la bacteria <i>Escherichia coli</i> y sus halos de inhibición.	<b>53</b>
<b>Figura 17.</b> Se muestran la figura de la bacteria <i>Salmonella spp</i> y sus halos de inhibición.	<b>54</b>
<b>Figura 18.</b> Se muestran la figura de la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> y sus halos de inhibición.	<b>55</b>
<b>Figura 19.</b> Se muestran la figura de la bacteria <i>Klebsiella pneumoniae</i> y sus halos de inhibición.	<b>55</b>
<b>Figura 20.</b> Se muestran la figura de la bacteria <i>Listeria monocytogenes</i> y sus halos de inhibición.	<b>56</b>
<b>Figura 21.</b> Se muestran la figura de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> y sus halos de inhibición.	<b>57</b>

<b>Figura 22.</b> Se muestran la figura de la bacteria <i>Staphylococcus epidermidis</i> y sus halos de inhibición.	<b>57</b>
<b>Figura 23.</b> Se muestran la figura de la bacteria <i>Streptococcus pyogenes</i> y sus halos de inhibición.	<b>58</b>
<b>Figura 24.</b> Se muestran la figura de la bacteria <i>Enterococo fecalis</i> y sus halos de inhibición.	<b>59</b>
<b>Figura 25.</b> Se muestran la figura de la bacteria <i>Candida albicans</i> y sus halos de inhibición.	<b>59</b>
<b>Figura 26.</b> Estructura histológica de la membrana amniótica aplicada en la superficie ocular, clasificada como categoría I, teñida con H-E vista a 4X(A), 10X(B) y 40X(C).	<b>78</b>
<b>Figura 27.</b> Estructura histológica de la membrana amniótica aplicada en la superficie ocular, clasificada como categoría II, teñida con H-E vista a 4X(A), 10X(B) y 40X(C).	<b>79</b>
<b>Figura 28.</b> Estructura histológica de la membrana amniótica aplicada en la superficie ocular, clasificada como categoría III, teñida con H-E vista a 4X(A), 10X(B) y 40X(C).	<b>80</b>
<b>Figura 29.</b> Corte histológico de superficie ocular de ojo normal observado con lente 4X.	<b>81</b>
<b>Figura 30.</b> Corte histológico de superficie ocular de ojo normal observado con lente 10X.	<b>81</b>
<b>8.3. INDICE DE GRÁFICAS.</b>	
<b>Gráfica 1.</b> Edad de las donantes.	<b>43</b>
<b>Gráfica 2.</b> Ocupación laboral de las donantes.	<b>43</b>
<b>Gráfica 3.</b> Grupo étnico de las donantes.	<b>44</b>
<b>Gráfica 4.</b> Semanas de embarazo al parto de las donantes.	<b>44</b>
<b>Gráfica 5.</b> Se presenta tres gráficas de las cinéticas de inhibición microbiana en fase líquida con <i>Escherichia coli</i> a diferentes concentraciones ( <b>A</b> de $10^2$ , <b>B</b> de $10^4$ y <b>C</b> de $10^6$ ).	<b>63</b>
<b>Gráfica 6.</b> Se presenta tres gráficas de las cinéticas de inhibición microbiana en fase líquida con <i>Salmonella spp</i> a diferentes concentraciones ( <b>A</b> de $10^2$ , <b>B</b> de $10^4$ y <b>C</b> de $10^6$ ).	<b>64</b>
<b>Gráfica 7.</b> Se presenta tres gráficas de las cinéticas de inhibición microbiana en fase líquida con <i>Pseudomona aeruginosa</i> a diferentes concentraciones ( <b>A</b> de $10^2$ , <b>B</b> de $10^4$ y <b>C</b> de $10^6$ ).	<b>66</b>
<b>Gráfica 8.</b> Se presenta tres gráficas de las cinéticas de inhibición microbiana en fase líquida con <i>Klebsiella pneumoniae</i> a diferentes concentraciones ( <b>A</b> de $10^2$ , <b>B</b> de $10^4$ y <b>C</b> de $10^6$ ).	<b>68</b>
<b>Gráfica 9.</b> Se presenta tres gráficas de las cinéticas de inhibición microbiana en fase líquida con <i>Listeria monocytogenes</i> a diferentes concentraciones ( <b>A</b> de $10^2$ , <b>B</b> de $10^4$ y <b>C</b> de $10^6$ ).	<b>70</b>
<b>Gráfica 10.</b> Se presenta tres graficas de las cinéticas de inhibición microbiana en fase líquida con <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes concentraciones ( <b>A</b> de $10^2$ , <b>B</b> de $10^4$ y <b>C</b> de $10^6$ ).	<b>72</b>

<b>Gráfica 11.</b> Se presenta tres graficas de las cinéticas de inhibición microbiana en fase liquida con <i>Staphylococcus epidermidis</i> a diferentes concentraciones ( <b>A</b> de $10^2$ , <b>B</b> de $10^4$ y <b>C</b> de $10^6$ ).	<b>73</b>
<b>Gráfica 12.</b> Se presenta tres graficas de las cinéticas de inhibición microbiana en fase liquida con <i>Streptococcus pyogenes</i> a diferentes concentraciones ( <b>A</b> de $10^2$ , <b>B</b> de $10^4$ y <b>C</b> de $10^6$ ).	<b>75</b>
<b>Gráfica 13.</b> Se presenta tres graficas de las cinéticas de inhibición microbiana en fase liquida con <i>Enterococcus faecalis</i> a diferentes concentraciones ( <b>A</b> de $10^2$ , <b>B</b> de $10^4$ y <b>C</b> de $10^6$ ).	<b>75</b>
<b>Gráfica 14.</b> Se presenta tres graficas de las cinéticas de inhibición microbiana en fase liquida con <i>Candida albicans</i> a diferentes concentraciones ( <b>A</b> de $10^2$ , <b>B</b> de $10^4$ y <b>C</b> de $10^6$ ).	<b>76</b>



## **CAPÍTULO I**

### **1.1. INTRODUCCIÓN**

La utilización de tejidos derivados de la placenta es una técnica que se ha venido haciendo desde hace más de 90 años para el tratamiento de diversas enfermedades cutáneas y mucosas. En la actualidad, dentro de la moderna cirugía oftalmológica el trasplante de membrana amniótica es un procedimiento quirúrgico en expansión, en el que sus indicaciones son cambiantes, estando posiblemente muchas de ellas aún por definir. La literatura muestra un aumento exponencial de publicaciones científicas relacionadas con diversos aspectos de la utilización del trasplante de membrana amniótica en oftalmología desde mediados de los años 90. Una búsqueda bibliográfica que incluya “amniotic membrane transplantation” en el PubMed arroja un resultado de 2061 referencias hasta el 6 de octubre del 2017. Este creciente interés puede ser debido a una mayor disponibilidad de la membrana amniótica, a una creciente percepción de sus posibilidades en el terreno de la cirugía oftálmica y a una lista de indicaciones que cada vez es mayor. Tampoco es ajeno el hecho de que la mayor parte de sus indicaciones son enfermedades con muy mal pronóstico para la función visual, en las que no existen terapéuticas alternativas y que debido a su gravedad justifican el tomar medidas extremas. No sólo las indicaciones quirúrgicas se encuentran sometidas a constante revisión. La técnica quirúrgica también constituye un punto en evolución para determinar la mejor forma de implantar el fragmento de membrana en cada entidad clínica, para que garantice una adecuada permanencia y proporcione todas las propiedades de la membrana amniótica.

## **CAPÍTULO II**

### **2. 1. ANTECEDENTES**

#### **2.1.1. Utilización de la membrana amniótica**

Los intentos racionales de utilizar la parte más interna del amnios, es decir, la membrana amniótica (MA) en Medicina, han sido realizados desde hace dos siglos, y no exclusivamente por parte de la Oftalmología. Se ha estimado que para tratar a un paciente con quemaduras de segundo o tercer grado en el 50% del organismo se necesitan del orden de 6000 cm<sup>2</sup> de piel (1), tal cantidad probablemente no esté disponible con la rapidez que se requiere para el manejo de una quemadura extensa de tercer grado, y de ahí la necesidad de investigar la posibilidad de disponer de otros tejidos alternativos. Hace más de cien años comenzaron los intentos con tejidos homólogos y, posteriormente, heterólogos. En 1890, Ivanova(2) publica un artículo donde realiza trasplantes de piel fetal a un gran quemado, abogando por la utilización de tejidos jóvenes dado que poseerían una mayor vitalidad.

En 1910, Davis(3) comunica el primer intento de injertar fragmentos de la capa más interna del saco amniótico con el fin de favorecer la granulación de una herida abierta. Dos años más tarde es tratado con membrana amniótica el primer gran quemado(4). En todos los casos nos encontramos ante soluciones de emergencia dado que estos fragmentos de membrana eran sólo provisionales, necesitaban ser cambiados cada pocos días y eran retirados en cuanto se disponía de otro tejido dado que se creía que podían inducir rechazo.

Este temor era lógico en aquel momento ya que la mayor parte de autores utilizaban la membrana amniótica adherida al corion y, por tanto, no es la membrana basal a celular que utilizamos en nuestros días. Desde ese momento los tejidos placentarios humanos (y bovinos en casos aislados) han sido utilizados de muy diversas formas por diferentes especialidades médicas(5). Aunque el uso de MA en la reparación quirúrgica de defectos cutáneos data de comienzos del siglo XX (6), no se describe su

uso en Oftalmología sino hasta 1940 cuando De Rotth(7) utilizó el amnios y el corion frescos como implante para la reconstrucción de la superficie ocular.

Posteriormente, Sorsby y colaboradores(8) usaron con éxito la amnioplastina, MA procesada químicamente, como recubrimiento temporal en el tratamiento de quemaduras químicas oculares. A pesar de los buenos resultados obtenidos por Sorsby en 1947, por razones desconocidas, durante un período de casi 50 años no se publicaron nuevos trabajos utilizando la MA, probablemente debido a la escasez de conservantes adecuados. Los precursores de los injertos de membrana amniótica con el fin de sustituir a otro tejido o cubrir un defecto epitelial practicaban la “histioterapia”, situando tejidos placentarios a nivel periocular en el tratamiento de diversas enfermedades. Los autores que practicaban este procedimiento se basaban en la observación de Filatov en 1933 de que una córnea dañada sometida a una queratoplastia penetrante mejoraba su transparencia en la región adyacente al injerto. Este autor lo atribuyó al hecho de que en condiciones límite los tejidos producirían factores capaces de estimular el crecimiento, unas “estimulinas biogénicas” que serían algo parecido al último suspiro que emiten las células antes de morir. De todos los tejidos disponibles en ese momento, el que más fácilmente se encontraba en condiciones similares a las descritas, era la placenta, y de esta forma se inició la terapia tisular: la placenta era conservada durante quince días en frío, posteriormente esterilizada y troceada en pequeños fragmentos que se introducían bajo la conjuntiva. Si hemos de considerar las numerosísimas publicaciones españolas y extranjeras de los años 30-50 se consiguieron verdaderos milagros, consiguiendo la curación de enfermedades como el tracoma, queratitis tuberculosa, corioretinosis miópica, atrofia de nervio óptico y retinosis pigmentaria. A nivel general tampoco eran “despreciables” los efectos obtenidos: se aliviaban las cefaleas, se producía un aumento de peso, se solucionaba la esterilidad masculina o, lo más importante, aumentaba la predisposición para el trabajo(9). La utilización de extractos placentarios en el área cosmética ha seguido en pleno auge, y el extracto de placenta liofilizado para utilización tópica oftalmológica aún estaba disponible hasta no hace muchos años. En literatura se siguen encontrando comunicaciones sobre la escleroplastia con tejidos amnióticos o del cordón umbilical en el tratamiento de la miopía progresiva(10,11,12).

Sin embargo, y de una forma paralela, en la mente de algunos oftalmólogos comenzó a germinar la idea de sustituir la conjuntiva dañada por placenta. Al ser considerada la placenta demasiado gruesa como para poder sustituir a una capa tan fina como era la conjuntiva se optó por prescindir del corion, implantándose únicamente el amnios. Esta técnica fue utilizada en los años 50 en el tratamiento de la queratitis tuberculosa, pterigión y en algunos casos de simbléfaron. Su utilización se basaba en la facilidad de obtención comparada con la mucosa labial que hasta ese momento se había utilizado. Sin embargo, la llegada de nuevos tratamientos médicos arrinconó este procedimiento prácticamente hasta nuestros días. En 1995, Kim y Tseng(13) comenzaron sus experimentos con MA para la reconstrucción de la superficie ocular de ojos de conejo severamente dañados con n-heptanol y queratectomía lamelar limbar asociada, para provocar una deficiencia limbar total. Demostraron en sus trabajos que el 40% de las córneas de conejo con deficiencia total de las células madre limbares podían reconstruirse reemplazando la superficie ocular “conjuntivalizada” con una MA humana crioconservada. Desde entonces se han publicado un gran número de artículos con un gran espectro de indicaciones oftalmológicas, generalizando así su utilización.

### **2.1.2. Propiedades de la membrana amniótica**

El origen y composición de la membrana amniótica son muy determinantes a la hora de definir los mecanismos que permiten que la MA sea utilizada en tan diferentes aplicaciones. Entre las propiedades de la MA que determinan su utilidad se encuentran las siguientes:

#### **2.1.2.1. Regula el transporte hidroelectrolítico**

Ésta es una propiedad que hace a la membrana amniótica altamente interesante en el tratamiento de los grandes quemados pero que en oftalmología pierde gran parte de su importancia dado el mínimo tamaño del injerto con respecto a la superficie ocular total. Ya previamente hemos comentado que se trata de un tejido metabólicamente muy activo que regula la composición del líquido amniótico y produce gran variedad de compuestos activos (hormonas, factores de crecimiento y citoquinas).

### **2.1.2. 2. Propiedad de disminuir el crecimiento bacteriano**

Una de las utilidades más frecuentes de la membrana amniótica en Oftalmología es el recubrimiento de defectos epiteliales corneales persistentes donde el evitar una infección sobreañadida es fundamental. En un estudio experimental, Rao y Chandrasekharam(14) provocaron quemaduras profundas en animales de experimentación y cinco días más tarde se realizó escarectomía y aposición de membrana amniótica sobre la mitad de la herida. Cultivos posteriores de la zona situada bajo la membrana fueron negativos a crecimiento bacteriano, mientras los realizados en la zona descubierta mostraron amplia variedad de gérmenes. Robson y Krizek(15) han demostrado recuentos bacterianos menores en aquellas heridas que habían sido inoculadas con *P. aeruginosa* y recubiertas con membrana amniótica, que en aquellas recubiertas con injertos de piel o descubiertas. Dado que estos autores no han podido demostrar en el tejido amniótico la presencia de un factor con actividad bacteriostática o bactericida, postulan que el cierre biológico de la herida con una más rápida instauración de un tejido de granulación bien vascularizado favorece la llegada de leucocitos y la eliminación de restos necróticos. Aunque este mismo experimento no ha sido (hasta donde se tiene conocimiento) realizado en córneas de animales de experimentación, se puede avanzar que el resultado podría diferir dado que la respuesta reparadora que sucede tras un daño corneal es sustancialmente diferente del que sucede en la piel y tejidos blandos. Otra duda es saber si los factores antibacterianos presentes en el líquido amniótico (lisozima, fundamentalmente)(16) son formados por el amnios o provienen de la madre.

### **2.1. 2. 3. Escasa inmunogenicidad**

De las dos partes en que se dividen las membranas fetales (amnios y corion) es conocido que la membrana amniótica se forma a partir del ectodermo fetal, por lo que un embarazo es en realidad un injerto. El cómo es posible que un feto llegue a término sin ser rechazado es realmente difícil de comprender y puede obedecer a dos factores. Por una parte se ha podido constatar un cierto grado de inmunodepresión de la madre durante el embarazo, y por otra parte los tejidos fetales en contacto con los maternos

se cree que es por la falta de vasos sanguíneos y linfáticos y ausencia de determinados antígenos.

Estas características le permiten al feto llegar a feliz término, estas características pueden ser las mismas que nos permitan utilizar la membrana amniótica en Oftalmología o sin la necesidad perentoria en otro tipo de trasplantes como es el limbar o la queratoplastia penetrante: la inmunosupresión del paciente. Adinolfi y colaboradores(17) demostraron con cultivos celulares de epitelio de la membrana amniótica que los antígenos de histocompatibilidad HLA 1, B, C y DR no pueden ser detectados en estas células con las técnicas de inmunofluorescencia habitualmente utilizadas. Sí se puede detectar una proteína relacionada con la  $\beta$ 2-microglobulina, cuya secuencia es casi idéntica al HLA-G, gen del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I aislado a partir de una línea de células B malignas y que se creía que no se expresaba en ningún tejido humano sano(18). El hecho de que la expresión de esta proteína sea máxima al principio del embarazo y baje posteriormente añadido al hecho de que no se haya podido encontrar en ningún tejido humano, apoya la hipótesis de que el trofoblasto es un tejido antigénicamente inmaduro y, tal vez, incapaz de provocar una reacción de rechazo. De forma experimental se implantaron injertos de membrana amniótica a seis voluntarios, dos de los cuales habían rechazado previamente injertos de piel. La región del implante fue extraída y examinada sin que se encontraran datos de reacción inmunológica. Las muestras de suero extraídas un mes más tarde no mostraron reactividad contra células del epitelio amniótico cultivadas *in vitro*(19). Sin embargo, una comunicación reciente nos alerta sobre una posible reacción de hipersensibilidad con formación de hipopión tras trasplantes repetidos de membrana amniótica procedente de la misma donante que se resolvieron con la utilización de esteroides tópicos, y sugiere utilizar membrana amniótica procedente de distintos donantes si es necesario el retrasplante con el fin de minimizar el riesgo de inflamación postoperatoria inmediata(20).

#### **2.1. 2. 4. Permitir una adecuada reepitelización**

De todas las propiedades que posee la MA, probablemente está sea la más importante y la que permite que su utilización sea hoy tan popular en Oftalmología.

Numerosos autores han utilizado diferentes membranas basales y han llegado a la conclusión de que favorecen una epitelización más rápida. La membrana no es otra cosa que una capa de células epiteliales asentadas sobre un tejido constituido por sustancia fundamental (matriz extracelular, membrana basal). Se ha visto que la membrana amniótica expresa mRNA de gran número de factores de crecimiento (EGF, KGF, HGF y bFGF) que pueden favorecer la reepitelización tras su trasplante, tanto si lleva células como si no, aunque las cantidades de factores de crecimiento son significativamente mayores cuando el epitelio está adherido a la membrana, que sugiere un origen epitelial para estos factores de crecimiento<sup>17</sup>. Se ha demostrado que el cultivo de fibroblastos en presencia de una matriz de membrana amniótica reduce la expresión de TGF $\beta$ , así como las señales intercelulares vía CD44, integrina b1 y FGFR1/flg(21).

El resultado final conforma un fenotipo menos mitogénico, contráctil y fibrogénico que podría explicar en parte el efecto inhibitor de la cicatrización que la membrana amniótica presenta cuando es utilizada en la reconstrucción de la superficie ocular. Este mismo resultado ha sido conseguido por otros autores(22), que también comunican una supresión del receptor de TGF $\beta$  tipo II y de la diferenciación a miofibroblastos de un cultivo de fibroblastos corneales y limbares en presencia de una matriz de membrana amniótica. Algunos autores(23) otorgan a la membrana amniótica una actividad inhibitora de la proteinasa que podría ser útil en el desarrollo de agentes para el tratamiento de queratitis recidivantes. Asimismo, se ha detectado en el estroma de la membrana amniótica criopreservada tinción positiva para los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, agentes con conocido efecto antiangiogénicos y antiinflamatorio(24).

#### **2.1.2.5. Facilita la migración de las células epiteliales**

En el trabajo experimental de Kim y Tseng se aprecia que tras el trasplante de membrana amniótica (TMA) algunos ojos (desafortunadamente no todos) experimentan una progresiva epitelización con una superficie relativamente transparente y escasa vascularización. Dado que las células limbares y corneales habían sido previamente eliminadas, se puede afirmar que las células que cubren la membrana amniótica derivan

del epitelio conjuntival. Estudios previos realizados en otros órganos(25) ya habían llegado a la conclusión de que la presencia de una membrana basal favorece la migración de células epiteliales. Esta labor facilitadora del crecimiento y migración de las células epiteliales se ve facilitado en gran medida si la superficie de la membrana amniótica es denudada previamente de sus propias células epiteliales, como han demostrado Koizumi y colaboradores(26). Sin embargo, los mecanismos moleculares de esta acción favorecedora de la epitelización son todavía el gran desconocido. Recientemente, Yeh y colaboradores(27) han descrito una glicoproteína derivada de la membrana amniótica humana, el Lumican, que administrada de forma soluble a tejidos corneales de animales de experimentación es capaz de favorecer la proliferación y migración de las células epiteliales, permitiendo una cicatrización más rápida de las heridas.

#### **2.1.2.6. Evita la vascularización de la superficie corneal**

Una de las características más comunes de la gran mayoría de trabajos consultados (entre ellos el trabajo experimental de Tseng sobre el efecto inhibitor de la vascularización corneal que tiene el TMA en ojos de animal de experimentación)(28) es la coincidencia en destacar la menor vascularización e incluso la ausencia de vascularización de la córnea en comparación con los ojos no sometidos a TMA. La propia avascularidad de la membrana amniótica podría ser determinante, dado que podría reducir los tejidos de granulación vascularizados y las cicatrices en el postoperatorio. Algunos autores han identificado proteínas que se comportarían como agentes antiangiogénicos en la membrana amniótica humana(29). Estudios posteriores realizados por Kobayashi y colaboradores han demostrado la inhibición de la migración y crecimiento de células endoteliales de cordón umbilical tras la administración de un extracto de membrana amniótica obtenido tras su digestión con colagenasas(30), lo cual sugiere que su administración podría ser útil en las enfermedades corneales que cursan con neovascularización.

#### **2.1.2.7. Favorece la diferenciación de un epitelio conjuntival**

El epitelio conjuntival es típicamente negativo para los marcadores AE5 y AK2 (dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra componentes específicos de la

queratina) y positivo para el AM3 (que identifica las proteínas glicosiladas de las células caliciformes, habitualmente presentes en la conjuntiva pero ausentes del epitelio conjuntival) mientras el epitelio corneal presenta unas características tintoriales totalmente diferentes (positivas para AE5 y AK2 y negatividad para AM3). En el trabajo experimental de Kim y Tseng(31) las córneas no sometidas a TMA mostraban un fenotipo típicamente conjuntival, mientras aquellas córneas en las que el resultado fue mejor captaban los anticuerpos AE5 y AK2 sugiriendo presencia de subunidades de queratina y, por tanto, instauración de un fenotipo corneal, aunque estas circunstancias pueden no ser exactas dada la posibilidad de reacción cruzada de esos anticuerpos con otras subunidades proteicas. Sin embargo, la conclusión que resulta fácil extraer es que en determinadas condiciones ambientales el epitelio conjuntival es capaz de modificarse produciendo queratina a semejanza del epitelio corneal. Sin embargo, estudios posteriores realizados en humanos mediante citología de impresión(32) señalan el hecho de que el epitelio presente sobre la membrana amniótica no es un epitelio corneal sino que continúa teniendo células caliciformes y que se trata, por lo tanto, de un epitelio conjuntival. No existiría, por lo tanto, una transdiferenciación de epitelio conjuntival a otro corneal. Otros autores han cultivado fragmentos conjuntivales y células epiteliales corneales sobre membrana amniótica, habiendo podido demostrar al final del mismo que los marcadores inmuno-histoquímicos de ambos tejidos permanecen sin cambios(33).

#### **2.1.2.8 Impide la apoptosis de las células epiteliales**

Estudios en diferentes órganos han demostrado que la presencia de una membrana basal(34) o de una matriz extracelular(35) es capaz de evitar la apoptosis de las células epiteliales rescatándolas hacia un nuevo ciclo celular.

#### **2.1.2.9 Actúa como inhibidor de la fibrosis**

Se ha demostrado que la membrana amniótica ejerce una regulación sobre las señales que activan la secreción de factores de crecimiento, responsables de la activación fibroblástica en el proceso de cicatrización de las heridas(36). Estudios muy recientes de Kim y colaboradores(37) sugieren que la utilización de un extracto de membrana amniótica sobre una base oleosa reduce la migración de polimorfonucleares,

la apoptosis de queratocitos y la peroxidación lipídica en ojos de animales de experimentación sometidos a PRK, lo cual puede sugerir que su aplicación puede ser útil en aquellos procesos que cursan con cicatrización ocular importante. El mecanismo de acción por el que consigue este efecto no es del todo conocido. La MA constituye una capa continua de colágeno sobre la esclera que podría actuar como barrera mecánica ante la formación de fibrosis. Por otro lado, los diferentes factores de crecimiento producidos en las células epiteliales de la MA podrían ser los responsables de la modulación de la proliferación y diferenciación de los fibroblastos estromales y conjuntivales, así como la inhibición de la señal de beta-TGF(38), limitando el proceso de formación de cicatrices. Además, parece que la MA promueve la epitelización normal y el paso de citoquinas entre las células epiteliales y estromales, que podrían ser las responsables de inhibir la formación de tejido fibrótico(39).

### **2.1.3. Mecanismo de acción de la Membrana Amniótica**

Los mecanismos de acción potenciales del trasplante de MA se encuentran relacionados con los factores de moléculas que sintetiza y secreta en las diferentes capas.

#### **2.1.3.1. El epitelio amniótico**

Contiene gran cantidad de factores de crecimiento y citoquinas que mantienen el microambiente necesario para la proliferación de las células germinales.

#### **2.1.3.2 La Membrana basal**

Contiene colágeno tipo IV, laminina 1, laminina 5, fibronectina y colágeno VII. Su composición es muy similar a la de la conjuntiva y las lamininas son particularmente efectivas en mejorar la adhesión de las células epiteliales de la córnea. En general la membrana basal de la MA facilita la migración de las células epiteliales, refuerza las adhesiones de las células epiteliales basales, promueve la diferenciación epitelial y previene la apoptosis.

#### **2.1.3.3 La matriz estromal**

La porción estromal de la MA contiene un componente de la matriz que suprime la señalización mediante el TGF-beta, así como la proliferación y diferenciación de los miofibroblastos de la córnea humana normal y de los fibroblastos del limbo. Este

componente también suprime la proliferación y diferenciación de los fibroblastos de la conjuntiva normal y de los fibroblastos del cuerpo del pterigión. Estas acciones explican por qué el trasplante de MA reduce la formación de cicatrices cuando se utiliza en la reconstrucción de la superficie conjuntival, previene la cicatrización recidivante tras la resección del pterigión y reduce la opacidad estromal tras la queratectomía fototerapéutica y la queratectomía fotorefractiva. La matriz estromal puede también atrapar las células inflamatorias excluyéndolas del resto de los tejidos y llevándolas a una rápida apoptosis. También contiene proteínas antiinflamatorias y antiangiogénicas y sustancias inhibitoras de varias proteasas. Estas propiedades explican por qué la inflamación estromal y la neovascularización corneal se reducen tras el trasplante de MA.

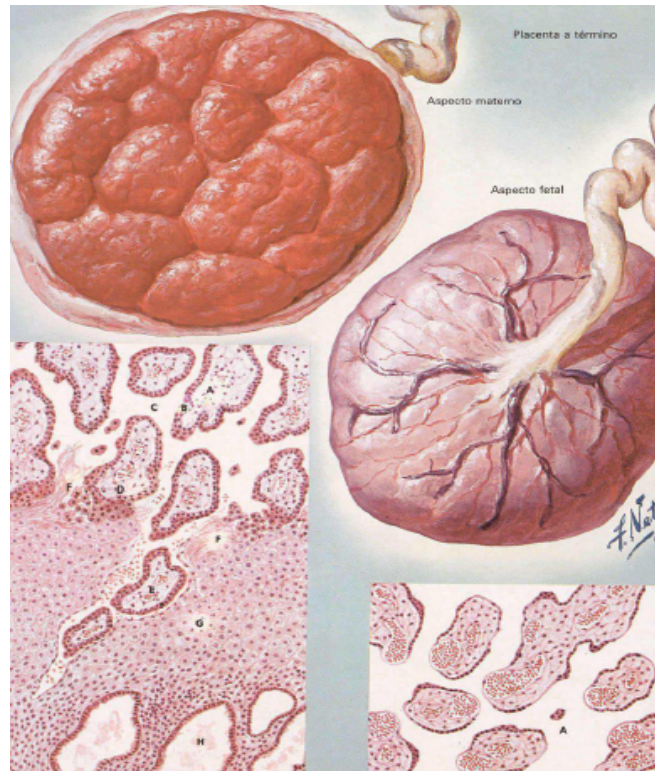
#### **2.1.4. Anatomía de la placenta humana**

La placenta es un órgano muy especializado, característico de los mamíferos superiores, que interviene de forma decisiva en la nutrición del feto así como en la regulación de su crecimiento y de su metabolismo durante los 9 meses de una gestación normal.

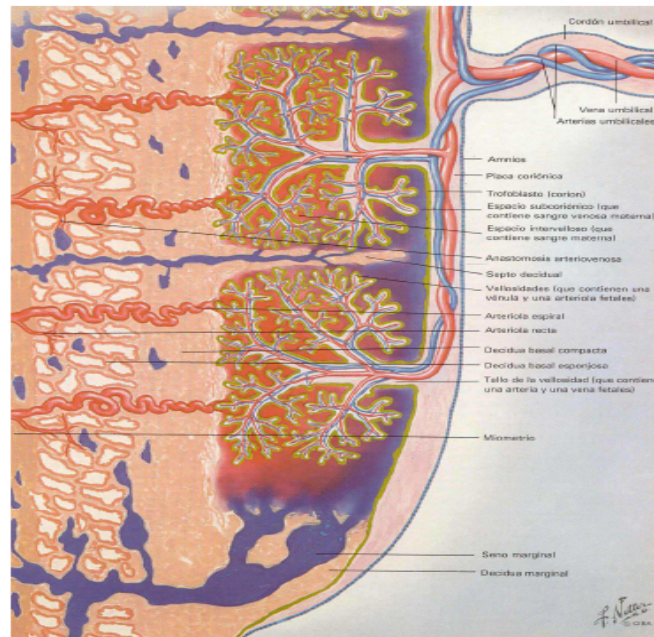
#### **2.1.5. Estructura macroscópica**

La placenta madura es un órgano de forma discoide, que tiene un diámetro aproximado de 15 a 20 cm y un espesor de 1,5 a 2,5 cm, con un peso promedio de 500-600 gramos. Se extiende sobre la cuarta o quinta parte de la cavidad uterina. En ella se distinguen dos caras (Figura 1) una materna y otra fetal en la que se inserta el cordón umbilical. La longitud de éste suele ser de 50 cm como término medio, si bien puede oscilar entre 25 y 150 cm. La cara fetal, orientada hacia la cavidad amniótica, está tapizada por el amnios, una membrana delgada, lisa y brillante que permite reconocer los vasos sanguíneos que recorren la lámina coriónica, y que son continuación de los vasos del cordón umbilical, que se inserta en el centro de dicha cara. Al final del embarazo dicho cordón tiene una longitud media de 50 cm y un diámetro entre 1 y 1.5 cm. En él hay dos arterias y una vena que poseen una musculatura propia y están rodeadas de un tejido mesenquimatoso, denominado gelatina de Wharton. La cubierta del cordón está formada por el amnios, y junto con la gelatina de Wharton, favorece la

circulación sanguínea por los vasos del cordón (Figura 2). Por la cara materna, la placenta se une al útero. Si se examina después del parto, esta cara tiene un color rojizo y un aspecto sangrante, y en ella se comprueba la existencia de surcos intercotiledóneos que son el resultado de la rotura de los tabiques placentarios durante el desprendimiento placentario. Dichos surcos dividen la superficie de la placenta en 15 a 20 lóbulos placentarios.



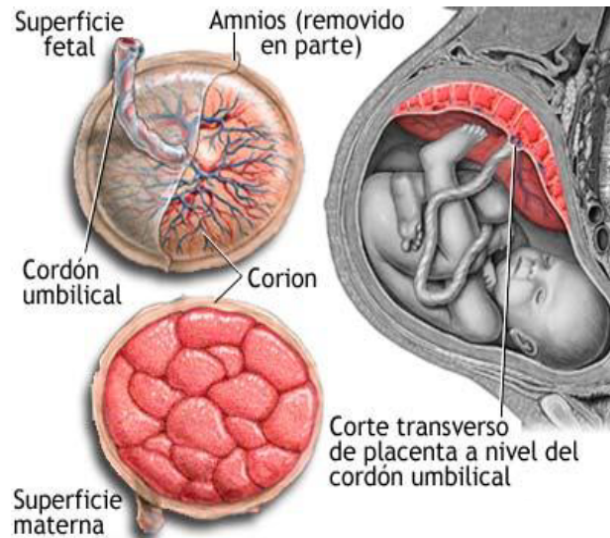
**Figura 1.** Esquema de la cara materna y fetal de la placenta.



**Figura 2.** Esquema circulación placentaria.

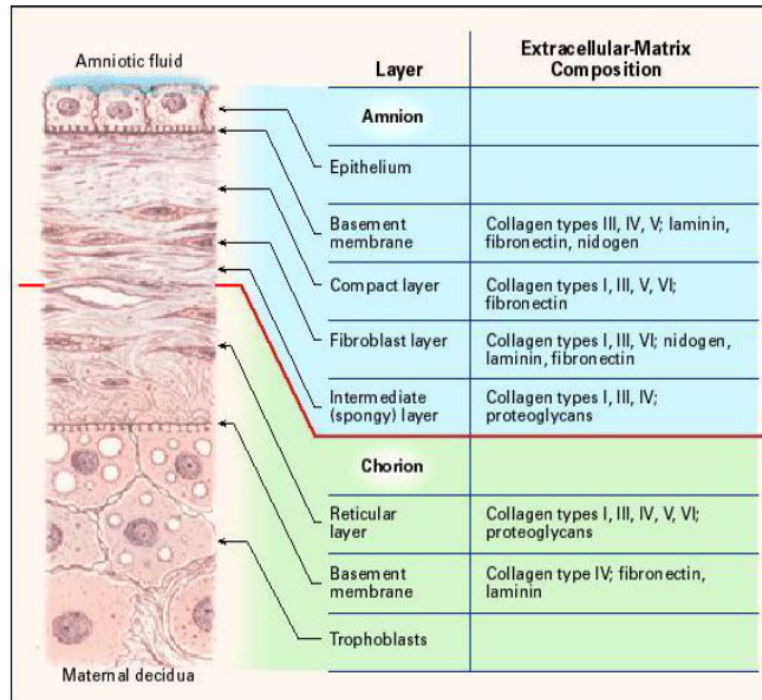
### 2.1.6. La Membrana Amniótica (MA) o Amnios

Es la capa más interna de la placenta, la cual es una estructura de origen feto-materno, de forma discoidea, que a término mide aproximadamente 15 a 20 cm. de diámetro, 2 a 3 cm de espesor y pesa 500 a 600 g. Tiene dos caras: una, de origen fetal, orientada hacia la cavidad amniótica, llamada placa coriónica e integrada por el amnios y el corion, y otra, la placa basal, formada por las deciduas (basal y parietal) de origen materno(40) (Figura 3).



**Figura 3.** Cara fetal y materna de la placenta.

Conjuntamente con el corion, la MA se extiende más allá de los márgenes del disco placentario para envolver al feto en la cavidad amniótica, brindarle protección durante su desarrollo y ofrecerle un ambiente de suspensión en el cual pueda crecer sin distorsión por presión de las estructuras que lo rodean. Ambas membranas facilitan el intercambio de gas y desechos y juegan un papel crítico como barrera de defensa contra infecciones, traumas y toxinas(41). La MA a término tiene una superficie de aproximadamente 700 a 1800 cm<sup>2</sup>, un peso de 15 a 35 g y un espesor que varía de 70 a 180  $\mu$ m, según las gestantes y las diversas regiones del amnios. Es una membrana translúcida compuesta por el epitelio amniótico, la lámina basal, un estroma de tejido conectivo a-vascular denominado mesodermo amniótico en el que se distinguen dos partes, una a-celular y otra celular, y finalmente por una capa esponjosa que la separa del corion(42) (Figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática de la estructura de las membranas fetales a término. Fuente: Tomado de Niknejad y col (2008).

El epitelio amniótico forma un tapizado simple, continuo, ininterrumpido, de células cilíndricas, cuboides o planas, en contacto con el líquido amniótico. Reposa sobre una lámina basal bien definida, compuesta de una malla de fibras de colágenos tipo III y IV, y glicoproteínas (lamininas, nidogen y fibronectina). Su cara interna guarda una relación compleja con las células epiteliales, dado que pequeños salientes romos y cortos del polo basal de dichas células se inter-digitan con procesos similares de la lámina basal. Su cara externa está conectada con el mesoderma amniótico, en cuya parte más proximal se distingue una capa compacta, acelular, relativamente densa, probablemente la más fuerte de todas las capas amnióticas, compuesta de fibronectina, colágeno intersticial tipo I y III dispuestos en forma de haces paralelos, y colágeno tipo V y VI que forman conexiones filamentosas entre el colágeno intersticial y la membrana basal. Por fuera de ésta se encuentra una capa dispersa de células estromales de tipo fibroblastos y escasos macrófagos, embebidos en una malla de fibras reticulares. Más externamente, se encuentra una capa muy variable en espesor, que es la capa

intermedia o esponjosa rica en elastina, proteoglicanos hidratados (especialmente perlecan), glicoproteínas que absorben agua, y fibras de colágeno predominantemente tipo III organizadas laxamente, que separa el amnios del corion(43). El amnios es uno de los pocos tejidos que carece de nervios, músculos y vasos linfáticos. Sus nutrientes son suplidos directamente por difusión desde el líquido amniótico y/o desde la decidua subyacente.

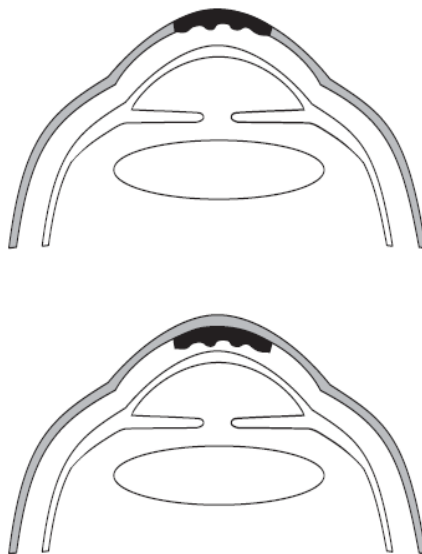
Se ha señalado que existen algunas diferencias en la estructura del amnios de acuerdo a su región: amnios placentario (ubicado sobre la placa coriónica), amnios libre (amnios de la membrana fetal extra-placentario) y amnios umbilical (que recubre la superficie del cordón umbilical) (42). Las células epiteliales del amnios placentario tienden a ser más cilíndricas que las del amnios libre y el estroma un poco más ancho. Estas diferencias, según algunos investigadores tienen implicaciones biológicas. En un estudio reciente(44) se ha demostrado que la síntesis de prostaglandinas, la liberación de citoquinas proinflamatorias y el perfil de expresión de genes, durante el trabajo de parto y fuera de él, fue diferente en el amnios placentario y el amnios libre. Con base a ello, los autores afirman que la estructura del amnios juega un papel importante no solo para mantener el embarazo, sino también para el inicio del parto(44). La falta de homogeneidad en la estructura del amnios se ha señalado también como causa de la ruptura de las membranas observada en los embarazos a término. Esta ruptura se considera que ocurre de forma controlada en una zona de morfología alterada dentro del sitio del desgarro, donde la apoptosis de las células amnióticas y la inducción de una gelatinasa específica: metaloproteinasa (MMP-9) y de colagenasa conduce a la degradación del colágeno fibrilar y con ello a la ruptura de la MA, lo que generalmente desencadena las contracciones uterinas y el trabajo de parto(43). La ocurrencia anticipada de este fenómeno se tiene como causa de la entidad clínica denominada Ruptura Prematura de Membranas.

#### **2.1.7. Formas de implantar la membrana amniótica**

Se han descrito dos formas de implantar la MA(45): como injerto o como recubrimiento, según el objetivo deseado porque tiene comportamiento e indicaciones

diferentes. Según el lado por el que se implante la membrana amniótica, se puede utilizar como «parche biológico» si se utiliza por su cara epitelial (no adhesiva, rica en citoquinas inmunomoduladores y factores de crecimiento epitelial) o como injerto «suministrador de tejido» si es por su cara estromal (rica en lamininas de colágeno).

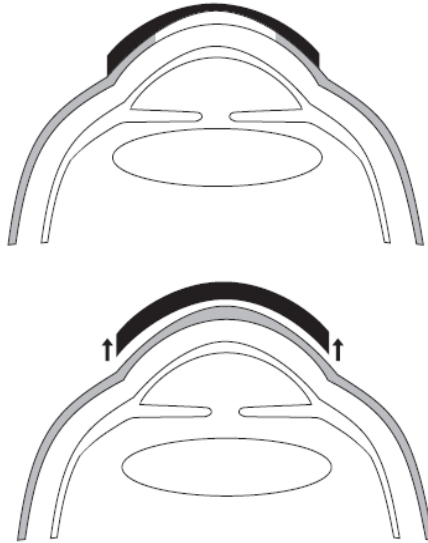
En los casos que se usa como injerto el objetivo es emplear la MA, aprovechando su gruesa membrana basal como soporte que favorezca la epitelización rápida. Además, proporciona una reducción de la inflamación, de la vascularización y de la formación de cicatrices. Para ello recortamos un fragmento de MA del tamaño adecuado y lo depositamos en el interior del lecho ulceroso o defecto estromal (Figura 5). Al encontrarse destruida o inexistente la membrana basal del epitelio corneal en el seno del lecho ulceroso, dificulta el proceso de reparación fisiológico de las heridas corneales, dando lugar al fenómeno anómalo de reparación, de conjuntivización corneal. Así, las células sanas del borde de la herida tendrán un soporte (la membrana) sobre el que replicarse centrípetamente hasta “cerrar” la úlcera corneal. La MA se debe colocar con la superficie epitelial mirando hacia arriba y la estromal hacia abajo. Esta orientación es fundamental para conseguir mayor adhesividad y multiplicación celulares.



**Figura 5.** Utilización de la membrana amniótica como injerto.

El tamaño del fragmento de MA que debemos emplear para rellenar el defecto debe ser similar al tamaño del lecho ulceroso, de tal modo que no sobrepase los bordes. Si suturamos la MA al tejido corneal circundante es preferible hacerlo mediante nylon monofilamento de 10.0. Otros autores prefieren emplear poliglactina (vicryl) 9-0 y/o 10-0, ya que no hay que retirar la sutura al ser reabsorbible. Si anclamos la MA al tejido conjuntival circundante y/o epiescleral se recomienda utilizar vicryl 9-0. El parpadeo continuo puede llegar a desprender la MA durante los primeros días: las lentes de contacto terapéuticas pueden ser útiles en las primeras semanas, así como la realización de una tarsorrafia lateral. Finalmente, recordar que antes de suturar la MA a modo de injerto, es importante revitalizar los bordes de la lesión o lecho ulceroso eliminando el tejido necrótico para anclar la MA a tejido sano.

La segunda opción es el uso de la MA como un recubrimiento. En este caso la superficie se recubre con un fragmento de MA sobrepasando los márgenes del defecto epitelial, de manera que el objetivo es conseguir reducir el proceso inflamatorio, favorecer la epitelización y disminuir el proceso de cicatrización bajo la membrana (Figura 6). Cuando se emplea de este modo, la MA funciona esencialmente como una lente de contacto terapéutica biológica temporal(46). La MA tarda en reabsorberse entre 3 y 4 semanas aproximadamente. Por lo tanto, no sólo actúa proporcionando una barrera mecánica sino también actúa como una barrera fisiológica para proteger la córnea subyacente o el estroma limbar de los mediadores de la inflamación segregados en la película lagrimal y de la infiltración de las células inflamatorias. La orientación del fragmento de la MA no parece ser tan importante con la técnica del parche como en la técnica del injerto, aunque también se recomienda que el estroma de la MA se oriente hacia abajo. El parche se ajusta holgadamente anclado a la conjuntiva y/o epiesclera circundante preferiblemente mediante sutura continua que cierre a modo de cremallera.



**Figura 6.** Utilización de la membrana amniótica como recubrimiento.

Por último comentar la posibilidad de poder utilizar la MA en forma de multicapa, donde se emplean varias capas de MA para tratar úlceras profundas e incluso microperforaciones. Aunque la orientación de las capas más profundas parece no tener importancia, se recomienda que la capa más superficial tenga el epitelio (membrana basal) orientada hacia arriba, impulsando la epitelización sobre la superficie de la MA del tejido receptor circundante sano. Sólo se necesita suturar la capa más superficial de la MA, de forma similar a la técnica del injerto(47).

### **2.1.8. Estudios clínicos realizados en donde se ha utilizado la membrana amniótica humana en problemas oculares**

La última década ha sido testigo del renacimiento de trasplante de membrana amniótica (TMA) en oftalmología. La importancia de la membrana amniótica reside en su capacidad para reducir la inflamación y cicatrización, mejorar la epitelización y cicatrización de la herida, así como sus propiedades antimicrobianas. La membrana amniótica se ha utilizado recientemente como un sustrato para el cultivo de células madre del limbo para el trasplante. También se ha utilizado ampliamente en la córnea en condiciones tales como úlceras neurotróficas, defectos epiteliales persistentes, úlceras, queratitis microbiana, queratopatía en banda, queratopatía bullosa, queratectomía fotorefractiva y lesiones químicas. Otras indicaciones para TMA incluyen

la reconstrucción de la superficie ocular, la cirugía para patologías de la conjuntiva tales como neoplasia escamosa, pterigión, y simbléfaron(48).

Se han reportado trasplantes de membrana amniótica en 13 ojos de 11 pacientes que sufrieron quemaduras oculares químicas y térmicas en diferentes grados, mostrando en 84.63 % epitelización corneal dentro de 2 a 5 semanas. Lo que tradujo su efectividad en etapas agudas, promoviendo la reepitelización, reducción de la inflamación, restaurando superficies corneal y conjuntival en grados de quemaduras leve a moderado(49). Santosh y colaboradores realizaron el procedimiento en 10 ojos de 10 pacientes con síndrome de Stevens-Johnson, logrando la restauración de la superficie bulbar en el 90%, sin simblefaron, con completa reepitelización corneal en todos los ojos(50). También se han realizado intervenciones en donde analizaron 7 ojos de 4 pacientes con úlceras por queratoconjuntivitis invernal de grados 2 y 3 que no respondían al tratamiento con esteroides, con o sin desbridamiento quirúrgico. Posterior al TMA pudo verse cierre de las úlceras sin defecto epitelial a las 2 semanas del procedimiento, concluyendo que el TMA combinado con desbridamiento quirúrgico es eficaz en el tratamiento de úlceras graves(51).

En 2002 se realizó en Miami, Florida TMA en 34 ojos de 33 pacientes operados de perforaciones corneales no traumáticas o descemetocel, cuyas causas fueron artritis reumatoide, síndrome de Stevens- Johnson, penfigoide cicatrizal ocular, lupus eritematoso sistémico, úlcera de Mooren, queratopatía neurotrófica, úlceras post-infecciosas y post-quirúrgicas, obteniendo resultados exitosos en 82.3 % de los casos, y fracaso en 6 ojos de pacientes con artritis reumatoide(52). En 2003 se realizó TMA en 17 ojos de 15 pacientes con simblefaron, con el objetivo de reconstruir los fondos de saco conjuntival, obteniéndose reconstrucción completa en el 70.6 % de los casos, fracasando sólo en pacientes que padecían trastornos autoinmunes y pterigión recurrente(53). En ese mismo año, se llevó a cabo el TMA en 18 ojos de pacientes con queratopatía bulosa y baja agudeza visual, observándose alivio de las molestias oculares en 88 % de estos(54).

En 27 ojos de 27 pacientes con pterigión recurrente, cuyo promedio de cirugías previas era de 3.1 se realizó TMA combinado con trasplante autólogo de células limbares y trasplante de autoinjerto conjuntival, obteniendo resultados exitosos de no recidiva en el 85.2 % de los casos a las 67 semanas posteriores. Se observó recurrencia en 4 ojos, 3 de los cuales se dio en el trasplante autólogo de células limbares y 1 en el trasplante de autoinjerto conjuntival. Mostrando con ello que la combinación más efectiva fue el TMA con el trasplante de autoinjerto conjuntival en el pterigión recurrente (50,55). Durante el 2006 reportaron un estudio sobre TMA en un niño de 6 años, que padecía necrosis epidérmica tóxica, presentando ulceración en el margen del párpado y conjuntiva tarsal, así como defectos epiteliales corneales en ambos ojos. A las 2 semanas del trasplante se observó completa epitelización conjuntival y corneal en el ojo izquierdo, requiriéndose un segundo trasplante en el ojo derecho, que de igual manera mostró epitelización a las 2 semanas posteriores al TMA. Mejorándose la agudeza visual, sin presencia de queratitis superficial puntiforme en ambos ojos a los 6 meses(56). En 2007 se trataron a 15 ojos de 15 pacientes con queratitis estromal por herpes necrotizante, que padecían persistente inflamación de la córnea y úlceras a pesar del tratamiento antiviral tópico y sistémico. Se les realizó TMA en múltiples capas, con posterior tratamiento antiviral y corticosteroides, evaluando la agudeza visual y estado de la córnea (ulceración, edema y opacificación). Observando mejoría de la agudeza visual en dos líneas en 14 ojos, así como cicatrización completa de las úlceras corneales a las 2 semanas(57).

En 2009 se llevó a cabo un estudio observacional de 7 pacientes sometidos a TMA para queratopatía bulosa y posteriormente una queratoplastia, observando los botones corneales por microscopia electrónica y óptica e inmunohistología con anticuerpos contra CD34 (queratocitos), actina de músculo liso y vimentina (miofibroblastos y fibroblastos respectivamente). El tejido amniótico fue cubierto con epitelio corneal estratificado con desmosomas bien definidos y hemidesmosomas. La inmunohistología mostró que las células que pueblan el estroma amniótico fueron CD34 negativas, pero positivas para vimentina y actina. Concluyendo con esto que la membrana basal amniótica facilita la migración de células epiteliales y la

adherencia(58). Durante el 2012 se estudiaron 14 ojos con queratitis por *Pseudomonas* en los que se realizó TMA y 11 ojos como grupo control, recibiendo ambos grupos tratamiento antibiótico, seguidos durante aproximadamente 1 año. Obteniendo como resultado la cicatrización completa de los defectos corneales en  $13.2 + 2.6$  días en el grupo intervenido, y de  $15.5 + 3.4$  días en el grupo control. La puntuación media de densidad de la opacidad de la córnea fue significativamente menor en el grupo trasplantado en comparación con el grupo control ( $p= 0.04$ ). Así como la agudeza visual no corregida fue mejor en los pacientes con TMA ( $p= 0.07$ ) (59).

### **2.1.9. Pterigión**

El pterigión constituye una hiperplasia fibrovascular de carácter benigno de la conjuntiva bulbar que invade la córnea. Está clasificado dentro de las degeneraciones no involutivas o tumoraciones epiteliales benignas corneales, y se localiza en la conjuntiva bulbar cerca del limbo corneal en el área interpalpebral, a las 3h y 9h. Puede ser unipolar (solo afecta una parte), o bipolar (cuando afecta la parte temporal y la nasal), y es más frecuente en el lado nasal. También puede ser unilateral o bilateral. Sus factores de riesgo son: las radiaciones ultravioletas, los factores ambientales (calor, viento, polvo y sequedad atmosférica), la irritación crónica ocular, los mecanismos inmunológicos (hipersensibilidad tipo I), las anomalías en la película lagrimal, las inflamaciones crónicas con producción de factores angiogénicos, la ocupación laboral asociada con factores ambientales, la predisposición genética, así como una mayor proximidad de la inserción tendinosa al limbo esclerocorneal. El pterigión es más común en climas cálidos y secos, con predominio en países comprendidos entre los 40° de latitud norte y sur, más frecuente en el ámbito rural que en el urbano, y no suele haber predominio entre sexos cuando las condiciones de vida son similares. El predominio del pterigión aumenta con la edad, pero es más frecuente entre grupos de población entre los 20 y los 50 años(60). El pterigión es la patología quirúrgica más frecuente a nivel de superficie ocular y es la principal causa de ingreso a cirugía ambulatoria en el medio oftalmológico. El principal cambio histopatológico en el pterigión primario es la elastodisplasia y la elastodistrofia en el tejido conectivo subepitelial(61).

El pterigión se clasifica de acuerdo a los siguientes grados:

Grado I: Invasión corneal menor a 1 mm.

Grado II: Invasión corneal de 1 a 3 mm.

Grado III: Invasión corneal superior a 3 mm.

En el año 2000 en Taiwán se realizó un estudio comparativo sobre la eficacia y seguridad de injerto de membrana amniótica como un adyuvante de terapia después de la eliminación de pterigión primario, comparando los resultados clínicos con autoinjerto conjuntival y mitomicina tópica C. Donde 80 ojos de 71 pacientes con pterigión primario fueron tratados con escisión seguida de injerto de membrana amniótica. El resultado se comparó retrospectivamente con 56 ojos de 50 pacientes que recibieron autoinjerto conjuntival, y 54 ojos de 46 los pacientes que recibieron mitomicina C. tópica, seguidos durante 6 meses. Obteniéndose tres recurrencias (3,8%) en el grupo de injerto de membrana amniótica, tres recurrencias (5,4%) en el grupo de autoinjerto conjuntival, y dos recurrencias (3,7%) en el de mitomicina tópica sin haber diferencia significativa en la tasa de recurrencia entre los tres grupos ( $p = 0,879$ ). Mostrándose que el injerto de membrana amniótica fue tan eficaz como autoinjerto conjuntival y mitomicina C en la prevención de la recurrencia del pterigión, y puede ser considerado como un procedimiento de preferencia para tratar pterigión primario(62). En 2000 en Trujillo, Perú se realizó TMA en 20 pacientes de ambos sexos, de los 30 años en adelante, con diagnóstico de pterigión recidivante, siguiéndolos durante 12 meses, mostrando epitelización precoz (primeras 24 a 48 horas), con sensación de cuerpo extraño. El tiempo de epitelización sobre la membrana amniótica es entre 2 y 5 semanas. Concluyendo que el TMA es una excelente alternativa en aquellos pacientes con tratamientos previos fallidos(63).

En 2008 en Irán se evaluó el TMA posterior a la escisión del pterigión, con un seguimiento de 12 meses. Cincuenta ojos de 50 pacientes consecutivos, incluyendo 27 hombres y 23 sujetos femeninos con edad media de  $43.36 \pm 10.88$  años fueron operados. Sólo un ojo (2%) demostró pterigión recurrente, que respondió a la inyección subconjuntival mitomicina C. Otro ojo (2%) desarrolló retracción de la membrana

amniótica que finalmente requirió un segundo trasplante. Concluyendo que el TMA posterior a la escisión del pterigión es una técnica quirúrgica segura y eficaz con una baja tasa de recurrencia(64).

En 2010 en China se evaluó la tasa de recurrencia y seguridad del trasplante de membrana amniótica (TMA) con mitomicina C (MMC) en comparación con trasplante de membrana amniótica sola durante la escisión del pterigión, llevando a cabo un metaanálisis. Obteniendo una tasa de recurrencia de 5.41 % en los pacientes tratados con TMA con mitomicina C, comparada con el 16.89% de los pacientes tratados únicamente con el TMA. Concluyendo que el trasplante de membrana amniótica con mitomicina C se asoció con una menor tasa de recurrencia en comparación con el trasplante de membrana amniótica sola en la escisión del pterigión(65). En 2014 en Miami se implantó TMA y autoinjerto conjuntival combinados, a 12 pacientes hombres y 7 mujeres con pterigión (14 primarios y 5 recurrentes), con un seguimiento de 10 a 26 meses. La edad media era de  $44,21 \pm 12,49$  años. La tasa de recurrencia fue del 5.2 % (Crecimiento fibrovascular 1 mm sobre la córnea) 13 meses después de la cirugía en una mujer de 67 años de edad, quien fue operada por un pterigión primario T3, sin complicaciones. Por lo que se llegó a la conclusión de que el TMA es una técnica segura y eficaz, que redujo la inflamación y previno la recurrencia(66).

#### **2.1.10. Características morfológicas del ojo de conejo**

El ojo del conejo presenta diferencias respecto al ojo humano(67). Tiene varias estructuras anatómicas que no existen en el humano: músculo retractor del globo, la glándula de Harder, la membrana y glándula nictitantes. Además el sistema lagrimal del conejo presenta una glándula lagrimal mucho mayor y el aparato de drenaje es diferente. También el sistema de drenaje del acuoso, aunque probablemente con resultados similares, es diferente. El tamaño del ojo varía con la edad y en el adulto es relativamente grande y prominente. Al nacimiento es de sólo 6 mm de diámetro pero crece rápidamente y a los 6-7 días de abrir los párpados ya se ha alcanzado el 90% del tamaño final que alcanza de la semana 14 a la 20 aproximadamente. Las características de las diferentes estructuras oculares del conejo son: la córnea del conejo es

prominente y relativamente grande, mucho más curva que la humana(68). De diámetro horizontal medio 15 mm y vertical de 13,5-14mm. Su curvatura no difiere mucho de la de la esclera por lo que el sulcus ciliar es muy poco pronunciado. El radio de curvatura es de 7-7,5 mm y el espesor corneal de 0,3-0,4 mm de media. La curvatura corneal, no obstante, va cambiando durante los primeros 15 meses de vida. Al nacimiento el poder dióptrico es de 60 que se reduce a menos de 50 a las 30 semanas y se establece en 40-43 dioptrías a las 60-80 semanas. Los bordes corneales se identifican en una sección histológica por una zona pigmentada en la parte anterior de la córnea y en la parte posterior por la unión de los pilares del iris con la superficie de transición corneo escleral. El epitelio corneal es más delgado que en el hombre (30-40 micras en el conejo). Está constituido por una fila de células basales columnares sobre dos filas de células poligonales y seis de células aladas y escamosas. Las células columnares tienen proyecciones hacia la membrana basal. Los desmosomas de unión son menos visibles en las células basales que en el hombre, siendo más marcados en capas intermedias y superficiales.

Cerca del limbo, las células basales presentan pigmentación que permite identificar el borde anatómico corneal en conejos pigmentados. De hecho, una pequeña cantidad de pigmento está presente en todas las capas del epitelio en el área del limbo. La córnea del conejo carece de membrana de Bowman, esta es una de las principales diferencias con la humana, aunque algunos investigadores han descrito como la membrana basal epitelial se divide en dos zonas, asumiendo que una de ellas corresponda a una membrana de Bowman muy delgada. El endotelio presenta capacidad regenerativa (mitosis) tras un trauma y se ha observado la transformación de células epiteliales en endoteliales si las primeras están en contacto con el humor acuoso; y de células endoteliales en epiteliales cuando están en contacto con la conjuntiva. La región trabecular es bastante diferente a la del ojo humano. El ángulo de la cámara anterior es muy difícil de observar ya que el iris se abomba hacia la córnea y lo oculta al examen clínico. En secciones histológicas, el seno cilioescleral parece estar separado de la cámara anterior, pero entre los pilares del iris hay libre acceso del acuoso entre él y la cámara anterior. Los procesos ciliares están muy desarrollados, formando

la porción secretora del cuerpo ciliar. Nacen de la porción anterior del cuerpo ciliar, se unen a la superficie posterior del iris en su base y se extienden hasta 1 mm del borde pupilar del iris, unidos unos a otros en gran parte de su extensión. De esta forma, como el iris del conejo es muy delgado, los procesos ciliares que se unen a él en su parte posterior le dan soporte. El cristalino es más grande y esférico que el humano, aunque su composición, anatomía y función son similares. El diámetro anteroposterior es de 1 mm y el ecuatorial de 9 a 11 mm. El radio de la superficie posterior es de 5 mm y de la anterior de 5,3 mm. La retina se diferencia fundamentalmente de la humana en que el conejo no posee fovea central, es rica sobre todo en bastones y tiene un reducido número de células bipolares y ganglionares.

## **2.2. JUSTIFICACIÓN**

La membrana amniótica se puede utilizar como injerto o recubrimiento que permite solucionar diferentes patologías de la superficie ocular, ya que la similitud histológica entre la membrana basal del amnios y la conjuntiva, permiten que un trasplante sea exitoso en propiciar el crecimiento de nuevas células epiteliales progenitoras que sustituyen al epitelio dañado en la superficie de la córnea. Las características biológicas de la membrana amniótica dependen de su constitución y estructura, que se ven alteradas durante los procesos de extracción y conservación a los que se somete el tejido. Todas estas variaciones técnicas pueden tener una consecuencia directa sobre las propiedades y mecanismos de acción de la membrana amniótica, y por lo tanto en los resultados clínicos tras la aplicación en la superficie ocular. Con este estudio se pretende fraccionar y crio-conservar la membrana amniótica con la aplicación de nanopartículas de plata para evaluar su eficacia contra diferentes bacterias (gram + y gram -) y el efecto protector por métodos histológicos y evidencias fotográficas de la epitelización de una úlcera corneal inducida experimentalmente en un grupo de conejos. Junto con ello se pretende valorar la eficacia del TMA en el manejo de lesiones de superficie ocular en patologías cuya alternativa actual no brinda resolución de la lesión, tal como ocurre en la queratopatía bulosa, úlceras corneales,

síndrome de Stevens Johnson, pterigión recidivante, penfigoide cicatrizal ocular entre otros.

### **2.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En los últimos años se ha producido un gran avance en el conocimiento de la fisiopatología y la terapéutica de las enfermedades de la superficie ocular, lo cual ha permitido mejorar los resultados en distintas patologías de la conjuntiva y de la córnea. Sin embargo, algunas patologías siguen representando un verdadero reto terapéutico. Una de las principales causas del reto terapéutico, es que la superficie ocular se encuentra formada por la conjuntiva, la córnea, el limbo esclerocorneal y la película lagrimal. Las alteraciones de la conjuntiva y de la córnea representan una parte muy importante en la patología de la superficie ocular. Por lesiones conjuntivales extensas, el lecho escleral que resulta expuesto, debe ser cubierto para evitar complicaciones importantes como la inflamación, infección, necrosis o cicatrización excesiva. En este sentido, la membrana amniótica parece un sustrato ideal para la regeneración conjuntival, con resultados en principio superiores a los que ofrecen otras alternativas quirúrgicas disponibles hasta ahora. Ya que las características biológicas de la membrana amniótica dependen de su constitución y estructura, que se ven alteradas durante los procesos de extracción y conservación a los que se somete el tejido. Todas estas variaciones técnicas pueden tener una consecuencia directa sobre las propiedades y mecanismos de acción de la membrana amniótica con efecto anti-bacteriano, y por lo tanto en los resultados clínicos tras la aplicación en lesiones de la superficie ocular. Con este estudio se pretende evaluar y comparar por métodos fotográficos e histológicos la epitelización de una úlcera corneal inducida experimentalmente en conejos y la eficacia de nanopartículas de plata como un criopreservador y anti-bacteriano en el implante de membrana amniótica.

### **2.4. HIPÓTESIS**

La aplicación de membrana amniótica tratada con nanopartículas de plata, será efectiva para el manejo de lesiones de superficie ocular en modelo animal.

## **2.5. OBJETIVOS**

### **2.5.1. Objetivo general**

Evaluar y comparar por métodos histológicos la epitelización de úlcera corneal inducida experimentalmente en conejos tras la aplicación de la membrana amniótica tratada con nanopartículas de plata.

### **2.5.2. Objetivos específicos**

- 1.-Estandarizar el método de crioconservación de membrana amniótica con nanopartículas de plata para el manejo de lesiones de superficie ocular en conejos.
- 2.-Determinar la eficacia antibacteriana in vitro de la membrana amniótica tratada con nanopartículas de plata para aplicar como alternativa de tratamiento en lesiones de superficie ocular en conejos.
- 3.-Determinar los cambios epiteliales histopatológicos que se presentan a los 20, 40 y 60 días en lesiones experimentales de superficie ocular en conejos, tratados con TMA.
- 4.-Determinar la eficacia del TMA en lesiones de superficie ocular en modelo animal.

## **CAPÍTULO III**

### **3.1. METODOLOGÍA**

#### **3.1.1. Tipo de Estudio**

Estudio prospectivo experimental.

#### **3.1.2. Tamaño de la muestra**

El trabajo se llevó a cabo utilizando diferentes fragmentos de membrana amniótica obtenidas de 16 placentas, y su aplicación en 30 piezas de ojos de modelo animal (conejos).

#### **3.1.3. Período del estudio**

El estudio de estandarización de técnicas para la extracción, conservación con nanopartículas de plata como crioprotector y antibacteriano para implante de membrana amniótica humana para la reconstrucción y tratamiento de úlcera corneal inducida experimentalmente en conejos, inicio el día 15 de noviembre del 2013, concluyendo el 15 de noviembre del 2015.

#### **3.1.4. Organización y responsabilidades**

El responsable técnico será el responsable de la coordinación de proyecto para la obtención de la membrana amniótica del servicio de obstetricia del Hospital Fray Junípero Serra del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) de Tijuana Baja California. El jefe del servicio de Gineco-obstetricia del Hospital ISSSTE será el responsable de la extracción y recogida de la placenta, autorizados previamente para ello. El responsable técnico, es también responsable del proceso de transporte y coordinación con el/los equipo/s que custodie los registros de placentas extraídas y su destino.

#### **3.1.5. Seguridad**

Los especialistas que extraigan la placenta (ginecólogo) deberán comunicar la existencia de cualquier evento o reacción adversa a la red de vigilancia. La red de vigilancia la constituye los coordinadores del trasplante que estén involucrados en el proyecto.

### **3.1.6. Consideraciones y equipamiento**

Al ser la membrana amniótica un tejido abierto en cuanto a su manipulación, es necesario que su procesamiento se efectúe en condiciones de calidad de aire especificada en su manipulación (campana de flujo laminar).

### **3.1.7. Criterios generales para la selección del donante**

La obtención de la membrana amniótica se realizará por el servicio de gineco-obstetricia del Hospital ISSSTE, mediante cesárea electiva, cumpliendo los criterios generales establecidos para la donación de órganos y además, se recomienda que sean donantes con pleno uso de sus facultades mentales, mayor de dieciocho años de edad, con embarazo controlado por un período no menor a 6 meses en donde presenta al feto sano y sin patología placentarias.

### **3.1.8. Criterios generales para la exclusión del donante**

Las donantes de membrana amniótica serán seleccionadas con los criterios generales de donantes de órganos y que además son criterios específicos de exclusión como embarazo no controlado, historia obstétrica con alteraciones, fiebre materna superior a 38.5°C, gestación inferior a 34 semanas o mayor de 40 semanas de gestación, ruptura prematura de membrana (RPM) de más de 12 horas antes del parto, duración del trabajo de parto superior a 24 h, antecedentes de corioamnioitis, presencia de síntomas de infección en el neonato, parto vaginal, cualquier excepción a los criterios predefinidos deberá ser registrada y validada por el responsable técnico del proyecto.

### **3.1.9. Obtención de membrana amniótica**

Previamente a la obtención del tejido, se conseguirá el correspondiente consentimiento informado (**ANEXO I**) autorizando la donación de la placenta por pacientes preseleccionadas del Hospital Fray Junípero Serra del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) en Tijuana Baja California y quedarán incluidos con la hoja de evaluación clínica del donante (**ANEXO II**). Posteriormente se realizará una historia clínica del donante (**ANEXO III**), donde deben constar todos los antecedentes gineco-obstétricos de interés y la exploración física para garantizar la adecuada selección del tejido.

### **3.1.10. Estudios de laboratorio**

Cada donante será sometida a las pruebas pertinentes, para minimizar el riesgo de enfermedades infecciosas transmisibles, mediante la realización de controles analíticos, como cualquier donante de órganos. Es importante señalar que los análisis de laboratorio que se realizarán son pruebas serológicas para la detección de los agentes infecciosos transmisibles por transfusión e incluyen obligatoriamente la detección de serológica de *Treponema pallidum* (mediante la prueba de detección VDRL), Virus B de la hepatitis (detectando el antígeno de superficie del virus B y anticuerpo anti-core), Virus C de la hepatitis (detectando anticuerpos anti-VHC), Virus de la inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2 (con detección de anticuerpos anti-VIH, mediante ensayo inmunoenzimático ELISA inicialmente, y Western blot en caso de salir positiva, para confirmar), *Trypanosoma cruzi* (mediante ensayo inmunoenzimático ELISA, detectando anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*), y *Brucellas abortus* (mediante seroaglutinación, detectando anticuerpos contra el lipopolisacárido). Cualquier prueba positiva en este caso serán criterios específicos de exclusión. De acuerdo a estos resultados, se podrá ver si la paciente puede ser donador de placenta.

### **3.1.11. Extracción de la placenta**

La obtención de placenta se realizará mediante extracción abdominal por cesárea electiva bajo anestesia regional (bloqueo ó anestesia epidural) y previa tricotomía abdominal y genital, se realiza asepsia y antisepsia de esas áreas y se procede al proceso quirúrgico por capas hasta llegar al útero para la extracción del producto de la gestación, posteriormente se pinza el cordón umbilical y se separa al producto de la mamá para proceder al alumbramiento de la placenta y limpiar la cavidad uterina, posteriormente se procede a suturar por capas hasta llegar a piel y se coloca un apósito y vendaje del área abdominal para proceso de recuperación y cicatrización. Una vez obtenida la placenta se procederá a colocarla en un recipiente específico que contiene un medio de transporte adecuado, para ser etiquetada y trasladada al laboratorio para su preparación.

### **3.1.12. Hoja de recogida de datos de la extracción**

Se elaborará una ficha de extracción del tejido (**ANEXO IV**), consensuada entre el equipo de obtención y el laboratorio receptor de la membrana, que debe incluir tanto la descripción del procedimiento como las posibles incidencias que hayan podido presentarse. Esta ficha que debe estar firmada por el responsable de obtención y deberá acompañar al tejido cuando este se remita a la Facultad de Medicina y Psicología de la UABC.

### **3.1.13. Recogida de la membrana**

La recogida de la membrana amniótica se efectuará por el personal cualificado en el área de partos, lo más pronto posible, después del alumbramiento. En un recipiente de frasco estéril, de cierre hermético. El recipiente de recogida contendrá una solución refrigerada, entre 2°C y 8°C, compuesta por solución salina isotónica o medios nutrientes y antibióticos. Este recipiente tendrá una etiqueta provisional de transporte de la placenta (**ANEXO V**).

### **3.1.14. Mantenimiento y envío**

El envío de la membrana debe ser lo más rápido posible al centro de procesamiento, no obstante, hasta este momento, debe permanecer a una temperatura entre 2°C y 8°C, que siempre que el envío se demore más de dos horas. El envío al establecimiento de tejidos se acogerá al etiquetado tanto interno como el contenedor de transporte según establece las normas oficiales mexicanas. Es aconsejable la utilización de unidades refrigerantes en caso de largos recorridos o de temperaturas extremas.

### **3.1.15. Almacenamiento previo al proceso**

Los envases de recogida se pueden mantener entre 2°C y 8°C en refrigeradores con control gráfico y acústico, durante un periodo de tiempo no superior a 72 horas previo a su procesamiento.

### **3.1.16. Control de calidad**

El control de calidad es el conjunto de actuaciones para establecer rigurosidad del proceso, desde la extracción de hasta el implante. Para ello debe existir una bitácora de procedimiento técnico (**ANEXO VI**) en el cual se especifiquen todos los procedimientos utilizados con el tejido, que debe incluir la metodología de registros

establecida para garantizar la trazabilidad, selección y antecedentes de la donante, como los resultados serológicos, bacteriológicos, fúngicos y anatomopatológico realizados para prevenir la transmisión de enfermedades, y todas las actuaciones realizadas y destinadas a lograr un tejido viable.

### **3.1.17. Estudios microbiológicos**

Es necesaria la realización de cultivos microbiológicos y fúngicos del propio tejido, así como de las soluciones de: recogida, lavado, crío-preservación, descongelación y transporte. Los controles microbiológicos y fúngicos del tejido y de las soluciones empleadas, se realizarán para cada una de las bolsas preparadas.

### **3.1.18. La manipulación para los procesos de disección y fragmentación**

Todo el proceso de manipulación, desde la disección, hasta el sellado final de los envases donde se almacenan las capas de membrana amniótica, debe realizarse en una campana de flujo laminar, teniendo en cuenta, en todo el proceso, la asepsia del mismo. Antes de la disección se realizará un lavado abundante en suero fisiológico, para eliminar los restos de la solución de recogida. Se hará una disección cuidadosa de la membrana, separando las dos capas que la forman retirando con las pinzas y bisturí los pequeños coágulos. La capa interna es la utilizada para criopreservación. Se pueden diseccionar cuadrados de diferentes medidas según la indicación clínica a la que se destina. En oftalmología, de forma orientativa, pueden ser de 4 x 4 cm. Se puede utilizar un soporte bien de nitrocelulosa o tul graso, facilita el manejo de utilizar unos puntos de sutura del tejido al soporte, evitando así el deslizamiento del tejido sobre un soporte. Siempre la membrana basal del corion se colocará hacia arriba. Esta superficie será la que cubra la zona cruenta a la que va destinada.

### **3.1.19. Congelación y crioprotectoras**

Las soluciones de criopreservación para la congelación de membrana amniótica, deberán estar establecida para minimizar el daño que se produce en la congelación. Las soluciones deberán evitar el daño osmótico, conteniendo niveles fisiológicos de sales así como, soluciones crioprotectoras como el glicerol. Se establece un tiempo entre 15 y 20 minutos para la correcta penetración del agente crioprotector en el tejido, así como la aplicación de nanopartículas de plata como crioprotector.

### **3.1.20. Almacenamiento de la membrana amniótica**

Las bolsas una vez selladas e identificadas se pueden almacenar en congeladores mecánicos a una temperatura aproximada de  $-80^{\circ}\text{C}$ , protegidas con un soporte metálico. Se colocan de forma horizontal, no apiladas, durante el tiempo necesario hasta su total congelación. Cada bolsa estará identificada con la etiqueta definitiva de almacenamiento (**ANEXO VII**). En la etiqueta tendrá la fecha de caducidad (que será de 2 años) para la membrana amniótica.

### **3.1.21. Descongelación de la membrana amniótica**

Se realiza en un baño a una temperatura aproximada a  $37^{\circ}\text{C}$  con la precaución de una doble bolsa de protección. En campana de flujo laminar y en sistema cerrado, se procede a sucesivos lavados con solución salina estéril, hasta comprobar que la salida de la solución de lavado es transparente. Entre un lavado y otro, se aconseja dejar transcurrir unos 5 minutos. Al final del proceso, se recomienda toma de muestra para control bacteriológico, de la solución de lavado, de cada bolsa. Finalmente, se resuspende la membrana en solución salina.

### **3.1.22. Envío de la membrana amniótica descongelada**

El transporte a quirófano se realizará conservando el tejido a una temperatura entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $8^{\circ}\text{C}$ , sobre hielo picado o acumuladores térmicos, si el tejido ha sido previamente descongelado en el establecimiento de tejidos.

### **3.1.23. Envío de la membrana amniótica congelada**

También se pondrá enviar el tejido congelado, en nieve carbónica o similar, acompañado de este caso del protocolo de descongelación, para proceder a la descongelación en el quirófano. Este procedimiento solo se contemplará ante una emergencia.

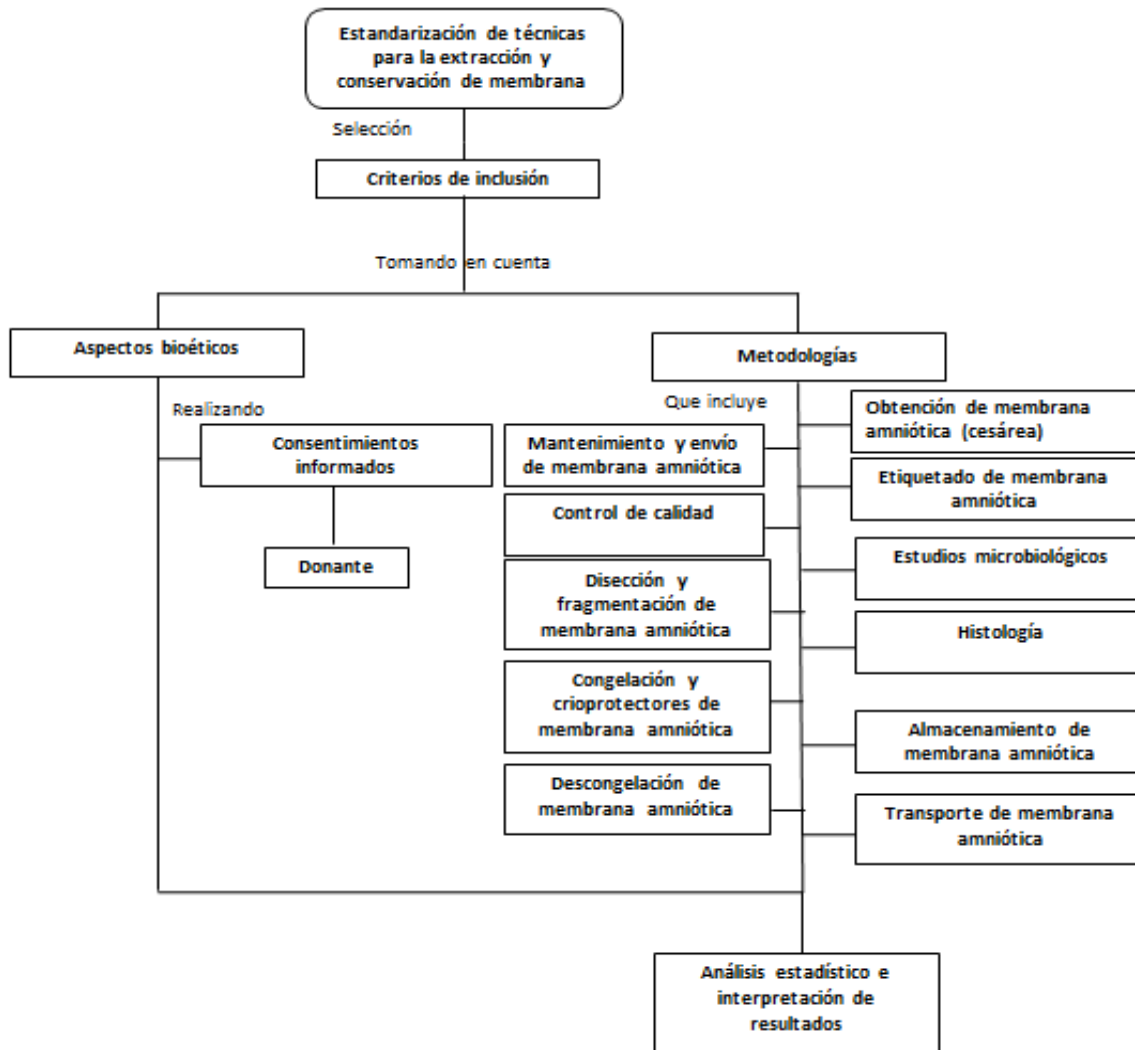
### **3.1.24. El transporte de las muestras**

El desarrollo de las diferentes metodologías se ilustra en las evidencias fotográficas del apartado **ANEXO VIII**, donde se esquematiza todo el procedimiento.

### **3.1.25. Procedimientos histopatológicos**

La obtención de la membrana amniótica se realizará por cesárea programada, para ser fijada por métodos químicos para mantener el tejido en el estado más parecido al que poseían durante la gestación. La solución se prepara con formol al 10%, agregando acetato de calcio, para evitar la oxidación del aldehído fórmico o ácido fórmico, el que perjudica la fijación. El formol se disolverá al 10% en buffer de fosfato en lugar de agua destilada para mantener el pH a 7.4. El tiempo de fijación del tejido será de 24 horas. posteriormente se realizaran lavados con agua para continuar con la deshidratación, en donde se colocará la muestra en alcoholes de concentración creciente para eliminar el agua que contenga, ya que la parafina no es miscible con agua. Se utiliza etanol 70%, 80%, 96% y 100%. La aclaración se realiza con xilol, que es un solvente que produce transparencia en los tejidos, además de solubilizar la parafina. La inclusión se realiza en parafina blanda que funde a 44 – 48°C y la parafina dura a 56 – 58°C. La parafina se pone en estufa de cultivo a unos grados por encima de su punto de fusión. Se sumerge la muestra, se lleva a estufa unos minutos para que la parafina penetre en los tejidos. Luego se enfría bruscamente colocando el recipiente en hielo. Para preparar el corte se coloca un trozo de parafina que contiene la muestra en forma de pirámide truncada, de manera tal que la misma quede sobre la base menor. Se pega la base mayoría un taquito de madera que servirá para sostenerlo en el micrótopo. Los cortes pueden tener un espesor de 4 a 100 micras. La colocación del tejido sobre el portaobjeto se realizara colocando los cortes en agua tibia para que se extiendan y luego se recogen con un pincel y se extienden en el portaobjetos y se dejan secar para su posterior coloración. La desparafinización se realiza con xilol y se hidrata el tejido ya que la mayoría de los colorantes son de base acuosa. Para ello se coloca el portaobjeto en soluciones de etanol de concentraciones decrecientes. Etanol 100%, 96%, 80%, 70% y agua destilada para ser teñidos por la técnica de hematoxilina y eosina, azul de metileno. Este mismo procedimiento de preparación histopatológica fue requerido para el estudio de las piezas de enucleación con TMA.

### 3.1.26. Diafragma de flujo del procedimiento



Se presenta el diagrama de flujo de los diferentes procedimientos para la estandarización de técnicas para la extracción, fragmentación, conservación e implante de membrana amniótica en diferentes problemas oculares.

### 3.3. Método de estabulación

Para ello, se evaluará la aplicación de membrana amniótica crioconservada con nanopartículas de plata en lesiones de superficie ocular (producida experimentalmente)

en conejos de raza nueva Zelanda blanco grande con peso promedio de 3.5 kg. Fueron mantenidos durante el estudio en estabulación en jaula, bajo cuidado de la veterinaria de la Facultad de Medicina y Psicología de la UABC. Bajo control de cuidados generales de alimentación, temperatura, humedad y manejo pre y postquirúrgico, durante su estabulación fueron albergados individualmente con acceso libre a agua y alimento propio para conejos.

### **3.4. Consideraciones Éticas**

#### **3.4.1. Aspectos éticos**

Todos los sujetos del estudio darán su consentimiento informado por escrito. El estudio fue revisado y aprobado por los Comités de Ética e Investigación del Hospital Fray Junípero Serra del ISSSTE (**ANEXO IX**) y de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California (**ANEXO X**), por lo tanto, se lleva a cabo esta tesis doctoral de acuerdo con las normas éticas de la declaración de Helsinki.

#### **3.4.2. Conflicto de intereses**

-Los colaboradores de esta tesis doctoral declaran que no existe conflicto de interés.

-El proyecto lo realizarán dos instituciones públicas, el Hospital Fray Junípero Serra del ISSSTE y de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California, el personal médico, técnico y científico, no percibirán sueldos por la participación en el proyecto.

#### **3.4.3. Bioseguridad o riesgos por la donación de placenta**

La obtención de placenta se realizará mediante cesárea electiva bajo anestesia regional (bloqueo o anestesia epidural) y previa tricotomía abdominal y genital, se realiza asepsia y antisepsia de esas áreas y se procede al proceso quirúrgico por capas hasta llegar al útero para la extracción del producto de la gestación, posteriormente se pinza el cordón umbilical y se separa al producto de la mamá para proceder al alumbramiento de la placenta y limpiar la cavidad uterina, a continuación se procede a suturar por capas hasta llegar a piel, colocando un apósito y vendaje del área abdominal para el proceso de recuperación y cicatrización. Una vez obtenida la placenta se

procederá a colocarla en un recipiente específico que contiene un medio de transporte adecuado, para ser etiquetada y trasladada al laboratorio para su preparación.

#### **3.4.4. El transporte de las muestras**

Las formas y procedimientos de embalaje, transporte y disposición final del material utilizado y desechos de material biológico en los procesos del análisis del estudio se elaborarán tomando como referencia los siguientes documentos y normas oficiales mexicanas.

- 1.- Organización Mundial de la Salud. Guía para el transporte seguro de sustancias infecciosas y especímenes diagnósticos.
- 2.-OMS- División para la Vigilancia y el Control de Enfermedades Emergentes y otras Enfermedades Transmisibles, Ginebra, 1997.
- 3.- Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCT2/1995, Especificaciones especiales y adicionales para los envases y embalajes de las sustancias peligrosas de la división 6.2 agentes infecciosos.
- 4.- Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2000, Características de las etiquetas de envases y embalajes destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.
- 5.- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

#### **3.5. Preparación prequirúrgica y postquirúrgica en modelo animal**

Se marcaron cada uno de los conejos colocándoles un número en el lomo y en la oreja derecha para su identificación, posteriormente cada uno de los conejos fue anestesiado con ketamina 5% IM a razón de 40 mg/kg, e hidrocortato de xilacina al 2% a dosis de 7 mg/kg, después de aplicación local de xilocaina al 2% en la zona quirúrgica, cuadrante superior interno de la córnea de cada ojo utilizado, en donde se produjo experimentalmente la lesión de superficie corneal y se sustituyó con implante de membrana amniótica tratada con nanopartículas de plata, que fue fijada en el sitio denudado con vicryl 10 ceros, siendo un total de 30 piezas oculares tratadas con

implante de membrana amniótica, se colocan en estabulación en jaulas individuales y se realizó seguimiento fotográfico del área quirúrgica y seguimiento médico de aparición de infecciones locales. Posteriormente los conejos se fueron sacrificando sin ser sometidos a sufrimiento alguno por inyección intravenosa de cloruro de potasio en la vena marginal de la oreja, en grupos de diez conejos a los 20, 40 y 60 días para la realización de enucleación y la evaluación de los estudios histopatológicos de las piezas tratadas con membrana amniótica .

### **3.6. Estandarización de la aplicación de MA en superficie ocular de conejo**

Para estandarizar, la aplicación de MA en la superficie ocular y valorar el proceso de reepitelización, se realizó la aplicación de MA crioconservada con glicerol sin nanopartículas de plata y se evaluaron los efectos histopatológicos en 5 piezas oculares (una pieza sin TMA como referencia anatómica). A estas muestras trasplantadas se las realizó el tratamiento antibacteriano profiláctico por siete días, dando seguimiento clínico y fotográfico postquirúrgico. Una vez obtenidos los resultados histopatológicos, se valorara los resultados inflamatorios de la lesión y su efecto en la reepitelización.

### **3.7. Evaluación del efecto de las nanopartículas de plata en MA**

Para evaluar el efecto de la crio-conservación con glicerol más la aplicación de las nanopartículas de plata con diferentes concentraciones en la MA, se realizarán estudios colocando en placas de 6 pocillos los fragmentos de MA, dejándolos por periodos de 24, 48 y 72 horas, manteniendo 7 días en estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C y 80% de humedad, para ser utilizada en estudios *in vivo* e *in vitro*. En donde se evaluará la estructura histológica de las membranas amnióticas obtenidas de las 16 voluntarias.

### **3.8. Prueba de inhibición microbiológica para cuantificar la eficacia de la MA recubierta con nanopartículas de plata**

Se realizará una evaluación *in vitro* sobre la eficiencia de la membrana amniótica recubierta con nanopartículas de plata para inhibir el crecimiento bacteriano de diez bacterias de relevancia clínica en agar Mueller Hinton. Las cepas bacterianas utilizadas en el análisis serán: *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*(Gram negativos) y *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* (Gram positivos) y *Candida albicans*. Posteriormente, se evaluará la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata sobre las bacterias en medio líquido de *Luria Bertanni (LB)* para determinar las concentraciones efectivas que inducen la disminución del crecimiento bacteriano. El análisis de inhibición se realizará por dilución en tubos de 2 mL, en donde cada cepa bacteriana se preparó como una suspensión que representa aproximadamente  $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$  CFU/mL. Las membrana amnióticas recubierta con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (utilizando las siguientes concentraciones porcentuales: 5%, 1.25%, 0.1562%, 0.0195% y 0.0024375%) se sumergieron en caldo LB inoculado con el nivel de inóculo diferente en los 10 organismos de ensayo. Los cultivos se incubarán a 37°C por 6 horas y cada hora se examinará la absorbancia de los tubos a 600nm. Los porcentajes de inhibición para cada bacteria y para cada dilución se calcularán según las absorbancias controles con bacterias solas, bacterias con MA sin recubrimiento de nanopartículas de plata y bacterias con MA con recubrimiento de nanopartícula de plata.

### **3.9. Inhibición del crecimiento bacteriano determinado por el diámetro de los halos de inhibición en agar**

El análisis sobre la inhibición del crecimiento bacteriano es determinado por el diámetro de los halos de inhibición en agar Mueller Hinton(MH). El procedimiento se realizará inoculando uniformemente las diferentes cepas en su respectiva placa de agar MH, colocando 100µL de una solución  $1 \times 10^8$  UFC de la bacteria y dispersándola con un triángulo metálico por todo el agar. Luego se colocó, una muestra de 0.5cm<sup>2</sup> de membrana amniótica impregnada con nanopartículas de plata a diferentes concentraciones porcentuales en agua (5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312%, 0.1562%, 0.0781%, 0.0390%, 0.0195%, 0.00975, 0.004875% y 0.0024375%), que fue puesta sobre el medio de cultivo bacteriano y las muestras se incubaran a 37°C por 24 horas. Los halos de inhibición serán determinados para las cepas bajo las diferentes concentraciones a 24, 48 y 72 horas. La medición del halo de inhibición se realizará por la parte trasera de la placa alrededor de membrana amniótica impregnada con nanopartículas de plata, clasificándose a estos halos como sensible (el microorganismo

presenta una gran área de inhibición causada por las nanopartículas de plata), intermedio (se presenta un halo de inhibición más reducido por las nanopartículas de plata) y resistentes (presenta muy poco o casi nada de halo de inhibición causada por las nanopartículas de plata).

### 3.10. Diseño estadístico

Con los resultados obtenidos se realizará una base de datos que será procesada utilizando el sistema estadísticos SPSS v.20 para Windows. Con los resultados se confeccionarán tablas de contingencia y gráficos que expresan los valores en números absolutos y en porcentajes. Se describirán datos demográficos de la base y características clínicas de cada grupo. Para cada resultado, se realizará un resumen de cada grupo, y el efecto estimado de la muestra y su precisión. Se analizarán y reportarán todos los efectos adversos, o efectos colaterales de cada grupo.

### 3.11. Análisis de las variables

La tabla I muestra las variables cualitativas y cuantitativas analizadas de acuerdo a las características poblacionales presentadas por las pacientes donantes de membrana amniótica.

Nombre de la Variable	Tipo de variable	Escala de Clasificación
Edad	Cualitativa	Años cumplidos
Ocupación laboral	Cualitativa nominal	Según ocupación laboral en el momento del diagnóstico
Grupo étnico	Cualitativa nominal	Blanca, moreno, mestiza e indígena
Semanas de embarazo.	Cualitativa nominal	Entre 35 y 40 semanas

**Tabla I.** Operacionalidad de las variables según las donantes.

En esta tabla I, muestra la clasificación de las variables para su operacionalidad tomando en cuenta la edad de las participantes, la ocupación laboral, el grupo étnico al que pertenecen y las semanas de embarazo presentadas al momento de la atención del parto y extracción de la placenta.

### 3.12. Cambios estructurales considerados para la comparación

La tabla II muestra el análisis de las variables estructurales producidas por el proceso de crioconservación de las membranas amnióticas utilizadas en el estudio.

Nombre de la Variable	Tipo de variable	Escala de Clasificación
Monocapa de células epiteliales	Cualitativa	Normal, estratificación o destrucción
Membrana basal	Cualitativa nominal	Normal, adelgazada, desaparición o grosor
Estroma	Cualitativa nominal	Normal, adelgazada, grosor o presentación de edema o fibrosis
Vacuolas intracitoplasmáticas	Cualitativa nominal	Ausencia o presencia

**Tabla II.** Operacionalidad de las variables de los cambios estructurales con respecto a la crioconservación.

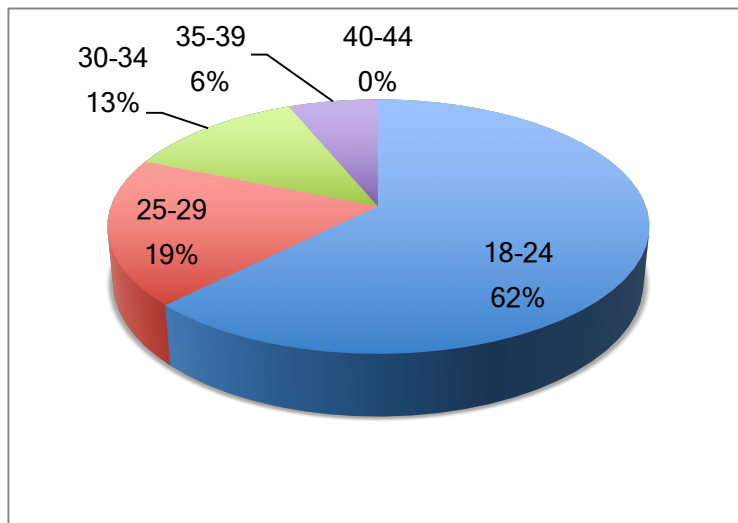
La tabla II, muestra la clasificación de las variables para su operacionalidad tomando en cuenta los cambios estructurales en su monocapa de células epiteliales, membrana basal, estroma y vacuolas intracitoplasmáticas que se presenten en la membrana amniótica al ser sometida al proceso de crioconservación para el estudio.

## CAPÍTULO IV

### 4.1. RESULTADOS

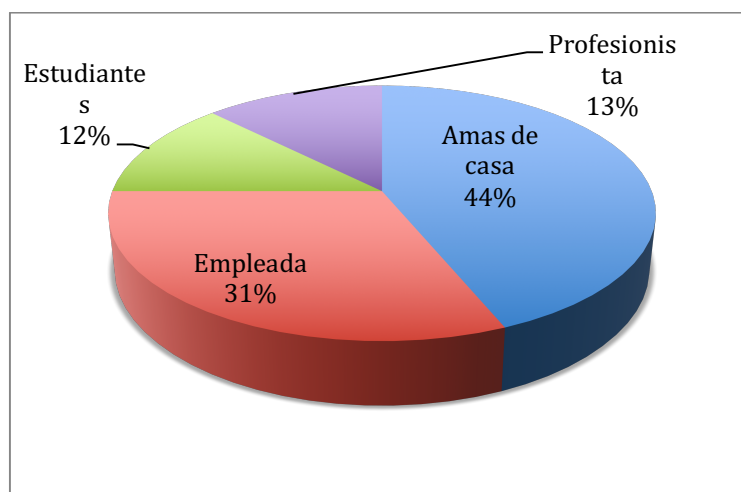
#### 4.1.1. Características de las donantes

Las 16 placentas de las que se obtuvo la membrana amniótica para establecer los grupos de estudio, procedían de donantes con una edad media de 24 años, con la mayoría de ellas entre los 18-24 años (62%). La distribución de las donantes por grupos de edad puede verse en la Gráfica 1.



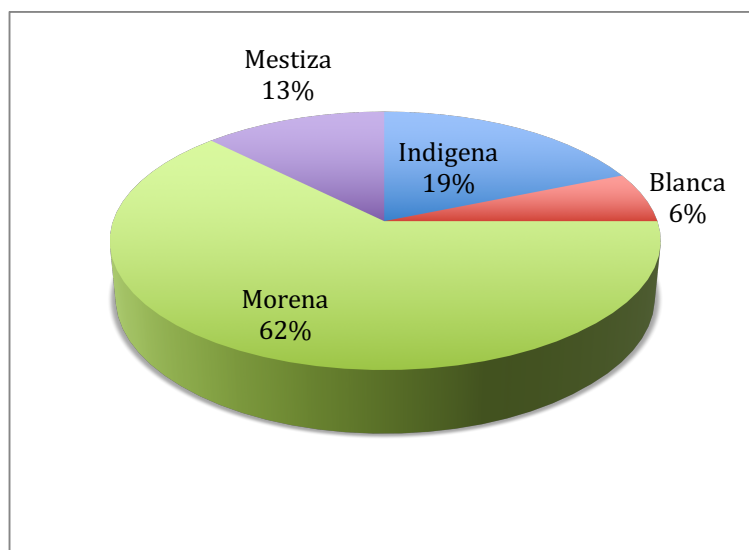
**Gráfica 1.** Edad de las donantes.

En la Gráfica 2 muestra la distribución porcentual de la ocupación laboral de las 16 donantes en el momento del diagnóstico donde el 44% son amas de casa.



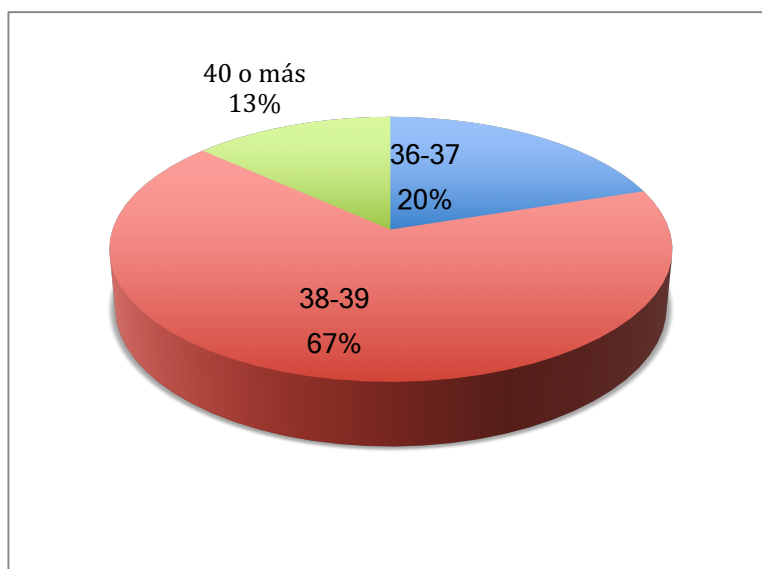
**Gráfica 2.** Ocupación laboral de las donantes.

En la Gráfica 3 muestra la distribución porcentual del grupo étnico de las 16 donantes en el momento del diagnóstico donde 62% son morenas.



**Gráfica 3.** Grupo étnico de las donantes.

En la Gráfica 4 muestra la distribución porcentual de las semanas de embarazo al momento del parto de las 16 donantes de placenta en donde el 67% de ellas lo presentaron entre la semana 38 y 39.



**Gráfica 4.** Semanas de embarazo al momento del parto de las donantes.

## 4.1.2. Evaluación morfológica de la membrana amniótica

### 4.1.2.1. Aspectos macroscópicos

La membrana amniótica no preservada, es un tejido translúcido y blanquecino, de superficie resbaladiza, y adherente por su cara estromal. Es también elástico y resistente a la rotura (Figura 7). La membrana amniótica liofilizada sin hidratar es rígida y se fragmenta con facilidad. Tras ser rehidratada, es más fina y transparente y su coloración es blancoamarillenta (Figura 8).



**Figura 7.** Aspectos macroscópicos de la membrana amniótica no preservada.

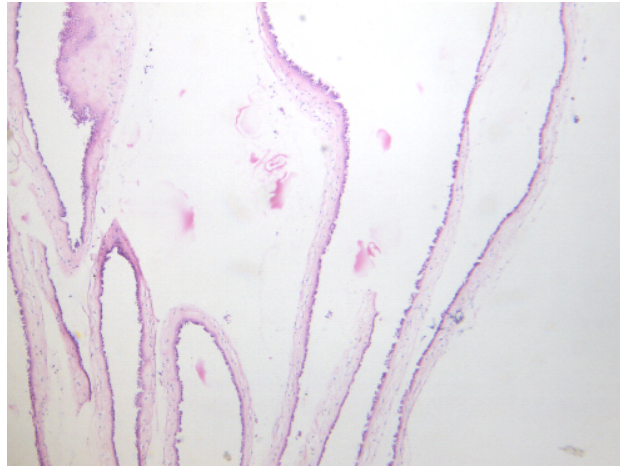


**Figura 8.** Aspecto macroscópico de la membrana amniótica rehidratada.

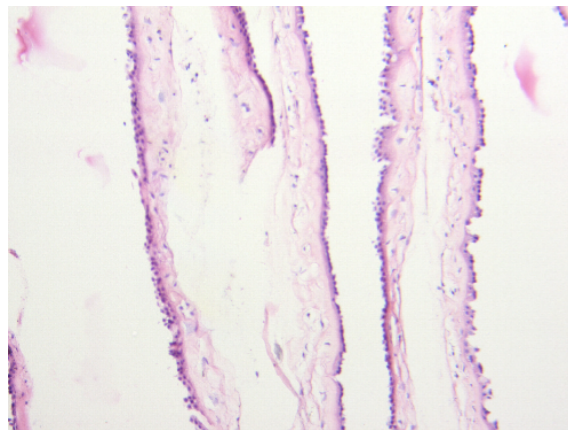
La membrana amniótica fresca se observa macroscópicamente como un tejido laxo, elástico, si se mantiene hidratada es muy manejable para los procesos de TMA en cualquier zona de lesión corporal, tal como lo muestran las figuras 7 y 8.

#### 4.1.2.2. Aspectos microscópicos en cortes de parafina teñidos con Hematoxilina-Eosina

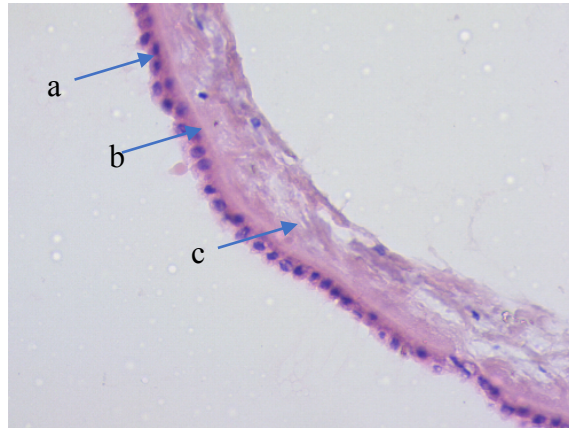
La membrana amniótica está formada por un epitelio cuboide, con estrechos contactos laterales que descansa sobre una membrana basal, y un estroma avascular que se dividen en tres capas, la capa esponjosa, la capa fibrosa (en la que se encuentran fibroblastos y células de Hofbauer) y la capa compacta (Figura 9,10 y 11).



**Figura 9.** Estructura histológica de la membrana amniótica liofilizada con glicerol y teñida con hematoxilina-eosina, vista a 4X con microscopio óptico.



**Figura 10.** Estructura histológica de la membrana amniótica liofilizada con glicerol y teñida con hematoxilina-eosina, vista a 10X con microscopio óptico.

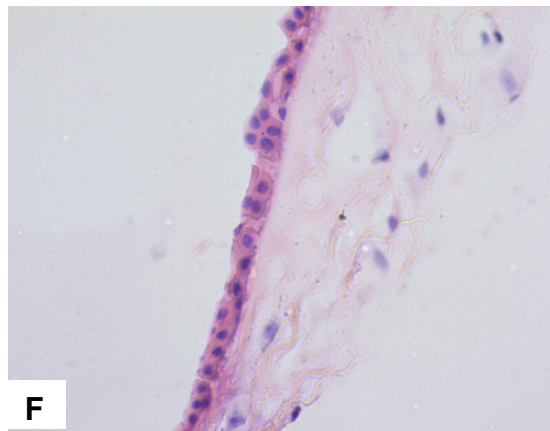
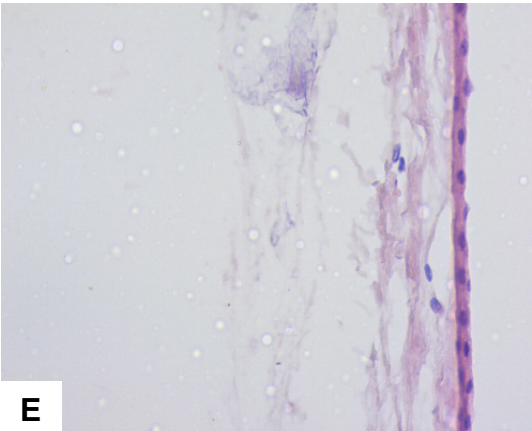
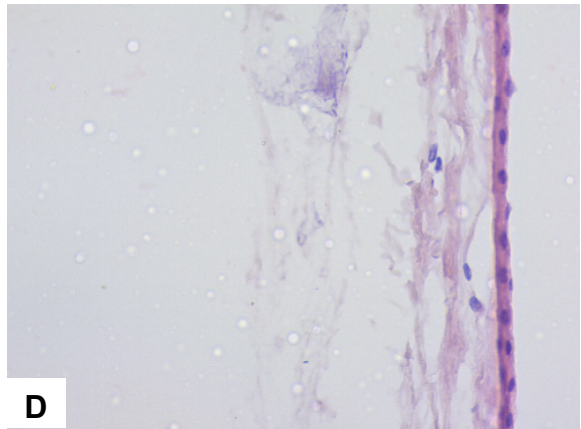
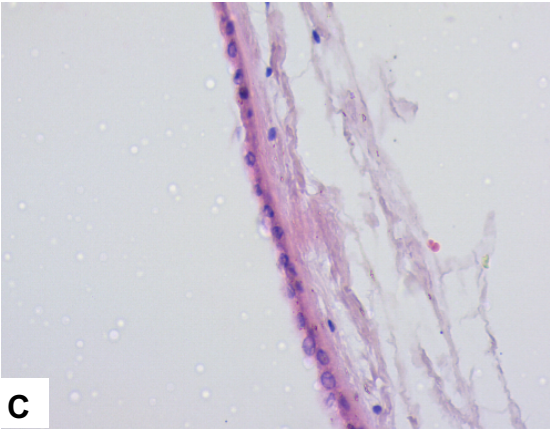
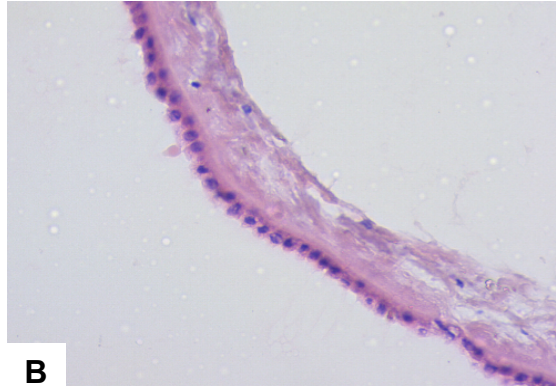
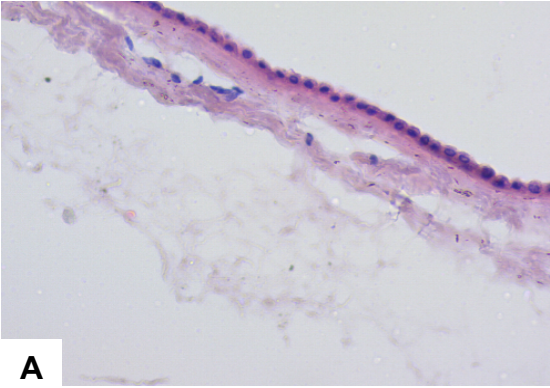


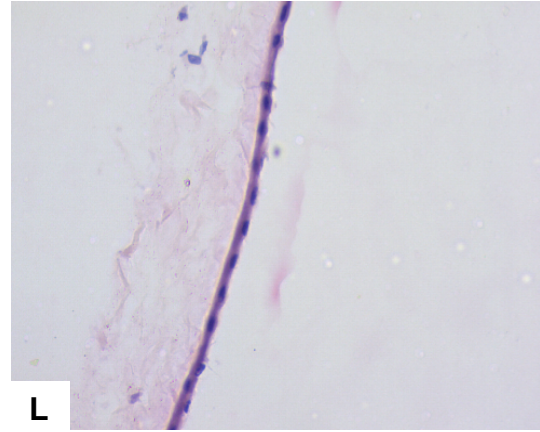
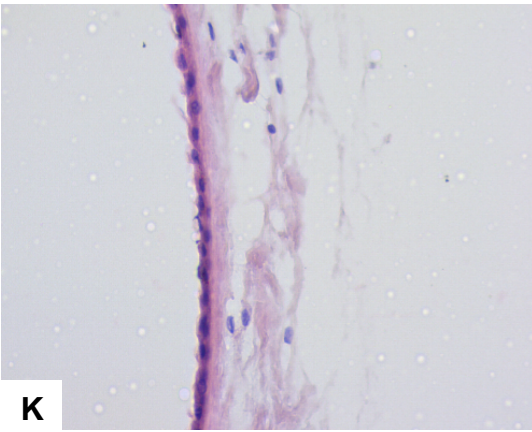
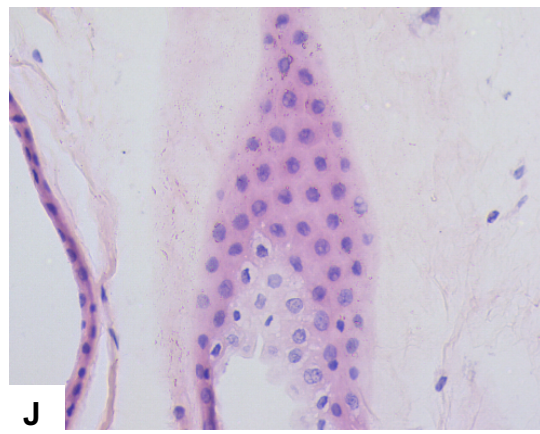
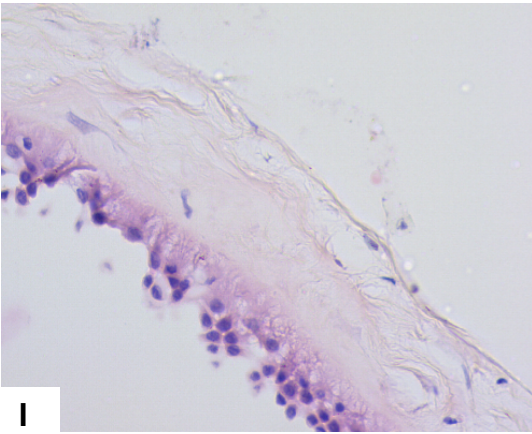
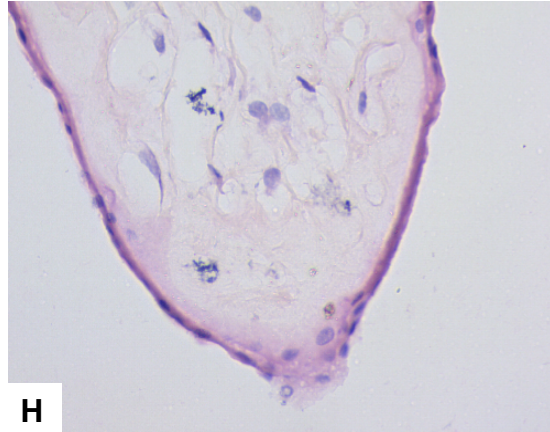
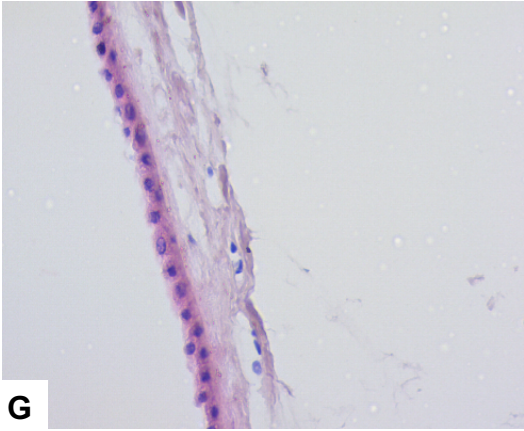
**Figura 11.** Estructura histológica de la membrana amniótica liofilizada con glicerol y teñida con hematoxilina-eosina, vista a 40X con microscopio óptico. En donde se presenta la monocapa de células epiteliales(a), membrana basal(b) y estroma(c).

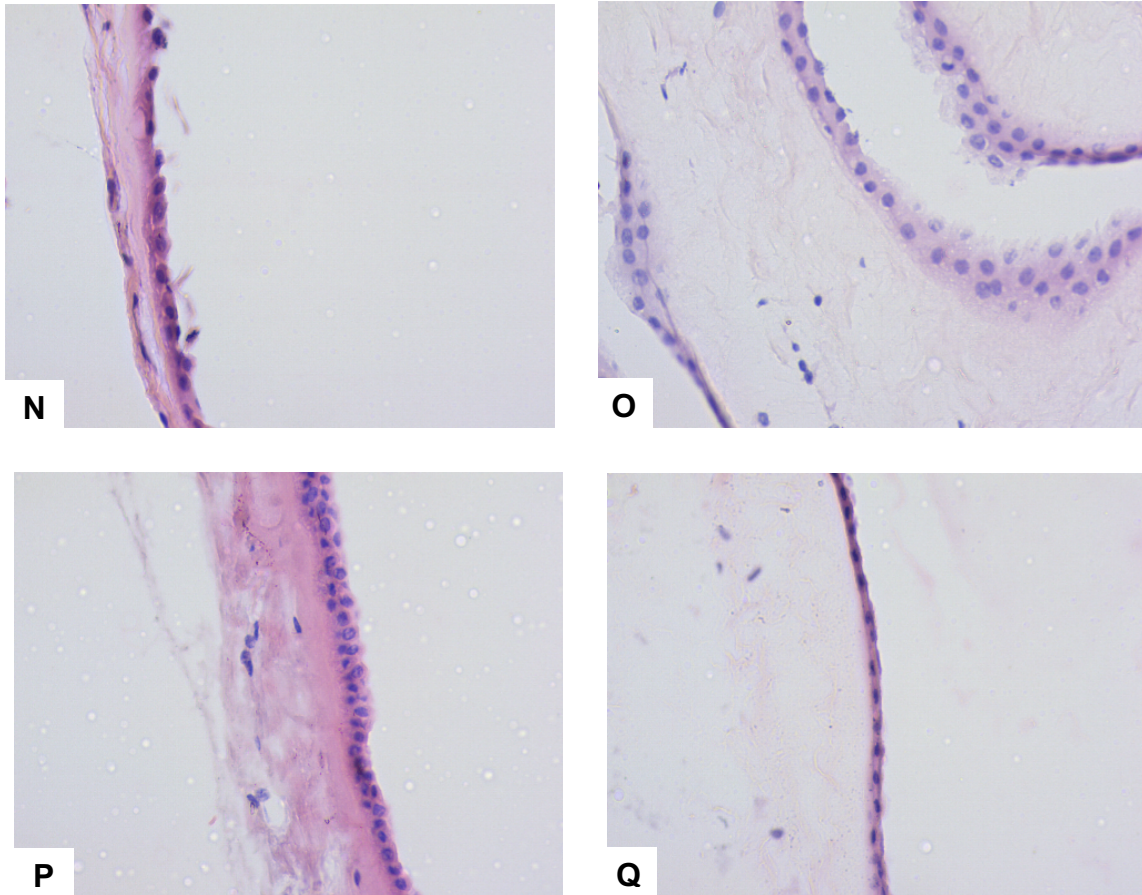
Las figuras 9,10 y 11 muestran las capas estructurales histológicas que conforman la MA crioconservada con glicerol y teñida con hematoxilina-eosina observada al microscopio óptico con lentes 4X, 10X y 40X permiten mostrar las células epiteliales, la membrana basal y el estroma que conforman estructuralmente la MA, sin alteraciones morfológicas ni histológicas.

#### **4.1.3. Resultados histológico del proceso de crioconservación**

Se estandarizó un proceso de crio-conservación de la membrana amniótica con glicerol más AgNPs al 0.01% a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para ser utilizada en numerosos estudio *in vivo* e *in vitro*. En el procesos de crio-conservación se evalúa la estructura histológica de las membranas amnióticas de las 16 voluntarias. Los parámetros evaluados fueron la monocapa de células epiteliales, con conservación de la membrana basal, estroma y la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas. Resultados de los diferentes cortes histológicos de las membranas amnióticas crio-conservada con glicerol más la aplicación de AgNPs a  $-80^{\circ}\text{C}$ .





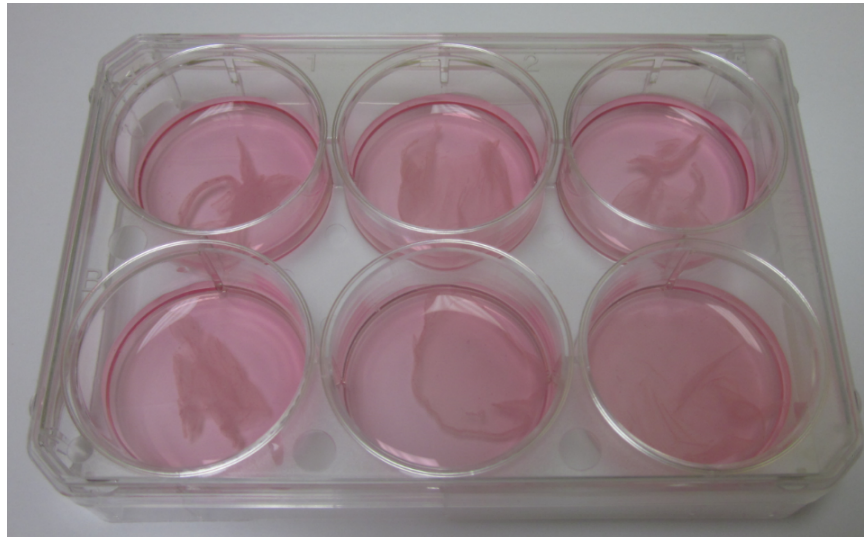


**Figura 12.** Estructura histológica de la membrana amniótica crio-conservada con glicerol más nanopartículas de plata al 0.01% a -80°C. Estructura histológica normal (A y B) con monocapa de células epiteliales normales, conservación de la membrana basal y estroma normal. La membrana amniótica presenta ligero daño en la monocapa de células epiteliales con pérdida de la membrana basal y áreas de estratificación(C y D). Ligero desestructuración del epitelio, pérdida de la membrana basal y estroma(E). Estructura histológica normal con células epiteliales normales, membrana basal y estroma normal(F,G). Pérdida de las células epiteliales con áreas de estratificación(H). Abundante destrucción de la monocapa de células epiteliales con ligera pérdida de la membrana basal(I). Monocapa de células epiteliales normales, conservación de la membrana basal y estroma normal(J). Ligero adelgazamiento de la monocapa de células epiteliales, pérdida de la membrana basal y estroma(K, L y M). Monocapa de células epiteliales normales, conservación de la membrana basal y estroma normal. H&E, 40x. Células epiteliales normales, conservación de la membrana basal y estroma normal con presencia de áreas de estratificación(O y P). Monocapa de células epiteliales normales, conservación de la membrana basal y estroma normal(Q). H&E, 40x.

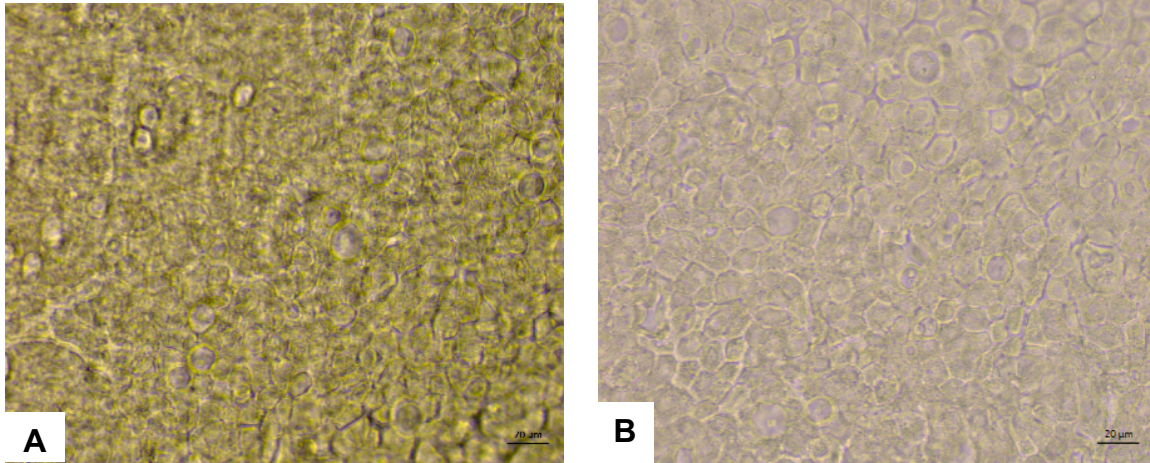
#### 4.1.4. Efecto de las nanopartículas de plata con la MA

Para evaluar el efecto de la crio-conservación del glicerol más la aplicación de las AgNPs al 0.01% de la MA, se realizaron diferentes estudios colocando en placas de 6 pocillos los fragmentos de MA (Figura 13), dejando por periodos de 24, 48 y 72

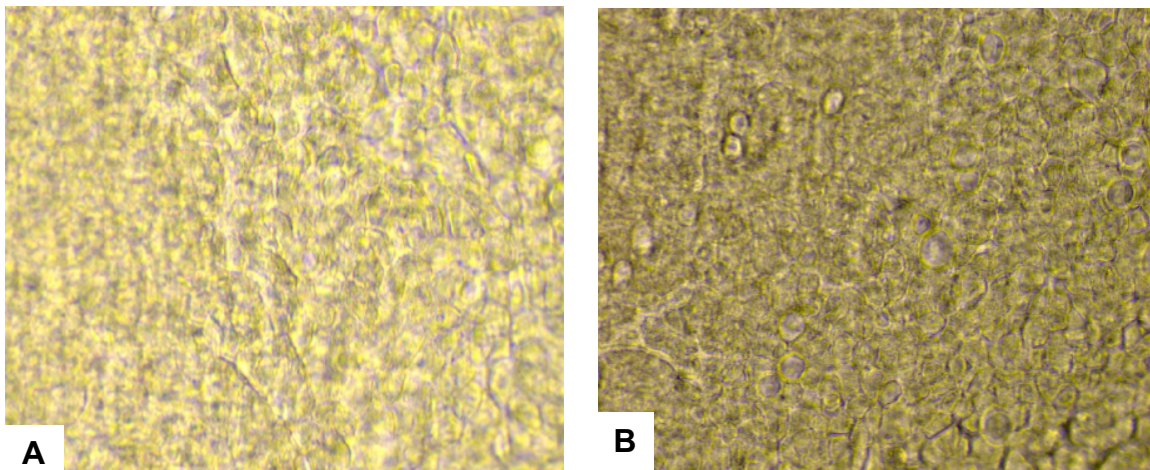
horas, así como 7 días en estufa de CO<sub>2</sub> al 5%, a 37°C y 80% de humedad, para ser utilizada en numerosos estudio *in vivo* e *in vitro*. En el procesos de crio-conservación se evalúa la estructura histológica de las placentas. Los parámetros evaluados fueron la estructura de la monocapa de células epiteliales, conservación de la membrana basal, estroma y la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas. Los resultados muestran que ninguna de las membranas crio-conservadas con glicerol más la aplicación de AgNPs al 0.01% presento crecimiento bacteriano y las fotografías de la membrana amniótica (Figura 14, A Y B) fueron tomadas con microscopio óptico invertido, en donde muestra la superficie de las células epiteliales, de forma poligonal. Esta disposición se conserva en todos los grupos estudiados. En la MA crio-conservada con glicerol y AgNPs al 0.01%, también se observaron aplanamiento de la superficie de las células epiteliales con pérdida de los microvilli que a mayores aumentos aparecen condesados (Figura 15 A y B).



**Figura 13.** Membrana amniótica crio-conservada con glicerol más la aplicación de las nanopartículas de plata al 0.01%. Se muestran en placas de 6 pocillos para ser observadas con microscopio óptico invertido.



**Figura 14.** Membrana amniótica crio-conservada con glicerol más la aplicación de las nanopartículas de plata al 0.01%. Estudio con microscopio óptico invertido. Conservación de la morfología epitelial poligonal, adheridas unas a otras, constituyendo una especie de mosaico ordenado de manera irregular y aplanamiento de la superficie celular (A), con condensación de microvilli a mayores aumentos (B).



**Figura 15.** Membrana amniótica crio-conservada con glicerol más la aplicación de las nanopartículas de plata al 0.01% (A y B). Estudio con microscopio óptico invertido a 10X. Conservación de la morfología epitelial poligonal, adheridas unas a otras, constituyendo una especie de mosaico ordenado de manera irregular y aplanamiento de la superficie celular.

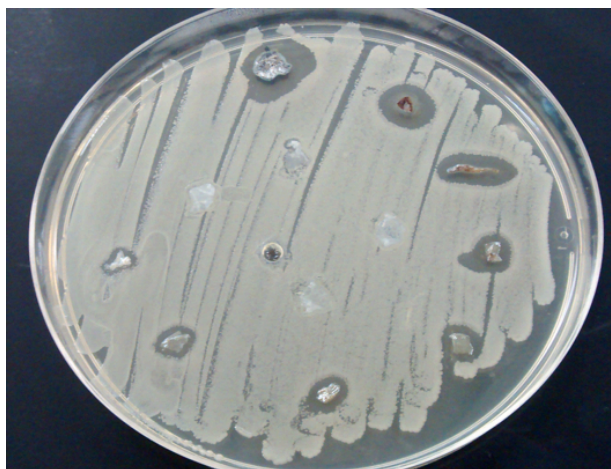
#### 4.1.5. Resultado de la inhibición del crecimiento bacteriano determinado por el diámetro de los halos de inhibición en agar

Las cepas de importancia médica utilizadas en el estudio fueron la *Escherichia coli* (ATCC 335342) (Figura 16), *Salmonella spp* (Figura 17), *Pseudomona aeruginosa* (Figura 18) y *Klebsiella pneumoniae* (Figura 19) del grupo de las Gram negativas, *Listeria monocytogenes* (ATCC 687891) (Figura 20), *Staphylococcus aureus* (Figura

21), *Staphylococcus epidermidis* (Figura 22), *Streptococcus pyogenes* (Figura 23), *Enterococo fecalis* (ATCC 29212) (Figura 24) del grupo de las Gram positivas y *Candida albicans* (ATCC 90028) (Figura 25) del grupo de los hongos. Posteriormente diferentes fragmentos de MA se impregno con AgNPs a las siguientes concentraciones 1(5%), 2(2.5%), 3(1.25%), 4(0.625%), 5(0.312%), 6(0.1562%), 7(0.0781%), 8(0.0390%), 9(0.0195%), 10(0.00975), 11(0.004875%) y 12(0.0024375%) respectivamente, para evaluar el halo de inhibición, que se clasifico en; sensible, intermedio y resistente.

### **Bacterias Gram Negativas**

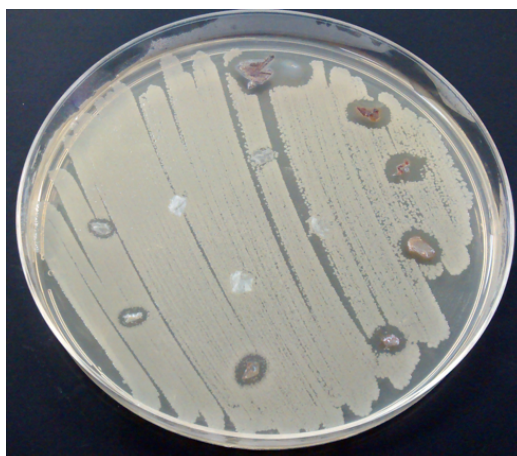
En la figura 16 se observa la distribución de la bacteria *Escherichia coli* sobre el agar Mueller Hinton(MH), en donde se colocaron las membranas amnióticas con las diferentes concentraciones de AgNPs (siguiendo el sentido de las manecillas del reloj) para evaluar los halos de inhibición. Las concentraciones del 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312% y 0.1562%, se clasificaron como sensibles, las concentraciones del 0.0781% y 0.0390%, se clasificaron como intermedias y las concentraciones del 0.0195%, 0.00975, 0.004875% y 0.0024375%, se consideraron como resistentes.



**Figura 16.** Se muestran la figura de la bacteria *Escherichia coli* que presenta los primeros 6 halos de inhibición en la MA como sensibles, los siguientes 2 halos de inhibición como intermedios y los últimos 4 halos como resistentes.

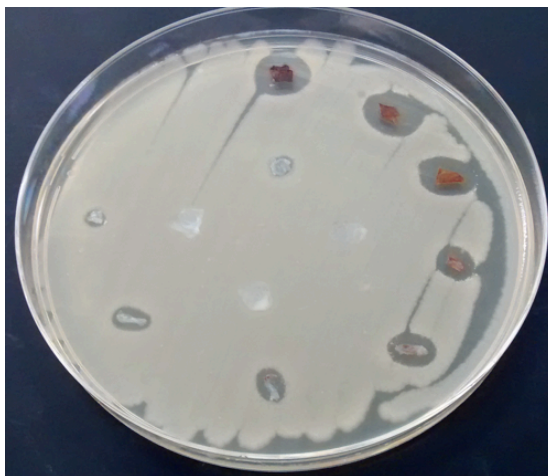
En la figura 17 se observa la distribución de la bacteria *Salmonella spp* sobre el agar MH. En donde se colocaron las membranas amnióticas con las diferentes

concentraciones de AgNPs (siguiendo el sentido de las manecillas del reloj) para evaluar los halos de inhibición. Las concentraciones del 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312% y 0.1562%, se clasificaron como sensibles, las concentraciones del 0.0781% y 0.0390%, se clasificaron como intermedias y las concentraciones del 0.0195%, 0.00975, 0.004875% y 0.0024375%, se consideraron como resistentes.



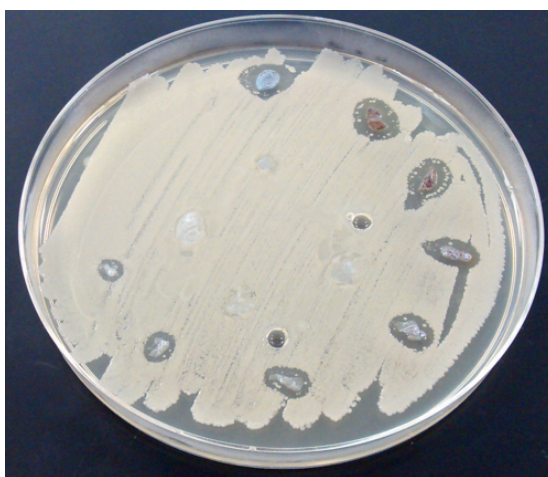
**Figura 17.** Se muestran la figura de la bacteria *Salmonella spp* que presenta los primeros 6 halos de inhibición en la MA como sensibles, los siguientes 2 halos de inhibición en la MA como intermedios y los últimos 4 halos como resistentes.

En la figura 18 se observa la distribución de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* sobre el agar MH. En donde se colocaron las membranas amnióticas con las diferentes concentraciones de AgNPs (siguiendo el sentido de las manecillas del reloj) para evaluar los halos de inhibición. Las concentraciones del 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312%, 0.1562% y 0.0781%, se clasificaron como sensibles, las concentraciones del 0.0390% y 0.0195%, se clasificaron como intermedias y las concentraciones del 0.00975, 0.004875% y 0.0024375%, se consideraron como resistentes.



**Figura 18.** Se muestran la figura de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* que presenta los primeros 7 halos de inhibición en la MA como sensibles, los siguientes 2 halos en la MA como intermedios y los últimos 3 halos como resistentes.

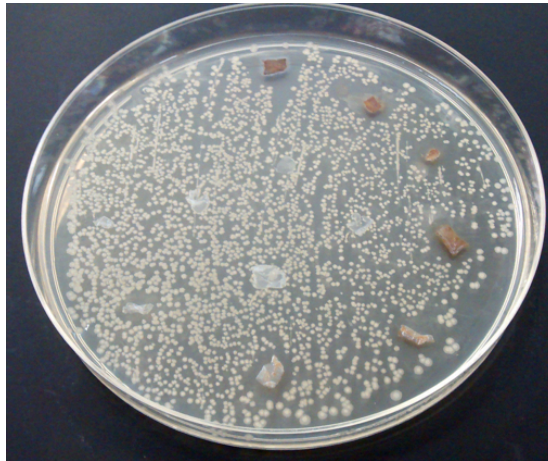
En la figura 19 se observa la distribución de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* sobre el agar MH. En donde se colocaron las membranas amnióticas con las diferentes concentraciones de AgNPs (siguiendo el sentido de las manecillas del reloj) para evaluar los halos de inhibición. Las concentraciones del 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312%, 0.1562% y 0.0781%, se clasificaron como sensibles, la concentraciones de 0.0390%, se clasificó como intermedia y las concentraciones del 0.0195%, 0.00975, 0.004875% y 0.0024375% se consideraron como resistentes.



**Figura 19.** Se muestran la figura de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* que presenta los primeros 7 halos de inhibición en la MA como sensibles, solo un halo de inhibición en la MA como intermedio y los últimos 4 halos como resistentes.

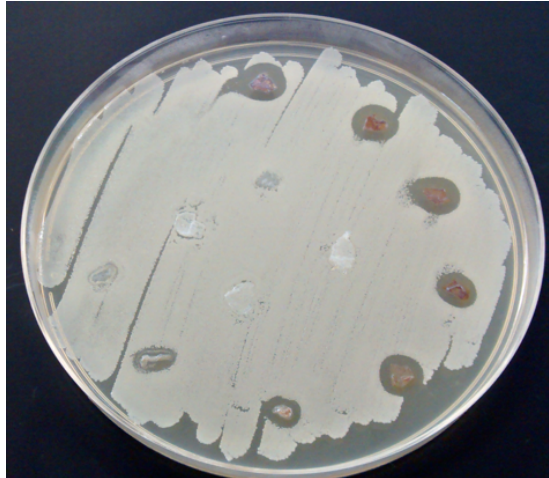
### Bacterias Gram Positivas

En la figura 20 se observa la distribución de la bacteria *Listeria monocytogenes* sobre el agar MH. En donde se colocaron las membranas amnióticas con las diferentes concentraciones de AgNPs (siguiendo el sentido de las manecillas del reloj) para evaluar los halos de inhibición. Las concentraciones del 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312% y 0.1562%, se clasificaron como sensibles, la concentración de 0.0781%, se clasifico como intermedia y las concentraciones de 0.0390%, 0.0195%, 0.00975, 0.004875% y 0.0024375%, se consideraron como resistentes.



**Figura 20.** Se muestran la figura de la bacteria *Listeria monocytogenes* que presenta los primeros 6 halos de inhibición en la MA como sensibles, solo un halos en la MA como intermedios y los últimos 5 halos como resistentes.

En la figura 21 se observa la distribución de la bacteria *Staphylococcus aureus* sobre el agar MH. En donde se colocaron las membranas amnióticas con las diferentes concentraciones de AgNPs (siguiendo el sentido de las manecillas del reloj) para evaluar los halos de inhibición. Las concentraciones del 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625% y 0.312%, se clasificaron como sensibles, las concentraciones del 0.1562% y 0.0781%, se clasificaron como intermedias y las concentraciones del 0.0390%, 0.0195%, 0.00975, 0.004875% y 0.0024375% se consideraron como resistentes.



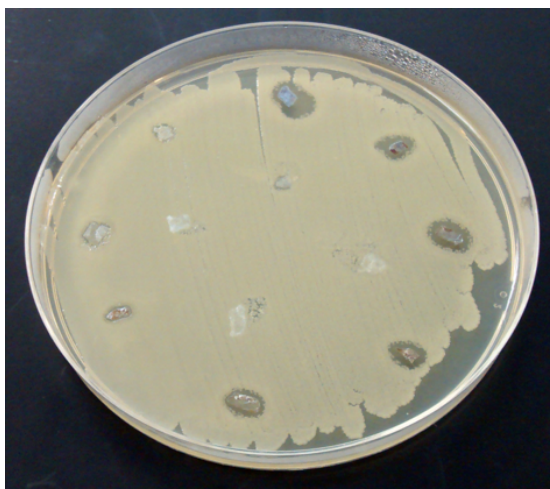
**Figura 21.** Se muestran la figura de la bacteria *Staphylococcus aureus* que presenta los primeros 5 halos de inhibición en la MA como sensibles, dos halos en la MA como intermedios y los últimos 5 halos como resistentes.

En la figura 22 se observa la distribución de la bacteria *Staphylococcus epidermidis* sobre el agar MH. En donde se colocaron las membranas amnióticas con las diferentes concentraciones de AgNPs (siguiendo el sentido de las manecillas del reloj) para evaluar los halos de inhibición. Las concentraciones del 5%, 2.5%, 1.25%, y 0.625%. se clasificaron como sensibles, las concentraciones del 0.312%, 0.1562% y 0.0781%. se clasificaron como intermedias y las concentraciones del 0.0390% 0.0195%, 0.00975, 0.004875% y 0.0024375%, se consideraron como resistentes.



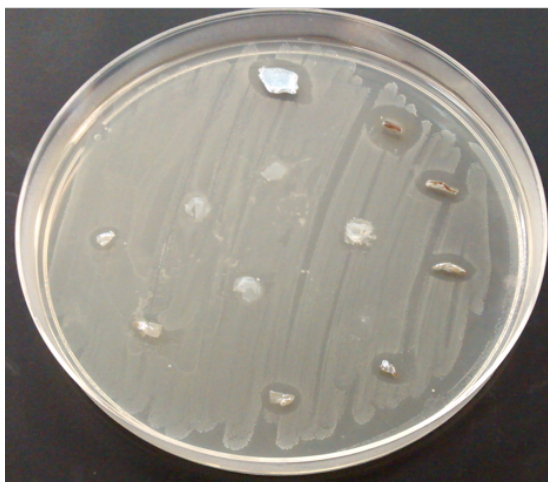
**Figura 22.** Se muestran la figura de la bacteria *Staphylococcus epidermidis* que presenta los primeros 4 halos de inhibición en la MA como sensibles, los siguientes 3 halos de inhibición en la MA como intermedios y los últimos 5 halos como resistentes.

En la figura 23 se observa la distribución de la bacteria *Streptococcus pyogenes* sobre el agar MH. En donde se colocaron las membranas amnióticas con las diferentes concentraciones de AgNPs (siguiendo el sentido de las manecillas del reloj) para evaluar los halos de inhibición. Las concentraciones del 5%, 2.5%, 1.25% y 0.625%, se clasificaron como sensibles, la concentración del 0.312%, se clasificó como intermedias y las concentraciones del 0.1562%, 0.0781%, 0.0390% 0.0195%, 0.00975, 0.004875% y 0.0024375%, se consideraron como resistentes.



**Figura 23.** Se muestran la figura de la bacteria *Streptococcus pyogenes* que presenta los primeros 4 halos de inhibición en la MA como sensibles, un halo de inhibición en la MA como intermedio y los últimos 7 halos como resistentes.

En la figura 24 se observa la distribución de la bacteria *Enterococo fecalis* sobre el agar MH. En donde se colocaron las membranas amnióticas con las diferentes concentraciones de AgNPs (siguiendo el sentido de las manecillas del reloj) para evaluar los halos de inhibición. Las concentraciones del 5%, 2.5%, 1.25% y 0.625%, se clasificaron como sensibles, la concentración del 0.312%, se clasificó como intermedias y las concentraciones del 0.1562%, 0.0781%, 0.0390% 0.0195%, 0.00975, 0.004875% y 0.0024375%, se consideraron como resistentes.



**Figura 24.** Se muestran la figura de la bacteria *Enterococo fecalis* que presenta los primeros 4 halos de inhibición en la MA como sensibles, un halo de inhibición en la MA como intermedio y los últimos 7 halos como resistentes.

**Hongos:**

En la figura 25 se observa la distribución del hongo *Cándida albicans* sobre el agar MH. En donde se colocaron las membranas amnióticas con las diferentes concentraciones de AgNPs (siguiendo el sentido de las manecillas del reloj) para evaluar los halos de inhibición. Las concentraciones del 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312%, 0.1562% y 0.0781%, se clasificaron como sensibles, la concentraciones de 0.0390%, se clasificó como intermedia y las concentraciones del 0.0195%, 0.00975, 0.004875% y 0.0024375%, se consideraron como resistentes.



**Figura 25.** Se muestran la figura del hongo *Cándida albicans* que presenta los primeros 6 halos de inhibición en la MA como sensibles, solo dos halos de inhibición en la MA como intermedio y los últimos 4 halos como resistentes.

#### 4.1.6. Análisis de resultados de los estudios de halos de inhibición bacteriana.

En la tabla III se presenta los resultados de los halos de inhibición bacteriana que se clasificaron en sensible, intermedio y resistente de las diferentes bacterias gram negativas, gram positivas y levaduras.

Bacteria [ ] NpdP %	5	2.5	1.25	0.625	0.312	0.1562	0.0781	0.0390	0.0195	0.00975	0.004875	0.0024375
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	I	I	R	R	R	R	R
<i>Salmonella spp</i>	S	S	S	I	I	I	I	I	R	R	R	R
<i>P. aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	I	I	I	R	R	R
<i>K. pneumoniae</i>	S	S	S	S	I	I	I	I	R	R	R	R
<i>L.monocytogenes</i>	S	S	S	S	S	I	I	R	R	R	R	R
<i>S. aureus</i>	S	S	S	S	S	S	I	I	I	R	R	R
<i>S. epidermidis</i>	S	S	S	S	R	R	I	I	R	R	R	R
<i>S. pyogenes</i>	S	S	S	S	S	I	I	I	R	R	R	R
<i>E. fecalis</i>	S	S	S	S	S	S	I	I	R	R	R	R
<i>Candida albicans</i>	S	S	S	S	S	S	I	I	R	R	R	R

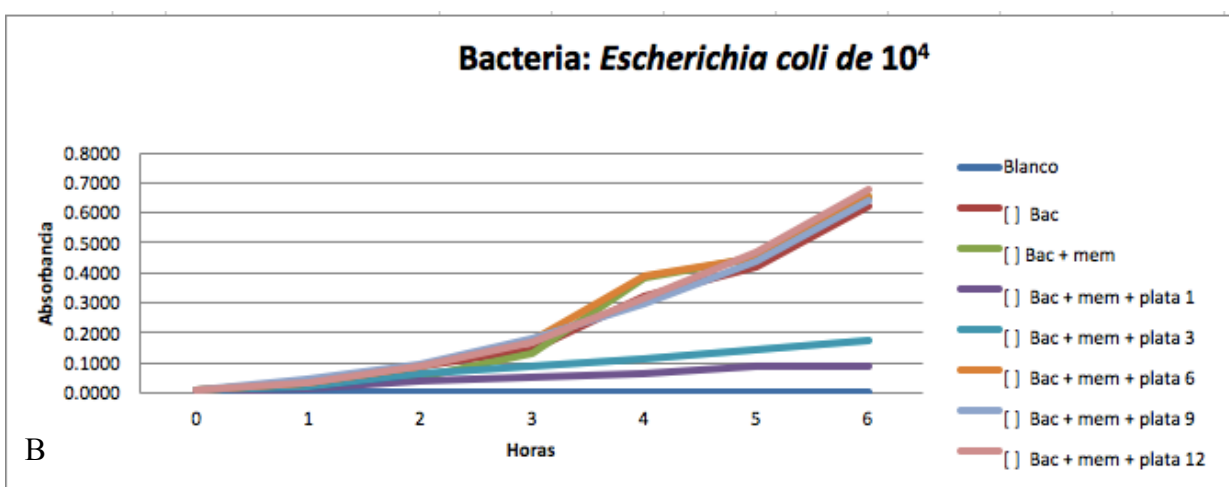
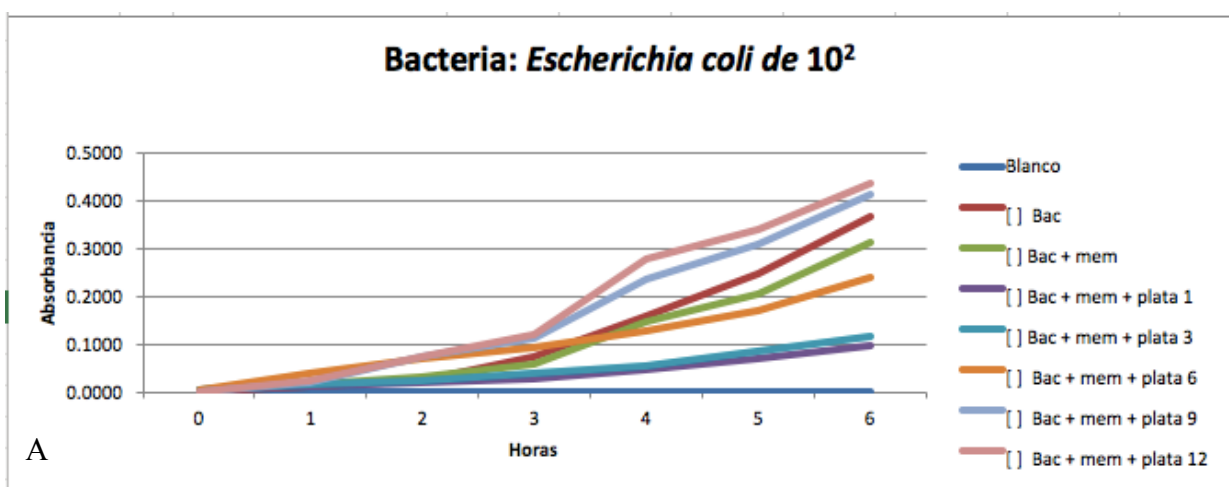
**Tabla III.** Comparativa de halo de inhibición bacteriana ante diferentes concentraciones de AgNPs.

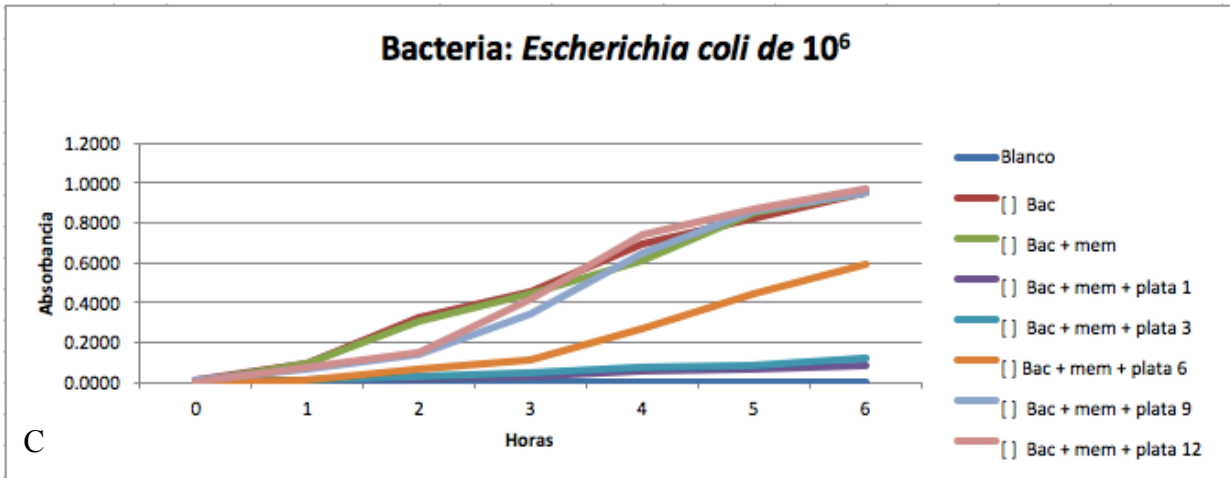
El análisis de los halos de inhibición bacteriana, se caracteriza por evaluar la sensibilidad de cada una de las bacterias frente las diferentes concentraciones de AgNPs utilizadas en el estudio. La bacteria *Escherichia coli* mostró una inhibición bacteriana a las primeras cinco concentraciones utilizadas (5%, 2.5%, 1.25%, 0.625% y 0.312%), caracterizándolas como sensible, las concentraciones de 0.1562% y 0.0781%, mostraron una inhibición intermedia y las concentraciones menores de 0.0390%, fueron resistentes. La bacteria *Salmonella spp* mostró una inhibición bacteriana a las primeras tres concentraciones utilizadas (5%, 2.5% y 1.25%), determinándolas como sensible, las concentraciones de 0.625%, 0.312%, 0.1562%, 0.0781% y 0.0390%, mostraron una inhibición intermedia y las concentraciones menores de 0.0195%, fueron resistentes. La bacteria *Pseudomona aeruginosa* mostró una inhibición bacteriana a las primeras seis concentraciones utilizadas (5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312% y 0.1562%), determinándolas como sensible, las concentraciones de 0.0781%, 0.0390% y 0.0195%, presentaron una inhibición intermedia y las concentraciones menores de 0.00975%, fueron resistentes.

La bacteria *Klebsiella pneumoniae* mostró una inhibición bacteriana a las primeras cuatro concentraciones utilizadas (5%, 2.5%, 1.25% y 0.625%), determinándolas como sensible, las concentraciones de 0.312%, 0.1562%, 0.0781% y 0.0390%, mostraron una inhibición intermedia y las concentraciones menores de 0.0195%, fueron resistentes. La bacteria *Listeria monocytogenes* mostró inhibición bacteriana a las primeras cinco concentraciones utilizadas (5%, 2.5%, 1.25%, 0.625% y 0.312%), determinándolas como sensible, las concentraciones de 0.1562% y 0.0781%, mostraron una inhibición intermedia y las concentraciones menores de 0.0390%, fueron resistentes. Así mismo la bacteria *Staphylococcus aureus* mostró una mejor inhibición bacteriana en las primeras seis concentraciones utilizadas (5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312% y 0.1562%), determinándolas como sensible, las concentraciones de 0.0781%, 0.0390% y 0.0195%, mostraron una inhibición intermedia y las concentraciones menores de 0.00975%, fueron resistentes. La bacteria *Staphylococcus epidermidis* mostró mejor inhibición bacteriana en las primeras cuatro concentraciones utilizadas (5%, 2.5%, 1.25% y 0.625%), determinándolas como sensible, las concentraciones de 0.0781% y 0.0390%, mostraron una inhibición intermedia y las concentraciones menores de 0.312%, fueron resistentes. La bacteria *Streptococcus pyogenes* mostró mejor inhibición bacteriana en las primeras cinco concentraciones utilizadas (5%, 2.5%, 1.25%, 0.625% y 0.312%), determinándolas como sensible, las concentraciones de 0.1562%, 0.0781% y 0.0390%, mostraron una inhibición intermedia y las concentraciones menores de 0.0195%, fueron resistentes. La bacteria *Enterococo fecalis* mostró una inhibición bacteriana en las primeras seis concentraciones utilizadas (5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312% y 0.1562%), determinándolas como sensible, las concentraciones de 0.0781% y 0.0390%, mostraron una inhibición intermedia y las concentraciones menores de 0.0195%, fueron resistentes. Por último, *Cándida albicans* mostró una mejor inhibición bacteriana en las primeras seis concentraciones utilizadas (5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312% y 0.1562%), determinándolas como sensible, las concentraciones de 0.0781% y 0.0390%, mostraron una inhibición intermedia y las concentraciones menores de 0.0195%, fueron resistentes.

#### 4.1.7. Resultados de la prueba de inhibición microbiológica en fase líquida de la MA recubierta con AgNPs

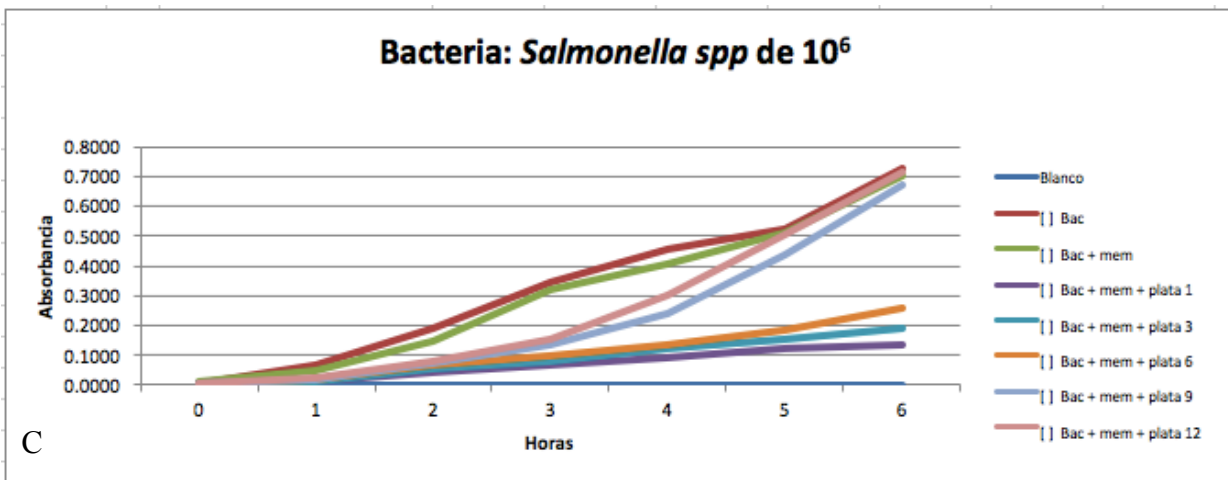
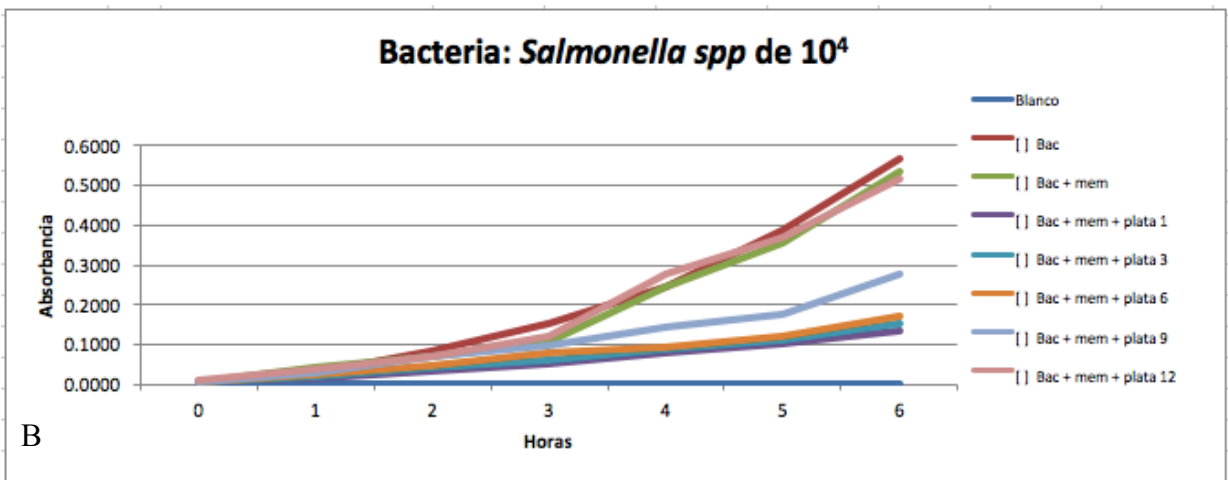
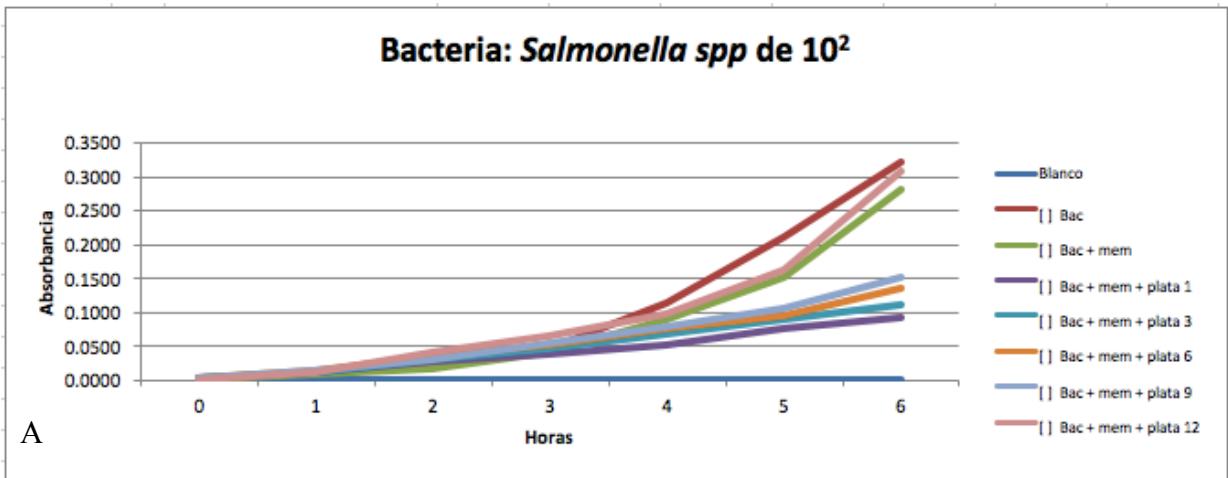
Se analizó el efecto inhibitor que producen las AgNPs impregnadas en la MA, frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y un hongo de importancia médica, estos estudios se realizaron con el fin de determinar la actividad microbicida con tres niveles de inóculo, en donde se determina un número promedio de las cepas en suspensión ( $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$  CFU/mL), colocando un blanco (medio LB), control (bacteria sola), bacteria con MA sin AgNPs y bacteria con MA impregnada con AgNPs a diferentes concentraciones; 1(5%), 3(1.25%), 6(0.1562%), 9(0.0195%) y 12(0.0024375%), respectivamente.





**Gráfica 5:** Se presenta tres gráficas de la cinéticas de inhibición microbiana en fase líquida con *Escherichia coli* a diferentes concentraciones (**A** de  $10^2$ , **B** de  $10^4$  y **C** de  $10^6$ ). En cada cinética se colocó el blanco (LB), la bacteria sola, la bacteria más MA y 5 concentraciones de nanopartículas de plata impregnadas en la MA.

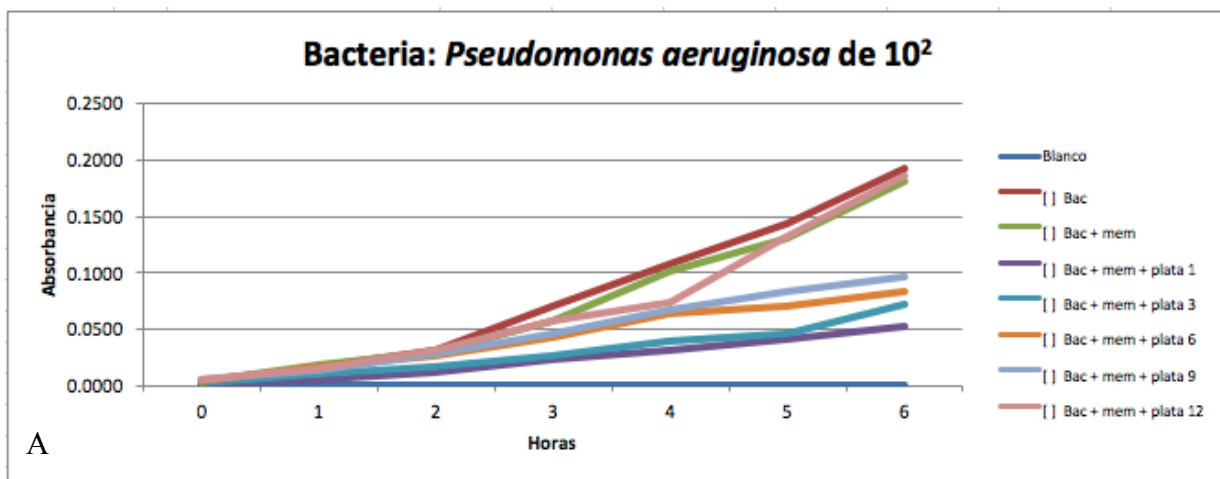
Los resultados obtenidos en las cinéticas en fase líquida con *Escherichia coli* a una concentración de  $10^2$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5% y 1.25% de AgNPs y en menor porcentaje de inhibición a las concentraciones de 0.1562% y 0.0195%. La cinéticas con *Escherichia coli* a concentración de  $10^4$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5% y 1.25% de AgNPs y en menor porcentaje de inhibición a las concentraciones de 0.1562% y 0.0195%. La cinéticas con *Escherichia coli* a concentración de  $10^6$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5% y 1.25% de AgNPs y en menor porcentaje de inhibición a las concentraciones de 0.1562% y 0.0195%. El efecto de inhibición de *Escherichia coli* en las diferentes concentraciones ( $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$ ) de inóculo, mostraron una similitud en los porcentajes de inhibición con las diferentes concentraciones de AgNPs (5%, 1.25% y 0.1562%), obteniendo una mayor inhibición de crecimiento bacteriano a mayor concentración de AgNPs.

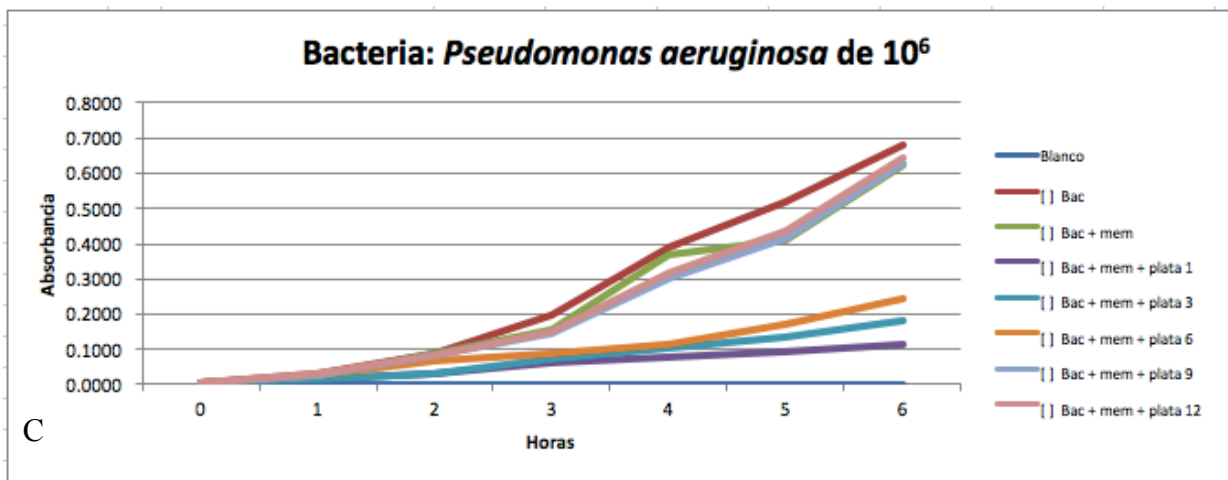
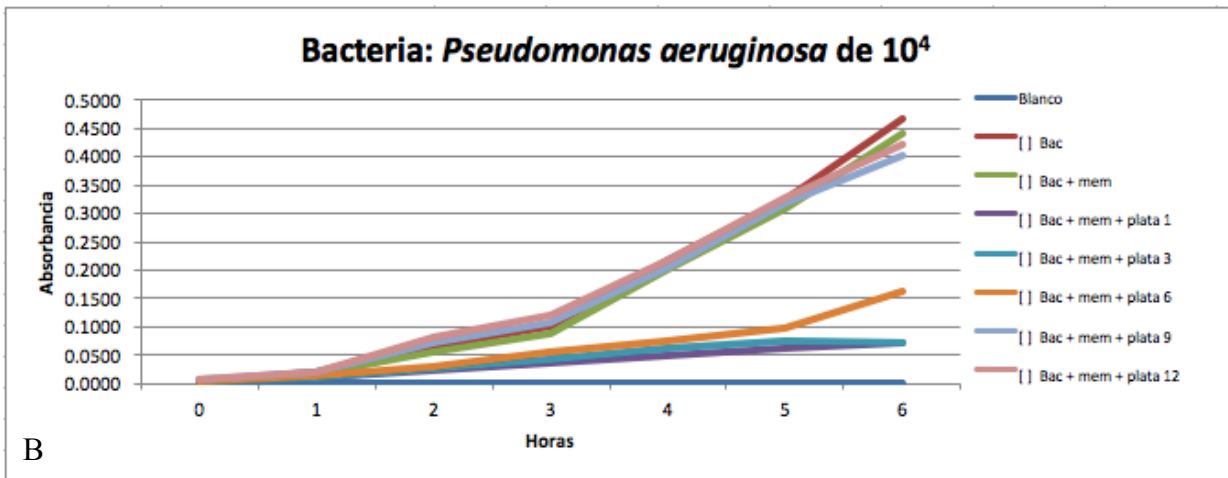


**Gráfica 6:** Se presenta tres gráficas de la cinética de inhibición microbiana en fase líquida con *Salmonella spp* a diferentes concentraciones (**A** de  $10^2$ , **B** de  $10^4$  y **C** de  $10^6$ ). En cada cinética se colocó

el blanco (LB), la bacteria sola, la bacteria más MA y 5 concentraciones de nanopartículas de plata impregnadas en la MA.

Los resultados obtenidos en las cinéticas en fase líquida de *Salmonella spp* a una concentración de  $10^2$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25%, 0.1562% y 0.0195%, de AgNPs. La cinéticas de inhibición en *Salmonella spp* a concentración de  $10^4$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25% y 0.1562% de AgNPs y en menor porcentaje de inhibición a la concentración de 0.0195%. La cinéticas con *Salmonella spp* a concentración de  $10^6$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25% y 0.1562% de AgNPs y en menor porcentaje de inhibición a las concentraciones de 0.0195%. El efecto de inhibición de *Salmonella spp* en las diferentes concentraciones ( $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$ ) de inóculo, mostraron una similitud en los porcentajes de inhibición con las diferentes concentraciones de AgNPs (5%, 1.25% y 0.1562%), obteniendo una mayor inhibición de crecimiento bacteriano a mayor concentración de AgNPs.

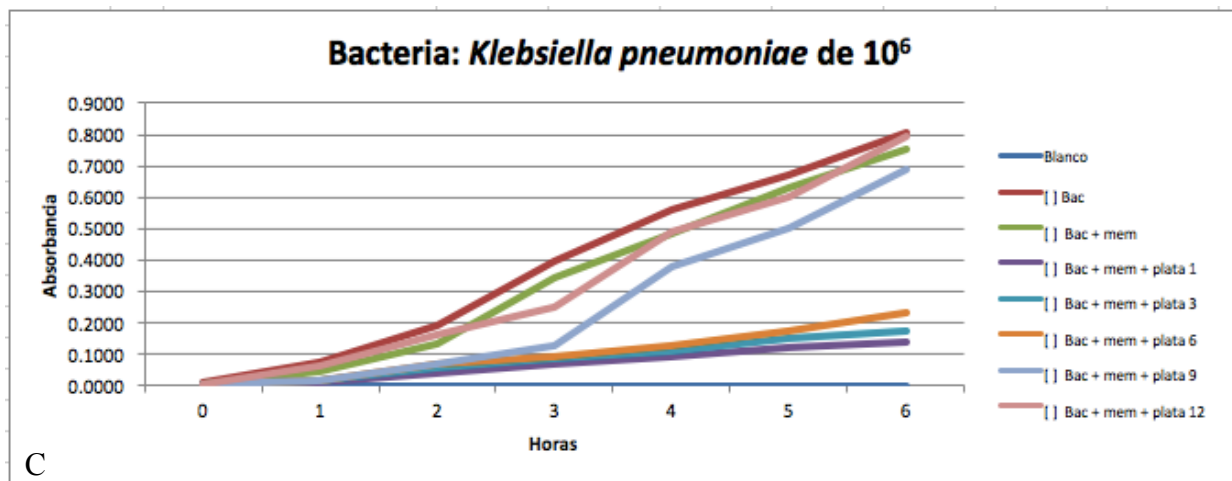
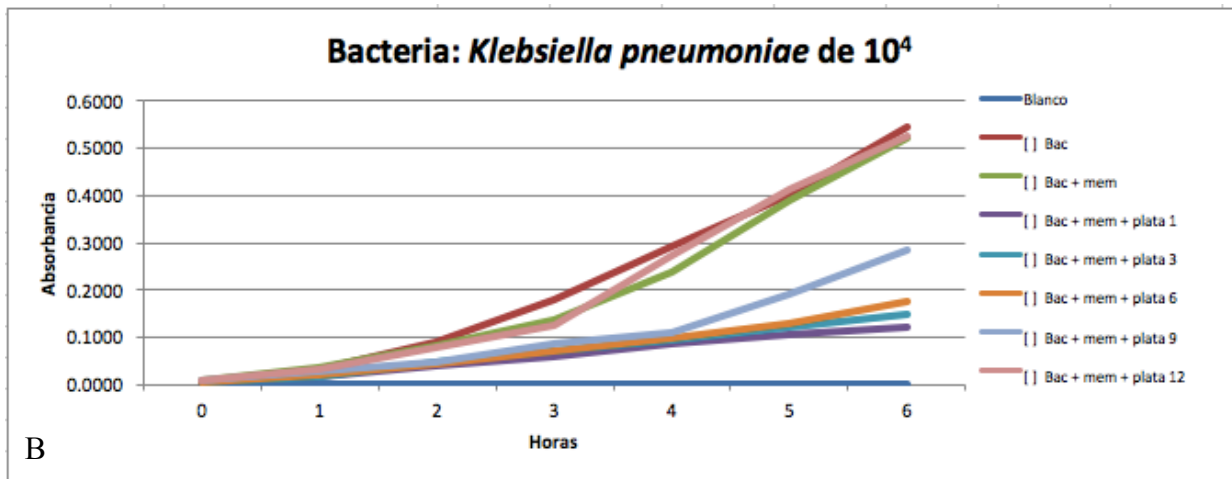
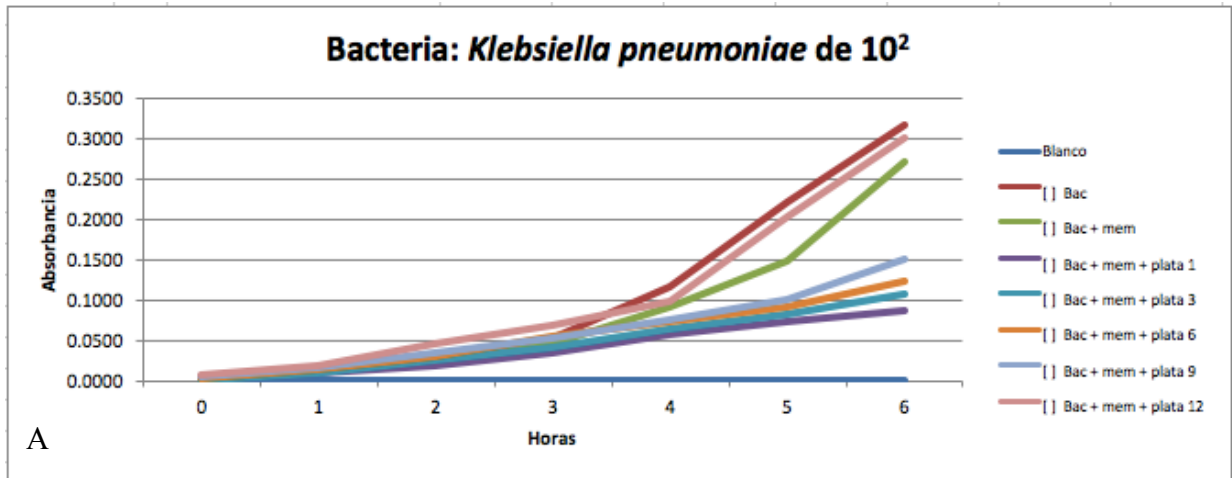




**Gráfica 7:** Se presenta tres gráficas de la cinética de inhibición microbiana en fase líquida con *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentraciones (**A** de  $10^2$ , **B** de  $10^4$  y **C** de  $10^6$ ). En cada cinética se colocó el blanco (LB), la bacteria sola, la bacteria más MA y 5 concentraciones de nanopartículas de plata impregnadas en la MA.

Los resultados obtenidos en las cinéticas en fase líquida de *P. aeruginosa* a una concentración de  $10^2$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25%, 0.1562% y 0.0195%, de AgNPs. La cinética de inhibición en *P. aeruginosa* a concentración de  $10^4$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25% y 0.1562% de AgNPs. La cinética con *P. aeruginosa* a concentración de  $10^6$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25% y 0.1562% de AgNPs y en menor porcentaje de inhibición a las concentraciones de 0.0195%. El efecto de inhibición de *P. aeruginosa* en las diferentes concentraciones ( $10^4$  y  $10^6$ ) de inóculo, mostraron una similitud en los porcentajes de inhibición con las diferentes

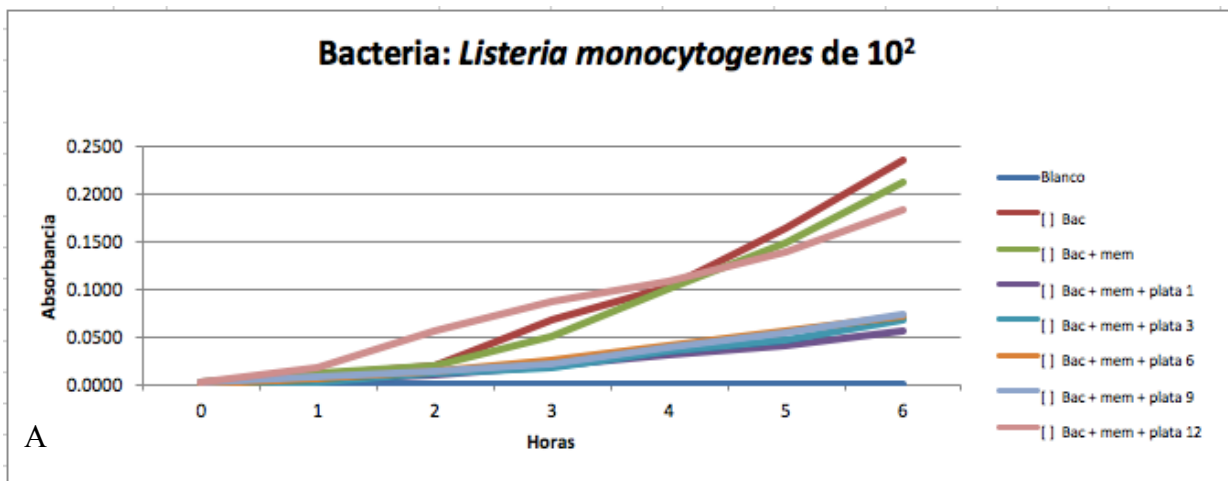
concentraciones de AgNPs (5%, 1.25% y 0.1562%), obteniendo una mayor inhibición de crecimiento bacteriano a mayor concentración de AgNPs.

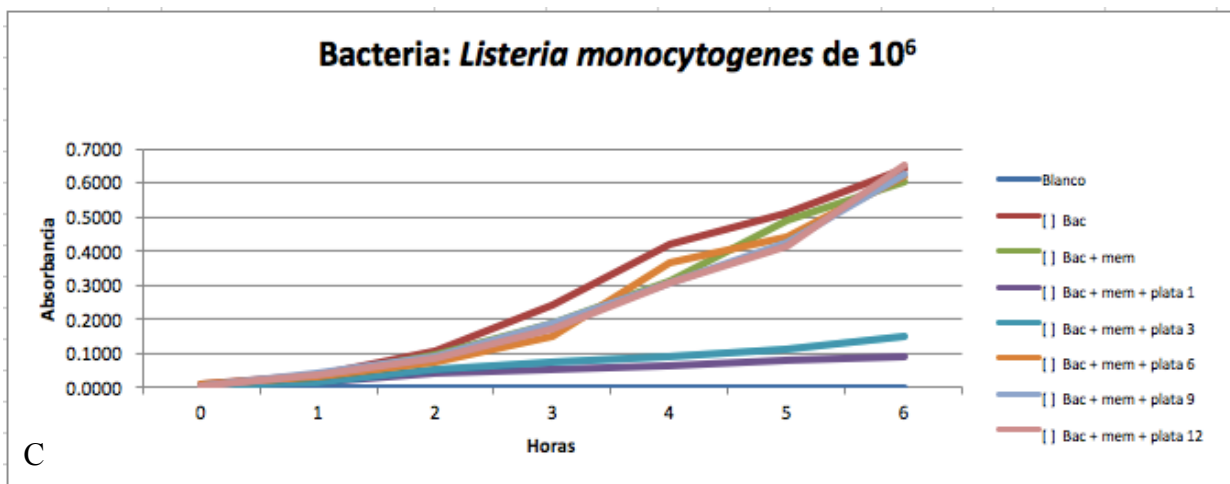
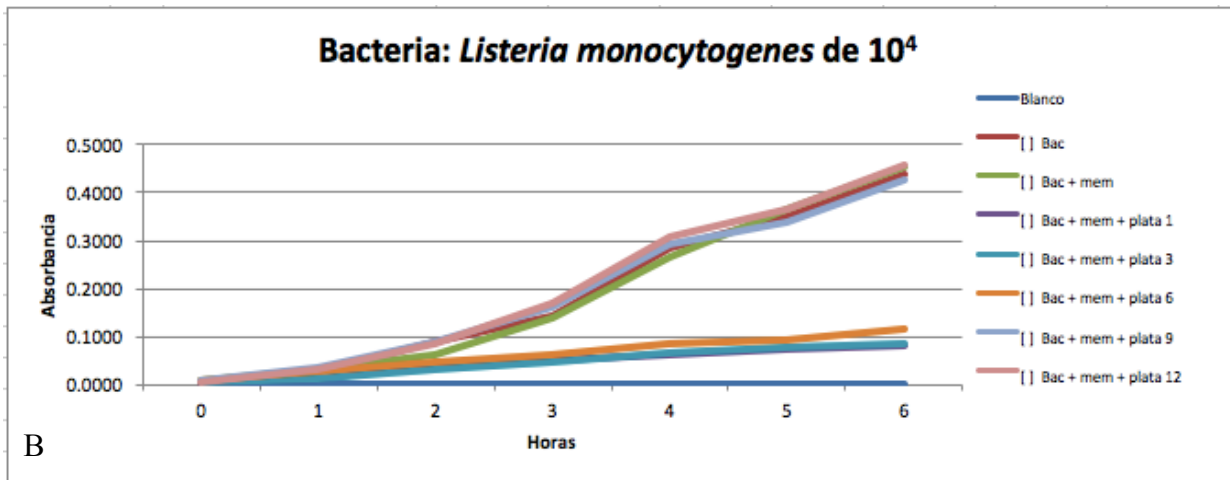


**Gráfica 8:** Se presenta tres gráficas de la cinética de inhibición microbiana en fase líquida con *Klebsiella pneumoniae* a diferentes concentraciones (**A** de  $10^2$ , **B** de  $10^4$  y **C** de  $10^6$ ). En cada cinética se colocó el

blanco (LB), la bacteria sola, la bacteria más MA y 5 concentraciones de nanopartículas de plata impregnadas en la MA.

Los resultados obtenidos en las cinéticas en fase líquida de *Klebsiella pneumoniae* a una concentración de  $10^2$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25%, 0.1562% y 0.0195%, de AgNPs. La cinéticas con *Klebsiella pneumoniae* a concentración de  $10^4$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25% y 0.1562% de AgNPs y en menor porcentaje a una concentración de 0.0195%. La cinéticas con *Klebsiella pneumoniae* a concentración de  $10^6$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25% y 0.1562% de AgNPs. El efecto con *Klebsiella pneumoniae* en las diferentes concentraciones ( $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$ ) de inóculo, mostraron una similitud en los porcentajes de inhibición con las diferentes concentraciones de AgNPs (5%, 1.25% y 0.1562%), obteniendo una mayor inhibición de crecimiento bacteriano a mayor concentración de AgNPs.

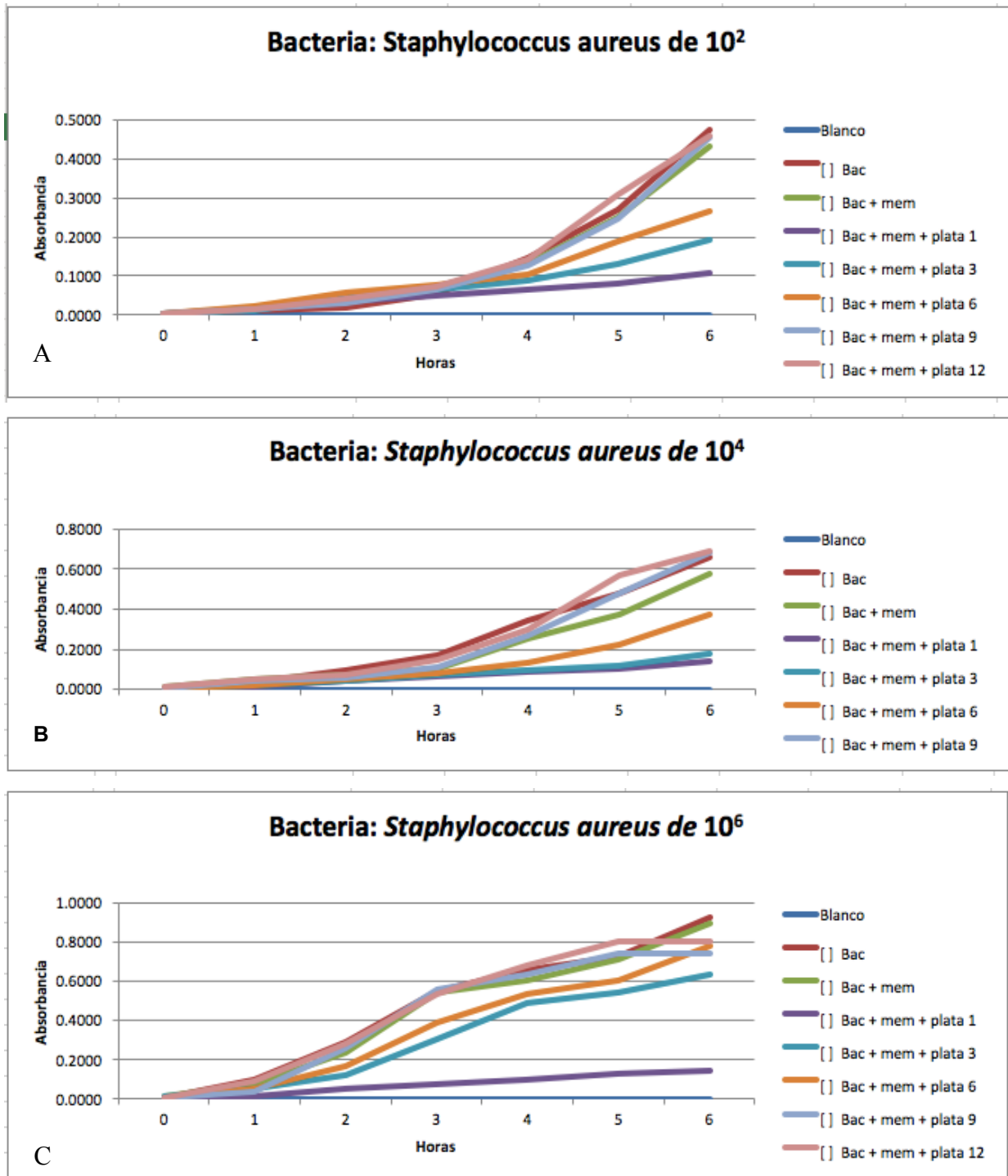




**Gráfica 9:** Se presenta tres gráficas de la cinéticas de inhibición microbiana en fase líquida con *Listeria monocytogenes* a diferentes concentraciones (**A** de  $10^2$ , **B** de  $10^4$  y **C** de  $10^6$ ). En cada cinética se colocó el blanco (LB), la bacteria sola, la bacteria más MA y 5 concentraciones de nanopartículas de plata impregnadas en la MA.

Los resultados obtenidos en las cinéticas en fase líquida de *Listeria monocytogenes* a una concentración de  $10^2$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25%, 0.1562% y 0.0195%, de AgNPs. La cinéticas con *L. monocytogenes* a concentración de  $10^4$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25% y 0.1562% de AgNPs y en menor porcentaje a una concentración de 0.0195%. La cinéticas con *L. monocytogenes* a concentración de  $10^6$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5% y 1.25% de AgNPs. El efecto de inhibición de *L. monocytogenes* en las diferentes concentraciones ( $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$ ) de inóculo, mostraron una similitud en los porcentajes de inhibición con las

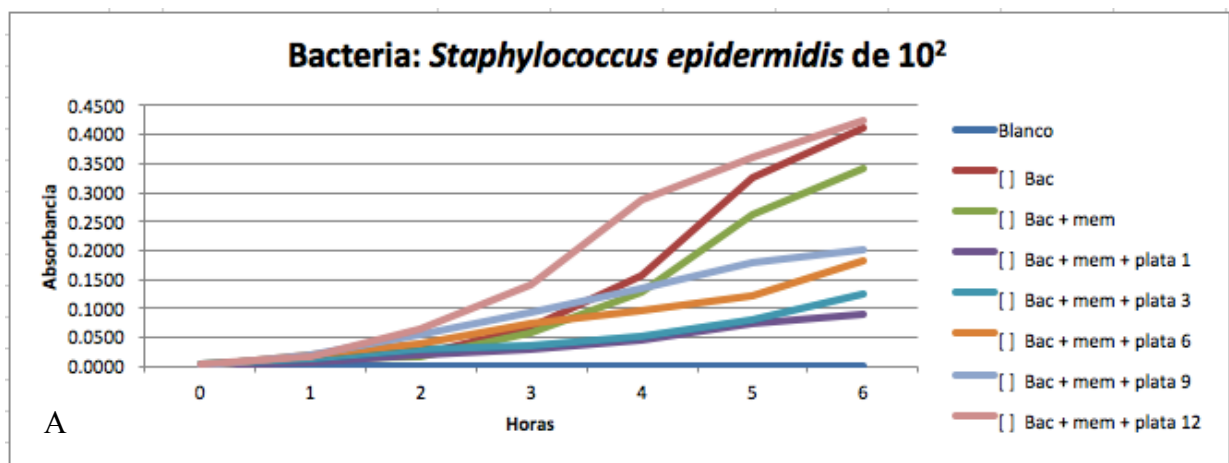
diferentes concentraciones de AgNPs (5% y 1.25%), obteniendo una mayor inhibición de crecimiento bacteriano a mayor concentración de AgNPs.

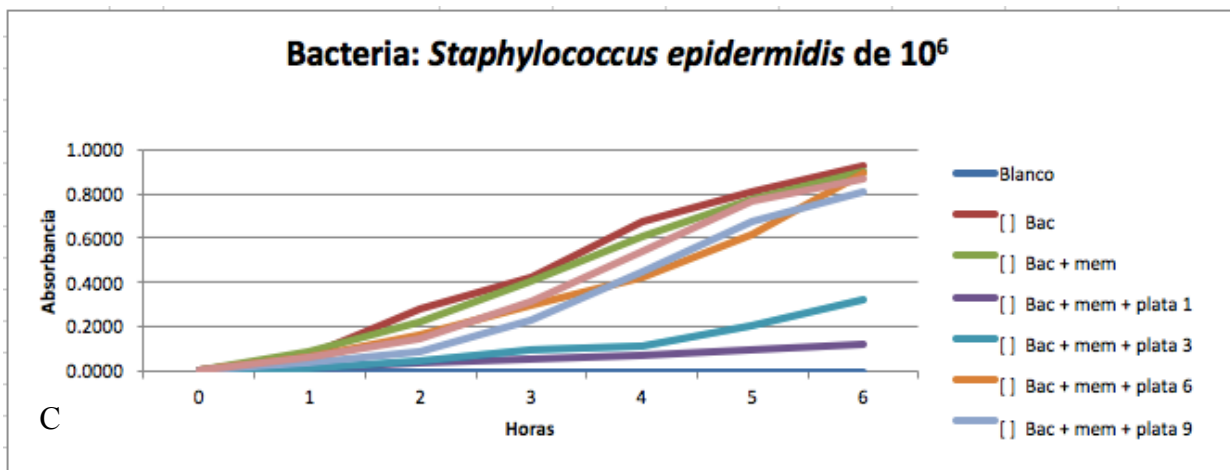
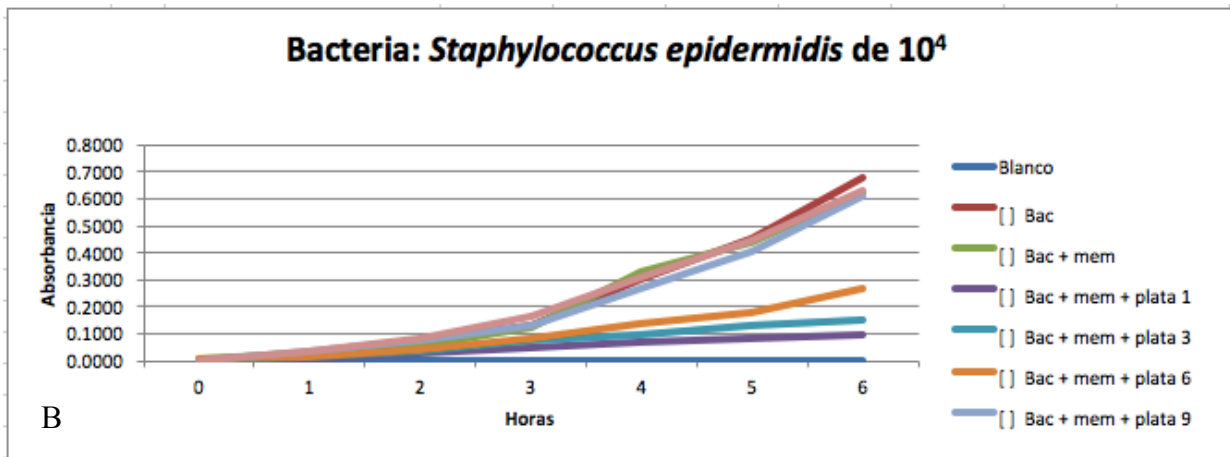


**Gráfica 10:** Se presenta tres graficas de la cinéticas de inhibición microbiana en fase líquida con *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones (**A** de  $10^2$ , **B** de  $10^4$  y **C** de  $10^6$ ). En cada cinética se

colocó el blanco (LB), la bacteria sola, la bacteria más MA y 5 concentraciones de nanopartículas de plata impregnadas en la MA.

Los resultados obtenidos en las cinéticas en fase líquida de *S. aureus* a una concentración de  $10^2$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5% y 1.25% y en menor porcentaje a una concentración de 0.1562% de AgNPs. La cinéticas de inhibición en *S. aureus* a concentración de  $10^4$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5% y 1.25% de AgNPs y en menor porcentaje a una concentración de 0.1562%. La cinéticas de inhibición en *S. aureus* a concentración de  $10^6$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5% de AgNPs y en menor porcentaje a una concentración de 1.25%. El efecto de inhibición de *S. aureus* en las diferentes concentraciones ( $10^2$  y  $10^4$ ) de inóculo, mostraron una similitud en los porcentajes de inhibición con las diferentes concentraciones de AgNPs (5% y 1.25%), obteniendo una mayor inhibición de crecimiento bacteriano a mayor concentración de AgNPs.

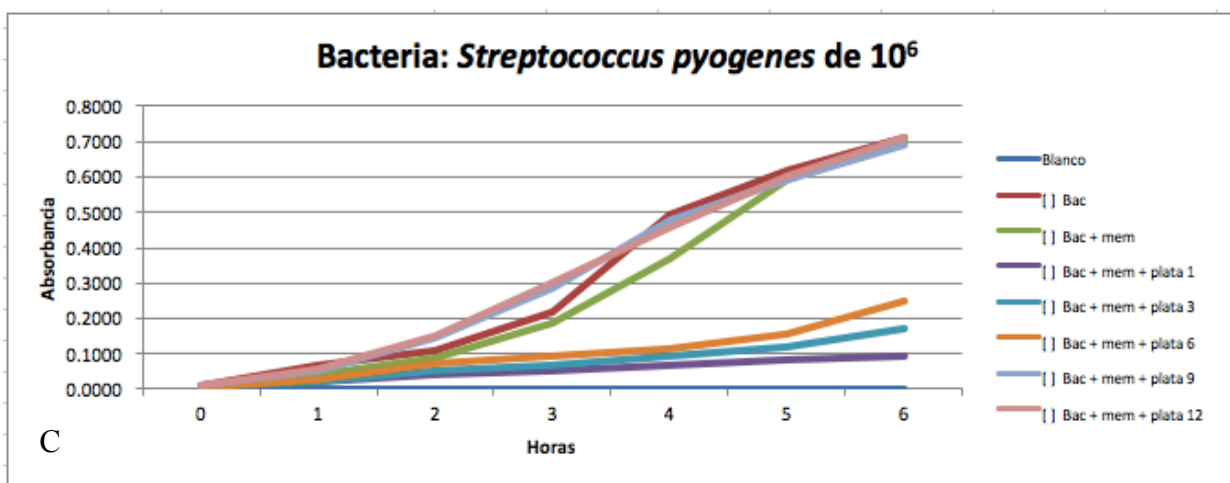
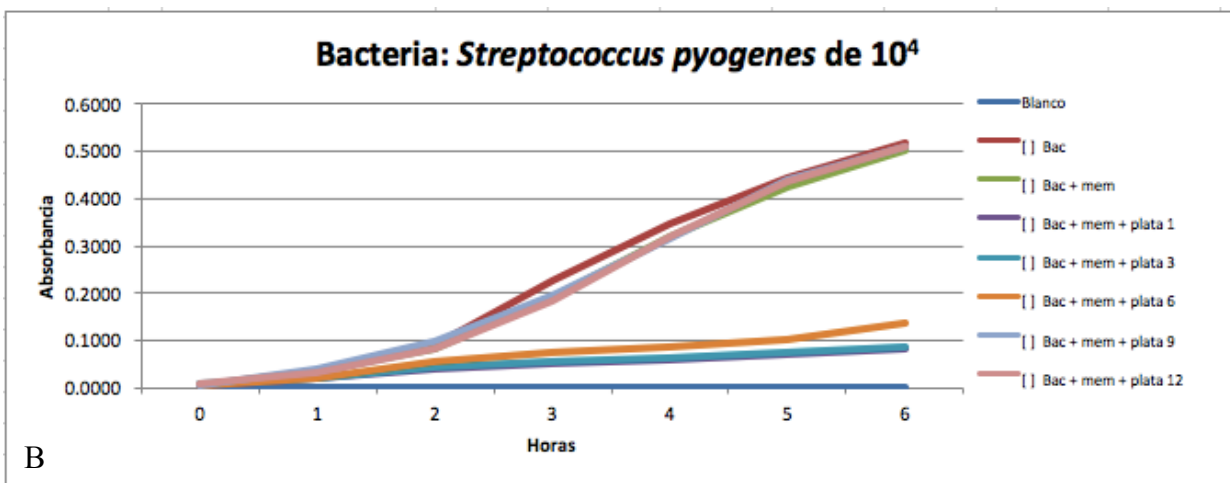
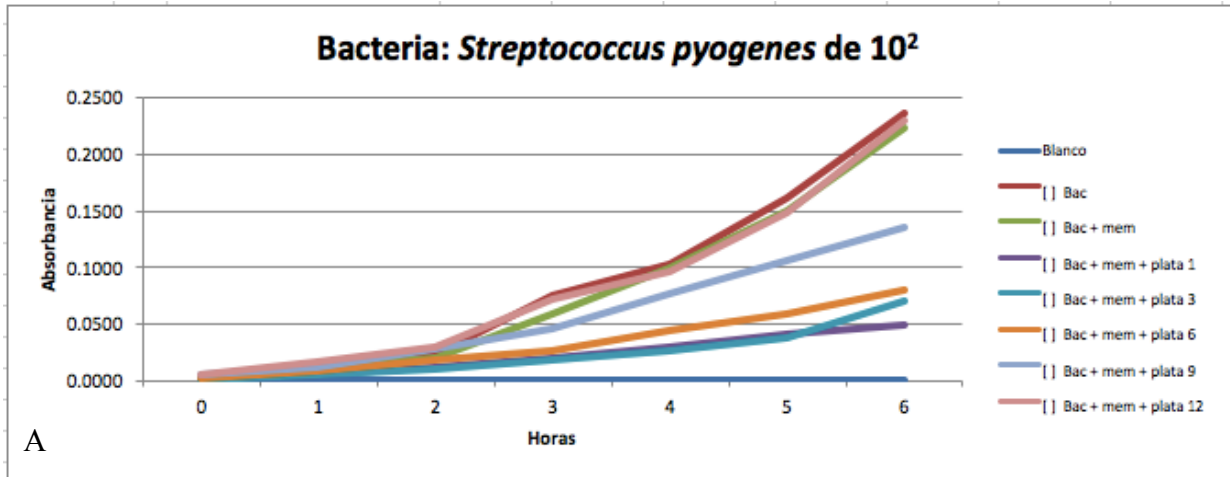




**Gráfico 11:** Se presenta tres graficas de la cinéticas de inhibición microbiana en fase liquida con *Staphylococcus epidermidis* a diferentes concentraciones (A de  $10^2$ , B de  $10^4$  y C de  $10^6$ ). En cada cinética se colocó el blanco (LB), la bacteria sola, la bacteria más MA y 5 concentraciones de nanopartículas de plata impregnadas en la MA.

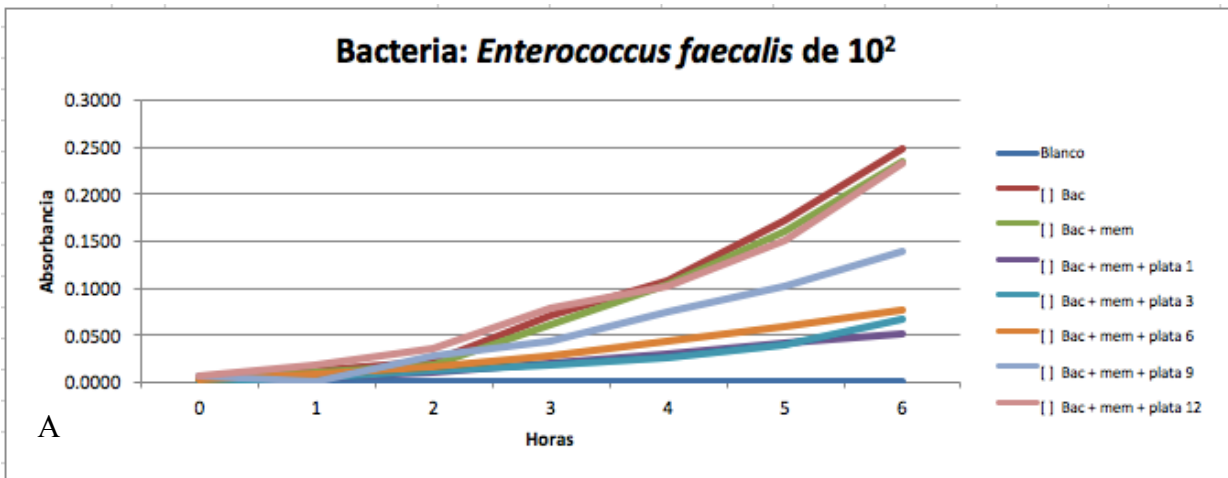
Los resultados obtenidos en las cinéticas en fase liquida con *Staphylococcus epidermidis* a una concentración de  $10^2$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25%, 0.1562%, y 0.0195% de AgNPs. La cinéticas con *Staphylococcus epidermidis* a concentración de  $10^4$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25% y 0.1562% de AgNPs. La cinéticas con *Staphylococcus epidermidis* a concentración de  $10^6$ , presentaron una mejor inhibición en la concentración de 5% de AgNPs y en menor porcentaje a una concentración de 1.25%. El efecto de inhibición de *Staphylococcus epidermidis* en las diferentes concentraciones ( $10^2$  y  $10^4$ ) de inóculo, mostraron una similitud en los porcentajes de

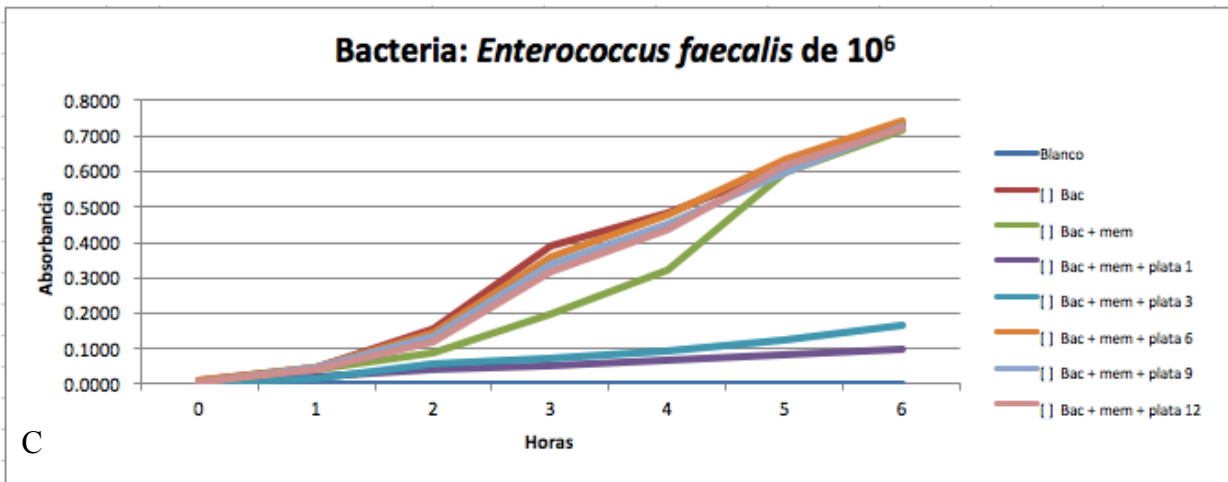
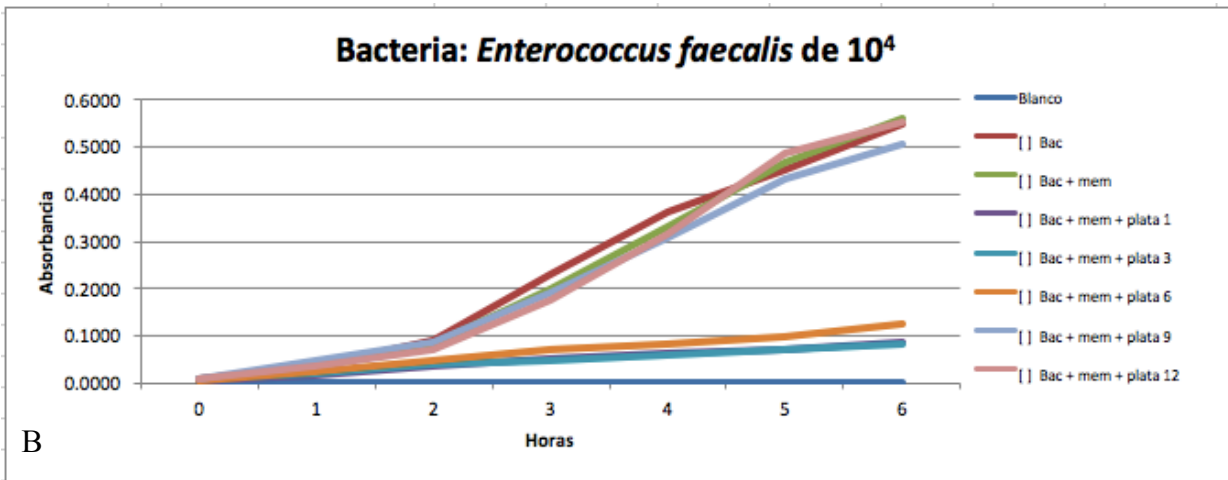
inhibición con las diferentes concentraciones de AgNPs (5% y 1.25%), obteniendo una mayor inhibición de crecimiento bacteriano a mayor concentración de AgNPs.



**Gráfica 12:** Se presenta tres graficas de la cinéticas de inhibición microbiana en fase liquida con *Streptococcus pyogenes* a diferentes concentraciones (**A** de  $10^2$ , **B** de  $10^4$  y **C** de  $10^6$ ). En cada cinética se colocó el blanco (LB), la bacteria sola, la bacteria más MA y 5 concentraciones de nanopartículas de plata impregnadas en la MA.

Los resultados obtenidos en las cinéticas en fase liquida de *Streptococcus pyogenes* a una concentración de  $10^2$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25%, 0.1562%, de AgNPs y un poco en menor porcentaje a 0.0195%. La cinéticas con *Streptococcus pyogenes* a concentración de  $10^4$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25% de AgNPs y un poco en menor porcentaje a 0.1562%. La cinéticas con *Streptococcus pyogenes* a concentración de  $10^6$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5% y 1.25%. de AgNPs y en menor porcentaje a una concentración de 0.1562%. El efecto de inhibición de *Streptococcus pyogenes* en las diferentes concentraciones ( $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$ ) de inóculo, mostraron una similitud en los porcentajes de inhibición con las diferentes concentraciones de AgNPs (5% y 1.25%), obteniendo una mayor inhibición de crecimiento bacteriano a mayor concentración de AgNPs.

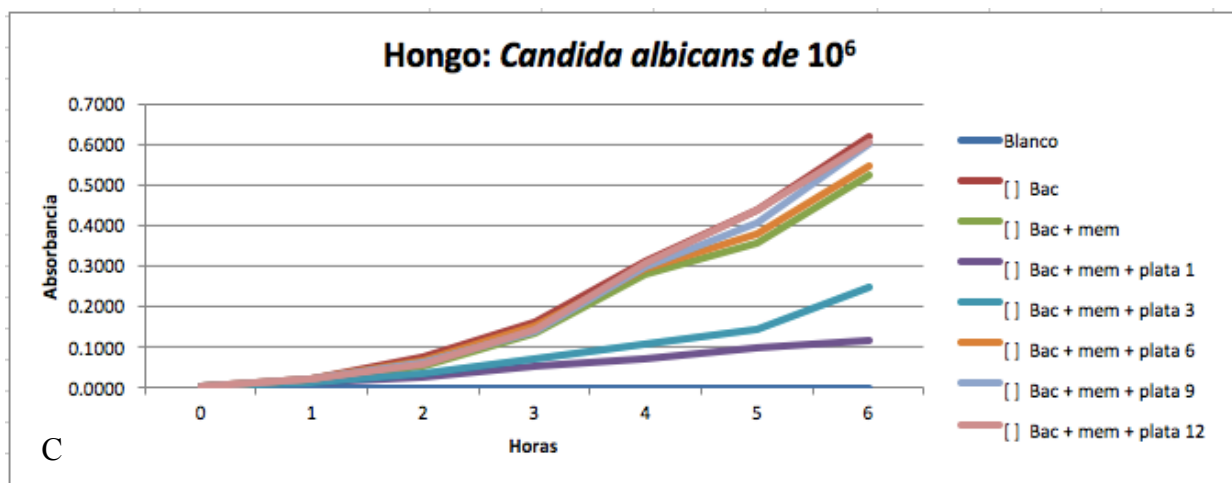
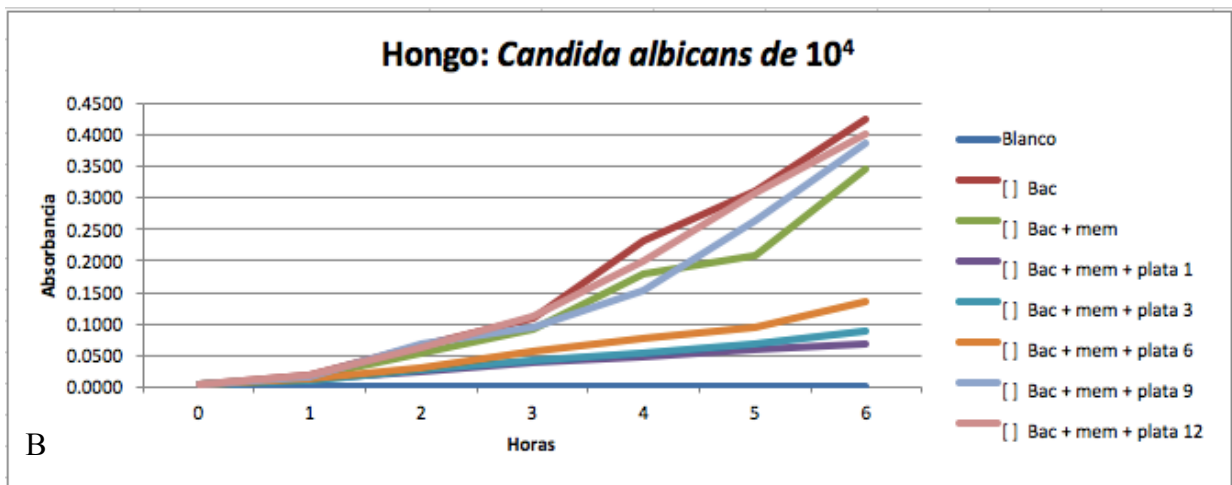
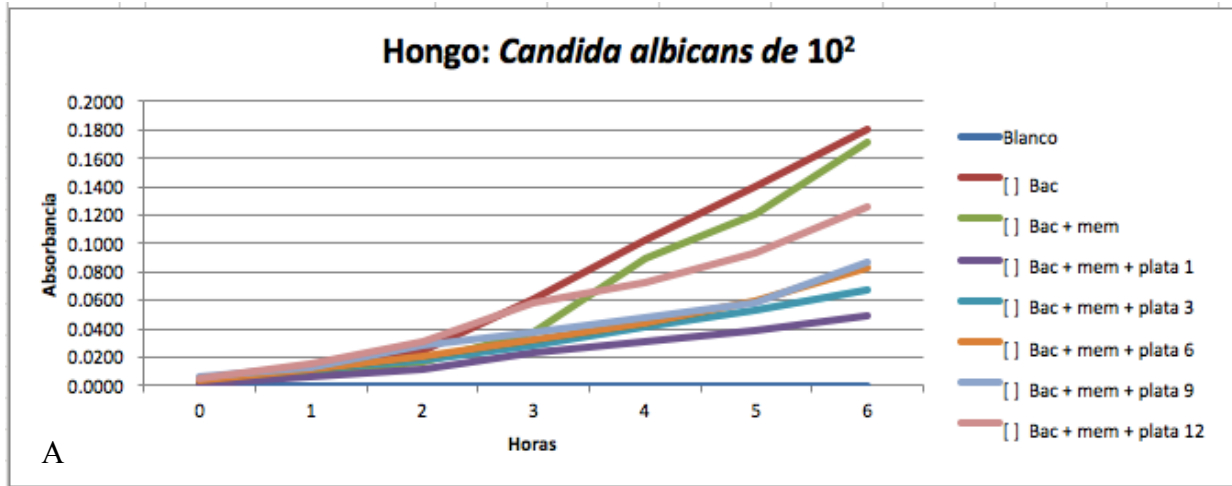




**Gráfica 13:** Se presenta tres graficas de la cinéticas de inhibición microbiana en fase liquida con *Enterococcus faecalis* a diferentes concentraciones (**A** de  $10^2$ , **B** de  $10^4$  y **C** de  $10^6$ ). En cada cinética se colocó el blanco (LB), la bacteria sola, la bacteria más MA y 5 concentraciones de nanopartículas de plata impregnadas en la MA.

Los resultados de las cinéticas en fase liquida de *Enterococcus faecalis* a una concentración de  $10^2$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25%, 0.1562%. La cinéticas con *Enterococcus faecalis* a concentración de  $10^4$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25% de AgNPs y un poco en menor porcentaje a 0.1562%. La cinéticas con *Enterococcus faecalis* a concentración de  $10^6$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5% y 1.25% de AgNPs. El efecto de inhibición de *Enterococcus faecalis* en las diferentes concentraciones ( $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$ ) de inculo, mostraron una similitud en los porcentajes

de inhibición con las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (5% y 1.25%), obteniendo una mayor inhibición de crecimiento bacteriano a mayor concentración de AgNPs.



**Gráfica 14:** Se presenta tres graficas de la cinéticas de inhibición microbiana en fase liquida con *Cándida albicans* a diferentes concentraciones (**A** de  $10^2$ , **B** de  $10^4$  y **C** de  $10^6$ ). En cada cinética se colocó el blanco (LB), la bacteria sola, la bacteria más MA y 5 concentraciones de nanopartículas de plata impregnadas en la MA.

Los resultados obtenidos en las cinéticas en fase liquida de *Cándida albicans* a una concentración de  $10^2$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25%, 0.1562% y 0.0195%) y en menor porcentaje a la concentración de 0.0024375%. La cinéticas con *Cándida albicans* a concentración de  $10^4$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5%, 1.25% de AgNPs y un poco en menor porcentaje a 0.1562%. La cinéticas con *Cándida albicans* a concentración de  $10^6$ , presentaron una mejor inhibición las concentraciones de 5% de AgNPs y un poco en menor porcentaje a la concentración de 1.25%. El efecto de inhibición de *Cándida albicans* en las diferentes concentraciones ( $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$ ) de inoculo, mostraron una similitud en los porcentajes de inhibición con las diferentes concentraciones de AgNPs 5%, obteniendo una mayor inhibición de crecimiento bacteriano a mayor concentración de AgNPs.

#### **4.1.8 Resultados del estudio histopatológico de piezas oculares**

Para el presente estudio se realizó la extracción, conservación e implante de la membrana amniótica humana y se aplicó como injerto con la capa estromal hacia abajo sobre el área de lesión en la superficie ocular, esto con el objetivo de favorecer un microambiente entre el sitio de lesión y la membrana amniótica, para evaluar el efecto físico local en el sitio de contacto, el crecimiento epitelial y el restablecimiento estético del área de lesión. Para ello se utilizaron 30 piezas de ojos de conejo en el que se realizó el implante a manera de injerto en la superficie conjuntival y se dio seguimiento postquirúrgico con la aplicación local de antiinflamatorios y antibiótico por siete días y la toma de evidencias fotográficas del sitio de lesión. Posteriormente se realizó enucleación de las piezas atendidas a los 20, 40 y 60 días y se sometieron a estudio histopatológico, obteniendo la clasificación de los siguientes resultados:

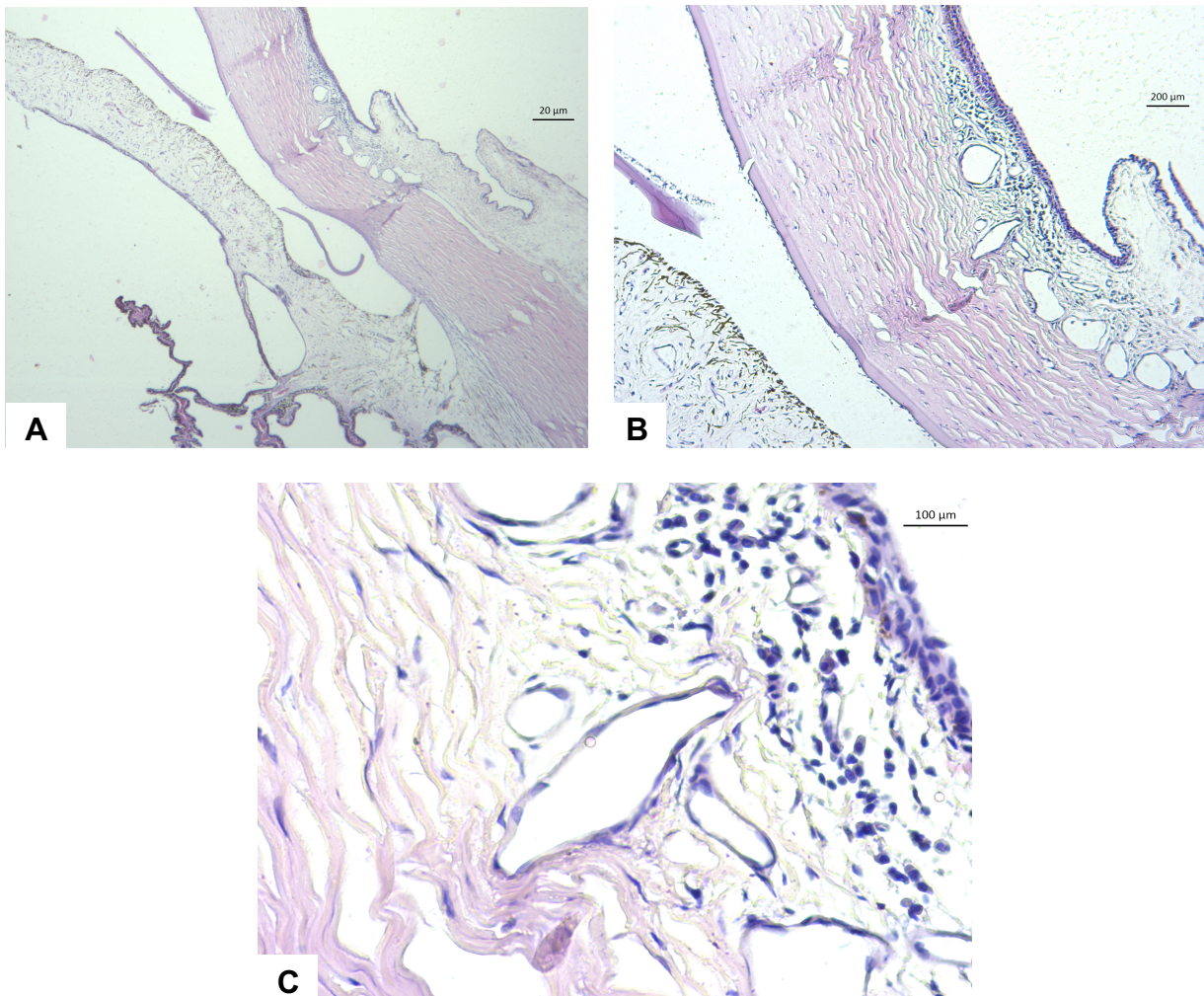
**Categoría I:** Ojos que no presentaron cambios histológicos. Se identifican estructuras sin alteraciones patológicas y sin presencia de inflamación.

**Categoría II:** Ojos con presencia de inflamación crónica en cantidad moderada, principalmente compuesta por linfocitos.

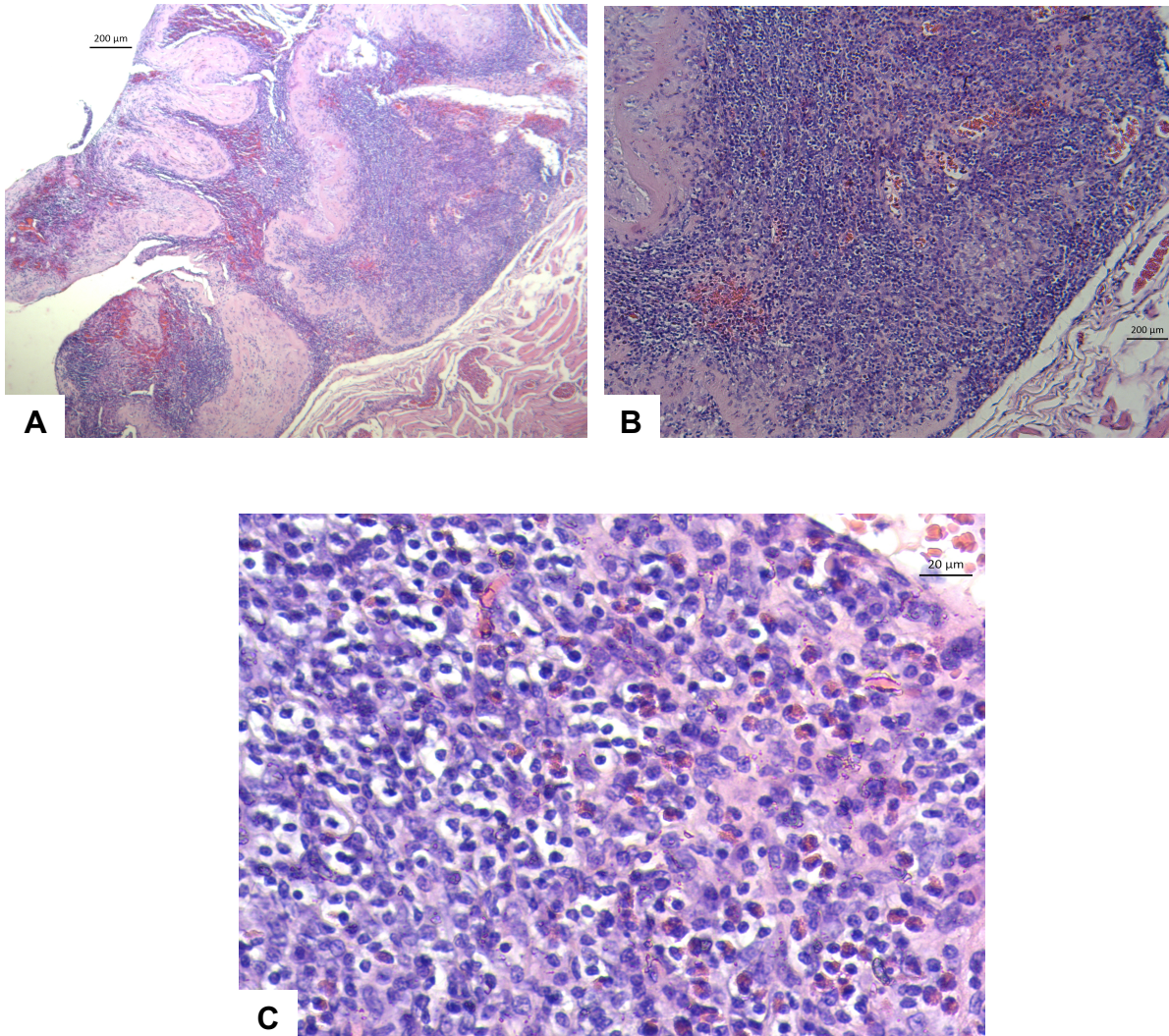
**Categoría III:** En esta categoría hay mayor inflamación, inclusive con células gigantes tipo cuerpo extraño, en las últimas dos imágenes se ilustran células que están fagocitando un material extraño, posiblemente sutura.

#### 4.1.9 Resultados histológicos de TMA

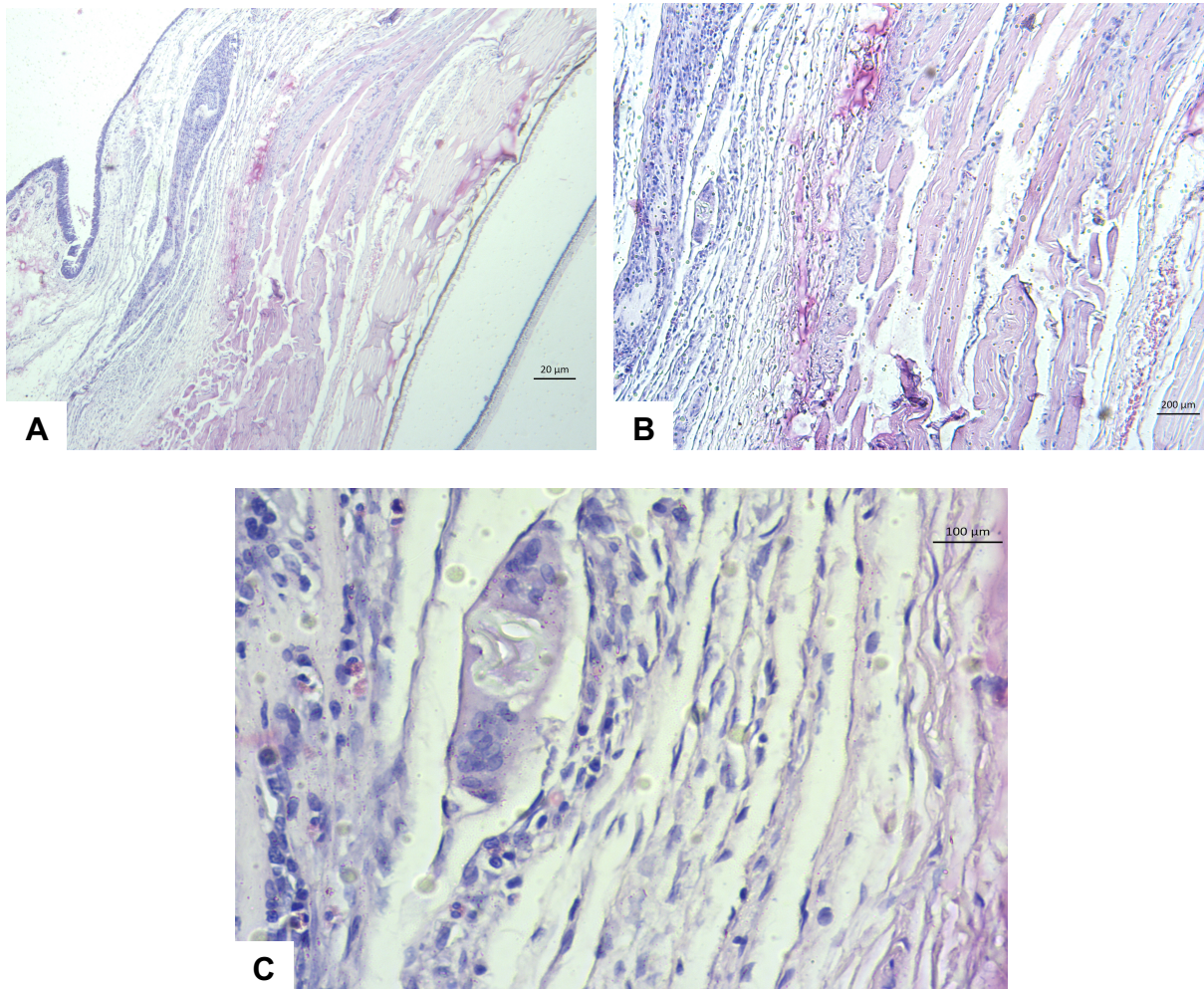
Se presentan los cambios histológicos producidos por el trasplante de MA tratada con nanopartículas de plata en superficie ocular. Se presentan las observaciones de los cambios histológicos en los globos oculares, analizados a los 20, 40 y 60 días, y clasificados en tres categorías por las siguientes particularidades:



**Figura 26.** Estructura histológica de la membrana amniótica aplicada a la superficie ocular clasificada como categoría I y teñida con hematoxilina-eosina, vista a 4X (A), 10X (B) y 40X (C) con microscopio óptico en donde se mostró que el ojo no presento cambios histológicos, y en los que se identifican estructuras sin alteraciones patológicas y sin presencia de inflamación.



**Figura 27.** Estructura histológica de la membrana amniótica aplicada a la superficie ocular clasificada como categoría II y teñida con hematoxilina-eosina, vista a 4X (A), 10X (B) y 40X (C) con microscopio óptico en donde se mostró el ojo con presencia de inflamación crónica en cantidad moderada, principalmente compuesta por linfocitos.

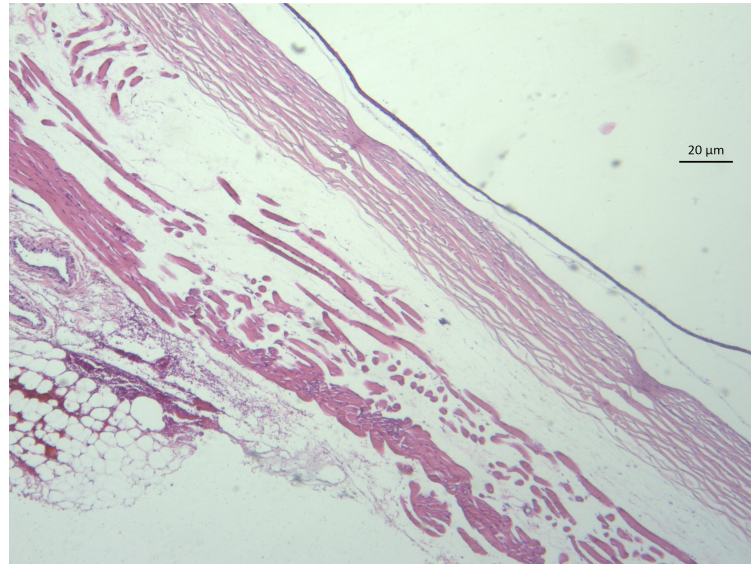


**Figura 28.** Estructura histológica de la membrana amniótica aplicada a la superficie ocular clasificada como categoría III y teñida con hematoxilina-eosina, vista a 4X (A), 10X (B) y 40X (C) con microscopio óptico en donde se mostró una mayor inflamación, caracterizadas por la presencia de un gran acumulo de macrófagos que llegaron a conformar la presencia de células gigantes tipo cuerpo extraño, ya que presentan células que están fagocitando un material extraño, posiblemente sutura.

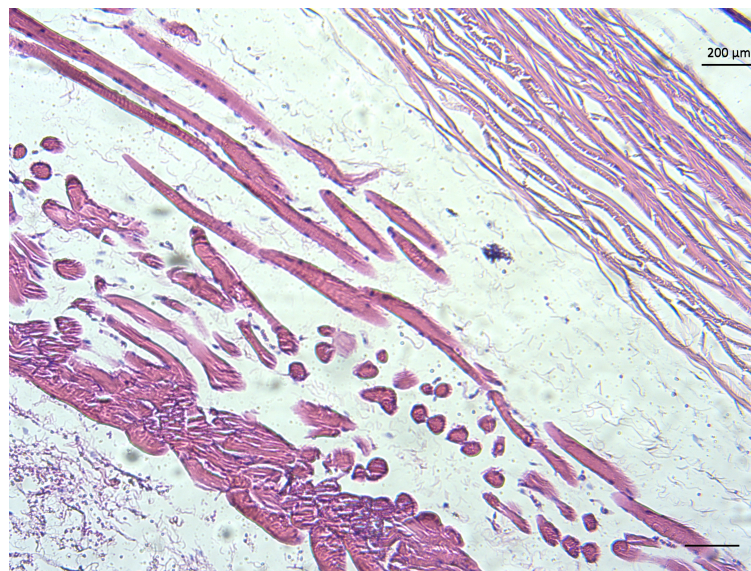
En las figura 26 se observó que el TMA no produjo cambios histológicos ni alteraciones patológicas o inflamatorias de la superficie ocular. En la figura 27 se observaron cambios histológicos tipo inflamación crónica moderada categoría II compuesta principalmente por linfocitos y en la figura 28 se observaron cambios histológicos tipo inflamación crónica categoría III compuesta por un gran número de macrófagos que llegaron a conformar la presencia de células gigantes tipo cuerpo extraño, probablemente a material extraño (sutura).

#### 4.1.10 Corte histológico de la superficie ocular del control normal

En las siguientes figuras se muestran las características de los aspectos histológicos de las diferentes estructuras de la superficie ocular de un ojo normal de modelo animal.



**Figura 29.** Corte histológico de superficie ocular de ojo normal observado con lente 4X.



**Figura 30.** Corte histológico de superficie ocular de ojo normal observado con lente 10X.

Las figuras 29 y 30 muestran las estructuras histológicas normal de la superficie ocular observadas con microscopio óptico con lente 4X y 10X.

#### 4.1.11 Resultados histopatológicos de la aplicación de MA en superficie ocular

Una vez realizado el TMA crioconservada con glicerol sin AgNPs en la superficie ocular, los resultados de la evolución clínica mostraron infección local conjuntival en dos (40%) piezas oculares, caracterizadas por irritación local, eritema conjuntival y secreción amarillenta ocular moderada, que fueron manejadas con un prolongación de la terapia antimicrobiana local por diez días, y los cambios histopatológicos reportados en estas piezas se muestran en la Tabla IV.

Número de pieza	Día pos-implante	Identificación de pieza ocular	Hallazgos HPT
1	20	Control anatómico normal	Estructuras histológicas sin alteraciones.
2	20	Sin alteración.	Estructuras histológicas sin inflamación.
3	20	Infección conjuntival	Estructuras histológicas con inflamación moderada GII.
4	20	Sin alteración	Estructuras histológicas sin inflamación.
5	20	Sin alteración	Estructuras histológicas sin inflamación.
6	20	Infección conjuntival.	Estructuras histológicas con inflamación moderada GII.

**Tabla IV.** Resultados histopatológicos.

Los resultados histopatológicos reportados para la estandarización de la MA crioconservada con glicerol sin AgNPs y posterior implante en la superficie ocular en un modelo animal, se utilizaron seis piezas oculares (una pieza solo como referencia anatómica normal de modelo animal), con aplicación profiláctica de antibióticos locales por siete días, dando seguimiento clínico y fotográfico posquirúrgico. Los resultados histológicos mostraron inflamación moderada grado II en las 2 piezas (40%) que presentaron infección local posquirúrgica y el resto de las piezas (60%) sin alteraciones patológicas ni inflamación de la superficie ocular.

#### 4.1.12. Tabla de resultados de estudios histopatológicos

Una vez aplicado el TMA crioconservada con glicerol y nanopartículas de plata, se evaluó la evolución clínica y los cambios histopatológicos reportados a los veinte, cuarenta y sesenta días. Clasificando estos cambios en grado 1 (sin cambios

histopatológicos y sin presencia de inflamación), grado 2 (presencia de inflamación crónica moderada compuesta principalmente por presencia de linfocitos) y grado 3 (presencia de inflamación crónica con células gigantes tipo cuerpo extraño en las que se observa fagocitando material extraño, posiblemente sutura), que se muestran en la siguiente Tabla V.

Número de pieza	Día pos-implante	Identificación de pieza ocular	Hallazgos HPT
1	20	Ojo derecho	1
2	20	Ojo derecho	2
3	20	Ojo derecho	1
4	20	Ojo derecho	2
5	20	Ojo derecho	3
6	20	Ojo derecho	1
7	20	Ojo derecho	2
8	20	Ojo derecho	1
9	20	Ojo derecho	2
10	20	Ojo derecho	1
11	20	Ojo derecho Control.	1
1	40	Ojo derecho	1
2	40	Ojo derecho	1
3	40	Ojo derecho	1
4	40	Ojo derecho	1
5	40	Ojo derecho	1
6	40	Ojo derecho	1
7	40	Ojo derecho	1
8	40	Ojo derecho	1
9	40	Ojo derecho	1
10	40	Ojo derecho	1
11	40	Ojo derecho Control.	1
1	60	Ojo izquierdo.	1
2	60	Ojo izquierdo.	1
3	60	Ojo izquierdo.	1
4	60	Ojo izquierdo.	1
5	60	Ojo izquierdo.	1
6	60	Ojo izquierdo.	1
7	60	Ojo izquierdo.	1
8	60	Ojo izquierdo.	1
9	60	Ojo izquierdo.	1
10	60	Ojo izquierdo.	1
11	60	Ojo izquierdo Control.	1

**Tabla V:** Resultados histopatológico de piezas oculares TMA con nanopartículas de plata.

Los resultados histopatológicos reportados de la crioconservación de la MA (con glicerol más la aplicación de AgNPs a una concentración de 0.01%) en lesiones de superficie ocular en 30 piezas de modelo animal y 3 piezas control. Utilizándose 10

piezas oculares (más una pieza para control de sutura) a los 20 días y 10 piezas oculares (más una pieza para control de sutura) a los 40 días y 10 piezas oculares (más una pieza para control de sutura) a los 60 días. En todas las piezas implantadas se aplicó antibacteriano local posquirúrgico por siete días, reportándose cuatro piezas afectadas con infección bacteriana durante la recuperación postquirúrgica, caracterizada por irritación y secreción amarillenta leve conjuntival, en estos casos se prolongó la aplicación del antibiótico a diez días. Tras la enucleación se realizó estudio histopatológico de las 10 piezas trasplantadas más una pieza control a los 20 días reportándose; cuatro piezas (40%) con inflamación crónica grado 2, una pieza (10%) con inflamación crónica grado 3 tipo cuerpo extraño asociada a la sutura, y cinco piezas (50%) sin inflamación. A los 40 y 60 días se reportaron el 100% de piezas sin inflamación. Del total de las 30 piezas trasplantadas, el estudio histopatológico reportó 4 piezas (13.3%) con inflamación crónica grado 2 moderada, caracterizada por la presencia de tejido de granulación constituido por proliferación de vasos sanguíneos congestivos así como inflamación linfocítica moderada no atípica, en un estroma fibroso en las mismas piezas que presentaron infección local bacteriana y una pieza (3.3%) presentó inflamación crónica grado 3 tipo cuerpo extraño asociada a la sutura a los 20 días y que las 25 piezas restantes (83.3%) de los 20, 40 y 60 días no se encontraron alteraciones patológicas sugestivas de inflamación, ni de cuerpo extraño.

## **CAPÍTULO V**

### **5.1 DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

#### **5.1.1 Características de las donantes de placenta**

La membrana amniótica obtenida de las 16 placentas donadas para establecer los grupos de estudio, procedieron de donantes con una edad promedio de 24 años, el 62% de ellas se encontraban entre los 18 -24 años, el 44% de las participantes eran amas de casa, el grupo étnico mayoritario fueron pacientes morenas en un 62%. El 67% de las pacientes contaban con 38-39 semanas de edad gestacional al momento de la atención del parto. Los criterios de selección de las donantes de placenta para obtener la membrana amniótica fueron cumpliendo los criterios generales establecidos para la donación de órganos, además de contar con la mayoría de edad legal de 18 años, con pleno uso de sus facultades mentales y con embarazo controlado por un periodo no menor de seis meses, con feto sano y sin patologías placentarias y cesárea electiva. Se consideraron como criterios de exclusión; la existencia de embarazo no controlado, historia obstétrica con alteraciones, presencia de síntomas de infección en el neonato, fiebre materna superiora 38.5°C, gestación inferior a 34 semanas, bolsa rota más de 12 horas antes del parto y atención del parto no mayor a 24 h. El tamaño muestral (n=16) puede ser considerado como representativo para estandarizar los métodos de crio-conservación, ya que los distintos procedimientos han sido efectuados sobre las mismas membranas amniótica, esto permite eliminar la variabilidad entre las donantes y realizar análisis precisos.

#### **5.1. 2. Características macroscópicas y microscópicas de la membrana amniótica**

La membrana amniótica de forma discoide, color blanquecino aperlada, que es un tejido muy laxo, muy elástica para dar soporte y protección al producto de la gestación (feto). En el estudio histológico de la estructura que conforma la membrana amniótica, se pudo observar que está conformada por una monocapa de células epiteliales, membrana basal y un estroma avascular que a su vez se encuentra conformado por una capa esponjosa, una capa fibrosa y una capa compacta de células, todas ellas organizadas para proteger al feto.

### **5.1.3. Análisis histológico del proceso de crioconservación y evaluación del efecto antibacteriano de las AgNPs en la MA**

Los resultados observados en los cortes histológicos de las 16 MA crioconservada con glicerol más la aplicación de AgNPs al 0.01%, en las que se evaluaron las características estructurales de las células epiteliales, membrana basal y el estroma avascular, así como el efecto bactericida de las AgNPs al 0.01%. Los resultados encontrados mostraron que la MA crioconservada con glicerol produjo discreto aplanamiento de la superficie de las células epiteliales en la membrana basal, en tanto que la MA crioconservada con glicerol más AgNPs mostraron una estructura normal de las células epiteliales, membrana basal y el estroma avascular y no mostraron ese ligero aplanamiento celular reportado con el glicerol. También se evaluó el efecto antibacteriano de las AgNPs en la MA y se observó que no presentaron crecimiento bacteriano tras periodos de incubación de 24, 48 y 72 horas, así como a los 7 días en estufa de CO<sub>2</sub> al 5%, a 37°C y 80% de humedad, en tanto que en las MA que no se aplicó AgNPs, el 40% presentaron crecimiento bacteriano. Estos hallazgos muestran un efecto crio-protector y antibacteriano de las AgNPs en la MA, que puede extenderse a la congelación de diferentes órganos y tejidos en la futura creación de un banco de tejidos.

### **5.1.4. Resultados del crecimiento bacteriano determinado por los halos de inhibición en agar**

En los resultados por halo de inhibición de las bacterias Gram negativas, Gram positivas y *Candida albicans* mostraron ser más sensibles a las concentraciones del 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312% y 0.1562%, que se clasificaron como sensibles y en menor medida por las concentraciones 0.1562%, 0.0781%, 0.0390% y 0.0195%, que se clasificaron como intermedias y las concentraciones del 0.00975%, 0.004875% y 0.0024375%, consideradas como resistentes. Estos resultados demuestran que las AgNPs son un potente agente antimicrobiano, en donde se han logrado avances en el conocimiento de los diferentes mecanismos de acción contra las bacterias(69). Su mecanismo de acción contra las bacterias Gram negativas(70), es la producción de

unas perforaciones en la pared bacteriana, haciendo que la morfología de la membrana cambie, incrementando su capacidad permeable y facilitando la muerte celular(71). La lisis bacteriana puede ser considerada como otra de las razones de esta propiedad, las AgNPs modulan el perfil de la fosfo-tirosina de los péptidos bacterianos, los cuales pueden afectar la señal bacteriana de transducción e inhibir el crecimiento de estas bacterias(72). Así también ha sido descrito que las AgNPs induce a una desnaturalización o a la oxidación de la pared celular la cual permite esta ruptura de los organelos que se encuentran dentro de ellas, resultando así la muerte bacteriana(73). Se han referido tres efectos de las AgNPs contra las bacterias Gram negativas; i) las AgNPs dentro del rango de 1-10 nm se unen a la superficie de la membrana de la célula, alterando drásticamente su funcionamiento, así como la permeabilidad y la respiración. ii) las AgNPs son capaces de penetrar dentro de la bacteria y causar más daños por la posibilidad que tienen de interactuar con azufre y fósforo que son compuestos que contiene el ADN. Iii) las AgNPs pueden liberan iones de plata, las cuales tienen una contribución adicional al efecto bactericida de las AgNPs, ya que es más pronunciado contra organismos gram negativos que las gram-positivas(74).

Así también el efecto antibacteriano de las AgNPs es independiente de la adquisición de resistencia por parte de las bacterias contra antibióticos(75), ya que las pruebas antimicrobianas contra *S. aureus* y *E. coli*, ponen de manifiesto que hay una actividad antimicrobiana eficiente principalmente sobre *E. coli* (gram negativa) mostrando mayor susceptibilidad en las bacterias gram negativas a diferencia de las gram positivas(76). Alude que esto se debe posiblemente a que la bacteria gram positiva, está cubierta por una delgada membrana de peptidoglicanos, la cual limita la penetración de las nanopartículas de plata; así también observó que si se incrementaba la concentración de nanopartículas de plata, la zona de inhibición incrementaba(76). Las diferencias entre las distintas especies puede influenciar en la susceptibilidad de los agentes antimicrobianos, las células Gram positivas contienen 3-20 veces más peptidoglicanos que las Gram negativas. Los peptidoglicanos presentan una carga negativa y ellos probablemente ciegan alguna porción de los iones de plata, por consecuente, las bacterias Gram positivas son menos susceptibles a ellos(77). Las

nanopartículas que están entre los rangos de tamaño de 1-10 nm, tienen una mayor actividad biocida contra bacterias(78). En estudios sobre el tamaño de las AgNPs demuestra, que a menor tamaño existe una mayor actividad antibacteriana contra las bacteria de *Escherichia coli* y *Streptococcus aureus*, donde se observa que esta actividad antimicrobiana, se reducía con el aumento de tamaño de las AgNPs, lo cual sugiere, que la mayor área de superficie específica en las pequeñas AgNPs, puede aumentar la oportunidad para la interacción con la superficie bacteriana y así promover un mayor efecto antibacteriano(79,80).

El mecanismo de acción antifúngica de las AgNPs se debe a que estas partículas se unen a la membrana del hongo modificando su permeabilidad y con ello alterar la viabilidad celular, o bien, pueden penetrar y modificar la capacidad respiratoria, detener su división celular ocasionando así la muerte celular. También se ha reportado que las AgNPs pueden liberar iones de plata que interactúan con los grupos tiol de muchas enzimas inactivándolas o bien generar radicales libres que son extremadamente reactivos y presentan gran actividad citotóxica(81). Los reportes de actividad contra *Candida albicans* mencionan que estas AgNPs inhiben eficientemente el crecimiento de levaduras a concentraciones por debajo del límite citotóxico probado en fibroblastos humanos a concentraciones de 30 mg/mL de plata en contraste con la plata iónica que inhibe el crecimiento a concentraciones de 1 mg/L en este mismo modelo experimental(82); además, se ha documentado la capacidad inhibitoria de la gemación de esta levadura por la dispersión de la integridad de su membrana por acción de estas nanopartículas(83). En relación con la actividad antifúngica comparativa de las nanopartículas de plata con anfotericina B y fluconazol ante *C. albicans* y *S. cerevisiae* se ha demostrado que estas partículas muestran una actividad antifúngica potente con valores similares en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) comparando con los antibióticos control(84). Otro efecto descrito para las AgNPs se relaciona con su acción sobre el micelio en *Cándida* ya que la presencia de suero induce la filamentación la cual se inhibe significativamente en presencia de estas nanopartículas. En la búsqueda de respuestas antifúngicas por estas AgNPs, también se ha probado la acción citotóxica de estas AgNPs sobre los dermatofitos demostrándose su actividad en

aislamientos clínicos y en cepas de referencia de *Trichophyton mentagrophytes* con respuestas comprobables con anfotericina B y respuestas aún mayores cuando se comparan contra el fluconazol(85). Se han explorado otras acciones de estas nanoestructuras sobre hongos fitopatógenos como *Bipolaris sorokiniana* y *Magnaporthe grisea* demostrando que tanto las AgNPs como los iones de plata interfieren sobre la formación de esporas y el desarrollo de la enfermedad promoviendo el contacto directo de la plata con las esporas y los tubos germinativos interfiriendo con su viabilidad(86).

#### **5.1.5. Resultados de las cinéticas en fase líquida de la MA recubierta con AgNPs**

En los resultados de las cinéticas microbiológica en fase líquida aplicada a tres concentraciones distintas de bacterias ( $10^2$ ,  $10^4$  y  $10^6$ ) con cinco concentraciones distintas de AgNPs (al 5%, 1.25%, 0.1562%, 0.0195% y 0.0024375%) en las diez bacterias de importancia médica (*Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* del grupo de las Gram negativas, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* *Enterococo fecalis* del grupo de las bacterias Gram positivas y *Candida albicans* del grupo de los hongos) utilizadas en el estudio. Se observó que a mayor concentración de bacterias  $10^6$ , la cinética de inhibición se mostró mejor a las 3 concentraciones más altas de AgNPs (5%, 1.25% y 0.1562%), en las diez bacterias de importancia médica utilizadas en el estudio. Estos resultados demuestran lo publicado en diferentes artículos internacionales sobre la actividad antimicrobiana de las AgNPs Argovit (molécula Rusa de nombre Argovit, que se utilizó para realizar los estudios en esta tesis doctoral), en donde sugieren el efecto antibacteriano en un modelo de ratón, infectado con tuberculosis(87). Este efecto inmunomodulador y antibacterial que producen las AgNPs (preparado comercial "Argovit"), se puso de manifiesto que la administración por inhalación de AgNPs recubiertas con polivinilpirrolidona, ocasionan una completa eliminación o reducción significativa de la concentración de *Mycobacterium Tuberculosis* en los pulmones de animales de experimentación. Se muestra a 7 días después de la inhalación de AgNPs en ratones con tuberculosis crónica en el suero y el lavado broncopulmonar de animales marcados, aumento la concentración de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), seguido por una disminución en el nivel de esta citocina a 30 días, que

coincide con la reducción observada de *M. Tuberculosis* en los órganos de ratones(87). El efecto antituberculosos también se mostró con experimento *in vitro*, donde se incluyeron 1164 cepas de las *Mycobacterium tuberculosis*, los resultados exhibieron un efecto potenciador de las AgNPs sobre los antituberculosos conocidos con respecto a la superación de resistencia a fármacos del agente causal. El experimento *in vitro*, basado en el modelo de la tuberculosis resistente, se realizó en 65 ratones blancos. Se demostró un efecto antituberculoso evidente la base de AgNPs y la isoniazida. La evaluación toxicológica de la de AgNPs se llevó a cabo. La investigación establece científicamente la eficacia y la seguridad de la aplicación nanocompuesto en la terapia de combinación de pacientes que sufren de tuberculosis resistente a los medicamentos. Los datos, obtenidos en el curso del experimento *in vivo* han permitido concluir con validez estadística de la actividad antituberculosa de las AgNPs en variante aislada, así como se usa conjuntamente con isoniazida poseen un carácter dependiente de la dosis. Se observó la máxima actividad antituberculosa en el modelo experimental de tuberculosis resistente a los fármacos cuando las AgNPs se utilizarón en la dosis de 25 mg / kg e isoniazida en la dosis de 50mg / kg. Los resultados de la acción terapéutica de las nanopartículas de plata en los modelos de tuberculosis en ratones blancos, en términos de dosis clínicas de la preparación para un hombre, obtenida en el curso de la investigación preclínica, permiten el establecimiento de una dosis terapéutica mínima que es igual a 2 mg / kg(88).

Estos mismos efectos se muestran cuando se evaluó la actividad bactericida y fungicida de las AgNPs (molécula Rusa Argovit, que se utilizó para realizar esta tesis doctoral) en medios de cultivo sólido. Diferentes cultivos de microorganismos responsables de la descomposición de los alimentos se han utilizado para evaluar la eficiencia del efecto antimicrobiano. Los métodos descritos en este documento pueden ser utilizados para comparar la actividad bactericida y fungicida de AgNPs (Argovit) al llevar a cabo la investigación, se puede encontrar aplicación en el control de la producción, y los datos sobre la actividad antimicrobiana pueden ser aplicadas para el desarrollo de medicamentos prometedores. En donde se concluyó que Argovit presenta

una clara capacidad bactericida y fungicida contra *Sarcina flava*, *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* y *L.acidophilus*(89).

Los estudios realizados con *Candida albicans*, que es el hongo patógeno más común en los seres humanos, y recientemente, algunos estudios han informado de la actividad antifúngica de las AgNPs (funcionalizadas con polivinilpirrolidona de Vector-Vita Ltd., Rusia) contra algunas especies de *Candida*. Sin embargo, los análisis ultraestructural de la interacción de AgNPs no se han reportado en estos microorganismos. En este trabajo se evaluó el efecto de AgNPs en *C. albicans* y la concentración mínima inhibitoria (CMI) se encontró que tienen un efecto fungicida. El IC50 se determinó también, y el uso de AgNPs con fluconazol (FLC), un fármaco fungistático, la proliferación celular reducida. Con el fin de entender cómo AgNPs interactúan con las células vivas, se determinó la distribución ultraestructural de AgNPs en este hongo. Los estudios realizados por Microscopía electrónica de transmisión (TEM), revelaron una alta acumulación de AgNPs fuera de las células, pero también se encontró pequeñas nanopartículas (NPs) localizada en todo el citoplasma. El análisis por Espectroscopía de energía dispersiva (EDS), confirmó la presencia de plata intracelular. A partir de nuestros resultados, se supone que AgNPs utilizados en este estudio no penetran en la célula, pero liberan iones de plata que se infiltran en la célula que conduce a la formación de NPs través de la reducción por compuestos orgánicos presentes en la pared celular y el citoplasma (90).

Los resultados demuestran la actividad de argovit (combinación de AgNPs con polivinilpirrolidona) y se concluyó que reduce el efecto tóxico y prolonga propiedades terapéuticas. Esto se demostró con un estudio exhaustivo de la actividad antibacteriana de la droga argovit para determinar la concentración mínima bactericida del fármaco contra microorganismos de relevancia clínica como *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATC 13311), *Shigella sonnei* (N 20044), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Por lo tanto, la *neumonía Klebsiella* tuvo el mayor resistencia a la droga, mientras que el crecimiento de la "agresividad" de AA y ALA indicadores 6.3 y 50.0%, respectivamente. Después de contacto con el fármaco al

mismo tiempo marcado por el crecimiento de AA y ALA de *Staphylococcus aureus* por 37.3 y 450.0%, respectivamente, con alta actividad bactericida. El estudio sobre la farmacocinética de la droga argovit y sus características toxicológicas no mostró efectos tóxicos, la presencia de propiedades anti-inflamatorias, así como un efecto bacteriostático y bactericida pronunciada contra enfermedades gastrointestinales infecciosas de ganado joven. En donde se mostró una gran acción antimicrobiana de la plata y se determinó que es responsable de su alta eficiencia terapéutica. Los resultados mostraron que la droga argovit produce un efecto terapéutico y la reducción de la mortalidad de los terneros por enfermedades gastrointestinales, lo que abre amplias perspectivas para su uso en la medicina veterinaria(91).

También los estudios más recientes reportados con el tratamiento de úlceras del pie diabético, en pacientes con infecciones microbianas, son la principal causa de hospitalización y amputación de extremidades inferiores. Se ha estudiado bien las propiedades antimicrobianas de las AgNPs, por lo que su uso en biomedicina es una tendencia. Presentamos por primera vez el uso de AgNPs para el tratamiento de las úlceras del pie diabético de grado II y III de la clasificación de Wagner. Las úlceras se trataron mediante administración tópica de AgNPs (a 1.2 mg / ml de plata metálica) además de los antibióticos convencionales. En todos los casos presentados en este estudio, se presentó una mejora significativa en la evolución de las úlceras tras la administración de AgNPs. Los bordes de la lesión llegaron al punto de cierre. Estos resultados constituyeron la base para estudios adicionales sobre el uso de AgNPs para el tratamiento de úlceras crónicas de diferentes orígenes. Por lo tanto, los AgNPs pueden ejercer la cicatrización de heridas debido a la abolición de las infecciones Gram-negativas o bacterias Gram-positivas, lo que resulta en una disminución del edema junto con la diferenciación de los linajes celulares que promueven un cierre más rápido y la reepitelización de la herida. La formulación de AgNPs de Argovit utilizada en este trabajo ha sido aprobada por instancias internacionales como complemento alimenticio, cosmético, recubrimiento de dispositivos médicos para humanos Cirugía y medicina veterinaria. Además, Argovit tiene otra ventaja: la única formulación de AgNPs demostrada tiene efectos no genotóxicos en líneas celulares para concentraciones

cercanas a la IC50 (3.5 µg / mL de plata metálica). Esto nos permite utilizar esta formulación de AgNPs como una alternativa a los fármacos convencionales y una formulación segura para el tratamiento de úlceras del pie diabético(92).

#### **5.1.6. Resultados del TMA en la superficie ocular**

Los resultados de la aplicación de MA con glicerol sin AgNPs mostraron que de las cinco piezas con TMA, un 40% (2 piezas) presento infección local posquirúrgica e inflamación moderada grado 2 y el 60% (3 piezas) no mostró cambios sugestivos de inflamación o alteración histológica, comparándolo con los resultados de las 30 piezas del TMA crioconservada con glicerol más la aplicación de AgNPs al 0.01%, mostraron 13.3% (4 piezas) de inflamación crónica grado 2 y 3.3%(1 pieza) presento inflamación crónica grado 3 tipo cuerpo extraño asociada a la sutura a los 20 días y el resto 83.3% (25 piezas) de las piezas de los 20, 40 y 60 días no se encontraron alteraciones patológicas sugestivas de inflamación, ni de cuerpo extraño, esto probablemente por el efecto antibacteriano e inmunomodulador (87) de las AgNPs comparadas con los resultados de la MA crioconservada solo con glicerol, estos resultados permiten que las nanopartículas de plata pueden usarse como inhibidores de crecimiento efectivo de varios microorganismos, siendo más sensibles los microorganismos gram negativos (*E. Coli*) y *Cándida albicans* en comparación con los gram positivos (*S. Aureus*)(92). Por lo que el uso de las nanopartículas de plata está tomando especial auge como un agente antimicrobiano potencial ya que muchas bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia a los antibacterianos, lo que hará que las nanopartículas de plata puedan utilizarse en diversas preparaciones médicas que van desde apositos cubiertos con base de plata, apositos biológicos con nanopartículas de plata como lo mostrado en este trabajo doctoral a base de MA con nanopartículas de plata o en nanogeles o nanoluciones etc.(93). Esto permite valorar que entre los nanomateriales más prometedores con propiedades antibacterianas se encuentran las nanopartículas metálicas, que exhiben una mayor actividad química debido a su gran relación superficie/volumen y estructura superficial cristalográfica, nuestros resultados indican que las propiedades antibacterianas de las AgNPs depende del tamaño de las mismas, ya que las únicas nanopartículas que presentan una interacción directa con las bacterias

tienen preferentemente un diámetro de 1-10nm.(94). Todos estos resultados ponen de manifiesto la futura aplicación de las AgNPs en apósitos con la MA para ser utilizadas como parches biológicos para úlceras de pie diabético, úlceras por presión y en pacientes con grandes quemaduras para la reconstrucción de su lesión de difícil manejo con los tratamientos convencionales(95), y la protección de esta tecnología con la realización de una patente por el grupo multidisciplinario.

## **CAPÍTULO VI**

### **6.1. CONCLUSIONES**

1.- Se estandarizaron los diferentes procesos de extracción, transporte, fragmentación y crio-conservación para generar un banco de membrana amniótica capaz de preservar su estructura para aplicarse en diferentes patologías de la superficie ocular.

2.-El trasplante de MA con la aplicación de AgNPs en patologías de la superficie oculares fue eficaz en un número importante de casos y constituye una alternativa terapéutica útil cuando fracasa el tratamiento médico convencionales.

3.- El trasplante de MA con la aplicación de AgNPs en lesiones de la superficie ocular consiguió una rápida regeneración tisular con mínimas cicatrices y procesos inflamatorios residuales en los casos tratados a los 20, 40 y 60 días en modelo animal.

4.- El TMA mejora los procesos de reparación de la superficie ocular, facilitando la regresión epitelial y con ello una mejor recuperación de la transparencia corneal.

5.- El modelo experimental en conejo cumple criterios clínicos de TMA, como lo demuestran las observaciones clínicas é histológicas reportadas en el presente estudio.

6.- El trasplante de membrana amniótica se mostró como una técnica segura en el tratamiento de patología de la superficie ocular con la contribución del efecto crio-protector y antibacteriano de las AgNPs.

7.- Es la primera vez en la literatura donde se cita la utilización de AgNPs con efectos crio-protectores en la preservación de la MA y su aplicación en la superficie ocular en un modelo de conejo, evaluando el proceso inflamatorio y su re-epitelización.

## **CAPÍTULO VII**

### **7.1. BIBLIOGRAFÍA**

- 1.- Song IC, Bromberg BE, Monh MP et al. Heterografts as biological dressings for large wounds. *Surgery* 1966;59:576.
- 2.- Ivanova SS. The transplantation of skin from dead boy to granulating surface. *Ann Surg* 1890;12:354.
- 3.- Davis JS. Skin transplantation. With a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *JHH Report* 1910;15:307.
- 4.- Sabella N. Use of fetal membranes in skin grafting. *Med Rec NY* 1913;83:478.
- 5.- Vázquez X, Net M, Gatell J et al. . Membrana amniótica: características, efectos y aplicaciones en Oftalmología. *Revista d'Or de Oftalmología*; 2001, nº 4: 19-36.
- 6.- Davis JS. Skin transplantation. With a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *JHH Report* 1910;15:307.
- 7.- De Rotth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 1940;23:522-5.
- 8.- Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br J Ophthalmol* 1946;30:337-45.
- 9.- Barraquer JI. Estado actual de la Histioterapia en Oftalmología. Comunicación solicitada. XXIX Congreso de la Sociedad Oftalmológica Hispano-Americana. Barcelona.
- 10.- Zaikova MV, Lialin AN. Use of alloamniotia in high progressive myopia. *Vestn Oftalmol* 1983;99:32.
- 11.- Iumasheva AA, Belous VI, Lishchenko BM. Scleroplasty results in progressive myopathy with the use of allogeneic amnion. *Oftalmol Zh* 1989;6:352.
- 12.- Zaikova MV, Molokova NF. Umbilical tissue transplantation in progressive myopia. *Vestn Oftalmol* 1991;107:18.
- 13.- Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995;14:473-84.
- 14.- Rao TV, Chandrasekharam V. Use of dry human and bovine amnion as a biological dressing. *Surg Ginecol Obstet* 1973;136:904.

- 15.- Robson M, Krizek TJ. The effect of the human amniotic membranes on the bacterial population of infected rat burns. *Ann Surg* 1973;177:144.
- 16.- Galask R, Snyder IS. Antimicrobial factors in amniotic fluid. *Amer J Obstet Gynec*;106:59.
- 17.-Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20:173.
- 18.- Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human MHC class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:9145.
- 19.- Akle CA, Welsh KI, Adinolfi M. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981;2:1003.
- 20.- Gabler B, Lohmann CP. Hypopyon after repeated transplantation of human amniotic membrane onto the corneal surface. *Ophthalmology* 2000;107:1344.
- 21.-Lee SB, Li DQ, Tan DT et al. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20:325.
- 22.-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.
- 23.-Na, B. K., Hwang, J. H., Shin et al. Analysis of human amniotic membrane components as proteinase inhibitors for development of therapeutic agent of recalcitrant keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, S90. 1998.
- 24.- Hao Y, Ma DH, Hwang DG. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000;19:348.
- 25.- Terranova VP, Lyall RM. Chemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin : a mechanism for epithelial cell apical migration. *J Periodontol* 1986;57:311.
- 26.- Koizumi N, Fullwood NK, 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;41:2506-13.
- 27.- Yeh L, Chen W, Li W, Espana EM, Ouyang J, Kawakita T, Kao WW, Tsenc SCG, Liu C: Soluble Lumican glycoprotein purified from human amniotic membrane promotes corneal epithelial wound healing. *IOVS* 2005;46:479-486.

- 28.- Kim JC, Tseng S.C.G. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol* 1995;9:32.
- 29.-Hao YX, Ma DH, Kim WS, Zhang F: Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000;19:348-52.
- 30.-Kobayashi N, Kabuyama Y, sasaki S, Suppression of corneal neovascularisation by culture supernatant of human amniotic cells. *Cornea* 2002;21:62-67.
- 31.-Addis PJ, Hunt C, hartley S: Bacterial contamination of amniotic membrane. *Br J Ophthalmol* 2001;85:228-30.
- 32.-Prabhasawat P, Tseng S.C.G. Estudio de citología de impresión del fenotipo epitelial de la superficie ocular reconstruida mediante membrana amniótica conservada. *Arch Ophthalmol (Ed. Esp)* 1998;9:68.
- 33.-Cho BJ, Djalilian AR, Obritsch WF et al. Conjunctival epithelial cells cultured on human amniotic membrane fail to transdifferentiate into corneal epithelial-type cells. *Cornea* 1999;18:216-24.
- 34.-Boudreau N, Werb Z, Bissell MJ. Supresión of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:3500.
- 35.-Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z et al Supresion of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995;267:891.
- 36.-Tseng SC, Li D, Ma X: Down-regulation of TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3 and TGG $\beta$  receptor II statement in human corneal fibroblasts by amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:428 S.
- 37.-Kim TH, Lee DY, Rho JH, Rho SH, Yoo KW, Ahn HB, Yoo YH, Park WC. Application of newly developed amniotic membrane ointment for photorefractive keratectomy in rabbits. *Ophthalmic Res* 2006;38:58-61.
- 38.-Tseng SCG, Li D-Q, Tan DTH et al. Suppression of Transforming Growth Factor isoforms, TGF beta receptor II, and myofibroblast differentiation in culture human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999;179:325-35.
- 39.-Li DQ, Tseng SCG. Three patterns of cytoquine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J Cell Physiol* 1995;163:61-79.

40. Bourne G. The Foetal Membranes. A Review of the Anatomy of Normal Amnion and Chorion and Some Aspects of Their Function. *Postgrad Med J* 1962; 38: 193-201.
41. Benirschke K., Kaufman P. Anatomy and Pathology of the placental membranes. In: *Pathology of the Human Placenta* 4th ed New York: Springer; 2000, 281-334.
42. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian A. Properties of the Amniotic Membrane for potential use in tissue engineering. *European Cells and materials* 2008; 15:88-99.
43. Dobрева MP, Pereira PM, Deprest J, Zwijsen A. On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *Int.J. Dev. Biol.* 2010; 54: 761-777.
44. Han YM, Romero R, Kim JS, Tarca AL, Kim SK, Draghici S, Kusanovic JP, Gotsch F, Mittal P, Hassan SS. Region-specific gene expression profiling: novel evidence for biological heterogeneity of the human amnion. *Biol Reprod* 2008; 79: 954-961.
- 45.-Gris. O, López-Navidad A, Caballero F. et al. Amniotic membrane transplantation for ocular surface pathology: long-term results. *Proceedings* 2003;35:2031-2035.
- 46.-Gris O., Del Campo Z., Wolley-Dod C. et al. Amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens for the treatment of epithelial disorders. *Cornea* 2002;21:22-27.
- 47.-Peris C., Menezo JL. Membrana amniótica y superficie ocular. MAC LINE, SL. 2004; capítulo 4, pag. 93.
- 48.- Li DQ, Tseng SCG. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J Cell Physiol* 1995;163:61-79.
49. Mariam S. Ahmad MD , Garret S. Frank MD, Eric m. Hink MD, Alan G. Palestine MD, Darren G. Gregory MD, Emily A. Mc Court MD. Amniotic membrane transplants in the pediatric population. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, vol.21, Issue 3, June 2017, pages 215-218.
50. Geeta K. Vemuganti, Virender S. Sangwan, Indumathi Mariappan, Praveen Joseph, Dorairajan Balasubramanian. *Regenerative Therapies for the Ocular Surface. Regenerative Medicine-from Protocol to Patient* pp 179-203.
- 51.- Ghanavati SZ, Shousha MA, Betancurt C, Perez V. Combined Conjunctival Autograft and Overlay Amniotic Membrane Transplantation; a Novel Surgical Treatment for Pterygium. *Journal of Ophthalmic and Vision Research.* 2014;9:399-403.

- 52.- Meller D., Pires R. T. F., Mack R. J. S., et al. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000;107:980-989.
- 53.- Honavar S. G., Bansal A. K., Sangwan V. S., et al. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology*.2000;107:975-979.
- 54.- Sridhar M. S., Sangwan V. S., Bansal A. K., et al. Amniotic membrane transplantation in the management of shield ulcers of vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 2001;108:1218-1222.
- 55.- Solomon A., Meller D., Prabhasawat P., et al. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocelles, and deep ulcers. *Ophthalmology* 2002;109:694-703.
- 56.- Solomon A., Espana E. M., & Tseng S. C. G. Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the conjunctival fornices. *Ophthalmology* 2003;110:93-100.
- 57.- Espana E. M., Grueterich M., Sandoval H., et al. Amniotic membrane transplantation for bullous keratopathy in eyes with poor visual potential. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2003;29:279-284.
- 56.- Shimazaki J., Kosaka K., Shimmura S., et al. Amniotic membrane transplantation with conjunctival autograft for recurrent pterygium. *Ophthalmology* 2003;110:119-124.
57. Kobayashi A., Yoshita T., Sugiyama K., et al. Amniotic Membrane Transplantation in Acute Phase of Toxic Epidermal Necrolysis with Severe Corneal Involvement. *Ophthalmology* 2006;113:126-132.
- 58.- Shi W., Chen M., & Xie L. Amniotic Membrane Transplantation Combined with Antiviral and Steroid Therapy for Herpes Necrotizing Stromal Keratitis. *Ophthalmology* 2007;114:1476-1481.
- 59.- Said D. G., Nubile M., Alomar T., et al. Histologic Features of Transplanted Amniotic Membrane: Implications for Corneal Wound Healing. *Ophthalmology* 2009;116:1287-1295.
- 60.- Kheirkhah A., Tabatabaei A., Zavareh M. K., et al. A controlled study of amniotic membrane transplantation for acute *Pseudomonas* keratitis. *Canadian Journal of Ophthalmology / Journal Canadien d'Ophtalmologie* 2012;47:305-311.

- 61.- Rojas Alvarez E. Aspectos básicos del pterigion para médicos generales integrales. Revista Cubana de Medicina General Integral. 2009; 25:127-137
- 62.- León Tellez Y, Martínez Prado ME, Vazquez Maya LE. Eficacia del trasplante de membrana amniótica radioesterilizada en cirugía de pterigión. Contacto Nuclear. 2010;26-29.
- 63.- Hui-Kang Ma D, See LC, Liao SB, Tsai RJF. Amniotic membrane graft for primary pterygium: comparison with conjunctival autograft and topical mitomycin C treatment. Br J Ophthalmol. 2000;84:973–978.
- 64.- Zegada Arteaga, JA. Transplante de membrana amniótica humana en cirugía de Pterigión recurrente. Revista médica. 2000.
- 65.- Katbaab A, Hamid-Reza AA, Hamid K, et al. Amniotic Membrane Transplantation for Primary Pterygium Surgery. Journal of ophthalmic and vision Research. 2008; 3: 23-27.
- 66.- Song YW, Yu AH, Cai XJ. Effectiveness of amniotic membrane transplantation combined with mitomycin C in the treatment of pterygium: a meta-analysis. Int J Ophthalmol. 2010;3:352-355.
- 67.- Prince JH. Charles C Thomas. The rabbit in eye research. Springfield IL, 1964, p: 386-88.
- 68.- Salinas-Martínez E. Estudio experimental de lentes intraoculares blandas precristalinianas. Tesis doctoral 1997. Universidad de Valencia.
- 69.- Kon K, Rai M. Metallic nanoparticles: mechanism of antibacterial action and influencing factors. J Comp Clin Path Res 2013;1:160 -74.
- 70.- McQuillan JS, Groenaga Infante H, Stokes E, Shaw AM. Silver nanoparticle enhanced silver ion stress response in Escherichia coli K12. Nanotoxicology, 2012;6:857-66.
- 71.- Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H, et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. J Proteome Res 2006;5:916–24.
- 72.- Durán N, Marcato PD, De Conti R, Alves OL, Costa FTM, M Brocchi. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. J Braz Chem Soc 2010;21:949-59.

- 73.- Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H, et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities J Biol Inorg Chem 2007;12:527–34.
- 74.- Mirzajani F, Ghassempour A, Aliahmadi A, Esmaeili MA. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. Res Microbiol 2011;162:542-9.
- 75.- Mritunjai Singh, Shinjini Singh, S, Prasad, I. S. Gambhir, 2008, Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles; Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures Vol. 3, No.3, p. 115 - 122 .
- 76.- Madhumathi K. Sudheesh Kumar PT, Abhilash S, Sreeja V, Tamura H, Manzoor K, Nair SV, Jayakumar R. 2010; Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. J Mater Sci Mater Med. 21(2):807-13.
- 77.- Douglas M R, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB. 2009; The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. Int J Antimicrob Agents.34(2):103-1.
- 78.- Allaker RP; 2010; The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. J Dent Res.;89(11):1175-86.
- 79.- Cardozo VF, Oliveira AG, Nishio EK, Perugini MRE, Andrade CGT, Silveira WD, et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a Pseudomonas strain against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2013;12:12.
- 80.-Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. J Appl Microbiol 2012;112:841-52.
- 81.- Prabhu, S., Poullose, K.E. (2012) Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. International Nano Letters, vol. 2: 32.
- 82.- Panáček, A., Kolár, M., Vecerová, R., Pruček, R., Soukupová, J., Krystof, V., Hamal, P., Zboril, R., Kvítek, L. (2009) Antifungal activity of silver nanoparticles against Candida spp. Iomaterials, vol. 30: 6333.
- 83.- Kim, K.J., Sung, W. S., Suh, B. K., Choi, J.S., Kim, J.G., Lee, D.G. (2009) Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on Candida albicans. Iometals, vol. 22: 235.

- 84.- Nasrollahi, A., Pourshamsian, Kh., Manosourkiaee, P. (2011) Antifungal activity of silver nanoparticles of silver nanoparticules on some fungi. International Journal of Nano Dimension, vol. 1: 233.
- 85.- Keuk-Jun, K., Sung, S.W., Moon, S. K., Choi, J.S., Kim G. J. (2008) Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. Journal Microbiology and Biotechnology, vol. 18: 1482.
- 86.- Young-Ki, J., Byung, H.K. (2009) Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. Plant Disease, vol. 93: 1037.
- 87.- Kalmantaeva Olga Valerievna. Los efectos antibacterianos y inmunomoduladores de nanopartículas plata, nanotubos de carbono en un modelo de salud y ratones infectados por Mycobacterium tuberculosis. 02/03/03 – Microbiología.
- 88.- GN Kreysberg, IE Gracheva, BS Kibrik, IV Golikov. Antituberculous effect of silver nanoparticles. Journal of Physics: Conference Series 291 (2011) 012030. doi:10.1088/1742-6596/291/1/012030
- 89.- D. O. Podkopaeva, L. N. Shaburovaa, G. V. Balandina, O. V. Krainevaa, N. V. Labutinaa, O. A. Suvorova, and Yu. I. Sidorenkob. Comparative Evaluation of Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles. ISSN 1995-0780, Nanotechnologies in Russia, 2014, Vol. 9, Nos. 1–2, pp. 93–97. © Pleiades Publishing, Ltd., 2014.
- 90.- Roberto Vázquez-Muñoz, Miguel Avalos-Borja, Ernestina Castro-Longoria. Ultrastructural Analysis of Candida albicans When Exposed to Silver Nanoparticles. PLOS ONE | www.plosone.org. October 2014 | Volume 9 | Issue 10 | e108876.
- 91.- A.I. Piskaeva\*, Yu. Yu. Sidorin, L. S. Dyshlyuk, Yu. V. Zhumaev, and A. Yu. Prosekov. Research on the influence of silver clusters on decomposer microorganisms and e. coli bacteria. BIOTECHNOLOGY. ISSN 2308-4057. Foods and Raw Materials Vol. 2, No. 1, 2014.
- 92.- César Alejandro Almonaci Hernández, Karla Juárez-Moreno, Martín E Castañeda-Juárez, Horacio Almanza-Reyes, Alexey Pestryakov y Nina Bogdanchikova. Silver Nanoparticles for the Rapid Healing of Diabetic Foot Ulcers. International Journal of Medical Nano Research. Hernández et al. Int J Med Nano Res 2017, 4:019. Volume 4 | Issue 1 Open Access. ISSN: 2378-3664. DOI: 10.23937/2378-3664.1410019.

93. Jun Sung Kim, DVM,PhD, Eunye Kuk, MS, Kyeong Nam Yu, MS, Jong-Ho Kim, MS, Sung Jin Park, BS, Hu Jang Lee, et-al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomaedicine: Nanotechnology, Biplogy, and Medicine* 3 (2007) 95-101.
94. Mahendra Rai, Alka Yadav, Aniket Gade. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances* 27 (2009) 76-83.
95. Morones, JR, Elechiguerra, JL., Camacho, A., Holt, K., Kouri, JB., Tapia, R.J., Yacaman, MJ., The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16 (2005) 2346-2353.

## CAPÍTULO VIII

### ANEXO I

**I.-Título del proyecto:** Extracción, conservación e implante de membrana amniótica humana para la reconstrucción y tratamiento de diferentes patologías en la superficie ocular.

**Investigador principal:** Dr. Horacio Almanza Reyes

**Sedes donde se realizará el estudio:**

- Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California (FMyP- UABC), campus Tijuana.
- Hospital Fray Junípero Serra del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) en Tijuana Baja California.

Nombre del paciente:

---

Está invitada a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de las siguientes etapas del proyecto. Este proceso se conoce como **consentimiento informado**, una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este formato, a continuación se le entregara una copia firmada y fechada como participante. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

#### **II.-Justificación del estudio.**

En este proyecto se utilizará la membrana amniótica como injerto o recubrimiento que permitirá solucionar las principales patologías en pacientes con complicaciones de la superficie ocular, ya que se presentan diferentes enfermedades (como ejemplo podemos mencionar las úlceras corneales, lesiones conjuntivales extensas y defectos epiteliales persistentes) de difícil manejo con los tratamientos existentes hasta la fecha, y en los que el trasplante de membrana amniótica parece representar una alternativa terapéutica eficaz. Las diferentes patologías que pueden afectar la superficie ocular ponen de manifiesto la relevancia del proyecto para desarrollar investigación aplicada entre la Fac. de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California y el Hospital Fray Junípero Serra del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE).

### **III.- Objetivos del estudio.**

- Conocer la eficacia que pudiera tener la práctica del trasplante de membrana amniótica en diferentes patologías en la superficie ocular.
- Establecer si el trasplante de membrana amniótica puede contribuir a la regeneración de la superficie ocular, y estudiar la influencia que dicha regeneración puede tener en los procesos de reparación ocular.
- Valorar la eficacia y seguridad del recubrimiento con membrana amniótica en los defectos epiteliales de la córnea.
- Conocer la estabilidad de los resultados obtenidos tras el trasplante de membrana amniótica a largo plazo.
- Valorar la respuesta al tratamiento con distintas formas de implante.

### **IV.- Procedimientos del estudio, incluyendo la identificación de los procedimientos experimentales.**

#### **Descripción de la intervención.**

La obtención de la membrana amniótica se realizara por el servicio de obstetricia del Hospital ISSSTE, mediante cesárea electiva bajo las medidas de seguridad más estrictas y estará apegada a los lineamientos de las normas nacionales e internacionales vigentes que regulan estos procedimientos. Se cumplirán los criterios generales establecidos para la donación de órganos y además, se recomienda que sean donantes con pleno uso de sus facultades mentales, mayor de dieciocho años de edad, con embarazo controlado por un período no menor a 6 meses en donde presenta al feto sano y sin patología placentarias. Para cumplir los criterios de donación de órganos se tomara una muestra sanguínea para realizar el estudio de laboratorio de biometría hemática completa, brucelosis, enfermedad de Chagas, hepatitis B (Ag HB), hepatitis C (VHC), sífilis (VDRL) y la prueba para detectar el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Las muestras serán marcadas con el número clave de identificación de los participantes. Dicho número estará relacionado con los datos documentados de los participantes con el fin de resguardar la confidencialidad de los participantes.

- En esta etapa se les explicará en que consiste el protocolo, las alternativas terapéuticas que existen y si aceptan se les dará a firmar la hoja de consentimiento informado.
- En caso de aceptar participar en el estudio se le realizará una historia clínica, sobre sus hábitos alimenticios, antecedentes médicos y el cuidado durante el embarazo.
- El procedimiento experimental consiste en una toma de muestra sanguínea y posteriormente que durante la cesárea usted done la placenta para obtener la membrana amniótica.

### **V.- Las molestias o los riesgos asociados con el estudio.**

El único riesgo que se pueden presentar es durante la cesárea, pero se realizara con personal altamente capacitado que cumplirán las medidas de seguridad más estrictas y estarán apegados a los lineamientos de las normas nacionales e internacionales vigentes que regulan estos procedimientos.

## **VI.-Los beneficios del estudio.**

En diferentes países existen protocolos estandarizados para realizar la extracción, conservación e implante de membrana amniótica humana para la reconstrucción y tratamiento de diferentes patologías en la superficie ocular, en los cuales se ha encontrado:

- a) Se pueden obtener nuevos esquemas de tratamiento al realizar trasplantes de membrana amniótica para obtener resultados satisfactorios desde el punto de vista clínico en múltiples patologías de la superficie ocular.
- b) Se realizaran trasplantes de membrana amniótica para implementar estrategias que disminuyan las complicaciones oftalmológicas y contribuir a mejorar la calidad de vida de los pacientes que muestren patologías de difícil manejo con los tratamientos existentes hasta la fecha, y en los que el trasplante de membrana amniótica parece representar una alternativa terapéutica eficaz.
- c) Se implementaran estrategias biomédicas para mejorar la donación de órganos y tejidos con fines terapéuticos en patologías oftalmológicas por medio del trasplante de membrana amniótica.

## **VII.- Los procedimientos alternativos al tratamiento.**

La obtención de la membrana amniótica se realizara por el servicio de obstetricia del Hospital ISSSTE, mediante cesárea electiva (si es obtenida por parto natural, tendrá que ser descartada) bajo las medidas de seguridad más estrictas y estará apegada a los lineamientos de las normas nacionales e internacionales vigentes que regulan estos procedimientos. La membrana amniótica se utilizara para la reconstrucción y tratamiento de diferentes patologías en la superficie ocular. Ya que la membrana amniótica es un sustrato ideal para la regeneración conjuntival con posibilidad de ofrecer resultados superiores a los que ofrecen alternativas quirúrgicas disponibles hasta ahora. Entre las principales patologías, se puede mencionar a las úlceras corneales, lesiones conjuntivales extensas y defectos epiteliales persistentes; éstas constituyen un grupo de lesiones corneales que, cuando no responden al tratamiento médico con frecuencia evolucionan hacia la perforación. Estas patologías son de difícil manejo con los tratamientos existentes en la actualidad y en los que el trasplante de membrana amniótica representa una alternativa terapéutica eficaz.

## **VIII.- La garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del sujeto.**

Al participar en este proyecto de investigación, tendrá derecho de recibir respuesta a cualquier pregunta, duda o aclaración acerca de los procedimientos realizados en dicho estudio, así como entender perfectamente los riesgos y beneficios que pueden presentarse con la investigación, al participar en el proyecto.

## **IX.- La libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se creen prejuicios para continuar su cuidado y tratamiento.**

Al participar en este proyecto de investigación, tendrá derecho de retirarse de este protocolo en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se

creen perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento convencional. Si usted lo desea puede llenar la carta de revocación del consentimiento, que se encuentra en los anexos de este protocolo.

**X.- La seguridad de que no se identificará al sujeto y que mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad.**

Todas las personas que coordinan y colaboran en la investigación se comprometen a mantener la confidencialidad con relación a toda la información obtenida en el proceso de realización del proyecto denominado: **Extracción, conservación e implante de membrana amniótica humana para la reconstrucción y tratamiento de diferentes patologías en la superficie ocular**, en relación con los participantes en dicho proyecto y declaran que están de acuerdo con lo siguiente:

- No divulgar a terceras personas o instituciones el contenido de cualquier documentación, parte o el resultado del proceso del estudio.
- No discutir ni divulgar problemas de los participantes a terceros.
- No permitir a terceros el manejo de documentación resultante del proceso del estudio.
- No explotar y aprovechar en beneficio propio, o permitir el uso por otros, de las informaciones obtenidas o conocimientos adquiridos durante el proceso del estudio.
- Si existe la posibilidad de conocer un proceso el cual pueda tener algún conflicto de interés o contravenir el Código de Ética, notificaremos de inmediato de este hecho.
- Si por algún motivo faltáramos a cualquiera de nuestros compromisos, aceptamos nuestras responsabilidades por cada uno de nuestros actos y sus posibles consecuencias.

**XI.- El compromiso de proporcionarle información actualizada durante el estudio aunque ésta pudiera afectar la voluntad del sujeto para continuar participando.**

Al participar en este proyecto de investigación, tendrá derecho de ser informado sobre su evolución del estudio y sus resultados, aunque ésta pudiera afectar la voluntad del sujeto para continuar en dicho proyecto, sin que por ello se creen perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento convencional. Si usted lo desea puede llenar la carta de revocación del consentimiento, que se encuentra en los anexos de este protocolo.

**XII.- La disponibilidad de tratamiento médico que legalmente tendría derecho, por parte de la institución de atención de la salud, en caso de daños que la ameriten, directamente causados por la investigación.**

Al participar en este proyecto de investigación, tendrá derecho de disponer de tratamiento y atención medica por parte del Hospital Fray Junípero Serra del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, en caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto causado por la toma de la membrana amniótica.

**XIII.- Si existen gastos adicionales, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación.**

Al participar en este proyecto de investigación, usted no realizara ningún gasto adicional, éstos serán absorbidos por el presupuesto de investigación.

**XIV.- Aclaraciones.**

- La decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar participar en la investigación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, informando las razones de su decisión, la cual será respetada.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tendrá derecho a atención médica necesaria, siempre que estos efectos sean consecuencia del procedimiento del proyecto. Si presenta alguna complicación relacionada con su enfermedad base, se le otorgara la atención necesaria estipulada por parte de la institución de salud.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, y si así lo desea firmar la carta de consentimiento informado anexa a este documento.

En caso de ocupar asistencia con dudas o preguntas que surjan respecto al estudio usted puede contactar al coordinador del proyecto en el teléfono (664) 6821233 o al correo electrónico [almanzareyes@uabc.edu.mx](mailto:almanzareyes@uabc.edu.mx)

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, y si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información comprendida del proyecto denominado: **Extracción, conservación e implante de membrana amniótica humana para la reconstrucción y tratamiento de diferentes patologías en la superficie ocular**, y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.



## ANEXO II

### Hoja de evaluación clínica del donante

#### Información y verificación de la salud del donador

Por favor escriba con letra de molde

Nombre del Donador:

Apellido Paterno \_\_\_\_\_ Apellido Materno \_\_\_\_\_ Nombre (s) \_\_\_\_\_  
Dirección del Donador: Calle \_\_\_\_\_ No. Exterior \_\_\_\_\_ No. Interior \_\_\_\_\_  
Colonia \_\_\_\_\_ Delegación \_\_\_\_\_  
Ciudad \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_ C.P. \_\_\_\_\_ País \_\_\_\_\_  
Teléfonos del Donador: Domicilio: Lada ( ) \_\_\_\_\_ Fax: \_\_\_\_\_  
Cel: ( ) \_\_\_\_\_ e-mail \_\_\_\_\_  
Nombre de la compañía donde trabaja: \_\_\_\_\_

Dirección: Calle \_\_\_\_\_ No. Exterior \_\_\_\_\_ No. Interior \_\_\_\_\_  
Colonia \_\_\_\_\_ Delegación \_\_\_\_\_  
Ciudad \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_ C.P. \_\_\_\_\_ País \_\_\_\_\_  
Teléfono: ( ) \_\_\_\_\_ Fax: ( ) \_\_\_\_\_

Por favor escriba los nombres de parientes o amigos cercanos que no vivan con usted para que siempre pueden comunicarse con usted, en caso de que no podamos localizarla.

Nombre: \_\_\_\_\_ Relación: \_\_\_\_\_  
Calle \_\_\_\_\_ No. Exterior \_\_\_\_\_ No. Interior \_\_\_\_\_  
Colonia \_\_\_\_\_ Delegación \_\_\_\_\_  
Ciudad \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_ C.P. \_\_\_\_\_ País \_\_\_\_\_  
Teléfono del domicilio: Lada ( ) \_\_\_\_\_ Fax: \_\_\_\_\_  
Cel: ( ) \_\_\_\_\_ e-mail \_\_\_\_\_

#### Datos generales del donador

Sexo: M F    Estatura: \_\_\_\_\_  
Peso: (kg) \_\_\_\_\_ Fuma: Si No  
Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_  
Lugar de nacimiento: \_\_\_\_\_  
Fecha en que se registra: \_\_\_\_\_  
Folio de la credencial de elector: \_\_\_\_\_

### **Evaluación médica del donante**

Sus respuestas a las siguientes preguntas son confidenciales. Esta evaluación médica está diseñada para protegerlo a usted, así como para salvaguardar al paciente que pudiese recibir su placenta (membrana amniótica).

- 1.- (SI) (NO) ¿Está usted entre los 18 y 30 años de edad?
- 2.- (SI) (NO) ¿Se encuentra usted en buen estado general de salud?
- 3.- (SI) (NO) ¿Ha leído el escrito sobre extracción, conservación e implante de membrana amniótica, y entiende la información sobre la propagación del virus del SIDA? Ha respondido a todas las preguntas sinceramente y ha asegurado que usted no tiene riesgos de ninguna de las categorías antes mencionadas.

Nota: si responde "SI" a las preguntas enumeradas abajo, podría o no descalificarse. Si alguna de sus respuestas es "SI", por favor conteste con detalle para que sus respuestas puedan ser correctamente evaluadas.

- 4.- (SI) (NO) ¿Ha sido rechazado o ha tenido algún problema al donar sangre?
- 5.- (SI) (NO) ¿Ha padecido alguna enfermedad grave como cáncer, diabetes, problemas del corazón o de los pulmones (incluyendo cirugía y/o ataque al corazón), convulsiones, dolores de pecho, asma o dificultad para respirar?
- 6.- (SI) (NO) ¿Ha padecido hepatitis, fiebre amarilla, enfermedad del hígado, o ha resultado positivo para hepatitis en algún examen de sangre?
- 7.- (SI) (NO) ¿Ha usted tenido resultados positivos en el examen de VIH (el virus del SIDA)?
- 8.- (SI) (NO) ¿Alguna vez ha recibido tratamiento por hemorragias o sangrado anormal?
- 9.- (SI) (NO) ¿Ha recibido transfusiones de sangre o se ha tatuado durante los últimos doce meses?
- 10.- (SI) (NO) ¿Durante el mes pasado ha tomado o usado algún medicamento bajo prescripción médica?
- 11.- (SI) (NO) ¿Ha usted usado drogas en forma inyectable, no prescritas por el médico?

**ANEXO III**  
**Historia clínica gineco-obstétricos**

**Datos generales:**

Apellidos y Nombres: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_ Raza: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Estado civil: \_\_\_\_\_

Nacionalidad: \_\_\_\_\_ Residencia actual: \_\_\_\_\_

**Antecedentes:**

**Heredofamiliares:** (enfermedades hereditarias o infectocontagiosas. Patología que puede heredar el niño: sordera, ceguera, gemelaridad, alteraciones metabólicas y cromosómicas).

---

---

---

**Personales patológicos:** (Diabetes, epilepsia, enfermedades del corazón, hipertensión, enfermedades de transmisión sexual, tuberculosis, fiebre reumática, rubeola, transfusiones, antecedentes de cirugías, toxicomanías):

---

---

---

---

**Personales no patológicos:** Hábitos tóxicos (café, tabaco y alcohol):

---

---

---

**Higiénico-dietéticos:** (Alimentación, diuresis, horas de sueño, recreación)

---

---

---

**Antecedentes Gineco-obstétricos:**

Menarquia: \_\_\_\_\_ Ciclos (regulares o irregulares): \_\_\_\_\_

Cantidad: \_\_\_\_\_ Color: \_\_\_\_\_

Aspecto: \_\_\_\_\_ Presencia de coagulos: \_\_\_\_\_

Dolor: \_\_\_\_\_ Síntomas acompañantes: \_\_\_\_\_

Inicio de relaciones sexuales: \_\_\_\_\_ Número de parejas sexuales: \_\_\_\_\_

Gestas (embarazos): \_\_\_\_\_ Partos: \_\_\_\_\_ Cesáreas: \_\_\_\_\_ Abortos: \_\_\_\_\_

Anticonceptivos: SI \_\_\_ NO \_\_\_ Tipo: \_\_\_\_\_ Tiempo: \_\_\_\_\_  
Papanicolaou realizados: SI \_\_\_ NO \_\_\_ Fecha último: \_\_\_\_\_  
Cirugías ginecológicas (especificar): \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

FUM: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ FPP: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ EDAD GESTACIONAL: \_\_\_ semanas.  
Gestaciones previas: \_\_\_\_\_  
Partos eutócicos (sin complicaciones): \_\_\_\_\_ Partos distócicos (complicados): \_\_\_\_\_  
Abortos: \_\_\_\_\_  
Fisiológicos \_\_\_\_\_ Provocados \_\_\_\_\_  
Nacidos vivos \_\_\_\_\_  
Nacidos muertos \_\_\_\_\_  
Fecha de culminación del último embarazo: \_\_\_\_\_  
Peso del niño al nacer: \_\_\_\_\_ kg.  
Embarazo planeado: \_\_\_\_\_  
Fracaso de métodos anticonceptivos:  
No usaba: \_\_\_\_\_ píldora \_\_\_\_\_ Inyecciones: \_\_\_\_\_  
DIU: \_\_\_\_\_ Barrera: \_\_\_\_\_ Ritmo: \_\_\_\_\_

**Abdomen y pelvis: Examen obstétrico:**

Inspección: \_\_\_\_\_  
Palpación: AU: \_\_\_\_\_ DU: \_\_\_\_\_ LCF \_\_\_\_\_  
MFA \_\_\_\_\_  
Maniobras de Leopold: \_\_\_\_\_  
Especuloscopia: \_\_\_\_\_  
Maniobra de Tarnier: \_\_\_\_\_  
Tacto Vaginal: \_\_\_\_\_  
Score de Bishop: P \_\_\_ R \_\_\_ E \_\_\_ L \_\_\_ D \_\_\_  
Membranas ovulares: \_\_\_\_\_  
Presentación \_\_\_\_\_  
Plano \_\_\_\_\_ Variedad de posición \_\_\_\_\_  
Pelvimetría interna \_\_\_\_\_

**Aparato Genitourinario:**

Puñopercusión  
Lumbar: \_\_\_\_\_ Derecha: \_\_\_\_\_ Izquierda: \_\_\_\_\_  
Tacto Vaginal: \_\_\_\_\_  
Vulva: \_\_\_\_\_  
Flujo: \_\_\_\_\_  
Sensibilidad: \_\_\_\_\_  
Fondo de saco vaginal: \_\_\_\_\_  
Cuello Uterino: \_\_\_\_\_

**Exploración física.**

Signos Vitales. T.A. \_\_\_\_\_ (brazo derecho) T.A.(brazo izquierdo) \_\_\_\_\_ F.C. \_\_\_\_\_  
Frec. Resp. \_\_\_\_\_ Temp. \_\_\_\_\_ Peso \_\_\_\_\_ Talla \_\_\_\_\_ IMC \_\_\_\_\_  
(IMC= Índice de Masa Corporal)(la Tensión arterial deberá de ser tomada en 2 posiciones ej.: acostado y sentado)

**Cabeza y Cuello** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Tórax** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Abdomen.** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Extremidades.** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Neurológico y Estado Mental** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Exámenes complementarios:**

Laboratorio:

Hto: \_\_\_\_\_ Leucocitos: \_\_\_\_\_ Cayados: \_\_\_\_\_ Segmentados: \_\_\_\_\_  
Eosinófilos: \_\_\_\_\_ Linfocitos: \_\_\_\_\_ Monocitos: \_\_\_\_\_  
VCM: \_\_\_\_\_ Plaquetas: \_\_\_\_\_

Glucemia: \_\_\_\_\_ Urea: \_\_\_\_\_ Creatinina: \_\_\_\_\_ Sodio: \_\_\_\_\_  
Potasio: \_\_\_\_\_ Cloro: \_\_\_\_\_

GOT: \_\_\_\_\_ GPT: \_\_\_\_\_ FAL: \_\_\_\_\_ Bilirrubina: \_\_\_\_\_

Total: \_\_\_\_\_ Directa \_\_\_\_\_ Coagulograma: \_\_\_\_\_

PH: \_\_\_\_\_ CO2: \_\_\_\_\_ HCO3: \_\_\_\_\_ PO2: \_\_\_\_\_ Sat: \_\_\_\_\_ GAP:.  
A-a \_\_\_\_\_ FIO2: \_\_\_\_\_

Orina: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Hemocultivo: SI - NO      Urocultivo: SI - NO      Otros: \_\_\_\_\_

## ANEXO IV

### La hoja de recogida de datos de la extracción de la placenta.

Durante el proceso de obtención de la placenta se aportaran los datos relativos a las características anatómicas del mismo (longitud, diámetro, peso, etc.) que puedan considerarse relevantes para su posterior uso clínico, se obtendrán durante la fase de manipulación en el Banco de Tejidos.

Se deberá guarda y custodia de la siguiente información:

- 1.- Identificación del centro, unidad u organismo de obtención autorizado: \_\_\_\_\_
- 2.- Número identificativo único de donación: \_\_\_\_\_
- 3.- Fecha de obtención de la placenta: \_\_\_\_\_
- 4.- Lugar de obtención de la placenta: \_\_\_\_\_
- 5.- Tipo de donante: \_\_\_\_\_
- 6.- Tipo de tejido: \_\_\_\_\_
- 7.- Número de lote, si procede: \_\_\_\_\_
- 8.- Número de sub-partición, si procede: \_\_\_\_\_
- 9.- Fecha de caducidad: \_\_\_\_\_
- 10.- Estatus del tejido/grupo celular: cuarentena, descartado, disponible, implantado.
- 11.- Descripción del tejido: origen, fases de procesamiento o transformación aplicadas, materiales y aditivos que han estado o están en contacto con las células o tejidos y que pueden afectar a su calidad y/o seguridad cuya presencia debe tenerse en cuenta por razones de seguridad para las personas en las que se apliquen (por ejemplo, presencia de antibióticos y posibles reacciones alérgicas): \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 12.- Identificación del centro o unidad de aplicación: \_\_\_\_\_
- 13.- Identificación del paciente receptor (nombre, número de historia clínica, edad, etc.): \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 14.- Fecha de intervención: \_\_\_\_\_
- 15.- Nombre del ginecólogo y diagnóstico que indica la utilización del tejido: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 16.- En caso de no utilización clínica de la placenta, causa que motivo la decisión: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Datos del referencia: \_\_\_\_\_  
 Código del donante: \_\_\_\_\_  
 Fecha: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_  
 Sexo: \_\_\_\_\_  
 Hospital: \_\_\_\_\_  
 Datos de interés: \_\_\_\_\_

Datos de Laboratorio:  
 Grupo ABO/Rh \_\_\_\_\_  
 VHB: \_\_\_\_\_  
 HBsAg \_\_\_\_\_ AntiHBc \_\_\_\_\_ AntiHBs \_\_\_\_\_  
 ADN de VHB \_\_\_\_\_  
 VCH: ANTI-VCH \_\_\_\_\_ ARN de HCV \_\_\_\_\_  
 VIH: ANTI-VIH 1+2 \_\_\_\_\_  
 OTROS \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

- Validación del donante:
- Validado por: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

- No validado y desechado la placenta.

Nombre: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

<b>Equipo que participo en la extracción de la placenta</b>				
Ginecólogo	Anestesiólogo	Pediatra	Enfermera	Otros
Dr.	Dr.	Dr.	Dr.	Dr.
Dr.	Dr.	Dr.	Dr.	Dr.

Pieza extraída:

Referencia:
_____
Envió: _____
Solicitada por: _____
Destino: _____
Bacteriología: _____

## ANEXO V

### Las etiquetas provisionales:

<p><b>Servicio de obstetricia del Hospital Fray Junípero Serra del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) en Tijuana Baja California.</b></p> <p>Número de referencia: _____ Fecha de extracción: _____</p> <p>Fecha de envió: _____ Dr. que realizó la extracción: _____</p> <p>Solicitada por Oftalmólogo: _____</p> <p>Destino: _____</p> <p>Medio de transporte: _____ Temperatura de envió: _____</p> <p>Mantenerse en refrigerador hasta su traslado:</p> <p>_____</p>
---

## ANEXO VI

### Bitácora de los procedimientos técnicos para el control de calidad.

<b>Tejido</b>	<b>Edad limite</b>	<b>Medio de recogida</b>	<b>Control Serológico</b>	<b>Medio de transporte</b>
Placenta	De 18 hasta 35 años de edad	Frasco de vidrio estéril.	-VDRL -Virus B de la hepatitis -Virus C de la hepatitis -VIH 1 y 2 -BA	Solución fisiológica, antibióticos y antimicóticos.
<b>Tejido</b>	<b>Medio de congelación para la MA</b>	<b>Control bacteriológico</b>	<b>Medios para control bacteriológico</b>	<b>Bolsa de congelación y temperatura</b>
Membrana amniótica	-DMEM - Albúmina 10% -Glicerol 10%	-Medio de transporte de placenta. - Medio de descongelación de membrana amniótica.	-Resiembra en medio BHI - Siembra en medios gran (-), medio gran (+) y Medio para antimicóticos.	-Bolsa C-T 1200 -180°C

## ANEXO VII

**Las etiquetas definitivas colocadas en la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California.**

Nº	de
REF: _____	
Fecha Extracción: _____	
Fecha de congelación: _____	
Fecha	de
caducidad: _____	
Medio de conservación: _____	
Mantenimiento: _____	
Tamaño: _____	
Tejido tratado con: Estreptomicina, penicilina y Anfotericina B, usar con precaución en alérgicos.	
Estudios: VDRL, VHB, VHC, BA, VIH I y II	

## ANEXO VIII

El desarrollo de las diferentes metodologías se ilustra en las evidencias fotográficas para la estandarización de un banco de membrana amniótica.



1.- Transporte de la membrana amniótica



2.- Material utilizado para realizar los procedimientos.



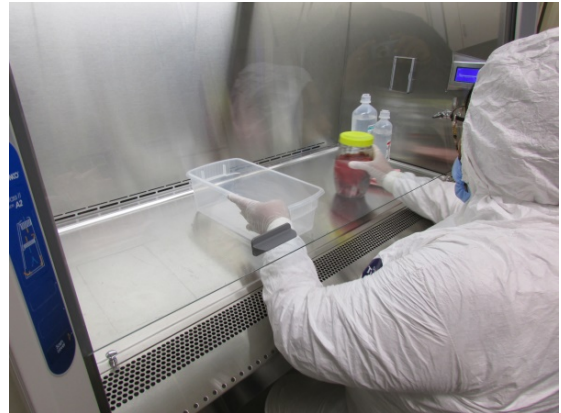
3.- Utilización de vestimenta estéril para el apresamiento de la membrana amniótica.



4.- Utilización de guantes y quipo estéril para el apresamiento de la membrana amniótica.



5.- Preparación del material estéril en la campana de flujo laminar.



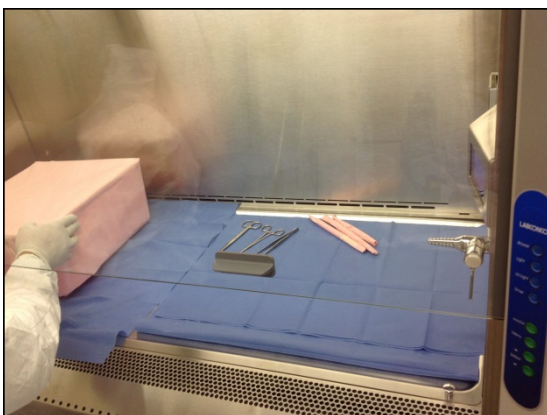
6.- Colocación de la placenta dentro de la campana de flujo laminar.



7.- Preparación de material para utilizar en el procesamiento de la placenta.



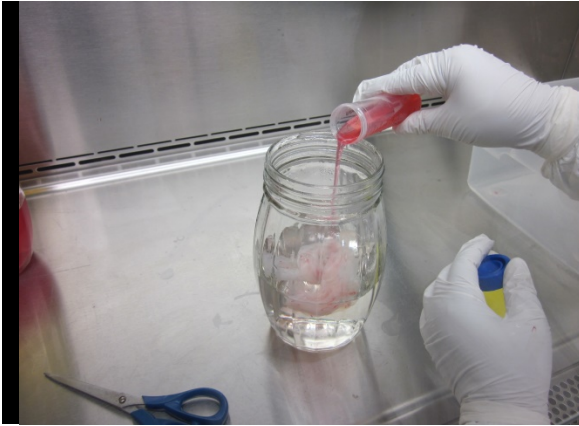
8.- Colocación del material dentro de la campana de flujo laminar.



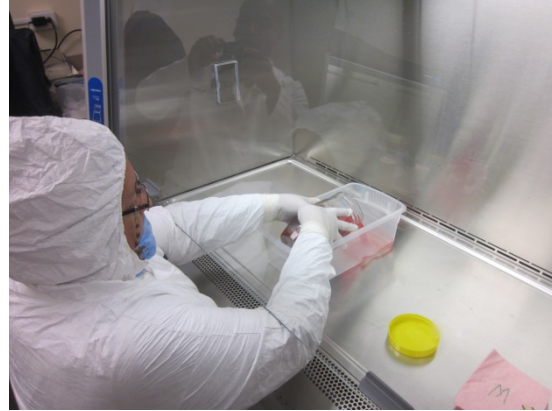
9.- Colocación del material dentro de la campana de flujo laminar.



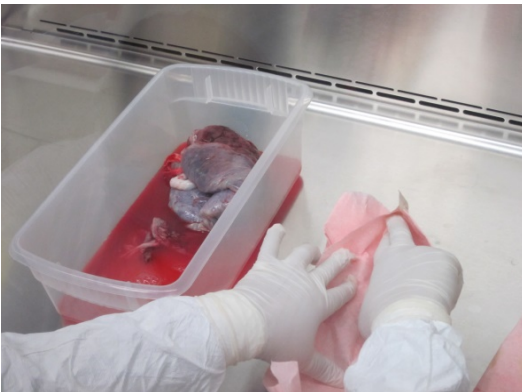
10.- Preparación de la solución para el lavado de la placenta.



11.- Preparación de la solución con una concentración de 0.01% de nanopartículas de plata para el lavado de la placenta.



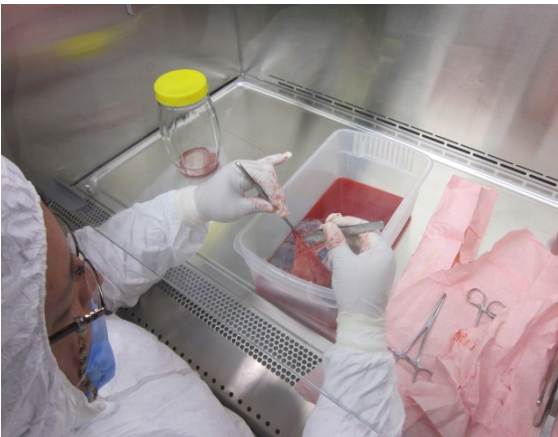
12.- Lavado de la placenta con una solución de 0.01% de nanopartículas de plata.



13.- Inserción de la placenta en medio de conservación.



14.- Preparación de la placenta para su fragmentación.



15.- Fragmentación de la placenta.



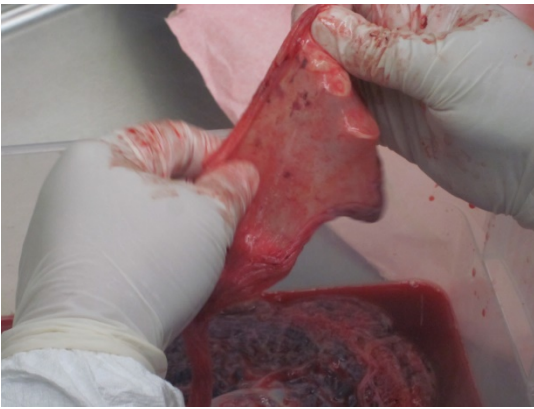
16.- Separación del amnios y la membrana amniótica de la placenta.



17.- Separación de la membrana amniótica de la placenta.



18.- Separación de la membrana amniótica de la placenta.



19.- Separación de la membrana amniótica de la placenta.



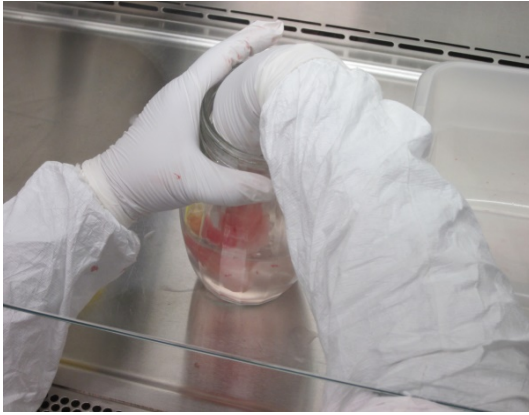
20.- Separación de la membrana amniótica de la placenta.



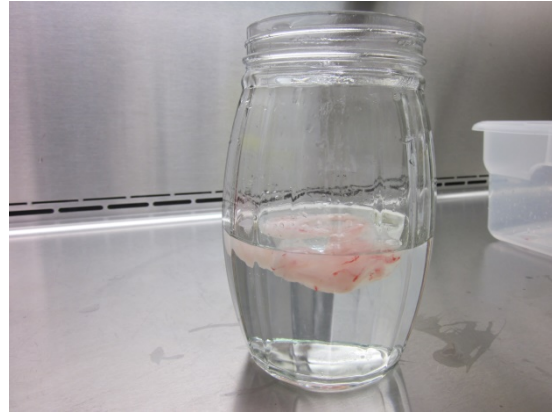
21.- Separación del cordón umbilical de la placenta.



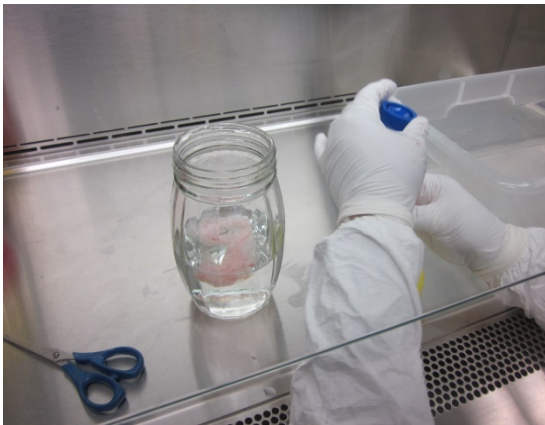
22.- Separación del cordón umbilical de la placenta.



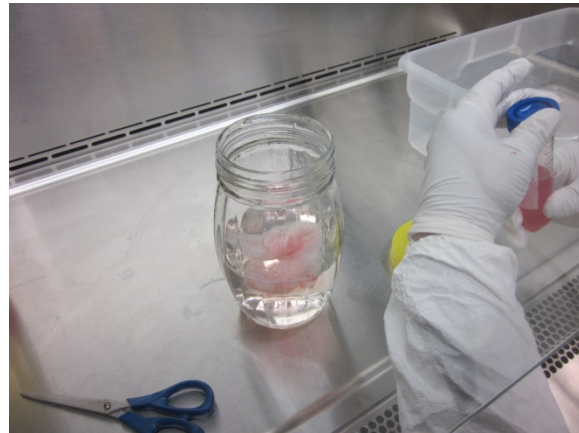
23.-Lavados de la membrana amniótica con solución salina.



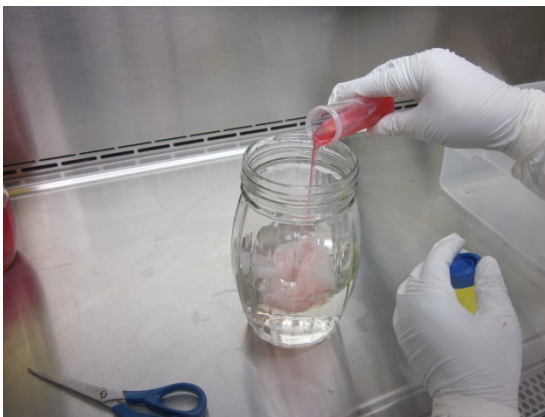
24.- Lavados de la membrana amniótica con solución salina.



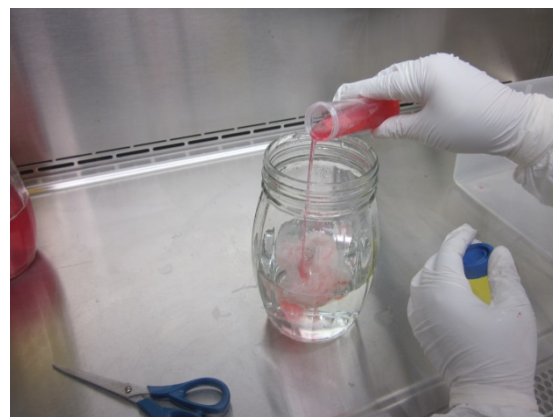
25.-Membrana amniótica colocada en solución salina.



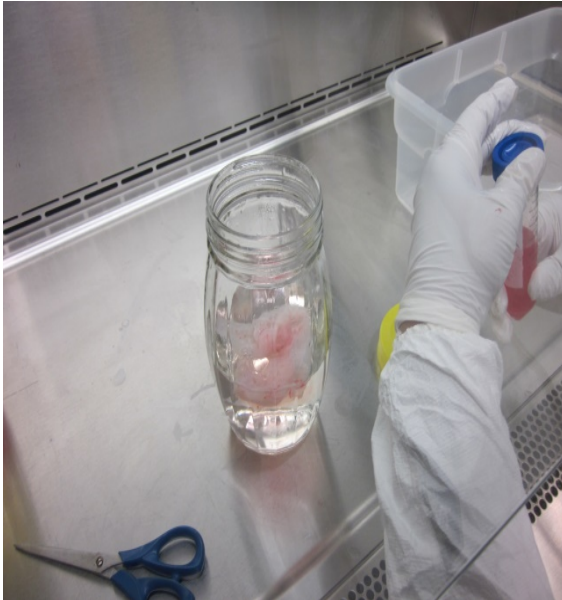
26.-Membrana amniótica en solución salina para realizar los diferentes lavados.



27.-Membrana amniótica después de los lavados con solución salina en donde se coloca una solución con 0.01% de nanopartículas de plata.



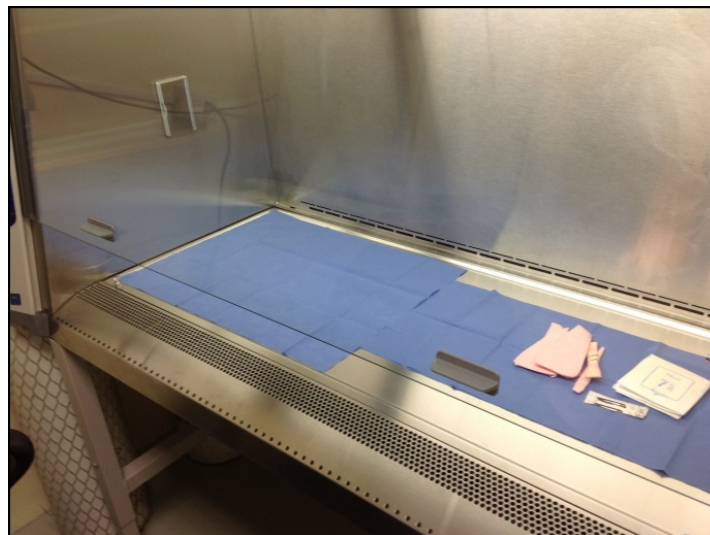
28.-Membrana amniótica en solución salina con 0.01% de nanopartículas de plata.



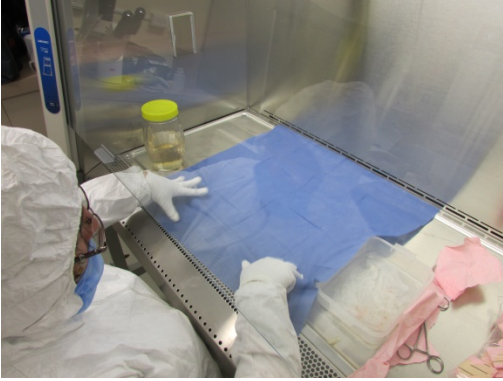
29.-Membrana amniótica en solución salina con 0.01% de nanopartículas de plata.



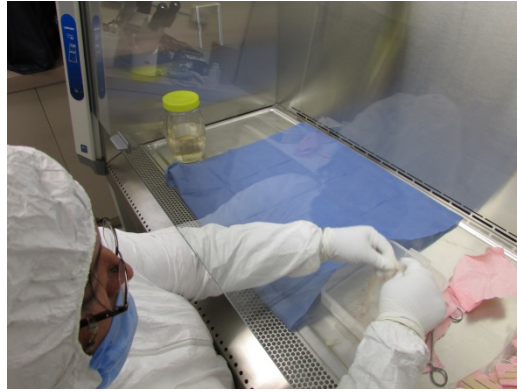
30.-Membrana amniótica colocada con solución de crio-conservación a 4 C en solución salina con 0.01% de nanopartículas de plata.



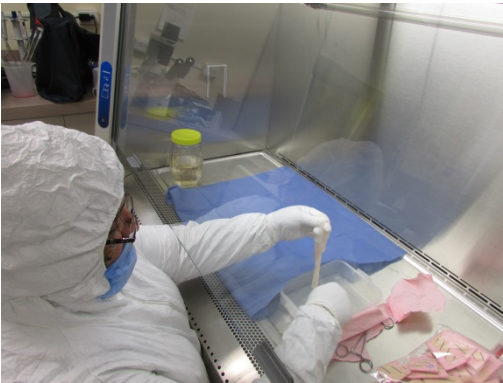
31.- Colocación del material dentro de la campana de flujo laminar.



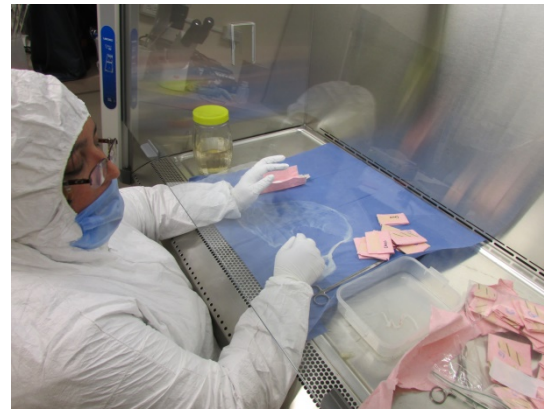
32.- Colocación del material dentro de la campana de flujo laminar.



33.- Colocación del material dentro de la campana de flujo laminar.



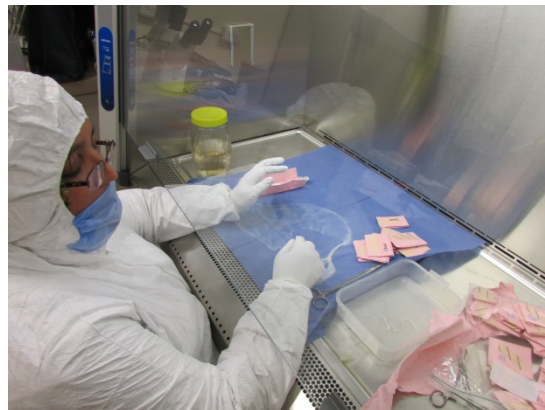
34.- Colocación del material dentro de la campana de flujo laminar para la fragmentación de la membrana amniótica.



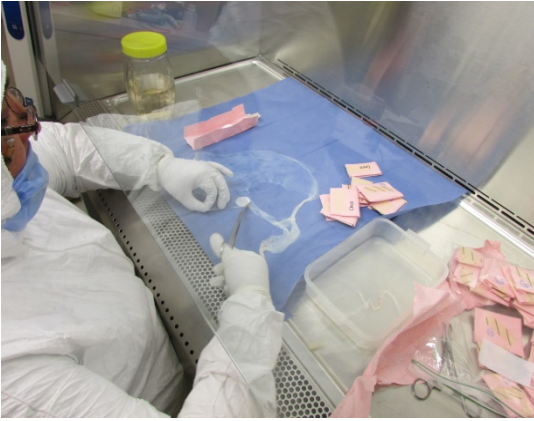
35.- Colocación del material dentro de la campana de flujo laminar para la fragmentación de la membrana amniótica.



36.- Colocación de la membrana amniótica sobre un campo estéril para su fragmentación.



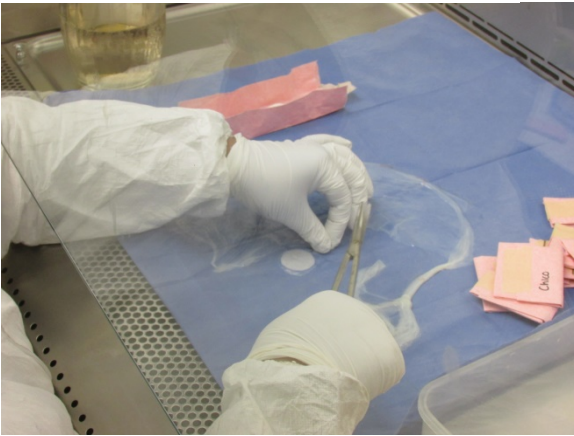
37.- Colocación de la membrana amniótica sobre un campo estéril para su fragmentación.



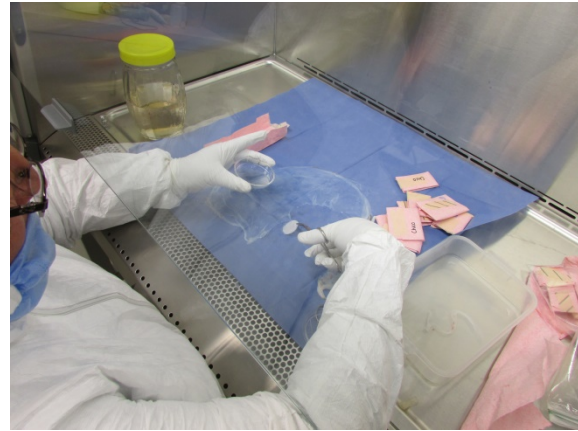
38.- Colocación de filtros de nitrocelulosa sobre la membrana amniótica en un campo estéril para su fragmentación.



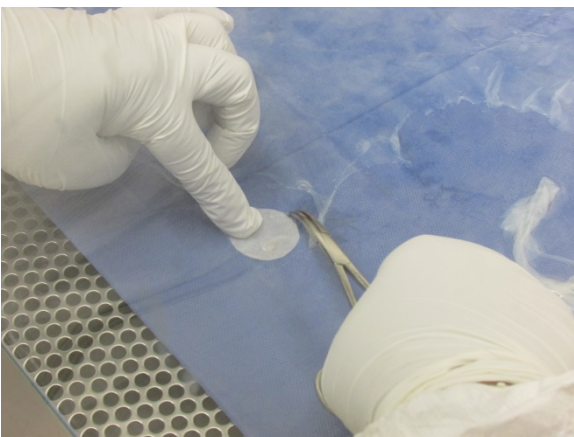
39.- Colocación de filtros de nitrocelulosa sobre la membrana amniótica en un campo estéril para su fragmentación.



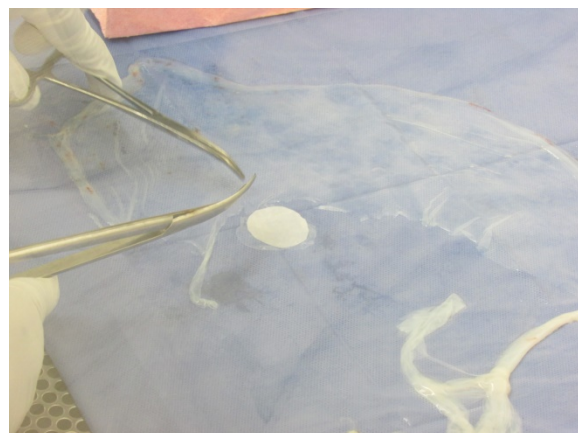
40.- Colocación de la membrana amniótica sobre los filtros de nitrocelulosa en campo estéril para su fragmentación.



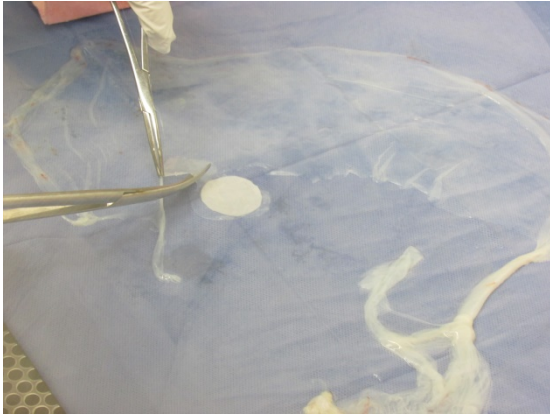
41.- Colocación de la solución de criopreservación para la membrana amniótica.



42.- Corte de la membrana amniótica sobre para ponerla sobre los filtros de nitrocelulosa.



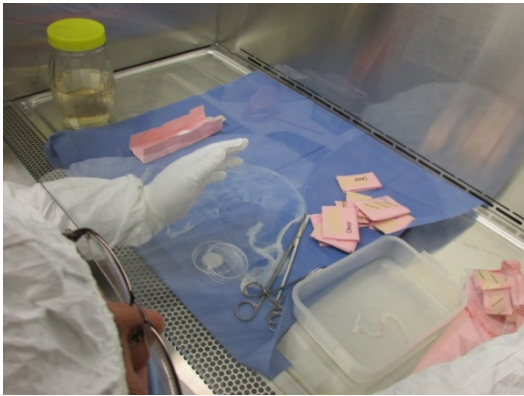
43.- Corte de la membrana amniótica sobre para ponerla sobre los filtros de nitrocelulosa.



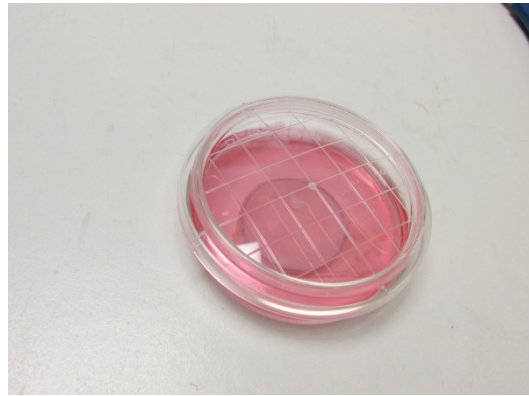
44.- Corte de la membrana amniótica para ponerla sobre los filtros de nitrocelulosa.



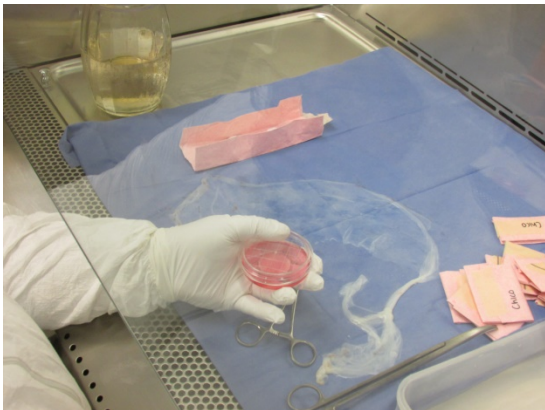
45.-Fragmentación de la membrana amniótica para ponerla sobre los filtros de nitrocelulosa.



46.-Crio-conservación de la membrana amniótica en filtros de nitrocelulosa.



47.-Crio-conservación de la membrana amniótica en filtros de nitrocelulosa con solución de glicerol.



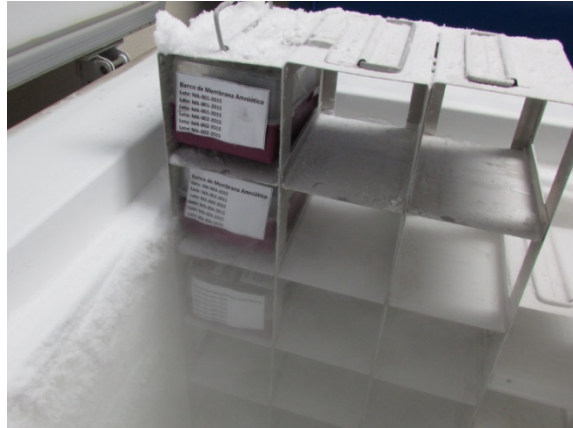
48.-Crio-conservación de la membrana amniótica en filtros de nitrocelulosa con solución de glicerol y con 0.01% de nanopartículas de plata.



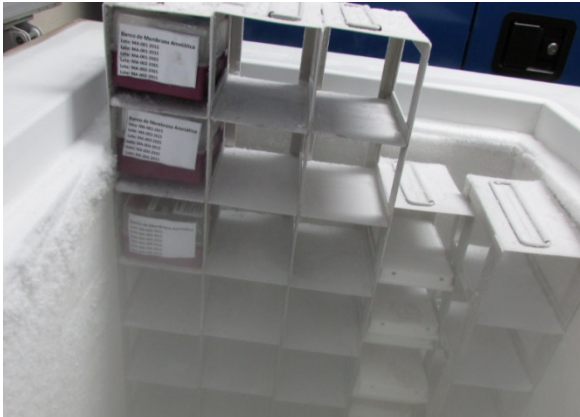
49.-Crio-conservación de la membrana amniótica en filtros de nitrocelulosa con solución de DMSO y con 0.01% de nanopartículas de plata.



50.-Cierre y etiquetado de la membrana amniótica en filtros de nitrocelulosa con solución de DMSO y con 0.01% de nanopartículas de plata.



51.-Área para la creación del banco de membrana amniótica.



52.-Creación del banco de membrana amniótica.



53.-Banco de membrana amniótica en ultracongelador a temperatura de  $-86^{\circ}\text{C}$ .

## ANEXO IX

Dictamen del Comité de Ética e Investigación del Hospital Fray Junípero Serra del ISSSTE.

MÉXICO  
GOBIERNO DE LA REPÚBLICA



*Tijuana Baja California, 19 de Julio del 2013.*

*Dr. Horacio Almanza Reyes*  
*Investigador Principal*  
**PRESENTE**

Estimado Dr.

Le notifico a Usted, que ha sido revisado y aprobado por parte de la Dirección de la Clínica Hospital Fray Junípero Serra Tijuana, la documentación sometida para la evaluación del estudio:

**Extracción, Conservación e Implante De Membrana Amniótica Humana Para La Reconstrucción y Tratamiento De Diferentes Patologías En La Superficie Ocular.**

Por tal motivo le informo que esta Clínica Hospital le AUTORIZA llevar a cabo dicho protocolo.

ATENTAMENTE

Dr. Antón Rolando Escobedo Flores  
Director de la C.H. Fray Junípero Serra  
Tijuana

*Tijuana Baja California, 19 de Julio del 2013.*

*Dr. Horacio Almanza Reyes  
Investigador Principal  
PRESENTE*

Estimada Dr.

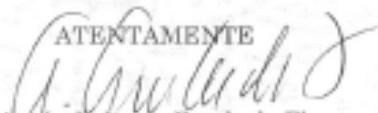
Notificamos a Usted, que ha sido revisado y aprobado por el Comité de Investigación de la Clínica Hospital Fray Junípero Serra Tijuana, la documentación sometida para la evaluación del estudio:

**Extracción, Conservación e Implante De Membrana Amniótica Humana Para La Reconstrucción y Tratamiento De Diferentes Patologías En La Superficie Ocular.**

Por lo tanto, ha sido usted autorizado por el Comité de Investigación de esta Clínica Hospital, para realizar dicho estudio.

Toda vez que el protocolo original y la carta de consentimiento informado sufran modificaciones, estas deberán someterse para su re-aprobación.

ATENTAMENTE



Dr. Anton Rolando Escobedo Flores  
Presidente del Comité de Investigación  
De la C.H. Fray Junípero Serra  
Tijuana

## ANEXO X

Dictamen del Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina y Psicología de la Universidad Autónoma de Baja California

### UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

Tijuana, Baja California, 27 de agosto del 2013  
Oficio No. 935/2013-2

**DR. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES**

Presente.-

Por medio de este conducto, me permito informarle que se sometió a revisión a la Comisión de Bioética de esta Facultad, los cambios realizados al proyecto titulado "EXTRACCIÓN, CONSERVACIÓN E IMPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA PARA LA RECONSTRUCCIÓN Y TRATAMIENTO DE DIFERENTES PATOLOGÍAS EN LA SUPERFICIE OCULAR", el cual tuvo como resultado un dictamen APROBATORIO.

Sin más por el momento, me despido de usted enviándole un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"

  
DR. ALFREDO RENÁN GONZÁLEZ RAMÍREZ  
DIRECTOR

UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE MEDICINA  
Y PSICOLOGIA  
CAMPUS TIJUANA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**  
**Comité de Bioética**

Tijuana, Baja California a 26 de Agosto del 2013.

**DR. ALFREDO RENÁN GONZÁLEZ RAMÍREZ**  
**DIRECTOR FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**  
**PRESENTE.**

Por medio del presente y aprovechando para extenderle un cordial saludo se le notifica que, después de revisar la solicitud de revisión del proyecto de investigación con título:

**"Extracción, conservación e implante de membrana amniótica humana para la reconstrucción y tratamiento de diferentes patologías en la superficie ocular"**

I.P.: Dr. Horacio Almanza Reyes

en comisión específica integrada por la Lic. Psic. Guillermina Medina Ocaranza y por su servidor Dr. Miguel Angel Fraga Vallejo, el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología, ha decidido el siguiente dictamen:

**APROBADO**

Los fundamentos para dicha decisión se basan en que es un proyecto clasificado "Categoría III. Con riesgo mayor que el mínimo" de acuerdo al Artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud por haber cumplido con las características para dicho nivel, además de cubrir los requisitos de privacidad y respeto a los sujetos en investigación durante todo el proceso y manejo de la información. Cumple con los requisitos señalados en el título décimo cuarto relativo a donación, trasplante y pérdida de la vida en su capítulo II sobre donación, artículos 320 y 321 de la LGS. Así mismo, los consentimientos informados tanto de la donante como del receptor(a) reúnen los requisitos señalados en el Art. 21 de dicha Ley.

La presente aprobación es para su aplicación en un periodo no mayor a **DOS AÑOS** a partir de la fecha del dictamen; para mantener la vigencia del mismo, se requiere entregar copia de autorización y registro ante la autoridad correspondiente de la institución de atención a la salud en que se realizará la investigación en un plazo no mayor a 4 semanas de la fecha actual. A la vez, cualquier cambio al protocolo requiere de notificación a esta Comisión antes de su aplicación.

Sin más por el momento, quedo de Usted como su S.S.

Atentamente  
*"Por la Realización Plena del Hombre"*

Dr. Miguel Angel Fraga Vallejo  
Comité de Bioética FMyP

C.c.p. Archivo Comité de Bioética / D84

