

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



Determinación de crecimiento bacteriano durante el protocolo de procesamiento de membrana amniótica humana.

POR
ANA KAREN MEDINA LIRA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN CIRUGIA PLASTICA, ESTÉTICA Y
RECONSTRUCTIVA

FEBRERO 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



Determinación de crecimiento bacteriano durante el protocolo de
procesamiento de membrana amnióticas humanas.

POR
ANA KAREN MEDINA LIRA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN CIRUGIA PLASTICA, ESTÉTICA Y
RECONSTRUCTIVA

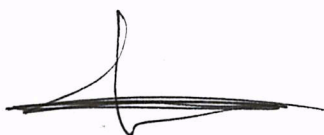
FEBRERO 2022

DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO DURANTE EL PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO DE MEMBRANAS AMNIÓTICAS HUMANAS

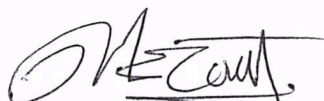
Aprobación de tesis:



Dr. med. Mauricio Manuel García Pérez
Director de Tesis



Dr. Everardo Valdés Flores
Co – Director de Tesis



Dr. MSc. Gabriel Ángel Mecott Rivera
Coordinador de Investigación del Servicio de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva



Dr. med. Yanko Castro Govea
Jefe del servicio de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A Dios por darme la fuerza y la capacidad de soñar, es quien forja mi futuro y me guía por el sendero correcto.

A mis padres, que han seguido este camino tan largo siempre sosteniéndome e impulsándome para conseguir mis sueños.

A mi esposo que, sin su apoyo y comprensión, esto no sería posible.

A mis maestros que desde que me conocieron no dudaron de mi capacidad y perseverancia, depositando su confianza y conocimientos para otorgarme las bases y poder concluir esta meta.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. med Mauricio Garcia Perez**, Profesor del Servicio de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva, del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL, maestro y mentor, él cual confió en mi, desde mis inicios y que sin darse cuenta nos ha inspirado al trabajo arduo con el ejemplo, disciplina y amor a esta profesión.

Al **Dr. med. José Félix Vilchez Cavazos**, Profesor del Servicio de Ortopedia y Traumatología y Coordinador del Banco de Huesos y Tejidos del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL por impulsar este proyecto, gracias por la oportunidad para concretar este trabajo.

Al **Dr. med, Abel Guzmán López**, Jefe del Servicio de Obstetricia, del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL, por apoyar la investigación y comprometerse en este proyecto brindando las herramientas necesarias para la realización del mismo.

Al **Dr. med Jorge Lara Arias**, profesor e investigador del Servicio de Ortopedia y Traumatología, Banco de Huesos y Tejidos del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” por todo su apoyo incondicional y por sentar las bases en el laboratorio para poderrealizar este proyecto.

Al **Dr. William Josef Rodriguez Guajardo**, médico interno de pregrado, por su ímpetu y compromiso hacia este al proyecto.

Índice

CONTENIDO	PÁGINA
Índice	7
Índice de Figuras	8
Lista de Abreviaturas	9
Resumen	11
Introducción	12
CAPÍTULO 1 Marco Teórico	13
CAPÍTULO 2 Antecedentes	18
CAPÍTULO 3 Planteamiento del problema	20
CAPÍTULO 4 Justificación	21
CAPÍTULO 5 Pregunta de investigación	23
CAPÍTULO 6 Hipótesis	24
CAPÍTULO 7 Variables del estudio	25
CAPÍTULO 8 Objetivos del estudio	28
CAPÍTULO 9 Material y métodos	29
CAPÍTULO 10 Descripción del estudio	31
CAPÍTULO 11 Resultados	46
CAPÍTULO 12 Discusión	50
CAPÍTULO 13 Limitaciones el estudio	54
CAPÍTULO 14 Conclusiones	55
CAPÍTULO 15 Bibliografía	56

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1. Principales componentes de la membrana fetal.	13
Figura 2. Capas histológicas de la membrana amniótica	14
Figura 3. Recolección de MA en la sala de operaciones del departamento de Obstetricia	34
Figura 4. Toma de la primera muestra al momento de la obtención en la sala de operaciones.	47
Figura 5. Toma de la segunda muestra al finalizar el procesamiento de la MA.	47
Figura 6. Cultivos con el correcto etiquetado del donante. Cultivo al momento de la obtención (izquierda). Cultivo al final del procesamiento (derecha).	48
Figura 7. Edad gestación de donantes de membrana amniótica.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

CMV: Citomegalovirus

MA: Membrana Amniótica

SOMI: sala de operaciones materno infantil

UFC: unidades formadoras de colonias

VDRL: Venereal Disease Research Laboratory

VIH: Virus Inmunodeficiencia Adquirida

**DETERMINACIÓN DE
CRECIMIENTO BACTERIANO
DURANTE EL PROTOCOLO DE
PROCESAMIENTO DE
MEMBRANAS AMNIÓTICAS
HUMANAS**

POR
ANA KAREN MEDINA LIRA

RESUMEN

ALUMNA: ANA KAREN MEDINA LIRA

Candidata para obtener el grado de especialista en Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva.

Fecha de Graduación: marzo 2021

Título del Estudio: Determinación de crecimiento bacteriano durante el protocolo de procesamiento de membranas amnióticas humanas.

Número de Páginas: 60 **Área de Estudio:** Cirugía Plástica y Reconstructiva

Introducción: La introducción del trasplante de membrana amniótica (MA) en la cirugía plástica es muy prometedora y en muchas situaciones ofrece una alternativa a las opciones existentes. Considerando que puede haber algunas ventajas teóricas para el uso de tejido fresco, el riesgo de infección por enfermedades infectocontagiosas (por ejemplo, VIH, CMV; a pesar del), es real, inclusive con una caracterización completa de donantes, así como procesamiento bajo condiciones estériles y la adición de antibióticos al almacenamiento medio.

Objetivo: El propósito de este estudio fue demostrar la eficacia antiséptica el de la esterilización convencional y los procedimientos de criopreservación en los tejidos de MA.

Material y métodos: Se tomaron muestras para cultivo bacteriano de la cara fetal de la MA, posteriormente se procesaron las membranas amnióticas de acuerdo con el protocolo de criopreservación estándar. Finalmente se tomaron muestras para cultivo previo a la congelación de la MA. Valoraremos los resultados de ambos cultivos (previo al procesamiento y posterior al procesamiento).

Resultados: En nuestro estudio comprendido de abril 2021- junio 2021 se lograron recabar 29 placentas. Respecto a los resultados obtenidos a partir de la toma de cultivos antes y después del procesamiento obtuvimos que, en las MA sin tratar, dos de las 29 placentas mostraron crecimiento bacteriano identificado como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Por otra parte, después del procesamiento de criopreservación todos los cultivos resultaron negativos para crecimiento bacteriano.

Conclusión: Se puede determinar cómo adecuado el procesamiento al cual se somete las MA en nuestro hospital para garantizar una esterilización óptima, lo que favorece la utilización posterior en distintos campos de la medicina.

Palabras clave: *membrana amniótica, cuenta bacteriana, propiedades mecánicas, apósito, heridas, cubierta.*

INTRODUCCIÓN

La MA ha tenido grandes aplicaciones en Cirugía Plástica, ha sido aplicada como una alternativa de vendaje biológico y de alguna manera ha aumentado su uso en la reconstrucción. Además, es usada como cobertura en pacientes con quemaduras químicas, como apósito secundario en autoinjertos, su uso en úlceras crónicas demostró un aumento en la angiogénesis, sin embargo, a pesar de la amplia evidencia que existe, acerca de los múltiples casos en los que se puede utilizar hay una escasez de estudios bien diseñados (ensayos clínicos controlados, metaanálisis etc.), que comprueben el rendimiento del amnios contra los estándares de oro.

Además de existir múltiples maneras de procesamiento y que en la actualidad ninguno ha demostrado superioridad, frente a los demás, la ventaja radica en obtener el método adecuado para tu entorno hospitalario, adaptado a las necesidades de los pacientes y teniendo las instalaciones pertinentes.

En este momento existen un gran número de investigaciones destinadas a describir distintos tipos de procesamiento, que van desde radioterapia, inmersiones en sustancias bactericidas e incluso el lavado únicamente con solución salina. Este trabajo tiene como objetivo contribuir al desarrollo de una ruta establecida, única y general para usar en nuestro hospital (Hospital Universitario Dr. José E. González), observar y describir si el procesamiento de Membrana Amniótica es adecuado en términos de esterilidad bacteriana para su posterior uso clínico.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

Tras la primera aplicación clínica de la membrana amniótica (MA) como cobertura de heridas a principios del siglo anterior, aparecieron varios reportes de su uso como apósito biológico en el tratamiento de quemaduras, úlceras crónicas y heridas.

Amnios o MA son términos usados de manera indistinta en la literatura. Definimos amnios y MA como la membrana separada del corion, y membrana fetal como nombre general que incluye amnios y corion.

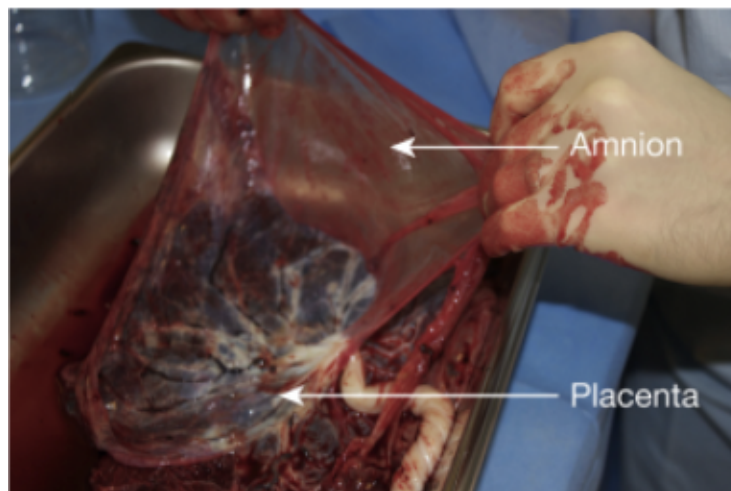


Figura 1. Principales componentes de la membrana fetal (Fairbairn NG, et al., 2014).

La membrana amniótica es la capa fetal más interna con un diámetro de 0.5mm.

La MA se compone de tres capas histológicas diferentes: una monocapa epitelial, una capa de membrana basal gruesa y una capa inferior de tejido mesenquimatoso avascular (Gholipourmalekabadi et. al. 2015).

La última capa se puede subdividir en subcapas compactas, de fibroblastos e intermedias o esponjosas. Las células epiteliales amnióticas contienen una pequeña cantidad de orgánulos intracitoplasmáticos, microvellosidades en la superficie apical y vesículas pinocíticas y también producen varias citocinas / factores conocidos por promover la proliferación y diferenciación celular (**Fairbairn NG, et al., 2014**). Las células epiteliales amnióticas posiblemente estén implicadas en las actividades secretoras y de transporte intra / transcelular.

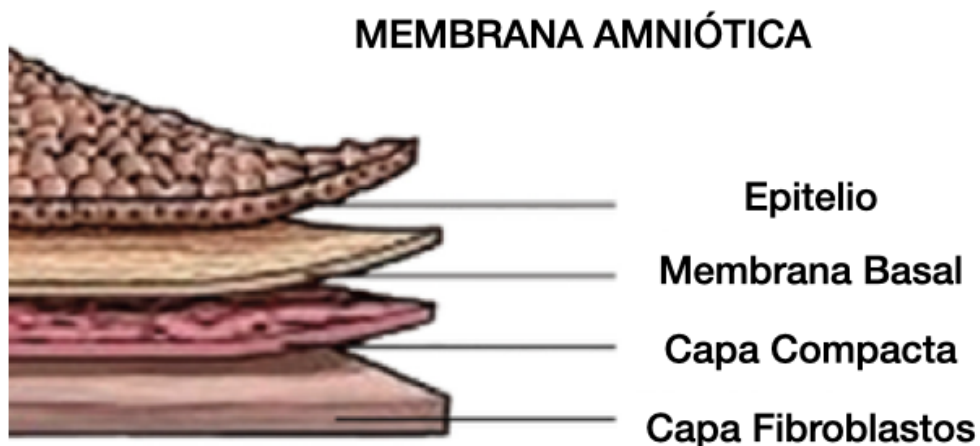
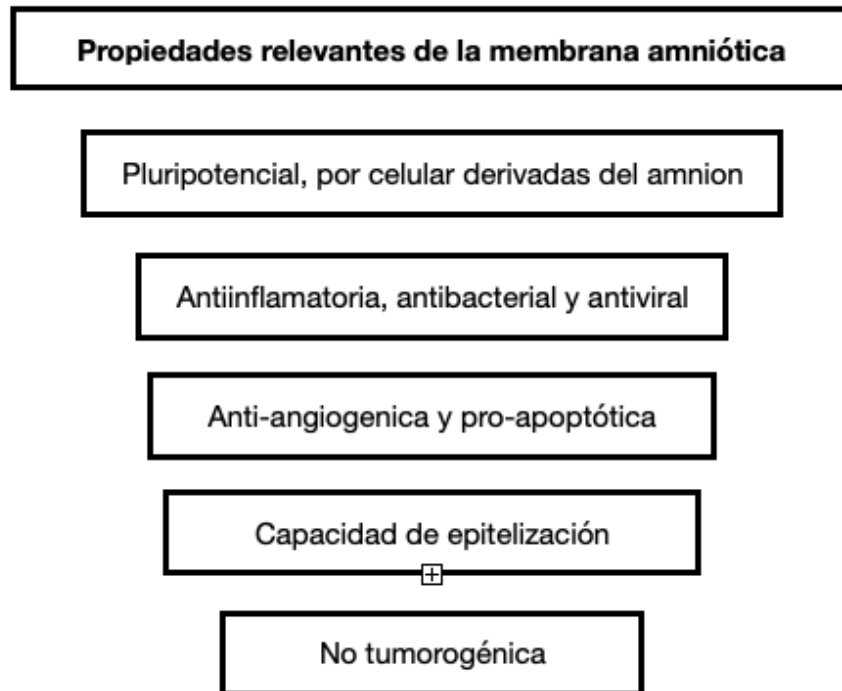


Figura 2. Capas histológicas de la membrana amniótica, (**Laftzi et. al. 2016**).

La membrana basal de la MA es una de las membranas basales más gruesas entre los tejidos humanos y contiene diferentes tipos de colágeno, mismo que le proporciona una fuerte resistencia a la tracción.

La capa interna del tejido mesenquimatoso avascular está en contacto con la membrana basal. La capa de fibroblasto contiene colágenos tipos I y III que están dispuestos en haces paralelos para mantener la integridad mecánica de la MA.

Como se mencionó anteriormente, la MA es una fuente rica de sustancias biológicamente activas que intervienen en los tejidos para la regeneración y cicatrización de heridas (Aghayan, 2013).



La idea de usar MA como reemplazo de piel fue descrita por primera vez por Davis en 1910 (Gholipourmalekabadi et. al. 2015). Durante otro intento, tres años más tarde, se observaron mayores tasas de epitelización del área dañada, ausencia de infección y reducción del dolor.

En 1940, Chao et al. fueron los primeros que utilizaron amnios conservados en alcohol al 70% y posteriormente secados para cubrir grandes defectos de la duramadre. Durante las últimas décadas, un número creciente de publicaciones han descrito el uso de MA como reemplazo temporal de la piel, para el tratamiento de quemaduras superficiales. El

espectro de indicaciones para la aplicación de MA ha crecido durante los últimos años en ginecología, donde se utilizó amnios para la reconstrucción de la vagina. Aunque de Roth sugirió el uso de amnios en el tratamiento del daño de la superficie ocular en 1940, a principios de la década de 1990 comenzó una nueva era con una evaluación clínica y científica del amnios para trasplante en oftalmología y un número de publicaciones en continuo aumento (**Frauke von Versen-Hoeynck, 2008**).

Durante el tiempo en el cual se ha estado utilizando la MA ha pasado por distintos métodos y procesos para su preparación. Entre los diversos métodos, el que se utiliza actualmente con mayor frecuencia implica la congelación profunda entre 70 C y 80 C. Otro enfoque relacionado con los métodos de conservación fue la impregnación con una alta concentración de glicerol. El método se introdujo para preservar la piel de un donante humano y se utiliza en Europa en particular. Se cree que el glicerol tiene un efecto antivírico, pero no se reconoce como agente esterilizante. Incluso después de la conservación durante varios meses, aún pueden estar presentes bacterias y virus.

Si bien puede haber algunas ventajas teóricas para el uso de tejido fresco, el riesgo de infección (por ejemplo, VIH, CMV) (**Riau AK, et. al., 2014**) a pesar de la detección exhaustiva de los donantes, el procesamiento en condiciones estériles, la adición de antibióticos al medio de almacenamiento, el uso de MA después de las cesáreas y la seronegatividad, debido al período de ventana entre la infección y la seroconversión, es real.

Los estándares internacionales (por ejemplo, la Directiva europea 2004/23/EC, los estándares generales de la Asociación Europea de Bancos de Tejidos) requieren el uso de procedimientos de esterilización validados. Además, las leyes de trasplantes y las leyes sobre medicamentos en diferentes países requieren diferentes protocolos para la conservación, prueba y almacenamiento.

Cada paso de la preparación, conservación y esterilización puede influir en las propiedades de un material biológico.

Estudios anteriores demostraron que la esterilización por irradiación y la conservación por liofilización tienen un impacto significativo en las propiedades histológicas y biofísicas de los aloinjertos de amnios (**Fairbairn NG, et al., 2014**).

El propósito de este estudio fue evaluar y determinar si nuestro procesamiento basado en estudios previos y en métodos que se llevan a cabo en otros hospitales tiene la influencia de los procedimientos de esterilización y conservación en las propiedades biofísicas de las membranas amnióticas.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

La MA se extrae con facilidad de una placenta humana (**Tseng y Tsubota 1997**), este tejido se forma del ectodermo en el feto y se considera que es una extensión de la piel de este. Es histológicamente similar a la piel y se compone de dos capas: el amnios y el corion. El amnios tiene su capa interna lisa, blanquecina, semitransparente y compuesta de células cuboidales. La superficie externa es de tejido conectivo mesenquimatoso y el corion tiene tejido conectivo mesenquimatoso en contacto con el amnios y una capa externa constituida por células epiteliales transicionales. La piel es un órgano biológicamente muy activo y es la primera barrera de defensa del ser humano, además, contribuye a mantener un equilibrio con el medio ambiente defendiéndolo e integrándolo con el mismo (**Alfaro, 2003**). Por tanto, cuando se presenta una lesión en la misma es imperante buscar un sustituto temporal, durable, de fácil adhesión, sencillo de almacenar, barato, no alergénico y que cumpla con algunas de las funciones de la piel.

Los sustitutos temporales de piel ayudan a sanar las heridas o quemaduras y mantienen la superficie cerrada hasta que se reconstruye la piel. Su uso en el tratamiento de pacientes con problemas cutáneos ha incrementado recientemente (**Rue et al., 1993**).

El uso de estas membranas en la superficie de una herida produce una disminución de la inflamación y la hidratación de esta, además, con un manejo apropiado, el rango de curación es excelente y el dolor manifestado por el paciente parece reducirse gradualmente (**Quinby 1982**).

La MA ha tenido grandes aplicaciones en Cirugía Plástica, ha sido aplicada como una alternativa vendaje biológico y de alguna manera ha aumentado su uso en la reconstrucción, es usado además como cobertura en pacientes con quemaduras químicas, como apósito secundario en autoinjertos, su uso en úlceras crónicas demostró un aumento en la angiogénesis, sin embargo a pesar de la amplia evidencia que existe, acerca de los múltiples casos en los que se puede utilizar hay una escasez de estudios bien diseñados (ensayos clínicos controlados, metaanálisis etc.), que comprueben el rendimiento del amnios contra los estándares de oro. El amnios humano proporciona al cirujano plástico un material increíblemente versátil.

Recientemente se ha estudiado sus componentes en específico relacionados con la respuesta sistemática de la madre y se ha observado que contiene una plétora de mediadores biológicos, lo cual lo hace un apósito alternativo bien establecido para heridas además de ser biocompatible, altamente conformable, delgado y a la vez conserva una resistencia a la tracción considerable. Puede apoyar y mejorar la supervivencia del tejido transferido además de que a través de la fabricación de vasos y nervios también pueden contribuir directamente en la reconstrucción neurovascular **(Hadley, E. E., Sheller-Miller, S., Saade 2018)**.

Otras de las ventajas de la MA es que es económica, ampliamente disponible, fácil de cosechar y almacenar, ofrece una fuente alternativa de células madre multipotenciales o pluripotenciales y no tiene restricciones éticas, por lo que se recomienda altamente su uso especialmente en países con dificultades económicas o en vías de desarrollo.

CAPÍTULO 3

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de membrana amniótica en distintos campos de la medicina (como apósito en quemaduras en cirugía plástica, en oftalmología, como cubierta de retina, en traumatología liofilizada para problemas de articulaciones), la ha obligado al estudio y correcto procesamiento para evitar la transmisión de enfermedades, sin retirar las desventajas que esta ofrece.

Como resultado, se ha generado gran interés en el desarrollo de alternativas efectivas con un adecuado procesamiento desde su obtención hasta el momento de su utilización. Actualmente en nuestro hospital no se cuenta con banco de piel o materiales disponibles para cobertura, a pesar de que tenemos el protocolo a seguir para el adecuado procesamiento de membrana amniótica, es imperante la necesidad de determinar si el protocolo es el adecuado y así poder estandarizarlo y llevarlo a cabo de manera definitiva.

CAPÍTULO 4

JUSTIFICACIÓN

El uso de la MA en medicina no es una práctica nueva. Esta membrana, obtenida de la placenta humana, es una de las cubiertas biológicas más efectivas utilizadas en el manejo de gran cantidad de patologías, permite una fácil aplicación en el área afectada y crea un efecto bactericida, reduciendo el riesgo de contaminación e infección.

La MA humana, en su calidad de apósito biológico, se ha utilizado en muchos países en vías de desarrollo pues su abundante suplemento y el relativo bajo costo de su preparación permite su uso como terapéutica definitiva como cobertura temporal. Entre las ventajas de su aplicación se encuentran que favorece la reepitelización, reduce la pérdida de líquidos, proteínas, calor y energía y disminuye la morbilidad.

No obstante, recientes estudios han demostrado que a pesar de las altas pruebas de esterilización y del procesamiento de la membrana, se ha notificado la contaminación y crecimiento de microorganismos en la misma. En nuestro medio, no existen reportes significativos acerca del crecimiento de microorganismos, durante el procesamiento de la MA. Varios informes, han reportado caso de colonización e infección de la MA por citomegalovirus incluso una muerte informada de un receptor de un aloinjerto contaminado con *Clostridium spp* (**Versen-Hoeynck, F., Steinfeld, 2008**), se mostró claramente que el tejido los aloinjertos pueden transmitir bacterias o virus aunque el tejido se someta a pasos bactericidas y viricidas específicos.

Conocer los posibles microorganismos contaminantes encontrados durante el protocolo de procesamiento estándar de la MA contribuirá a proponer estrategias de prevención evitando complicaciones en el proceso o en el receptor haciendo que los trasplantes sean efectivos y no existan secuelas respecto al procedimiento. En este estudio se trata de demostrar el crecimiento bacteriano durante el procesamiento y criopreservación de la MA humana.

CAPÍTULO 5

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los microorganismos que potencialmente pudiesen contaminar la membrana amniótica, al momento de la obtención y al final del procesamiento de esta?

CAPÍTULO 6

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Los microorganismos encontrados en nuestro medio durante el proceso de obtención y criopreservación de la membrana amniótica es similar a lo reportado en la literatura mundial.

HIPÓTESIS NULA

Los microorganismos encontrados en nuestro medio durante el proceso de obtención y criopreservación de la membrana amniótica no es similar a lo reportado en la literatura mundial.

CAPÍTULO 7

VARIABLES DEL ESTUDIO

Operacionalización de las variables

Nombre de la variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de Variable
Variables Independientes			
Tipos de microorganismos presentes	Identificación de los microorganismos presentes en el cultivo.	Identificación en base a características y si se requiere pruebas adicionales para determinar el tipo de microorganismo presente en el cultivo.	Cualitativa polinómica, categórica y Nominal: 1= Numeradas según los nombres de los microorganismos encontrados en el cultivo.
Numero de microorganismos presentes	Número de unidades formadoras de colonias (UFC)	Se mide las UFC, para la cuantificación de microorganismos,	Cuantitativa, no categórica y continua.

	presentes en el cultivo.	bacterias o células fúngicas.	
--	--------------------------	-------------------------------	--

Socio demográficas			
Nombre de la variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de Variable
Edad	Años cumplidos al momento de la entrevista.	Se interroga al paciente la edad en años cumplidos al momento de la entrevista verificando fecha de nacimiento en cualquier documento oficial.	Cuantitativa, no categórica y discontinua.
Sexo	Diferencia fenotípica y de conducta que distingue a los sujetos.	Se observaron las características físicas del sujeto.	Cualitativa, dicotómica y nominal: 1= Femenino 2= Masculino

Variables Dependientes			
Nombre de la variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de Variable
Contaminación de la muestra	Presencia de crecimiento de microorganismos en medio de cultivo de la muestra de membrana amniótica tomada.	Análisis cuantitativo y cualitativo del cultivo determinando si existe o no señales de crecimiento de algún posible microorganismo.	Cualitativa dicotómica, categórica y nominal: 1= No contaminada 2= Contaminada.

CAPÍTULO 8

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

OBJETIVO GENERAL

Determinar los microorganismos aislados durante la obtención y el procesamiento de la membrana amniótica para su criopreservación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el crecimiento bacteriano entre la primera muestra y la segunda
- Determinar las especies aisladas durante el proceso.
- Determinar si alguno de los cambios presenta un impacto clínico.

CAPÍTULO 9

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Longitudinal, observacional y descriptivo.

Población de estudio: Pacientes de edad entre los 18 a 35 años con diagnóstico de embarazo normoevolutivo, que hayan acudido a todas las consultas de control prenatal y que hayan pasado las pruebas infectocontagiosas con resultados negativos (sin presencia de infección u organismo presente).

Unidad de estudio: Membrana amniótica, obtenida de las pacientes con las características descritas en el inciso anterior.

Unidad de análisis: Cultivo, tomado al inicio y al final del procesamiento de procuración de membrana amniótica.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión

Se procesarán las membranas amnióticas obtenidas de:

- Pacientes de 18 a 35 años.
- Con embarazo a término.
- Que hayan acudido a todas las consultas de control prenatal.

- Que hayan pasado las pruebas infectocontagiosas con resultados negativos para *Toxoplasma gondii*, *Tripanosoma cruzi*, brucella, rubeola, citomegalovirus, herpes virus simple tipo 1 y 2, hepatitis A, B y C, virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 y VDRL
- Nacimiento por cesárea.
- Sin ruptura de membranas.

Criterios de exclusión

Se excluirán las membranas de pacientes con:

- Embarazos de alto riesgo.
- Diabetes gestacional.
- Salida de Meconio.
- Infección activa.

Criterios de eliminación

- Membranas que no sean tratadas de acuerdo con el protocolo.
- Muestras mal procesadas.

CAPÍTULO 10

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

METODOLOGÍA

Consentimiento informado

- El responsable del equipo de procura o transporte de la membrana amniótica debe verificar la aprobación de la donación de placenta, mediante el correcto llenado y firmado del consentimiento informado siguiendo los criterios de calidad y formatos establecidos.

Del ambiente

- La placenta es obtenida después del parto por cesárea en la sala de operaciones del departamento de Ginecología y Obstetricia del hospital “Dr. José Eleuterio González”, por lo que los ambientes se encuentran controlados por responsables de dichas áreas.
- El responsable del equipo de procura debe garantizar la seguridad de los tejidos obtenidos, a través de los medios de contención como antibióticos que puedan certificar el transporte estéril del tejido.

Del donante (placenta)

- Criterios específicos de exclusión de donante de placenta.

- Infección bacteriana, viral, parasitaria o micótica local importante en el tracto genital, específicamente el síndrome de infección amniótica.

Del tejido (membrana amniótica)

- La membrana puede ser extraída o separada de la estructura placentaria en sala de operaciones o si el procedimiento interfiere el correcto desarrollo de la cirugía, puede ser efectuado en banco de tejidos.

Del personal

- Si la extracción de membrana amniótica se realiza en sala de operaciones de Ginecología y Obstetricia debe ser efectuado por personal profesional capacitado y la asistencia del personal técnico o profesional entrenado en instrumentación quirúrgica.
- Si la extracción se realiza en banco de tejidos, esta será ejecutada por el personal que realiza el procesamiento primario y secundario.

Equipos e instrumentos

- Equipos validados, funcionando y con el mantenimiento establecido por cronograma como se define en EG03/POEEQMANT/02 y bajo formato EG03-BT/FR-EQ05 “Mantenimiento preventivo y correctivo de Equipos”.

Del procedimiento de ablación

- Ablación de membrana amniótica estéril:

- El banco de tejidos ha normalizado procesos de conservación de membrana amniótica tomando en consideración descontaminación terminal mediante soluciones antibióticas y la conservación de su viabilidad y estructura, por lo que se deberá utilizar un procedimiento de extracción completamente estéril en un ambiente controlado de contención tipo A (Cabina de flujo laminar).
- Ablación de membrana amniótica no estéril:
 - Si la ablación se realiza en sala de operaciones materno infantil, se deberá considerar como extracción en un ambiente no controlado. Por lo que es indispensable establecer medidas de contención para garantizar la calidad del tejido.

Recolección de MA en sala de operaciones materno infantil (SOMI)

- Procedimiento preliminar.
 - El equipo de ablación debe verificar contar con los permisos correspondientes de los responsables de Sala de Operaciones (SOMI) e indicar que se realizará la procura de la placenta, para que luego efectuada la cesárea el tejido sea colocado en una bandeja de acero quirúrgico de 1000cc.

- El equipo procede a colocarse la indumentaria quirúrgica y realizar el lavado común de manos para ingreso a área controlada sala de operaciones
- El profesional responsable de la ablación debe verificar, en la historia clínica, la presencia de consentimiento informado **(CP19-00006)**, y resultados de análisis serológicos y microbiológicos de la sangre del donante /test serológicos”
- Previo al ingreso a Sala de Operaciones, el equipo, debe constatar la salida del neonato sin ninguna complicación médica.



Figura 3. Recolección de MA en la sala de operaciones del departamento de Obstetricia

- Preparación de la mesa de mayo para extracción de MA.
 - Luego de realizado el “procedimiento preliminar, se procede al lavado de manos según Instrucción técnica y se ingresa a sala de operaciones.

- Con la ayuda del instrumentista se coloca el mandil quirúrgico estéril, guantes, estériles y se prepara la mesa de mayo, en el siguiente orden:
 - Se coloca campo estéril.
 - El frasco estéril de 500ml boca ancha.
 - Dos paquetes de gasas grandes.
 - Hoja de bisturí #23.
- Preparación del medio de transporte del tejido.
 - Adicionar al frasco boca ancha de 500ml la cantidad de 250 ml de solución fisiológica fría estéril.
- Procedimiento de extracción de membrana amniótica.
 - Antes de realizar la extracción se procede a un lavado extensivo de los guantes quirúrgicos con **alcohol al 70% y gasa**, con la finalidad de remover el exceso de talco presente en ellos, y se solicita mediante asistencia colocar la bandeja conteniendo la placenta en la mesa preparada.
 - Luego se procede a la extracción de MA, separando manualmente el tejido del corno por la cara fetal, evitando cualquier fragmentación. Tras separar el tejido hasta la base del cordón umbilical se utiliza bisturí para realizar el corte y la liberación del tejido.

- La MA obtenida es colocada en el medio de transporte preparado preventivamente.
- Finalización del procedimiento de ablación de MA.
 - Luego de terminado el proceso de extracción de MA, se debe rociar extensivamente con alcohol al 70% el frasco conteniendo el tejido y colocarlo en el contenedor de cadena fría.
 - Los desechos biológicos y no biológicos generados durante la ablación deben ser descartados siguiendo los procedimientos establecidos por la sala de operaciones, con la finalidad no interferirían su flujo de trabajo.
 - Los materiales utilizados (bandeja de acero quirúrgico, campos estériles y mango de bisturí), deben ser colocados en doble bolsa roja devueltas al banco en la maleta de ablación.
- Transporte al banco de tejidos.
 - El frasco conteniendo la membrana amniótica debe ser condicionado un contenedor térmico en cadena de frío para su transporte banco de tejidos por el equipo de ablación. Dicho contenedor debe estar debidamente rotulado tomando los criterios de calidad descritos, en nuestra unidad.
- Tiempos admitidos.

- El tejido ablacionado debe ser remitido al banco de tejidos lo antes posible no excediéndose de las **36 horas**, pues este constituye el tiempo máximo de espera para que se inicie el procesamiento primario del tejido.
- Recolección de placenta en Ginecología y Obstetricia y extracción de MA en banco de tejidos.
 - Se procesará la membrana de acuerdo con el protocolo de criopreservación estándar, según se explica a continuación:

PRIMER PROCESAMIENTO

1. Se realiza en sala blanca bajo cabina de flujo laminar.
2. Buscar insumos y materiales que se utilizaran en el procesamiento

MATERIALES	INSUMOS
<ul style="list-style-type: none"> • 1 kit de membrana (lavacara, semiluna, pinza de disección, tijera de mayo y Halsted) 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 pares de guantes estériles
<ul style="list-style-type: none"> • 1 campo de tela estéril mediano 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 paquete de gasas quirúrgicas
<ul style="list-style-type: none"> • 1 bata estéril 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 jeringa de 5cc
<ul style="list-style-type: none"> • 1 envase plástico 4L 	<ul style="list-style-type: none"> • Solución ATB/ATM

<ul style="list-style-type: none"> • 1 envase plástico 1L 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 Soluciones salinas esterilizadas
<ul style="list-style-type: none"> • 1 envase plástico de 150ml 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 fundas (1roja y 1negra)
<ul style="list-style-type: none"> • 1 plancha de acero inoxidable 	

3. El circulante saca la funda de la nevera transportadora que contiene la placenta, abre la 1era funda contenedora de la placenta, limpia su exterior con alcohol 70% y la abre.
4. El operador procede a tomar la 2^{da} y 3^{era} funda y la coloca dentro de cabina de flujo laminar.
5. Operador abre la segunda y tercera funda extrae la placenta y se descartan fundas en balde con funda roja.
6. Se coloca placenta en lava cara y se procede a separar manualmente el amnios del corion, despegando desde la periferia hacia el centro.
7. Descartar el corion en funda roja.
8. Colocar membrana amniótica extendida sobre plancha de acero inoxidable y retirar restos de corion y sangre con ayuda de gasas.
9. Una vez limpio el amnios se coloca en envase plástico de 1 litro para su lavado.
10. Realizar 5 lavados con solución salina o los necesarios hasta eliminar remanentes de sangre.

11. Operador prepara 150 cc de solución de incubación: en envase plástico de 150ml:

✓ 99 cc de solución salina estéril

✓ 1 cc de solución ATB/ATM

12. Se coloca el amnios en el envase de 150 ml de tapa naranja que contiene la solución de incubación.

13. Se coloca el frasco en un segundo envase plástico estéril de 1 litro, se cierra el envase y se almacena por 24 horas en nevera a 4°C.

SEGUNDO PROCESAMIENTO

1. Se realiza en sala blanca bajo cabina de flujo laminar.

2. Buscar insumos y materiales que se utilizaran en el procesamiento:

MATERIALES	INSUMOS
<ul style="list-style-type: none">• Set de empaque de tejido laminar grande	<ul style="list-style-type: none">• 2 pares de guantes estériles
<ul style="list-style-type: none">• 1 campo de tela estéril mediano	<ul style="list-style-type: none">• 1 paquete de gasas quirúrgicas
<ul style="list-style-type: none">• 1 bata estéril	<ul style="list-style-type: none">• 1 jeringa de 10cc
<ul style="list-style-type: none">• 1 envase plástico 4L	<ul style="list-style-type: none">• 2 soluciones salinas esterilizadas
<ul style="list-style-type: none">• 1 envase plástico de 150ml	<ul style="list-style-type: none">• 1 tubo seco tapa roja estéril

<ul style="list-style-type: none"> • 1 frasco de 500ml 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 fundas (1roja y 1 negra)
<ul style="list-style-type: none"> • 1 selladora 	

3. Circulante retira de la nevera el envase contenedor y lo limpia con alcohol 70%.
4. Se ingresa el contenedor al interior de la cabina de flujo laminar y se abre para que el operador extraiga el envase con amnios.
5. El operador coloca el amnios en plancha de acero inoxidable y la extiende.
6. Se verifica si se encuentran remanentes adheridos al amnios y se retiran con gasas.
7. Realizar 3 lavados con solución salina.
8. Operador prepara 100cc de solución de crio preservación: en frasco de 150ml:
 - ✓ 10cc de albumina
 - ✓ 10cc de glicerol
 - ✓ 80cc solución salina.
9. Operador con jeringa de 10ml extrae 10cc del líquido del último lavado y coloca en tubo seco tapa roja estéril
10. Circulante rótula el tubo con el código temporal del tejido y realiza la correspondiente orden para enviar la a muestra a microbiología.

11. Operador coloca el amnios en la primera funda del set de crio preservación y llena la misma con los 100 cc de líquido de crio preservación.
 12. Operado sella las fundas con ayuda de termo selladora estéril, colocando etiqueta provisional en la última funda.
 13. Producto final se almacena en cuarentena en nevera de 4°C por 4 horas y luego en freezer de -20°C, hasta su liberación.
 14. Luego de recibir resultados negativos de pruebas serológicas y microbiológicas, el tejido es crio preservado en freezer de -80°C, previa colocación de etiqueta definitiva.
- Finalmente, se tomará una muestra para cultivo previo a la congelación de la membrana amniótica.
 - Valoraremos los resultados de ambos cultivos (previo al procesamiento y posterior al procesamiento).
 - Se describirán los resultados y se compararán en una tabla de Excel.
 - Los resultados se mostrarán con medidas de tendencia central y dispersión según convenga. Así como frecuencias y rangos.

MUESTREO

Muestreo probabilístico: Aleatorio simple.

Muestra

El cálculo del tamaño muestral fue de 29 muestras, se realizó en base una a diferencia clínica mínima de 2,08, un DE de 1.98, poder 80% y nivel de confianza del 95% reportados en un estudio previo de las mismas características.

PLAN DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Técnica: Información disponible por medio de interrogatorio y expediente.

Fuente: Cuestionario elaborado por asesores e investigador.

Instrumento: Cultivos evaluados en el departamento de Banco de Hueso y Tejidos del Hospital Universitario "Dr. José E. González".

PLAN DE PROCESAMIENTO DE DATOS:

Los datos recogidos en los formularios de los pacientes serán introducidos en el programa de análisis IBM SPSS 20 para Windows, para su manejo estadístico. Se aceptó significación estadística cuando $p < 0,05$ con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

PLAN DE ANALISIS

Univariado. Se determinará medidas de tendencia central y dispersión por las variables cuantitativas. Así como análisis de frecuencias para variables nominales.

CONTROL DE CALIDAD

Para evaluar la calidad en una investigación científica, existen ciertos criterios de credibilidad, transferibilidad, dependencia o consistencia y conformabilidad, esto es una propuesta de Lincoln y Guba (1985), la cual es la más utilizada en este ámbito.

La calidad de la información será controlada de manera constante por el investigador, quien aplicará la encuesta en forma directa.

El almacenamiento de información se realizará en una base de datos y hoja de registro, con el fin de llevar un estricto control de la información.

CONSIDERACIONES ETICAS.

Existen seis factores principales que proveen un buen marco para el desarrollo ético de las investigaciones.

Valor: la investigación debe buscar mejorar la salud o el conocimiento.

Validez científica: la investigación debe ser metodológicamente sensata, se procuró darles tratamiento inicial a los pacientes que necesitaban desbridación y si no eran candidatos para protocolo se les brindara tratamiento adecuado a su lesión.

Comité de ética: El estudio fue evaluado y aprobado por el comité de ética respectivo a I Hospital Universitario José Eleuterio González.

La selección de seres humanos o sujetos debe ser justa: los pacientes fueron asignados de manera aleatoria, con la misma oportunidad cada uno de entrar a cualquiera de los dos grupos formados.

Proporción favorable de riesgo/ beneficio: los riesgos a los participantes de la investigación fueron mínimos y los beneficios potenciales, fueron aumentados, al tomar

en cuenta, la mejoría de todos los pacientes, además del apego que se le brindó durante todo el periodo.

Consentimiento informado: los individuos fueron informados acerca de la investigación antes de convertirse en participantes de esta, se les entregó un formato de consentimiento informado donde por escrito se mencionaban los aspectos generales y de importancia del estudio el cual leyeron y firmaron.

Respeto para los seres humanos participantes: Para los datos obtenidos se consideraron expedientes clínicos (cumpliendo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico) y se guardó la más estricta confidencialidad y anonimato de los pacientes que participaron en la investigación.

PRUEBA PILOTO.

Ninguna reportada.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	AGO	SEPT	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL
Elaboración del protocolo	X	X										
Registro del protocolo		X										
Prueba piloto			X									
Recolección de la información				X	X	X	X					
Captura de datos					X	X	X					
Análisis de datos							X	X				
Interpretación de resultados								X	X	X		
Elaboración del escrito médico											X	X

2019
2021

CAPÍTULO 11

RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente el uso de la MA en medicina no es una práctica nueva. Esta membrana, obtenida de la placenta humana, es una de las cubiertas biológicas más efectivas utilizadas en el manejo de gran cantidad de patologías, permite una fácil aplicación en el área afectada y crea un efecto bactericida, reduciendo el riesgo de contaminación e infección. Sin embargo, se han descrito diversas técnicas para su adecuado procesamiento, tratando de asegurar la correcta esterilización para posteriormente ser usada en diversos campos de la medicina, nuestro trabajo tuvo como objetivo tratar de determinar si el procesamiento que llevamos a cabo era el adecuado para obtener una máxima esterilización de la membrana.

En nuestro estudio comprendido de Abril 2021- Junio 2021 se lograron recabar 29 placentas, de las cuales se obtuvo el consentimiento informado de la donante de la placenta, la correcta procuración (con toma de muestra para cultivo al momento del alumbramiento) y traslado de la membrana amniotica, posteriormente en el departamento de Banco de tejidos se llevo acabo el procesamiento, descrito anteriormente y finalmente se tomo una segunda muestra para determinar si el procesamiento fue el adecuado.

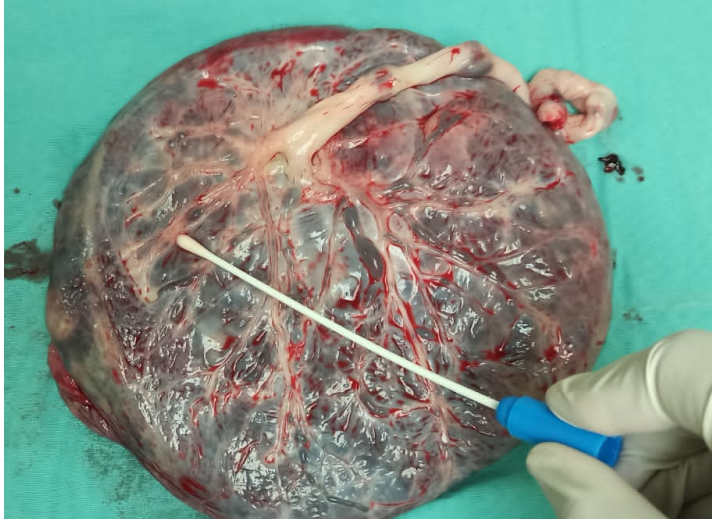


Figura 4. Toma de la primera muestra al momento de la obtención en la sala de operaciones.

Las características demográficas obtenidas a partir del estudio, se observó una edad media de las mujeres donantes de 26 años (rango 19-38 años), la mayoría presento un embarazo de termino en promedio a la semana 38.38 de gestación (rango 36.3-40.6 SDG). La desproporción cefalopélvica fue la indicaciónn de la cesárea en la mayoría de los casos.



Figura 5. Toma de la segunda muestra al finalizar el procesamiento de la MA.

Respecto a los resultados obtenidos a partir de la toma de cultivos antes y después del procesamiento obtuvimos que en la primera toma, dos de las 29 placentas salieron positivas con crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, sin embargo después del procesamiento y toma de la segunda muestra todos los cultivos se obtuvieron negativos para microorganismos. Lo que demuestra un adecuado procesamiento y una esterilidad total la cual se mantuvo en la preparación para membranas al 100%.

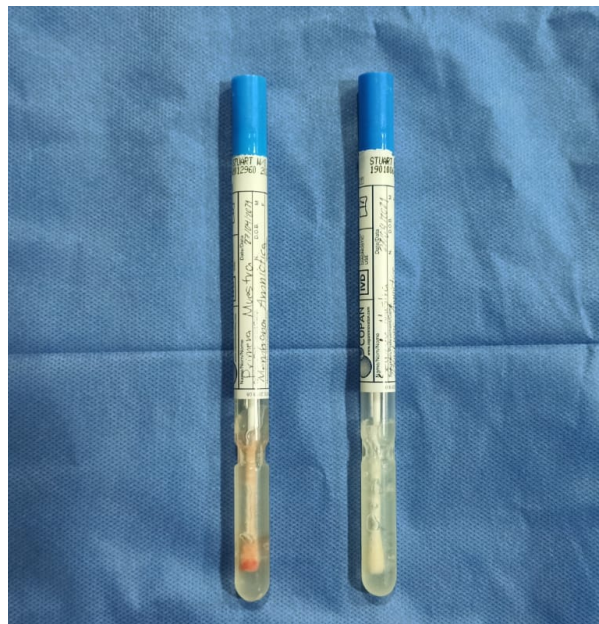


Figura 6. Cultivos con el correcto etiquetado de los donantes. Cultivo al momento de la obtención (izquierda). Cultivo al final del procesamiento (derecha).

EDAD GESTACIONAL DE DONANTES DE
MEMBRANA AMNIÓNICA

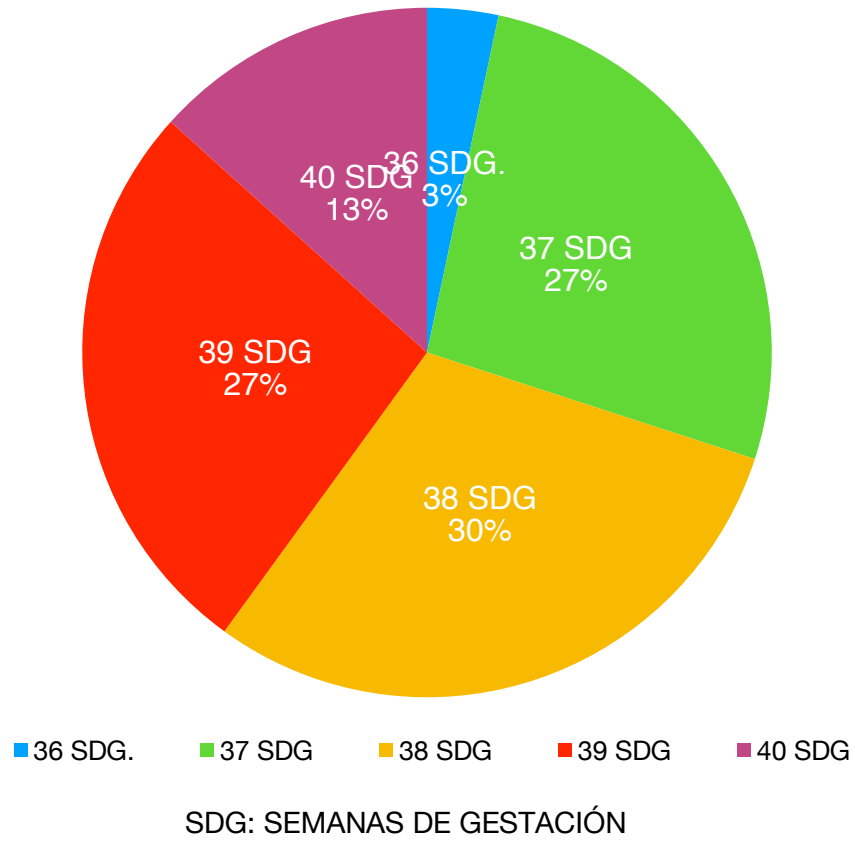


Figura 7. Edad gestación de donantes de membrana amniótica.

CAPÍTULO 12

DISCUSION

En nuestro estudio y siguiendo el protocolo descrito previamente, se determino que el procesamiento es seguro y se espera que las membranas amnióticas recolectadas siguiendo este protocolo tengan una vida útil prolongada. Es importante recalcar que, la preparación de la MA en un laboratorio requiere experiencia en la preparación de medios y soluciones además de buenas prácticas de laboratorio para la esterilización y preservación de materiales biológicos.

El uso de la membrana amniótica humana tiene una historia que abarca más de 100 años. El primer uso clínico informado fue en 1910, cuando se aplicó en el trasplante de piel (**Trelford y Trelford-Sauder 1979**). Poco tiempo después, se extendió su aplicación para tratar piel quemada, ulcerada y defectos conjuntivales. Desde su redescubrimiento en 1995, se ha aplicado ampliamente en oftalmología, cirugía de tejidos blandos y cicatrización de heridas (**Mamede et al. 2012**).

Históricamente, se han utilizado varios métodos para limpiar las membranas amnióticas y mantener sus propiedades naturales para uso clínico. Haberal et al utilizaron nitrato de plata al 0,5% durante más de 2 horas; Robson y Krizek utilizaron un enjuague de solución de hipoclorito de sodio al 0.025% para asegurar la esterilidad. Maral et al⁵ utilizaron amnios conservados en glicerol.

En la mayor parte del mundo occidental, los estrictos normas y legislaciones exigen pruebas de diferentes marcadores virales del donante incluso de VIH negativo. Por lo tanto, la MA fresca rara vez se usa (**Rahman et al. 2009**). Sin embargo, esta descrito el uso de MA fresca sin conservadores, especialmente en los países, donde los materiales necesarios para la criopreservacion son costosos (**Mejía et al. al.2002**). Adds y colaboradores en el 2001 demostraron que no hubo diferencias en los resultados clínicos cuando se utilizó MA fresca (almacenada a menos 4 C durante 14 días) versus crioconservada (en glicerol al 50% a -80 C durante 6 meses) (**Adds et al. 2001**), aunque los diferentes métodos de procesamiento, almacenamiento y esterilización afectan las propiedades de la MA (**Cirman T, et al 2014**).

Si nos centramos en nuestro país, a pesar de que el uso de membrana amniótica tiene más de un siglo, no fue hasta 2014, que la Legislación Sanitaria Mexicana consideró por primera vez la existencia de Bancos de Membranas Amnióticas en México para ser utilizados con fines de trasplante. En 2003 se describió el primer Banco de Amnios en México en el que se incluye la radioesterilización sobre la técnica de preservación, sin embargo, no se ha publicado más información sobre su actividad (**Esther Martinez-Pardo y Lourdes Reyes-Frias2003**).

De acuerdo con los estándares de los bancos de tejidos (Asociación Americana de Bancos de Tejidos, 2002), el estricto control bacteriano sobre la utilización de membrana

amniotica antes y durante el procesamiento puede ser eficaz en la esterilidad del injerto de MA en el momento de la utilización.

Estudios clínicos previos sobre la infección después del trasplante de MA demostraron que los organismos grampositivos (especialmente las especies de *Staphylococcus*) son los agentes más frecuentes (**Khokhar et al. 2001**).

En nuestro estudio, verificamos la contaminación microbiana antes y después del procesamiento de tejidos. La tasa de contaminación en nuestro estudio (7% muestra obtenida al momento del alumbramiento) fue menor que las tasas informadas anteriormente en otros estudios, (**Aghayan HR et al. 2013**) en la cual mencionan fue del 61% en Iran (**Adds et al. 2001**).

La adecuada selección de las donantes, incluso desde la consulta prenatal, además de la capacitación del equipo de obtención y la adecuada transportación y procesamiento tienen un papel importante en la disminución de la tasa de contaminación de los productos de tejidos. Respecto a los criterios de inclusión para las donantes fueron seleccionados de cesáreas electivas y embarazos a término.

Al igual que en estudios previos, identificamos las especies de estafilococos como los agentes aislados con mayor frecuencia.

En las 2 muestras obtenidas (100%) que presentaron contaminación de bacterias en el preprocesamiento fueron especies de *Staphylococcus*, que son la flora normal de la piel. Como la contaminación intraoperatoria es común, puede aumentar el riesgo de contaminación a través de la flora normal del donante o del personal. (**Davis et al. 1999**).

Las bacterias predominantes de las muestras de preprocesamiento fueron *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* las cuales se consideran

actualmente dos de los patógenos más importantes en las infecciones nosocomiales asociadas con catéteres y otros implantes médicos y también son los principales contaminantes de los instrumentos médicos. Sin embargo, debido a que estas especies de *Staphylococcus* forman parte de la flora bacteriana normal de la piel humana y las superficies mucosas **(Beenken KE et al 2012)**.

Comparando nuestro procesamiento con dos estudios similares **(Addis et al. (2001) y Aghayan HR et al. 2013)** podemos definir que nuestro procesamiento es altamente eficaz, ya que las dos muestras en las cuales se aislaron bacterias durante el preprocesamiento, posterior a este, no se obtuvo ningún cultivo positivo para crecimiento bacteriano.

Esta disminución significativa en la tasa de contaminación puede estar relacionada con el método de selección eficaz, además del procesamiento adecuado con múltiples lavados e inmersión de la MA con antibióticos.

Por otro lado, seleccionamos el tipo y la concentración de antibióticos en función de la prevalencia bacteriana y su resistencia a los antibióticos.

CAPÍTULO 13

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Con base en estos hallazgos, estamos seguros de que la manera en la cual llevamos a cabo el procesamiento es eficaz para la utilización de la membrana en múltiples campos de la medicina. Sin embargo, advertimos a los lectores sobre las considerables limitaciones de este estudio. Primero, el análisis actual se basó en datos de un número relativamente pequeño de placentas. Por lo tanto, la regularidad de los resultados podría no ser suficiente para derivar claramente las conclusiones del análisis actual. En segundo lugar, aun no llevamos el estudio a la siguiente etapa en la cual ya se coloque el amnios en algún sitio del cuerpo en particular. Y finalmente, los períodos de seguimiento a los cuales se expondrá la membrana en conservación no se llevaron a largo plazo. Este trabajo solo es el preámbulo para abrir las puertas para la siguiente fase de estudios clínicos con el uso de la membrana amniotica.

CAPÍTULO 14

CONCLUSIONES

La membrana amniótica proporciona al cirujano un material increíblemente versátil. Es económico, está ampliamente disponible, es fácil de cosechar y almacenar y no tiene restricciones éticas. Sin embargo, una de las principales desventajas de usar MA es que el proceso aún no está estandarizado. El gran número de procesos descritos para la recolección, el procesamiento, la selección de pacientes, las indicaciones y las técnicas quirúrgicas hacen que los ensayos prospectivos aleatorizados sean casi imposibles y con ello la comparación de estos diferentes protocolos.

Además debemos tomar en cuenta las variables propias de la placenta como lo son la composición bioquímica y el aspecto histológico de la membrana amniótica la cual cambian durante el embarazo. También puede haber variaciones raciales dentro de la edad del donante y la edad gestacional influye en los niveles de diferentes factores de crecimiento en la MA (**López-Valladares et al. 2010**).

Como conclusión se puede determinar cómo adecuado el procesamiento al cual se somete la MA en nuestro hospital para garantizar una esterilización óptima para la utilización posterior en distintos campos de la medicina.

CAPÍTULO 15

BIBLIOGRAFÍA

1. De Rotth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. Arch Ophthalmol 1940; 23:522-5.
2. Sorsby A & Symons HM. 1946. Amniotic membrane graft in caustic burns of the eye. Br J Ophthalmol 30: 237-45.
3. Chen HJ. 2000. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. Br J Ophthalmol 84:826-33.
4. Tseng S & Tsubota K. 1997. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. Am J Ophthalmol 124:825-35.
5. Quinby WC Jr. 1982. Clinical Trials of amniotic membranas in burn wound care; Plast Reconstr Surgery.
6. Colocho G. 1974. Human Amniotic Membrana as a Physiologic Wound Dressing. Arch. Surgery 109: 370- 373.

7. Alfaro M. 2003. Quemaduras. Unidad Nacional de Quemados, Hospital San Juan de Dios. San José, Costa Rica.

8. Rue, L.W. IIIrd; Cioffi, W.G.; McManus, W.F. y Pruitt, B.A. Jr. 1993. Wound closure and outcome in extensively burned patients treated with cultured autologous keratinocytes. J Trauma 34:662-667.

9. Haberal M. 1987. The use of silver nitrate-incorporated amniotic membrane as a temporary dressing; Burns Int. Therm Inj, Apr.

10. Esther Martinez-Pardo M, Lourdes Reyes-Frias M (2003) The tissue bank at the national nuclear research institute in Mexico. Cell Tissue Bank 4:163–168.

11. Rahman I, Said DG, Maharajan VS, Dua HS (2009) Amniotic membrane in ophthalmology: indications and limitations. Eye 23(10):1954–1961

12. Mejía LF, Acosta C, Santamaría JP (2000) Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. Cornea 19(3):288–291

13. Addis PJ, Hunt CJ, Dart JKG (2001b) Amniotic membrane grafts, 'fresh' or frozen?
A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol* 85(8):905–907
14. Cirman T, Beltram M, Schollmayer P, Rožman P, Kreft ME. Amniotic membrane properties and current practice of amniotic membrane use in ophthalmology in Slovenia. *Cell Tissue Bank*. 2014 Jun;15(2):177-92. doi: 10.1007/s10561-013-9417-6.
15. Fairbairn NG, Randolph MA, Redmond RW. The clinical applications of human amnion in plastic surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2014 May;67(5):662-75. doi: 10.1016/j.bjps.2014.01.031.
16. Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, Botelho MF (2012) Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res* 349(2):447–458
17. Trelford JD, Trelford-Sauder M (1979) The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 134(7):833–845

18. Laurent R, Nallet A, Obert L, Nicod L, Gindraux F. Storage and qualification of viable intact human amniotic graft and technology transfer to a tissue bank. *Cell Tissue Bank*. 2014 Jun;15(2):267-75.
19. Chávez-García C, Jiménez-Corona A, Graue-Hernández EO, Zaga-Clavellina V, García-Mejía M, Jiménez-Martínez MC, Garfias Y. Ophthalmic indications of amniotic membrane transplantation in Mexico: an eight years Amniotic Membrane Bank experience. *Cell Tissue Bank*. 2016 Jun;17(2):261-8.
20. Khokhar S, Sharma N, Kumar H et al (2001) Infection after use of non-preserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea* 20:773–774
21. Aghayan HR, Goodarzi P, Baradaran-Rafii A, Larijani B, Moradabadi L, Rahim F, Arjmand B. Bacterial contamination of amniotic membrane in a tissue bank from Iran. *Cell Tissue Bank*. 2013 Sep;14(3):401-6.
22. Riau AK, Beurman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialisation of human amniotic membrane for use ocular surface reconstruction. *Biomaterials* 2010;31:216-25.

23. Davis N, Curry A, Gambhir AK et al (1999) Intraoperative bacterial contamination in operations for joint replacement. *J Bone Joint Surg Br* 8:886–889
24. Beenken KE, Spencer H, Griffin LM, Smeltzer MS. Impact of extracellular nuclease production on the biofilm phenotype of *Staphylococcus aureus* under in vitro and in vivo conditions. *Infect Immun*. 2012;80(5):1634–8.
25. López-Valladares MJ, Rodríguez-Ares MT, Touriño R, Gude F, Teresa Silva M, Couceiro J (2010) Donor age and gestational age influence on growth factor levels in human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol* 88(6):211–216