

Membrana amniótica humana. Esterilizada en autoclave y conservada en solución salina acidulada para uso terapéutico.

Human amniotic membrane. Autoclaved and preserved in acidified saline for therapeutic use.

Emilio Barcelona Colas¹,
Gabriel Manuel Coto Valdés²

¹Centro de Histoterapia Placentaria "Dr. Carlos Manuel Miyares Cao, La Habana, Cuba

²Escuela Latinoamericana de Medicina, La Habana, Cuba.

RESUMEN

Objetivo: demostrar que la membrana amniótica humana esterilizada en autoclave se conserva durante tres meses, a la temperatura ambiente, para su empleo veterinario.

Materiales y Métodos: la membrana amniótica humana, se obtuvo de acuerdo a la norma "Recogida de Placentas Humanas, emitida por el Centro de Control de Medicamentos y Dispositivos Médicos, se separó de la placenta y de la membrana coriónica, se sometió a lavados sucesivos, para luego conservarla en solución salina acidulada con ácido acético, a una concentración de 0,1 mL, en un litro de suero fisiológico, para estudiar la estabilidad microbiológica, a 60 porciones de 20 cm², se distribuyeron en cuatro grupos, con diferentes tiempos de esterilización: 0, 5, 15 y 30 minutos, luego estas membranas se almacenaron a temperatura ambiente durante 1, 2 y 3 meses, el análisis estadístico se realizó mediante la prueba Q de Cochran.

Resultados: la esterilización de las membranas, durante 15 minutos fue suficiente para conservarlas sin crecimiento microbiano, durante tres meses.

Conclusiones: el procedimiento propuesto permite la estabilidad microbiológica, de las membranas amnióticas conservadas durante tres meses a temperatura ambiente.

Palabras clave: amnioterapia, medicina regenerativa.

ABSTRACT

Objective: to demonstrate that autoclaved human amniotic membrane is preserved for three months at room temperature for veterinary use.

Materials and Methods: human amniotic membrane was obtained in accordance with the "Collection of Human Placentas" standard issued by the Center for Drug and Medical Device Control. It was separated from the placenta and chorionic membrane, subjected to successive washes, and then preserved in saline solution acidulated with acetic acid, at a concentration of 0.1 mL, in one liter of physiological saline. To study microbiological stability, 60 portions of 20 cm² were distributed into four groups, with different sterilization times: 0, 5, 15, and 30 minutes. These membranes were then stored at room temperature for 1, 2, and 3 months. Statistical analysis was performed using Cochran's Q test.

Results: sterilization of the membranes for 15 minutes was sufficient to preserve them without microbial growth for three months.

Conclusions: the proposed procedure allows for the microbiological stability of the membranes. Amniotic fluids stored for three months at room temperature.

Keywords: amniotherapy, regenerative medicine.

INTRODUCCIÓN

La membrana amniótica humana (MAH), cubre la cara fetal de la placenta, está en contacto directo con el líquido amniótico y se adhiere al corion mediante un espacio virtual; tiene una superficie de alrededor de 700 a 1 800 cm², un peso de 15 a 35 g y un espesor que varía entre 70 a 180 μm.⁽¹⁾

La MAH es traslúcida, está compuesta por un epitelio amniótico simple y continuo de células cilíndricas, cuboides o planas, en contacto con el líquido amniótico. Reposa sobre una membrana basal bien definida, integrada por una malla de fibras de colágenos del tipo III, tipo IV y glicoproteínas.⁽¹⁾

Está documentado que el empleo de la MAH, para los estudios preclínicos o en los animales afectivos ocupa, un papel importante en la medicina humana y veterinaria.^(2,3,4,5) Además, la MAH se considera uno de los tratamientos de elección utilizados, para la cicatrización en el trasplante de piel, por poseer características que favorecen la reepitelización, controla la inflamación y disminuye el dolor producido por la queratitis neurotrófica,⁽⁶⁾ la MHA se emplea también en la regeneración ósea de los conejos,⁽⁷⁾ así como en su implante, y corrección de las úlceras corneales profundas de los caninos y felinos.⁽⁸⁾

Otra ventaja de la MAH es su capacidad bacteriostática, que ayuda a reducir el riesgo de las infecciones y contaminaciones de las heridas, pues aísla a la lesión de los factores externos y gracias a su contenido de factores de crecimiento, inmunomoduladores y diferentes tipos de colágenos, contribuyen a la no proliferación de microorganismos.⁽²⁾

En correspondencia con la literatura consultada, el uso de la MAH se ha procesado mediante diferentes formas de esterilización. El objetivo del trabajo, es demostrar que la membrana amniótica humana esterilizada en autoclave, se conserva durante tres meses, a la temperatura de 20 a 26 °C, para su empleo como apósito biológico para uso veterinario.

MATERIALES Y MÉTODOS

La MAH, se obtuvo de acuerdo a la Norma Nacional “Recogida de Placentas Humanas, emitida por el Centro de Control de Medicamentos y Dispositivos Médicos,^(9, 10) procedente de los hospitales

maternos. Se separó de la placenta y de la membrana coriónica, por la técnica de disección roma,⁽¹¹⁾ además, se sometió a lavados sucesivos,⁽¹⁾ para luego conservarla en solución salina acidulada con ácido acético de Calidad Reactivo, a una concentración de 0,1 mL, en un litro de suero fisiológico. La incorporación del ácido acético al medio, le proporcionó un pH entre 4,0 a 4,2. La MAH se enjuaga en el flujo laminar durante una hora, en suero fisiológico y agua destilada estéril. En ambas soluciones, los enjuagues se alternan cada 10 minutos. El criterio de selección de las MAH, para su empleo como se evidencia en la figura 1, es que sean transparentes, con una tonalidad rosada ligera, un grosor fino sedoso, con una superficie lisa sin restos de corion y una superficie no menor de 20 cm².

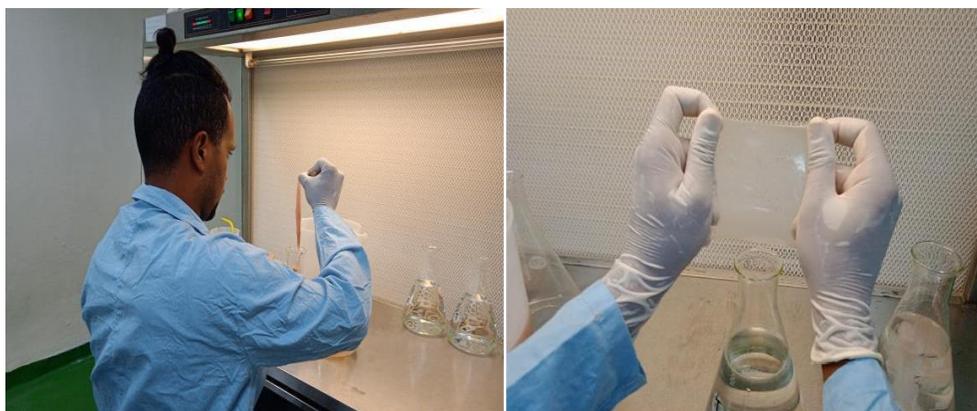


Figura 1. Secuencias de selección de las membranas amnióticas humanas, en el proceso de enjuague. Se observa una membrana, con restos no deseados (en la secuencia de la izquierda) y luego de la primera selección, una membrana traslúcida (vista de la derecha).

A continuación, las MHA se distribuyeron en frascos estériles, que contenían 20 mL de suero fisiológico acidulado, en cuatro grupos con 15 muestras, por tratamientos diferentes: 0, 5, 15 y 30 minutos. El tratamiento 0 representa que no fue sometido al autoclave, se considera el testigo en el experimento.

Al concluir los tiempos de esterilización en el autoclave, se identificaron mediante el nombre del producto, el lote, la fecha de fabricación, el tiempo de esterilización y el momento del ensayo, para realizarles el análisis microbiológico planificado una vez al mes, durante tres meses que duró el experimento.

En su análisis estadístico, se calcularon las frecuencias absolutas, mediante la prueba Q de Cochran,⁽¹²⁾ para la obtención de medidas repetidas y de esta forma, analizar las diferencias en los tres tiempos de esterilización en autoclave y el tiempo de almacenamiento, considerando efectivo o no el tratamiento.

Las muestras se conservaron a la temperatura entre 20 y 26°C, durante todo el período analizado, en frascos cerrados y en condiciones de asepsia. Todos los meses se tomaron cuatro frascos de cada una de las muestras para realizarles un método de control microbiológico. Después de su esterilización, se determinó el recuento total de microorganismos aerobios, el recuento total combinado de hongos y levaduras, así como se identificó también la presencia de bacterias gramnegativas tolerantes a la bilis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.^(13, 14, 15)

Los criterios de aceptación para garantizar la calidad microbiológica de los frascos que contenían las MAH esterilizadas, se realizó en correspondencia con las normas utilizadas en Cuba,⁽¹⁴⁾ que establece el máximo de cero (0) respecto a las unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL).

RESULTADOS

La tabla 1 muestra el total de las colonias, de microorganismos, en los diferentes tiempos de esterilización aplicados en el autoclave.

Tabla 1. Recuento total de las colonias, de microorganismos aerobios, en los diferentes tiempos de esterilización aplicados en el autoclave.

Muestra/mes	1	2	3
Control	C UFC/ml	C UFC/ml	C UFC/ml
5 minutos	C UFC/ml	C UFC/ml	C UFC/ml
15 minutos	NC UFC/ml	NC UFC/ml	NC UFC/ml
30 minutos	NC UFC/ml	NC UFC/ml	NC UFC/ml

Leyenda. C: crecimiento no cumple; NC: no se observó crecimientos en ninguna placa; UFC: unidades formadoras de colonias.

En la muestra control, se demostró que, solo la solución salina acidulada no mantuvo la esterilidad, pues se identificaron incontables UFC/mL, en todos los meses. También en los frascos de 5 minutos hubo crecimiento, lo que según la prueba Q de Cochran,⁽¹²⁾ se descarta este tiempo como se observa en la figura 2, sin embargo, en los tratamientos de 15 y 30 minutos de esterilización en autoclave, no hubo crecimiento en ninguna de las muestras investigadas, durante tres meses.

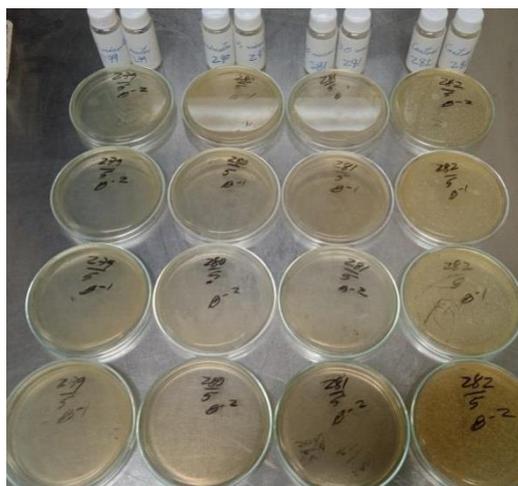


Figura 2. Muestras experimentales, de derecha a izquierda: las (columnas de la izquierda de las placas que se observan más claras), no presentan crecimiento bacteriano y en las dos últimas filas (a la derecha), corresponden a los controles y a la estádia en autoclave durante 5 minutos, donde sí hubo crecimiento.

Para el recuento total combinado de hongos y levaduras (rtchl), la muestra se sembró en Agar Sabouraud Dextrosa y se incubó durante cinco días a la temperatura entre 20-25° C. Los resultados del ensayo durante los tres meses, para todos los tratamientos, mostraron, que no hubo crecimiento, en la determinación del recuento total de microorganismos aerobios y de hongos, levaduras, así como, presencia de enterobacterias, bacilos Gram positivo (tabla 2),

Tampoco se observó crecimientos en: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, bacterias gramnegativas tolerantes a la bilis y *Candida albicans*, en los medios de conservación durante este periodo (tabla 2).

Tabla 2. Recuento total de UFC/ml para hongos y levaduras, en los diferentes tiempos en autoclave.

Muestra	Mes 1	Mes 2	Mes 3
Control	NC UFC/ml	NC UFC/ml	NC UFC/ml
5 minutos	NC UFC/ml	NC UFC/ml	NC UFC/ml
15 minutos	NC UFC/ml	NC UFC/ml	NC UFC/ml
30 minutos	NC UFC/ml	NC UFC/ml	NC UFC/ml

Leyenda: NC no se observó crecimientos en ninguna placa UFC: unidades formadoras de colonias.

DISCUSIÓN

Dentro de los diferentes métodos de conservación de la MAH, los más comunes implican la criopreservación y la liofilización, pero requieren de costosos equipos para su desarrollo.^(5,7) En estos momentos no están disponibles en el Centro estos equipos y medios de conservación, por lo que se utilizó la técnica y la metodología diseñada en este trabajo.

Para lograr los objetivos propuestos se utilizó el enjuague de las MAH en solución salina y agua destilada, en la primera etapa, lo que garantiza un producto más limpio.⁽¹⁾ Se sustituyó el uso de antibióticos según la literatura consultada,⁽¹³⁾ estos incrementan los costos del procedimiento, por lo que se utilizó solamente, la esterilización por autoclave ^(14,16) y la solución salina acidulada para lograr que no existiera crecimiento de colonias.

El pH de 4,0 a 4.2 de este medio de conservación garantiza, que no proliferen microorganismos como *Enterobacterias*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida Albicans*.^(15,16,17)

El empleo de la autoclave permitió inactivar los posibles gérmenes presentes en la MAH, como se corroboró al comparar los resultados con los tratamientos control y 5 minutos en la autoclave. Por otra parte, es el método más sencillo, económico y práctico, tanto los tiempos de 15 y 30 minutos no hubo microorganismos.

La ausencia de productos antimicóticos que reduzcan la presencia de serotipos de hongos y levaduras en el medio de conservación permite buscar una nueva alternativa. Al ser un producto de origen animal, proveniente de la placenta,⁽¹⁾ existe el riesgo de que esté contaminada con *Cándida albicans*. Estos patógenos sobreviven a pH 5 a 35°C de temperatura según investigaciones recientes.⁽¹⁷⁾

Por lo tanto, se trataron las muestras a pH 4,0 a 120°C de temperatura en autoclave. Al combinar la solución salina con ácido acético se logra una solución ácida, capaz de impedir el desarrollo de estos microorganismos. En el recuento total combinado de hongos y levaduras se observó que no crecieron microorganismos en ningún caso durante los tres meses, aspecto que se debe continuar estudiando, para demostrar este resultado, en estas condiciones en las MAH, con el procedimiento propuesto.⁽¹⁸⁾

CONCLUSIONES

La solución salina acidulada y esterilizada en autoclave resulta eficaz para la conservación de las MAH, porque evita el desarrollo de microorganismos durante tres meses. El tiempo de esterilización más eficaz para las MAH conservadas en solución salina acidulada estéril es de 15 minutos. Este trabajo sirve de referencia como una de las aplicaciones de la Histoterapia Placentaria en el área de la Medicina Veterinaria, y en la medicina regenerativa en general e incrementará la cartera de productos de este Centro de Histoterapia Placentaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hospital Garrahan. Membrana Amniótica Generalidades de la Membrana Amniótica. [Internet]. 2023 [citado 2023 Septiembre 16]; Disponible en: https://www.garrahan.gov.ar/PDFS/tejidos/Membrana_amiotica.pdf
2. Eslani M, Baradaran RA, Cheung AY, Kurji KH, Hasani H, Djailian AR. Amniotic Membrane Transplantation in Acute Severe Ocular Chemical Injury: A Randomized Clinical Trial. *Am J Ophthalmol* [Internet] 2019 Dic [citado 2023 Sep 19]; 199: 209–215. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30419194/>
3. Alsina MG, Pedregosa SF; Aplicación de membrana amniótica en el tratamiento de las úlceras crónicas de extremidades inferiores. *Elsevier Doyma*. (2012); 103(7): 608-613.
4. Duarte YM, Flórez PR, Garzón VM. Manejo de quemaduras oculares con implante de membrana amniótica: revisión sistemática de la literatura. Trabajo de grado para optar al título de Optómetra. Bogotá D.C. Universidad el Bosque. facultad de medicina programa de optometría. 2022.
5. Ferrarin DD, Czczeko NG, Kubrusly LF, Malafaia O, Sousa EL, Repka JCD, et al. Use of decellularized human amniotic membrane in intestinal anastomoses: a study in rats treated with 5-fluorouracil [Internet]. *SciELO Preprints*. 2022 [cited 2023 Jun. 13]. Available from: <https://preprints.scielo.org/index.php/scielo/preprint/view/4505>.
6. Dua HS, Said DG, Messmer EM, Rolando M, Benitez JM. Neurotrophic keratopathy. *Prog Retin Eye Res* [Internet] 2018 Dic [citado 2023 Sep 17]; 66: 107–131. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29698813/>
7. Yábar CJ. Efecto de la membrana amniótica liofilizada como barrera en el proceso de regeneración ósea en tibia de conejo. 2010. Grado de Cirujano Dentista. Universidad nacional mayor de san marcos. Disponible en https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/3166/Yabar_cj.pdf?sequence=1&isAllowed=y
8. Graciano LF, Acevedo SP, Vanegas JL. doi: <http://dx.doi.org/10.19052/mv.5177>). Implante de membrana amniótica en la corrección de úlceras corneales profundas de caninos y felinos. 2018. *Rev. Med. Vet.* ISSN 0122-9354 ISSN 2389-8526: Bogotá (Colombia) N° 36: 109-120, enero-junio.
9. CECMED. Regulación 2/95: Requisitos para la recolección, conservación y transportación de placentas humanas. Cuba: 1995. La Habana: Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos; 1995.
10. Trujillo AM, Vega ARL. La seguridad de las placentas humanas utilizadas como materia prima farmacéutica desde el enfoque bioético. *Rev haban cienc méd* [Internet]. 2022 [citado]; 21(5):e4562. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4562>.
11. Maestro FJ, Méndez A, López R, Puime P, Veleiro MJ, Vázquez M. Taller de Cirugía Menor: 2.ª Parte. 2007. *Cad Aten Primaria*; Vol 14 P. 118-122.
12. Conover, William Jay. *Practical Nonparametric Statistics (Third Edition edición)*. Wiley, New York, NY USA. 1999. pp. 388-395. ISBN 9780471160687.
13. Mejía MS. Estabilidad, seguridad y viabilidad de la membrana amniótica preservada en eusol-c, en comparación con la preservada en glicerina y la preservada en solución salina. Posgrado de Salud Pública en Epidemiología Medellín. Instituto de Ciencias de la Salud CES Facultad de Medicina. (2020).
14. CECMED. Buenas Prácticas para la Fabricación de Productos Estériles, Anexo No. 04 de la Regulación No. 16-2012, Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos, Cuba, 2011. http://www.cecmecmed.cu/Docs/RegFarm/DRA/BPPF/2010-2012/Reg/Reg_16-06%20Anexo-04.pdf.
15. Palleroni NJ. *Pseudomonas*. In: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York 2005,2:323-379.
16. Comité interno de seguridad, salud ocupacional y calidad. Procedimiento para el uso de autoclave. 2015. P-PROBIEN N° 002/2015. (5). Disponible en: <https://probien.conicet.gov.ar/wp-content/uploads/sites/56/2017/06/002-Procedimiento-autoclave-PROBIEN.pdf>.
17. Ruiz L. *Pseudomona aeruginosa*. Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Universitat de Barcelona, Tesis Doctoral. Noviembre 2007
18. Barcelona E, Coto GM, Barcelona L; Procedimiento operacional para la conservación de la Membrana Amniótica Humana de uso veterinario. Facultad de Tecnología de la Salud (FATESA), Tesis de Maestría. Abril 2025.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses en relación con la investigación.