



TÍTULO: ESTUDIO COMPARATIVO A CORTO Y MEDIANO PLAZO DE LOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN PARA LA MEMBRANA AMNIÓTICA CON FINALIDAD BIO-SUSTITUTIVA Y TERAPÉUTICA.

Ricardo P. Casaroli-Marano^{1,2,3}, Eva M. Martínez-Conesa^{1,3}, Nausica Otero¹, Elba Agustí¹, Alfredo Adán², Esteve Trías¹, Blanca Miranda¹.

¹Transplant Services Foundation. Corporació Sanitària Clínic. Hospital Clínic de Barcelona.

²Institut Clínic d'Oftalmologia. Hospital Clínic de Barcelona.

³Departamento de Biología Celular. Universidad de Barcelona.

Objetivo. La membrana amniótica (MAM) preservada se emplea ampliamente en la actualidad, con finalidad bio-sustitutiva y terapéutica, en los diferentes desórdenes de la superficie ocular. La optimización de métodos para su crio-conservación es un aspecto importante y se considera un punto crítico para la excelencia de los resultados reconstructivos finales. El objetivo del presente estudio es el de comparar tres distintos métodos empleados para la conservación y mantenimiento de MAM con finalidad terapéutica.

Metodología. La MAM fue obtenida bajo condición aséptica, lavada abundantemente con soluciones estériles de PBS y antibióticos, y recortada sobre soportes individuales y estériles de nitrocelulosa de 0.22 µm. Posteriormente los fragmentos de MAM fueron acondicionados en tres métodos distintos de conservación tal y cómo se describe a continuación: a) Medio RPMI / Albúmina / DMSO (8:1:1) y conservados en N2 líquido a -196°C; b) Medio DMEM / Glicerol (1:1) y congelados a -80°C; y c) Medio DMEM / Glicerol (1:1) y congelados a -20°C. Los especímenes correspondiente a cada condición de criopreservación fueron descongelados progresivamente al 1º, 3º y 6º meses de almacenamiento. Las muestras fueron fijadas e incluidas en parafina para su evaluación histológica mediante microscopía óptica. Los extractos proteicos se obtuvieron mediante homogenización mecánica en tampón de lisis apropiado y posterior tratamiento con ultrasonidos. Los perfiles proteicos fueron analizados mediante electroforesis de proteínas por SDS-PAGE y Western-blot para la presencia de proteínas específicas. Fragmentos de MAM fresca fueron utilizados como control para los experimentos de identificación de proteínas y para la comparación histológica.

Resultados. Las concentraciones de proteínas de las muestras criopreservadas decrecían aproximadamente la mitad en comparación con la muestra control. Las tinciones de Coomassie, Rojo Ponceau y amplificación con Plata mostraron una disminución discreta y selectiva de las proteínas de alto peso molecular (>90 kDa) así como de polipéptidos (<30 kDa) de manera directamente proporcional al tiempo de conservación del tejido. En todas las condiciones analizadas, los marcadores epiteliales (queratinas 1/5/10/14 y E-cadherina) y los marcadores específicos de láminas basales (laminina y colágeno tipo IV) se mantuvieron conservados, aunque se observó una discreta disminución de fragmentos de colágeno IV en las muestras con mayor tiempo de conservación en más altas temperaturas. Sin embargo, el colágeno tipo III -el principal componente estromal de la MAM- presentó evidencias de degradación en las muestras mantenidas a más altas temperaturas a partir del 3º mes de preservación. El estudio histológico no evidenció alteraciones estructurales significativas entre los diferentes métodos de crioconservación.

Conclusiones: Los métodos de conservación a muy bajas temperaturas (-80°C y -196°C) fueron efectivos para mantener las características de integridad histológica de la MAM en nuestro estudio pese a que la degradación de alguna proteína pudo ser observada a los 6 meses de almacenamiento. El método de conservación a -80°C parece presentar una relación coste-beneficio satisfactoria para la preservación de la MAM con finalidad bio-sustitutivas y terapéuticas.