

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA
TRABAJO FIN DE GRADO EN PODOLOGÍA



**Membrana Amniótica en Ulceras Crónicas de
Pie Diabético**

AUTOR: RODRIGUEZ VALIENTE, MONICA

Nº expediente: 201

TUTOR: PADROS FLORES, NURIA

Departamento y Área: PSICOLOGIA DE LA SALUD. ENFERMERIA

Curso académico 2016 - 2017

Convocatoria de Junio

ÍNDICE

1. ASPECTOS PRELIMINARES.....	4
1.1. Resumen.....	4
1.2. Summary.....	5
2. ANALISIS DE LOS OBJETIVOS E HIPOTESIS	6
2.1. Justificación.....	6
2.2. Objetivo principal	7
2.3. Objetivo secundario	7
2.4. Hipótesis de trabajo	7
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1. Diabetes Mellitus	8
3.2. Pie Diabético	8
3.2.1. Definición del síndrome del pie diabético (DFS).....	9
3.2.2. Fisiopatología	9
3.3. Terapia celular.....	11
3.3.1. Definición de células madre (Stem Cells)	11
3.3.2. Tipos de células madre.....	11
3.3.3. Clasificación.....	12
3.3.4. Células madre fetales y de tejidos extraembrionarios	12
3.4. Células madre de membrana amniótica (MA).....	13
3.4.1. Origen y características de la MA	13
3.4.2. Propiedades de MA	15
3.4.3. Clasificación de la MA.....	17
3.4.4. Aplicaciones clínicas de la MA	18
4. MATERIAL Y METODO.....	19
4.1. Obtención y procesamiento de MA.....	19
4.2. Selección de los pacientes.....	20
4.3. Procedimientos de estudio y tratamiento con MA.....	20
4.4. Evaluación del tratamiento	22
4.5. Resultados del estudio y análisis de datos	22
5. RESULTADOS.....	23
6. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS	27

7. BIBLIOGRAFIA	28
8. ANEXOS	32



ABREVIATURAS

DM	Diabetes Mellitus
MA	Membrana Amniótica
DFS	Síndrome del pie diabético
ATPasa	Adenosin- trifosfato deshi-drogenosa
SC	Células Madre
PSCs	Células Madre Pluripotentes
CES	Células Madre Embrionarias
iPSCs	Células Madre Pluripotentes Inducidas
HSC	Células Madre Hematopoyéticas
MSC	Células Madre Mesenquimales
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
fMSCs	Células Madre Mesenquimales Fetales
hAEC	Células Epiteliales Amnióticas
hAMSC	Células Mesenquimales Estromales de la Membrana Amniótica
HIV 1 y 2	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 y tipo 2
HBV	Virus de la Hepatitis B
HCV	Virus de la Hepatitis C
HTLV	Virus Linfotrópico de Células T Humanas
CMV	Citomegalovirus
EBV	Virus Epstein Bars
UPC	Unidad de Producción Celular
AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Producto Sanitario
HbA1c	Hemoglobina Glicosilada
ITB	Índice Tobillo Brazo

1. ASPECTOS PRELIMINARES

1.1 RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Una de las complicaciones de la Diabetes Mellitus es el pie diabético, en nuestra unidad atendemos pacientes con pie diabético y úlceras complejas que en determinados casos requieren la amputación del miembro afecto. A pesar de utilizar los tratamientos de los que disponemos, en ocasiones tenemos que recurrir a terapias avanzadas como la terapia celular: membrana amniótica (MA). A la membrana amniótica se le atribuyen diversas propiedades biológicas entre ellas: propiedades analgésicas, anti-microbianas y anti-inflamatorias relacionadas con su capacidad para sintetizar y liberar sustancias que incluyen citoquinas y moléculas de señalización.

MATERIAL Y METODO

Se aplicó MA criopreservada a pacientes con úlceras complejas en pie diabético de más de 8 semanas de evolución desde Mayo de 2014 hasta Febrero de 2016. Se incluyeron aquellos pacientes que tras ser informados, firmaron el consentimiento informado. No se incluyeron pacientes con signos clínicos de infección ni proceso neoplásico activo. La MA se aplicó semanalmente o cada diez días sobre el lecho de la herida.

RESULTADOS

Fueron tratados 14 pacientes de edades comprendidas entre 16 y 80 años afectados de polineuropatía, macro y microangiopatía diabética y deformaciones en los pies. Todos los pacientes alcanzaron la epitelización. El tiempo medio de epitelización con MA fue de 20 semanas (56-7) con una media de 12 membranas (4-40). No se observaron acontecimientos adversos relacionados con la aplicación de MA.

CONCLUSION

Nuestros resultados muestran que la MA es un tratamiento seguro y eficaz que contribuye a la evolución hacia la resolución de estas úlceras y se puede utilizar con seguridad después de que la úlcera se ha estabilizado clínicamente y los signos de infección han sido eliminados.

Palabras Clave: membrana amniótica, pie diabético, úlceras complejas, terapia celular.

1.2 SUMMARY

INTRODUCTION

One of the complications of Diabetes Mellitus is the diabetic foot, in our unit we healing patients with diabetic foot who present chronic ulcers and in certain cases require amputation of the affected member. Despite using the treatments available, sometimes we have to resort to advanced therapies such as cell therapy: amniotic membrane (MA). The amniotic membrane is attributed biological properties including: analgesic, antimicrobial and anti-inflammatory properties related to its ability to synthesize and release substances including cytokines and signaling molecules.

MATERIAL AND METHOD

Cryopreserved MA was applied to patients with complex ulcers on diabetic foot for more than 8 weeks of evolution from May 2014 to February 2016. Those patients who, after being informed, signed the informed consent were included. We did not include patients with clinical signs of infection or active neoplastic process. MA was applied weekly or every ten days on the wound bed.

RESULTS

Fourteen patients aged between 16 and 80 years were treated with polyneuropathy, macro and diabetic microangiopathy and deformities in the feet. All patients achieved epithelialization. The mean time of epithelization with MA was 20 weeks (56-7) with a mean of 12 membranes (4-40). There were no adverse events related to the application of MA.

CONCLUSION

Our results show that MA is a safe and effective treatment that contributes to the evolution towards resolution of these ulcers and can be used safely after the ulcer has been clinically stabilized and signs of infection have been eliminated.

Key Words: amniotic membrane, diabetic foot, chronic ulcers, cell therapy.

2. ANALISIS DE LOS OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Justificación

La prevalencia de la Diabetes Mellitus (DM) está aumentando en todo el mundo; en el año 2025 se estima que 300 millones de personas tendrán diabetes. El pie diabético es una complicación asociada a la DM, cuyo riesgo oscila entre el 15 y 25% de los pacientes diabéticos¹. Se trata de una patología neuromusculo-esquelética progresiva de etiopatogenia desconocida, cuyo factor predisponente es la neuropatía mixta crónica que conduce a traumatismos internos y/o externos desencadenantes de ulceraciones a veces agravadas por infecciones o isquemia arterial. Se estima que un 15% de los pacientes diabéticos presentará una úlcera en el curso de su enfermedad. Su incidencia anual es del 2-3% y del 7% en pacientes con neuropatía y su prevalencia del 2-10%².

En la actualidad, el tratamiento de las ulceraciones del pie diabético plantea controversias, debido a que la cicatrización en estos pacientes se encuentra seriamente dañada como consecuencia de alteraciones inmunitarias locales y biológicas³. Así, en la práctica clínica diaria se observa que algunas de estas úlceras, una vez controlada la fase infecciosa aguda, revascularizadas y con la descarga adecuada, se curan en un corto periodo de dos o tres meses, mientras que en otros casos el proceso se alarga incluso hasta años.

Por la complejidad de los pacientes con los que nos encontramos, se hace necesaria la utilización de diferentes tratamientos como: apósitos hidrocoloides, antimicrobianos, terapia de presión negativa tópica (TPNT) y tratamientos con terapias avanzadas como es la membrana amniótica (MA) que es un tejido de especial importancia como apósito biológico, con numerosas ventajas sobre otros apósitos biológicos y sintéticos ya que actúa como una barrera específica, reduce la pérdida de

calor, tiene buena adherencia, reduce la incidencia de infección, tiene efecto analgésico, y no produce reacciones inmunológicas.

2.2 Objetivo principal

Evaluar la seguridad y eficacia de la aplicación de la MA en úlceras crónicas en pie diabético.

Variable principal de seguridad:

1. La presencia de acontecimientos adversos relacionados con la aplicación de MA: aparición de cambios inflamatorios en la lesión o piel perilesional (tumoración, rubor, cambios inflamatorios)

Variables principales de eficacia:

1. Evaluar la disminución del área de la úlcera tras la aplicación de MA.
2. Definir el aspecto macroscópico y características de la úlcera.
3. Describir la evolución temporal hasta la cicatrización total de la úlcera.

2.3 Objetivo secundario

1. Describir las características de los pacientes con úlceras diabéticas.

2. Identificar los microorganismos presentes en dichas úlceras durante el tratamiento con membrana amniótica.

2.4 Hipótesis de trabajo

La hipótesis de este estudio es que la aplicación de membrana amniótica es un tratamiento factible y seguro que favorece la epitelización de úlceras complejas de pie diabético.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 DIABETES MELLITUS

La DM se define como un conjunto de metabólopatías que tienen en común altos niveles de glucemia por déficit de insulinemia o alta resistencia celular a su efecto o hiperproducción de glucosa.

En el concepto de DM tenemos que tener presente que la duración de la hiperglucemia y su gravedad son los factores mas importantes en la aparición a medio y largo plazo de complicaciones de muy diversa índole. Aunque hay una afectación de todo el organismo, las manifestaciones clínicas mas evidentes son vasculares, de ellas destacan las microangiopáticas: como oftalmopatía, nefropátia y polineuritis y las macroangiopáticas: como la artropatía obstructiva crónica multisistémica y multisegmentaria, afectación cardiaca, cerebrovascular y del Sistema Nervioso Central y Periférico con afectación osteomuscular y presencia de úlceras e infecciones de partes blandas⁴.

3.2 PIE DIABETICO

Entre las personas con diagnóstico de diabetes mellitus, el riesgo de desarrollar una úlcera en el pie se estima en un 15%, la incidencia anual basada en la población oscila entre el 1,0% al 4,1% y la prevalencia oscila entre el 4% al 10%, lo que sugiere que la incidencia de por vida puede ser tan alta como la enfermedad.

La enfermedad vascular periférica puede alcanzar hasta el 25% de los casos, quienes tienen un riesgo 30 veces mayor de sufrir una amputación⁵.

De todas las complicaciones diabéticas, el pie diabético es uno de los más devastadores y costosos⁶.

3.2.1 Definición del síndrome del pie diabético (DFS)

La Organización Mundial de la Salud, lo define como " Ulceración del pie (en sentido distal desde el tobillo y que incluye el tobillo) asociado con la neuropatía y diferentes grados de isquemia e infección".

3.2.2 Fisiopatología

El inicio de la alteración clínica del pie diabético radica en el descontrol metabólico, cifras de hemoglobina glucosilada por encima de 6.5%, potencian la vía de incremento en el sorbitol intraneural por glucosilación proteica no enzimático provocando una disminución de mioinositol y ATPasa con la consecuente degeneración neuronal y el retardo en la velocidad de conducción nerviosa; y por otro lado la misma hiperglucemia sostenida provoca alteración en la vasculatura endoneural disminuyendo el flujo y consecuentemente ocasionando hipoxia neural, así se genera el mecanismo fisiopatológico inicial de la neuropatía, cuyo componente sensitivo motor en el pie diabético va generando pérdida sensorial térmica, vibratoria y táctil, que hace vulnerable el pie frente a traumatismos, apareciendo callosidades y deformaciones óseas.

La afectación sensitiva suele ser asintomática, produce inicialmente pérdida de la sensación de dolor y temperatura, y posteriormente de la percepción de vibración y la sensibilidad superficial. La afectación motora provoca atrofia y debilidad de los músculos intrínsecos del pie, perdiéndose la función de estabilización de las articulaciones metatarsofalángicas e interfalángicas, produciendo una contractura dinámica de los flexores y extensores largos, provocando dedos en martillo y dedos en garra, que conducen a la protrusión de las cabezas de los metatarsianos y a una distribución anormal de las cargas en el pie⁷.

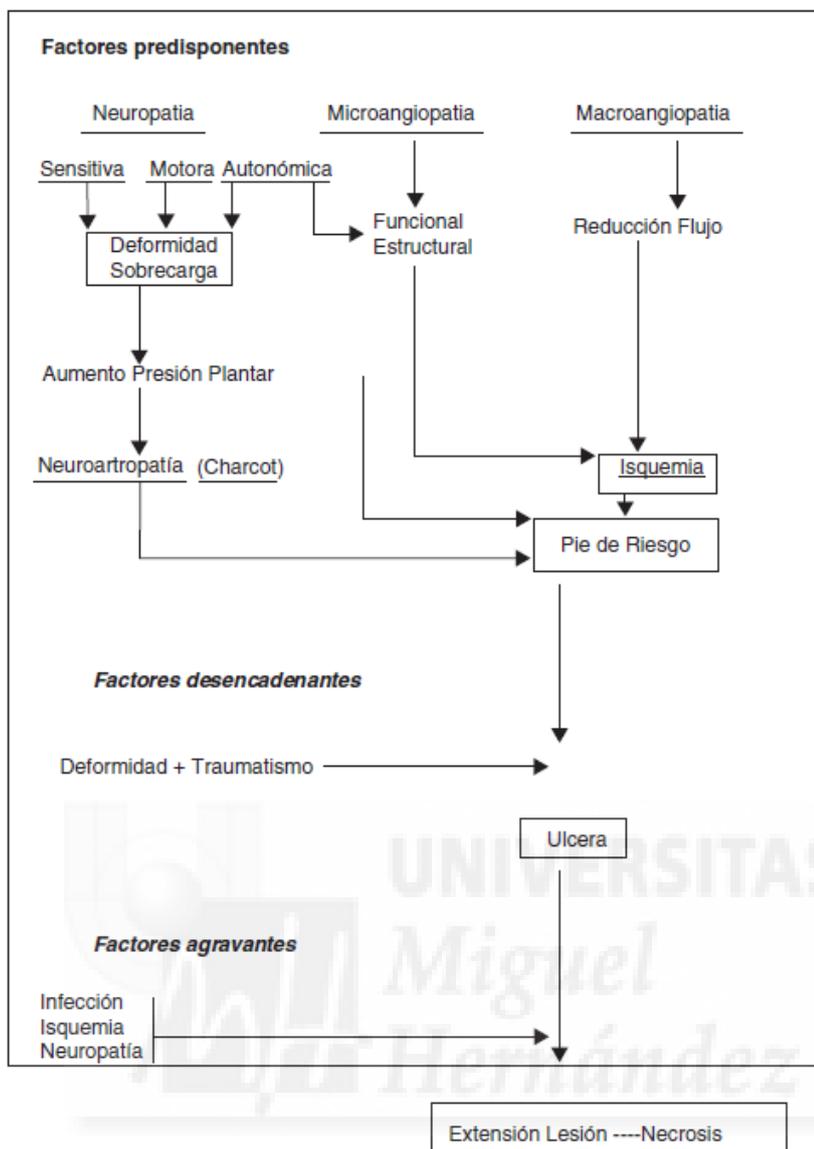


Figura 1. Mecanismo de producción de la úlcera de Pie diabético. Tomada de Blanes, 2012

La neuropatía autonómica tiene su participación en el pie diabético por los siguientes factores: anhidrosis que por la sequedad ocasiona fisuras, apertura de cortocircuitos arteriovenosos con desviaciones del flujo de los capilares nutricios ocasionando déficit de aporte, pérdida de la vasoconstricción postural que produce edema, además, participando como responsable de la calcificación de la capa media arterial.

Simultáneamente, la glucosilación engrosa el endotelio que conforma la capa basal del capilar, dificultando el intercambio metabólico celular. La interacción de los

mecanismos fisiopatológicos neuropáticos, microvasculares y macrovasculares forman la placa de ateroma con la consecuente progresión de la misma y la aparición precoz de estenosis, que ocasiona reducción del flujo y presión de perfusión e isquemia con las características de multisegmentaridad, bilateralidad y afección de troncos tibioperoneos. Esquemmatizando, existen unos factores predisponentes, una neuropatía asociada en mayor o menor grado a macro y microangiopatía, que provocan un pie vulnerable, de alto riesgo; unos factores precipitantes o desencadenantes, generalmente un traumatismo mecánico, que producen una *úlcer*a o necrosis y unos factores agravantes que determinan el pronóstico de la extremidad, que son la infección, que provocará daño tisular extenso, la isquemia que retrasará la cicatrización y la neuropatía que evitará el reconocimiento tanto de la lesión como del factor precipitante⁷.

3.3 TERAPIA CELULAR

3.3.1 Definición de células madre (Stem Cells)

Las células madre se definen como células indiferenciadas con capacidad de autorenovación y potenciales de diferenciación.

3.3.2 Tipos de células madre

Se han descrito dos tipos principales de células madre: Las células madre pluripotentes (PSCs) y las células madre somáticas. Las células madre pluripotentes son las únicas células que pueden diferenciarse en todos los tipos de células del cuerpo e incluyen células madre embrionarias (CES) y células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). Las células madre somáticas específicas de cada tejido dan lugar a tipos de células específicas de órganos.

Las CES se establecieron por primera vez de la masa celular interna de los blastocistos en un huevo o cigoto fertilizado de 7-9 días. Estudios in vitro han demostrado que las CES cultivadas tienen la capacidad de auto-renovación y

diferenciación a múltiples linajes. Las CES pueden diferenciarse en tipos de células que incluyen las tres capas germinales, y estudios in vivo han demostrado que los CES pueden formar teratomas cuando se inoculan en ratones inmunodeficientes⁸.

3.3.3 Clasificación

Las células madre multipotentes pueden diferenciarse en muchos tipos de células, pero dentro de un determinado linaje. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas: Stem Cells Hematopoyéticas (HSC) se puede desarrollar en glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas.

Las células madre adultas, que existen en el organismo después del parto, son multipotentes o unipotentes. La mayoría de las células madre adultas conocidas residen en la médula ósea. Entre ellas, se encuentran las células madre multipotentes: HSC que tienen la capacidad de regenerar todo el sistema hematopoyético y las células madre mesenquimales (MSC), que pueden diferenciarse en hueso, condrocitos y células adiposas⁹.

3.3.4 Células madre fetales y de tejidos extraembrionarios

Las células madre fetales se incluyen en la categoría de células madre adultas para diferenciarlas de las células madre embrionarias. El uso de CES planteó controversias éticas que fueron impulsadas cuando se obtuvieron CES de primates, estas objeciones fueron un obstáculo importante para muchas investigaciones¹⁰.

Una fuente alternativa de Stem Cells (SC) fueron aisladas de tejido fetal disponibles después del nacimiento recuperando membranas o células procedentes de la placenta, del líquido amniótico y de vellosidades coriónicas.

El tipo principal de SC aisladas de estas fuentes fueron células mesenquimales ya que mostraban marcadores de superficie celular y morfología similar a células mesenquimales de otros tejidos¹¹.

Estas células presentaron un potencial de expansión superior a las SC derivadas de tejido adulto y eran menos inmunogénicas ya que no expresaban el antígeno leucocitario humano (HLA) tipo I de superficie¹². Las células madre mesenquimales fetales (fMSCs) han sido muy bien documentadas por presentar capacidad adipogénica, osteogénica y condrogénica, así como diferenciación en miocitos, células neuronales y tejido endotelial.

Las estructuras derivadas de la placenta (amnios y el corion) constituyen una valiosa fuente de MSC. La capacidad de expandir SC de estas células está relacionada con la edad gestacional ya que las SC tienden a ser menos numerosas hacia el final del embarazo. Pero incluso a finales del embarazo, su número y potencial de expansión se mantiene significativamente mayor si se compara con las MSC de tejidos adultos. La edad gestacional sin embargo no afecta a su potencial de diferenciación.

3.4 CELULAS MADRE DE LA MEMBRANA AMNIOTICA

3.4.1 Origen y características

La placenta es una estructura de origen materno-fetal, con una forma redonda, de 15 a 20 cm de diámetro y 2-3 cm de espesor. Tiene dos partes: una es la placa coriónica que está formada por el amnios y el corion. En el otro lado, la llamada placa basal, que está formada por las deciduas (basal y parietal)¹³.

Las membranas fetales (amnios y corion) cubren la cavidad amniótica donde se encuentra el feto ofreciéndole un entorno seguro, donde puede crecer sin ser distorsionado por la presión de estructuras vecinas.

La estructura de la membrana amniótica tiene tres partes: una monocapa epitelial, una membrana basal, y un estroma avascular.

La monocapa epitelial consiste en una sola capa de células que están dispuestos de manera uniforme sobre la membrana basal. Es la capa más interna, y es también

llamada epitelio amniótico. Las células epiteliales amnióticas tienen funciones de secreción y de transporte. Este epitelio está firmemente fijado a una membrana basal, que a su vez está conectado a una condensada capa acelular. Esta capa se compone de colágeno de los tipos I, II, y V¹⁴. Los vasos sanguíneos o los nervios están ausentes en la membrana amniótica.

La membrana basal se encuentra en todos los tejidos humanos y proporciona apoyo para el feto durante la gestación. Es similar a la de la conjuntiva en su distribución de colágeno de tipo IV.

El principal esqueleto fibroso de la membrana amniótica está formado por la capa compacta de estroma formada por células mesenquimales responsable de la secreción de diferentes tipos de colágenos. Los tipos predominantes son los colágenos intersticiales (Tipos I y III) que forman haces paralelos para mantener la integridad mecánica de la membrana. Las conexiones entre los colágenos intersticiales y epiteliales de la membrana basal se proporcionan por tipos de colágenos V y VI. La última capa que se conoce como capa intermedia se encuentra adyacente a la membrana coriónica y contiene una malla de colágeno en su mayoría de tipo III (figura 2).

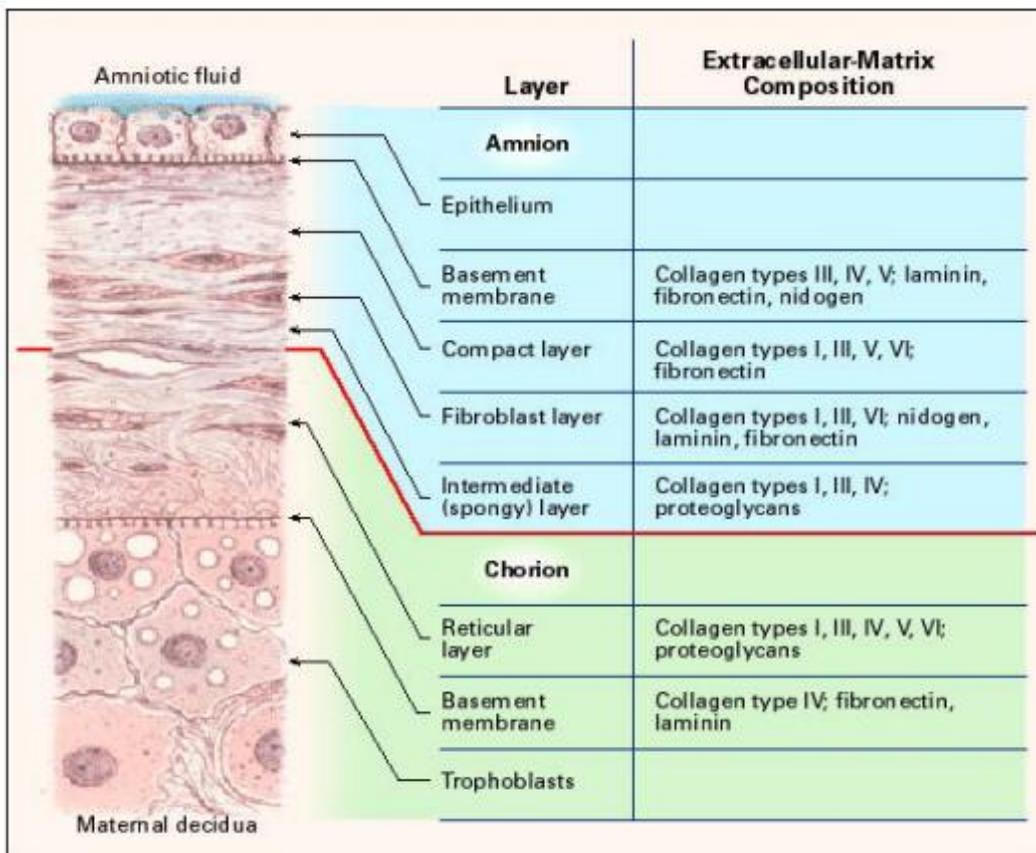


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de la membrana fetal a término.

3.4.2 Propiedades de la membrana amniótica

Propiedades biomecánicas

El espesor de la membrana se encuentra entre 0,02 y 0,5 milímetros e incluye alrededor de 6-8 capas de células. La superficie media es de aproximadamente 1,600 centímetros cuadrados¹⁴. La membrana amniótica tiene múltiples funciones metabólicas como su papel en el transporte de agua y la producción de péptidos bioactivos, factores de crecimiento, y citoquinas.

Efecto analgésico y de barrera

La aplicación de amnios a un lecho de la herida impide la desecación y la pérdida excesiva de líquidos y proporciona un analgésico efecto mediante la protección de nervio expuesto¹⁵.

Promoción de la epitelización

La membrana amniótica facilita la migración de las células epiteliales, refuerza la adhesión celular, previene la apoptosis epitelial, y promueve la epitelización en la curación de heridas.

Su lámina basal sirve como base para el crecimiento de células epiteliales proporcionando oxigenación suficiente para la permeabilidad de las células epiteliales en comparación con otros materiales sintéticos¹⁶.

Inhibición de la fibrosis

Los fibroblastos son naturalmente responsables de la formación de cicatrices durante la cicatrización de heridas y son activados por factor de crecimiento transformante β . La membrana amniótica reduce el riesgo de fibrosis por regulación a la baja del factor de crecimiento transformante β y su receptor expresión por los fibroblastos. Por lo tanto, la membrana amniótica modula la curación de heridas promoviendo la reconstrucción de los tejidos en lugar de promover la formación de la cicatriz en los tejidos¹⁷.

Inhibición de la inflamación y la angiogénesis

El mecanismo exacto de las propiedades anti-inflamatorias de la membrana amniótica no está claro. Se plantea la hipótesis de que disminuye la afluencia de células inflamatorias a la zona de la herida y atrapa los linfocitos T cuando se aplica en una herida in vivo. Las metaloproteinasas infiltradas en los neutrófilos y macrófagos son eliminados por inhibidores de metaloproteinasas de la matriz que se encuentran en la membrana amniótica¹⁸.

Otras sustancias expresadas en la membrana amniótica son inhibidores de elastasa de baja masa molecular, que tienen acciones antimicrobianas además de sus propiedades anti-inflamatorias.

La falta de inmunogenicidad

La aparición de rechazo agudo después de un trasplante de membrana amniótica es negada por el hecho de que las células epiteliales amnióticas no expresan HLA-A, antígenos HLA-B, HLA-D, y HLA-DR, pero expresa HLA-G en su superficie¹⁹.

Propiedades antimicrobianas y antivirales

Las membranas amnióticas también tienen la capacidad de producir β -defensinas con el tipo predominante presente en el epitelio amniótico siendo β 3-defensinas²⁰. Sus propiedades antivirales se exhiben por la presencia de la cistatina E.

Otro mecanismo de acción contra la infección por la membrana es a través de su adhesión a la superficie de la herida. Esta adhesión previene la formación de espacios muertos y acumulación de carga serosa. Además, el atrapamiento de bacterias y la estimulación de la migración de los fagocitos también se producen por los filamentos de fibrina formados durante la cicatrización de heridas.

Propiedad de diferenciación celular

Los tejidos fetales de la placenta tienen el potencial de transformarse en diferentes linajes celulares. Se considera que la membrana amniótica puede mantener potencial de células madre pluripotentes para la diferenciación celular¹⁴.

3.4.3 Caracterización de la MA

Se han identificado células epiteliales amnióticas (hAEC) y Células Mesenquimales Estromales de la MA (hAMSC) ambos tipos de células poseen características de células madre, como potencial de diferenciación hacia linajes de diferentes capas germinales, y propiedades inmunomoduladoras.

Los criterios mínimos para la definición de hAEC y hAMSC son los siguientes:

La formación de unidades formadoras de colonias de fibroblastos, un patrón específico de expresión del antígeno de superficie, y potencial de diferenciación hacia

uno o más linajes, incluyendo: osteogénico, adipogénico, condrogénica, y vascular o endotelial y origen fetal.

Las células hAECs parecen no expresar o expresar niveles muy bajos de antígeno leucocitario humano (HLA) - A, B, D²¹. Los marcadores de superficie que están ausentes en las hAEC incluyen SSEA-1, CD34, y CD133, mientras que otros marcadores, tales como CD117 (c-kit) y CCR4 (receptor de quimioquinas CC), son ya negativos o puede ser expresados en algunas células a niveles muy bajos. Aunque las células iniciales aisladas expresan niveles muy bajos de CD90 (Thy-1), la expresión de este antígeno aumenta rápidamente en cultivo²².

3.4.4 Aplicaciones clínicas MA

En 1910, Davis fue el primero en reportar el uso de membranas fetales como material quirúrgico en la piel. En 1940 varios autores informaron del papel beneficioso de la membrana amniótica en el tratamiento de una variedad de afecciones de la superficie ocular. Este tejido, también ha sido utilizado como un apósito biológico para la piel quemada, epidermiolisis bullosa²³, heridas en la piel y úlceras venosas²⁴.

Cuando la cicatrización de las heridas con apósitos o autoinjertos no es eficaz, la MA constituye una de las alternativas eficaces para este tratamiento. La membrana amniótica ha sido utilizada según se muestra en la tabla 1.

NOMBRE COMERCIAL	FORMA FARMACÉUTICA
Epifix®	Deshidratado
Purión®	Deshidratado e irradiado, liofilizada
AmnioShield®	Deshidratada y esterilizada
BioXclude™	Deshidratada y esterilizada
AmnioFix®	Inyectable (micronizado)
CLARIX®FLO	Criopreservado
NEOX®FLO	Criopreservado
AMNIOEXCEL®	Deshidratada
PalinGen Flow®	Fluido

Tabla 1. Productos comerciales con MA y su forma farmacéutica.

4. MATERIAL Y METODO

4.1 Obtención y procesamiento de la MA

La MA se obtuvo de donantes con embarazo controlado sometidas a una cesárea electiva debido a motivos obstétricos. Con una analítica seronegativa para todas las infecciones transmisibles como son HIV 1 y 2, HBV, HCV, HTLV, CMV, EBV, toxoplasma y sífilis en el momento de la extracción del tejido.

Previo a la extracción de la MA todas las donantes firmaron un consentimiento informado para la donación de tejidos.

En el quirófano y en condiciones estériles se extrajo la placenta que se depositó en una mesa auxiliar sobre un paño estéril, aquí, la membrana amniótica fue diseccionada separándola de la membrana coriónica. Una vez diseccionada, se introdujo en un frasco estéril que contenía 1000 ml de solución salina con antibióticos [Soltrim® 48mg, Tobramicina® 50mg y Vancomicina® 50mg]. Desde el quirófano fue transportada a temperatura ambiente a la Unidad de Producción Celular (UPC). Aquí, la MA fue lavada tres veces con solución salina para eliminar los restos de sangre y corión. Fue fragmentada y cada fragmento se unió sobre una apósito (linitul®) mediante una sutura de seda.

A continuación, cada fragmento fue introducido en bolsas especiales para ser criopreservado, añadiendo una solución de congelación a base de albúmina humana al 20%, Medio TC-199 y 9% de dimetilsulfoxido DMSO.

Estos fragmentos fueron criopreservados a -196 °C hasta que se solicitó desde la unidad para su aplicación. Justo antes de su uso, la MA se descongeló a 37 °C, en un baño descongelador se lavó con solución salina estéril bajo condiciones asépticas y se

transportó a la Unidad de Heridas Complejas y Pie Diabético en un recipiente con la temperatura controlada.

4.2 Selección de los pacientes

Fueron tratados pacientes con úlceras crónicas de pie diabético con MA criopreservada bajo un programa de uso compasivo en la Unidad de Heridas Complejas y Pie Diabético del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca entre mayo de 2014 y febrero de 2017. Cada tratamiento individual fue aprobado por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS). El protocolo fue aprobado por el comité de ética local y se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los pacientes.

Los criterios para la aplicación de MA incluyeron la falta de progreso hacia la epitelización, un mínimo de 8 semanas de progreso insatisfactorio se consideró el límite inferior para incluir a los pacientes en el programa de uso compasivo. Los criterios de exclusión fueron enfermedad neoplásica activa o infección no controlada. El número de solicitudes de MA se basó en el juicio del médico y el tiempo entre las solicitudes de MA fue de 7 a 14 días en forma ambulatoria.

4.3 Procedimientos de estudio y tratamiento con MA

Una vez que un paciente fue considerado elegible para el tratamiento con MA y firmó el consentimiento informado, se revisó la hemoglobina glicosilada HbA1c más reciente previa al tratamiento, en todos los pacientes se realizó una exploración vascular midiendo el índice tobillo brazo (ITB) y una ecografía Doppler para valorar el estado de las arterias, también se realizó una radiología simple y una electromiografía para evaluar la morfología y la neuropatía del pie.

En cada aplicación se tomaron muestras de la herida para el análisis microbiológico. Estas fueron clasificadas usando la escala de Wagner-Meggitt. **ANEXO 1.** La historia clínica incluía la etiología, la duración de la herida, las comorbilidades, la descarga ortoprotésica y el tratamiento previo (Tabla 2).

PACIENTES	TPNT	PRP	CH	ANTB/EQO y CA	REV	HbA1c	AMC	T. TTO (meses)	ÁREA PREVIA (cm ²)	GRADO WAGNER*	PIE
1	NO	SI	SI	SI	SI	6,40	NO	7	12	III	izquierdo
2	SI	NO	SI	SI	NO	4,90	NO	2	19,7	II	derecho
3	SI	NO	SI	SI	SI	8,50	NO	36	3	II	derecho
4	SI	NO	NO	SI	NO	7,40	NO	48	8,5	II	derecho
5	SI	NO	NO	SI	SI	7,10	SI	7	35,8	IV	derecho
6	SI	NO	NO	SI	SI	6,70	NO	18	5,5	II	izquierdo
7	NO	NO	NO	SI	NO	9,50	SI	18	17,74	III	izquierdo
8	SI	NO	NO	SI	NO	6	NO	10	0,52	II	derecho
9	NO	NO	NO	SI	NO	10,20	SI	7	7	II	izquierdo
10	NO	NO	NO	SI	NO	9,50	NO	12	0,7	II	derecho
11	SI	NO	NO	SI	NO	6,90	NO	4	42,5	III	izquierdo
12	NO	NO	NO	SI	NO	5,50	NO	6	5,3	II	derecho
13	NO	NO	NO	SI	SI	8,80	NO	5	9	II	derecho
14	NO	NO	NO	SI	NO	4,80	NO	9	4,98	III	izquierdo

Tabla 2. Características de los pacientes tratados: Tratamientos empleados, tiempo de tratamiento previo, área previa de la úlcera, características y localización de las lesiones.

TPNT: Terapia de Presión Negativa Tópica, PRP: Plasma Rico en Plaquetas, CH: Cámara Hiperbárica, ANTB: Antibioterapia, EQO: Exéresis quirúrgicas óseas, CA: Curas Ambientales, REV: Revascularización, T.TTO: Tiempo de tratamiento, HbA1c: Hemoglobina glicosilada, AMC: Amputación del Miembro Contralateral.

Antes y tras cada aplicación de MA todas las heridas se fotografiaron a una distancia de 20 cm. Las imágenes se midieron mediante el software Image J.

Para la preparación del lecho de la úlcera se limpió el pie con una esponja jabonosa y solución salina. Cuando la superficie de la herida presentaba tejido necrótico, se retiró mediante un desbridamiento cortante. Por último, el lecho de la herida se irrigó con solución salina estéril y se tomó una muestra con un hisopo para el análisis microbiológico.

Una vez que la herida alcanzó una condición óptima, procedimos a la aplicación de MA sobre el lecho de la úlcera cubriendo los bordes. A continuación, la MA se cubrió con un apósito de vaselina estéril linitul®. Finalmente, se aplicaron gasas estériles y sobre estas un vendaje de crepe. Para evitar la presión externa, los pacientes siguieron usando sus dispositivos ortopédicos de descarga personalizados. Quedando registrado en la historia clínica todos los datos referentes al procedimiento y aquellas observaciones referentes a las características que presentaban las heridas.

4.4 Evaluación del tratamiento

Las visitas de seguimiento se realizaron de forma semanal hasta el cierre de la herida. Se documentó, la apariencia de la herida, el área, la presencia, el grado de granulación, y el porcentaje de epitelización en cada visita. Se registraron los resultados de los cultivos microbianos y los efectos adversos. Tras el cierre de las heridas, se realizó un seguimiento al año.

4.5 Resultados del estudio y análisis de los datos:

Se realizó un estudio descriptivo en el que las variables numéricas se resumieron como media, desviación típica, mediana, mínimo y máximo y las variables cualitativas con frecuencias y porcentajes.

La aplicación del contraste de hipótesis en variables continuas, se valoró mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff y las condiciones de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. En función de estos resultados, se aplicó la comparación de medias de T-Student para dos factores o ANOVA para cuando hubo más de 2 factores, con aplicación del test de Bonferroni para detectar diferencias entre subgrupos. Para la comparación de variables cualitativas aplicamos el test de la Chi-Cuadrado y prueba exacta de Fisher.

Todos los resultados se consideraron significativos para un nivel $\alpha < 0.05$. Los análisis se llevaron a cabo con el programa IBM SPSS Statistics v20 (SPSS Inc., Chicago, IL).

La fecha completa de cierre de la herida se estableció cuando las dimensiones de la herida eran de 0 a 0.05. El tiempo hasta el cierre se midió como el número de días desde la primera aplicación de MA hasta el cierre completo de la herida.

5 RESULTADOS

Fueron tratados 14 pacientes desde mayo de 2014 hasta febrero de 2017. Todos los pacientes epitelizaron la ulcera tratada. No se observó ningún acontecimiento adverso relacionado con la aplicación de membrana amniótica. Durante el tratamiento con MA se observó un lecho más vitalizado y una reducción del tejido esfacelado.

Tras el seguimiento al año de los pacientes, se observó una epitelización normal (Figura 3).



Figura 3. Evolución y seguimiento de la ulcera de un paciente tratado con MA.

El tiempo medio de epitelización con MA fue de 20 semanas (56-7) con una media de 12 membranas (4-40).

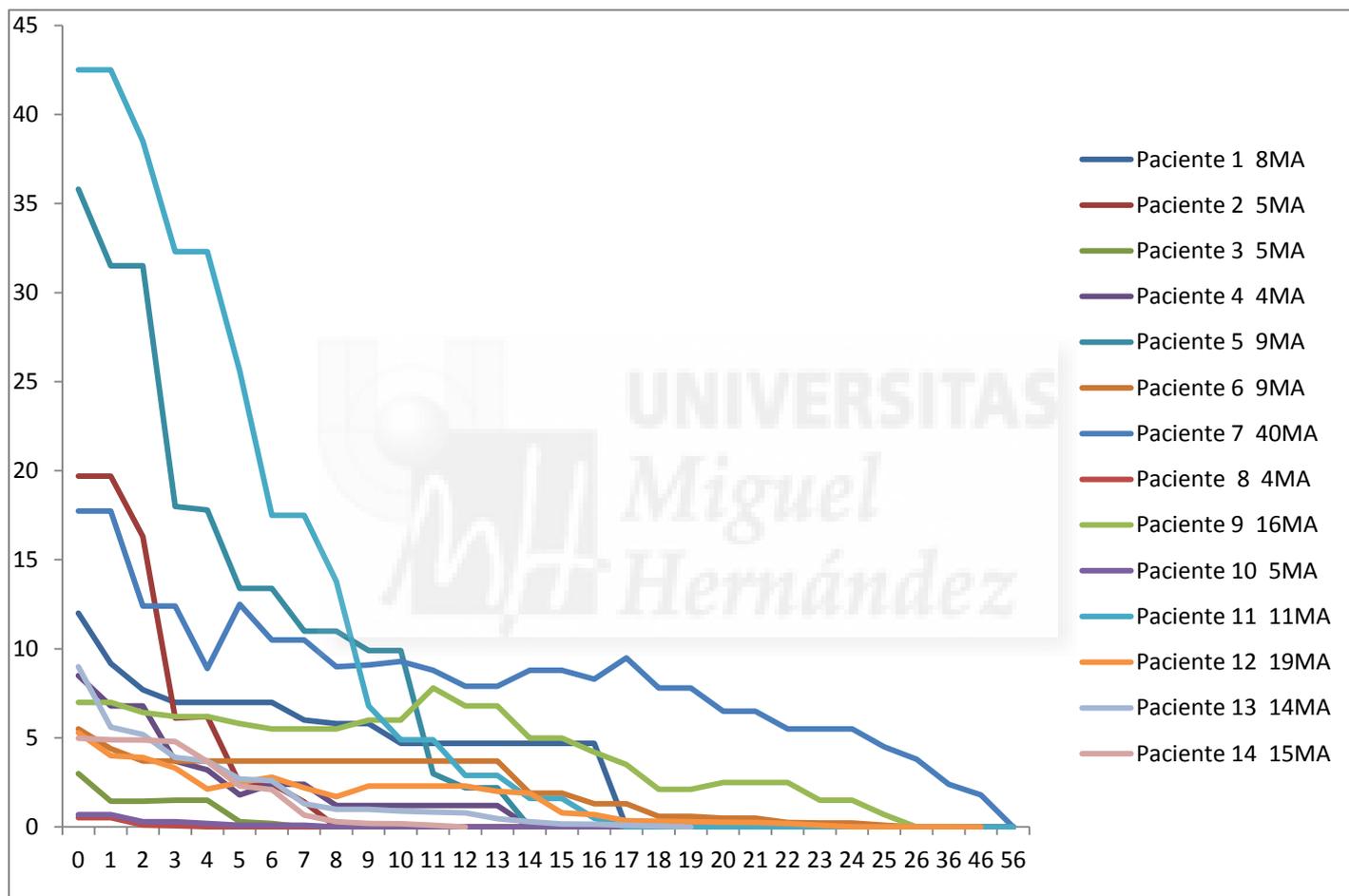


Figura 4. Disminución del área, ritmo de epitelización en semanas y numero de membranas amnióticas aplicadas.

Las características de las úlceras se muestran en la tabla 3, durante el año de seguimiento tres pacientes recidivaron sus úlceras y otros tres desarrollaron nuevas úlceras.

Pacientes	Ulcera inicial	Durante la aplicación MA	Epitelización y seguimiento
1	Esfacelo fibrinoso, exhudativa, dolor	↓área ↓ Esfacelo fibrinoso ↓dolor	Epitelización normal
2	Exhudativa, hipergranulada	↓área ↓hipergranulación	Epitelización normal
3	Borde hiperqueratosico, biofilm en el lecho	↓área	Hiperqueratosis generalizada, recidiva
4	Borde hiperqueratosico, biofilm, lecho desvitalizado	↓área, lecho mas vitalizado	Epitelización normal, sin cicatriz
5	Escara necrosada, exposición ósea, esfacelo fibrinoso	↓área ↓ Esfacelo fibrinoso	Epitelización normal, sin cicatriz
6	Esfacelo fibrinoso, exhudativa	↓área ↓ Esfacelo fibrinoso	Hiperqueratosis, sin cicatriz, nuevas ulceras
7	Esfacelo fibrinoso, lecho desvitalizado	↓área ↓ Esfacelo fibrinoso, lecho mas vitalizado	Epitelización normal, sin cicatriz, nueva ulcera
8	Borde hiperqueratosico, lecho desvitalizado	↓área, lecho mas vitalizado	Epitelización normal, recidiva
9	Esfacelo fibrinoso, dolor	↓área ↓ Esfacelo fibrinoso, lecho más vitalizado, ↓dolor	Epitelización normal, sin cicatriz, nueva ulcera
10	Borde hiperqueratosico, biofilm, lecho desvitalizado	↓área, lecho más vitalizado	Epitelización normal, sin cicatriz
11	Hipergranulación, biofilm, lecho desvitalizado	↓área, ↓hipergranulación, lecho más vitalizado, epitelización de los bordes	Epitelización normal, sin cicatriz
12	Esfacelo fibrinoso, borde macerado	↓área ↓ Esfacelo fibrinoso	Epitelización normal, sin cicatriz, recidiva
13	Esfacelo fibrinoso	↓área	Epitelización normal, sin cicatriz
14	Esfacelo fibrinoso, borde macerado, lecho desvitalizado	↓área	Epitelización normal, sin cicatriz

Tabla 3. Características de las úlceras al inicio y tras la aplicación de MA y seguimiento al año.

Las características de los pacientes se muestran en la tabla 4.

PACIENTES	EDAD	SEXO	HTA	D.M. ⁽¹⁾ TIPO	ITB	AD	OD	P Y M	ND	OAG
1	52	varón	NO	I	0,87	SI	SI	SI	SI	NO
2	54	varón	SI	II	1	SI	SI	SI	SI	II
3	54	varón	SI	II	0,8	SI	SI	SI	SI	I
4	47	varón	SI	II	1,1	NO	NO	SI	NO	II
5	65	varón	SI	II	0,9	SI	SI	SI	SI	NO
6	48	varón	SI	II	0,9	SI	SI	SI	SI	NO
7	64	mujer	SI	II	0,4	SI	SI	SI	SI	II
8	16	mujer	NO	I	1	NO	NO	SI	SI	NO
9	80	mujer	SI	II	0,8	SI	SI	SI	SI	II
10	62	varón	SI	II	1	SI	SI	SI	SI	NO
11	61	varón	SI	II	0,9	SI	SI	SI	SI	NO

12	72	varón	SI	II	0,5	SI	SI	SI	SI	NO
13	60	varón	SI	II	1,15	SI	NO	SI	SI	II
14	71	mujer	SI	II	1,27	SI	SI	SI	NO	NO

Tabla 4. Pacientes y enfermedades asociadas

(1) Diabetes Mellitus

HTA: Hipertensión Arterial, AD: Arteriopatía Diabética, OD: Oftalmopatía Diabética, P y M: Polineuropatía y Metadiabetes, ND: Nefropatía Diabética, OAG: Obesidad Androide Grado, ITB: Índice Tobillo Brazo.

Los microorganismos presentes en las úlceras durante la aplicación de MA se representan en la figura 4.

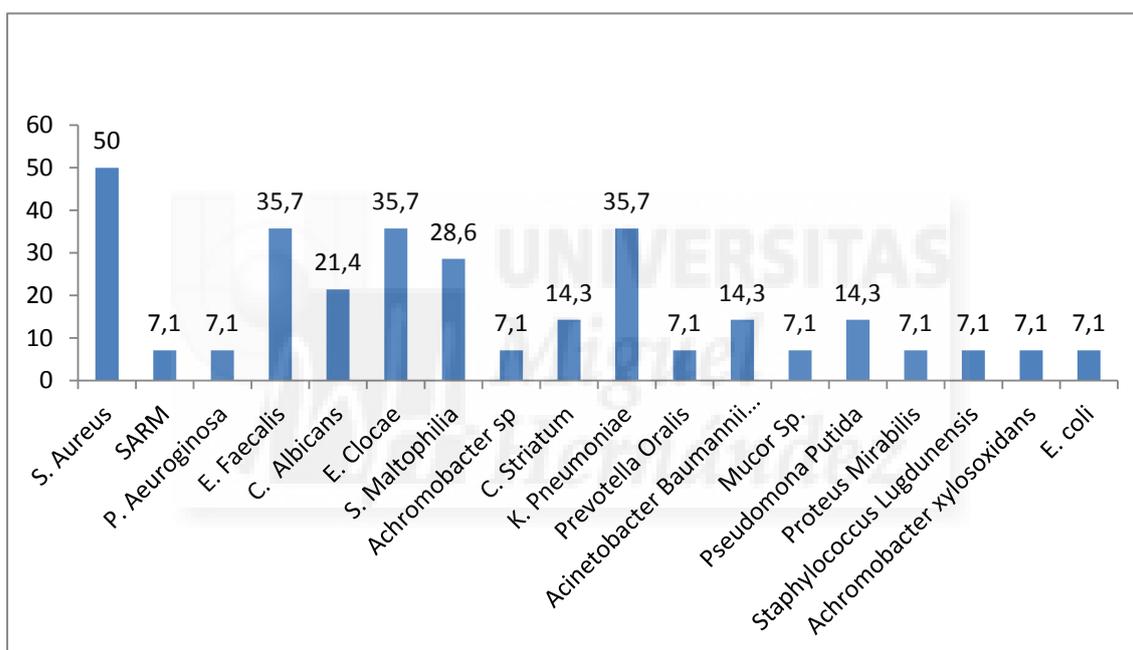


Figura 4. Porcentaje de microorganismos presentes en las úlceras durante el tratamiento con MA.

Tras enfrentar las variables, se estableció una relación inversa entre el ITB y el tiempo de epitelización ($R^2 = -0.77$, $P < 0.01$). Los demás cálculos mostraron tendencias.

6 DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

El resultado del tratamiento con MA fue el mismo: todos los pacientes dieron lugar a la epitelización de la herida. El hecho clínico más significativo fue la reducción del área de la herida, aunque también se observó una disminución del dolor, lo que confirma las observaciones de otros grupos^{25,26,27}.

En dos pacientes de nuestra serie que habían desarrollado hipergranulación, la MA disminuyó este exceso de granulación después de sólo dos aplicaciones. Poco se sabe sobre la hipergranulación en pacientes diabéticos²⁸. El efecto positivo de la MA sobre las úlceras hipergranuladas podría explicarse por las propiedades antiinflamatorias de la membrana que actuarían como un agente regulador durante la inflamación.

La observación de las úlceras del pie diabético, durante la aplicación de MA, muestra un lecho vascular de la herida más vitalizado que es un indicador del procedimiento correcto para la curación. Tras la aplicación de MA se observa una disminución del tejido esfacelado dato que podría deberse en algunos pacientes al desbridamiento cortante antes de la aplicación de MA. Tras enfrentar las variables encontramos una correlación inversa: a medida que descienden los valores de ITB, aumenta el tiempo de epitelización. Dato que corrobora la importancia del buen flujo sanguíneo para la curación de la herida.

El tratamiento con MA puede contribuir a la reducción de la carga bacteriana de dicha úlcera ya que no nos encontramos con signos de infección en los pacientes. Esto es coherente con las bien documentadas propiedades antibacterianas de la MA²⁹.

Nuestros resultados muestran que la MA es eficaz y se puede utilizar con seguridad después de que la úlcera se ha estabilizado clínicamente y los signos de infección se han eliminado.

BIBLIOGRAFIA

1. Snyder RJ, Kirsner RS, Warriner RA, 3rd, Lavery LA, Hanft JR, Sheehan P. Consensus recommendations on advancing the standard of care for treating neuropathic foot ulcers in patients with diabetes. *Ostomy Wound Manage.* 2010 Apr; 56(4 Suppl):S1-24.
2. O'Loughlin A, McIntosh C, Dinneen SF, O'Brien T. Review paper: basic concepts to novel therapies: a review of the diabetic foot. *Int J Low Extrem Wounds.* 2010 Jun; 9(2):90-102.
3. López D, Muñoz L, García S. Standardization of care in patients with lower extremity ulcers venous etiology. *Nure Investigation.* 2012; 9(61):1-10.
4. Tebar FJ, Ferrer M. Concepto, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. In: Tebar FJ, Escobar F, editors. *la Diabetes Mellitus en la práctica clínica.* 2009: Medica Panamericana; 2009. p. 1- 9.
5. Tuttolomondo A, Maida C, Pinto A. Diabetic foot syndrome as a possible cardiovascular marker in diabetic patients. *J Diabetes Res.* 2015; 2015: 268390.
6. Cornell S, Dorsey VJ. Diabetes pharmacotherapy in 2012: considerations in medication selection. *Postgrad Med.* 2012 Jul; 124(4):84-94.
7. Blanes JJ, Consensus document on treatment of infections in diabetic foot. *Rev Esp Quimioter.* 2011 Dec; 24(4):233-62.
8. Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010 Jan 12; 365(1537):155-63.
9. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Jozkowicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(3):329-37
10. Marti M, Mulero L, Pardo C, Morera C, Carrio M, Laricchia-Robbio L, et al. Characterization of pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2013 Feb; 8(2):223-53.

11. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatitotis S, et al. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res.* 2006 Apr; 16(4):329-36.
12. Gucciardo L, Lories R, Ochsenbein-Kolble N, Done' E, Zwijsen A, Deprest J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *BJOG.* 2009 Jan; 116(2):166-72.
13. Caruso M, Evangelista M, Parolini O. Human term placental cells: phenotype, properties and new avenues in regenerative medicine. *Int J Mol Cell Med.* 2012 Spring; 1(2):64-74.
14. Gupta A, Kedige SD, Jain K. Amnion and Chorion Membranes: Potential Stem Cell Reservoir with Wide Applications in Periodontics. *Int J Biomater.* 2015; 2015: 274082.
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.
16. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000 Mar; 20(3):173-7.
17. 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 Jun; 179(3):325-35.
18. Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res.* 2000 Mar; 70(3):329-37.

19. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet*. 1981 Nov 7; 2(8254):1003-5.
20. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Nov; 191(5):1678-87.
21. Terada S, Matsuura K, Enosawa S, Miki M, Hoshika A, Suzuki S, et al. Inducing proliferation of human amniotic epithelial (HAE) cells for cell therapy. *Cell Transplant*. 2000 Sep-Oct; 9(5):701-4.
22. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhring HJ, Evangelista M, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008 Feb; 26(2):300-11.
23. Nevala-Plagemann C, Lee C, Tolar J. Placenta-based therapies for the treatment of epidermolysis bullosa. *Cytotherapy*. 2015 Jun; 17(6):786-95.
24. Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, Malugani C, Cairey-Remonnay S, Maddens S, et al. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2007 Jul-Aug; 15(4):459-64.
25. Zelen CM, Serena TE, Denoziere G, Fetterolf DE. A prospective randomised comparative parallel study of amniotic membrane wound graft in the management of diabetic foot ulcers. *Int Wound J*. 2013 Oct; 10(5):502-7.
26. Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, Malugani C, Cairey-Remonnay S, Maddens S, et al. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2007 Jul-Aug; 15(4):459-64.

27. Gibert M, Fauste S. Aplicación de membrana amniótica en el tratamiento de las úlceras crónicas de extremidades inferiores. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2012; 103(7):608.
28. Warriner L, Spruce P. Managing overgranulation tissue around gastrostomy sites. *Br J Nurs*. 2012 Mar 8-21; 21(5):S14,6, S18, S20 passim.
29. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2008 Apr 29; 15:88-99.



ANEXO I

ESCALA MEGGIT-WAGNER

GRADO	LESIÓN	CARACTERÍSTICAS
0	Ninguna, pie de riesgo	Callos gruesos, cabezas de metatarsianos prominentes, dedos en garra, deformidades óseas
I	Ulceras superficiales	Destrucción del espesor total de la piel
II	Ulceras profundas	Penetra la piel grasa, ligamentos pero sin afectar hueso, infectada
III	Ulcera profunda mas absceso (osteomielitis)	Extensa y profunda, secreción, mal olor
IV	Gangrena limitada	Necrosis de una parte del pie o de los dedos, talón o planta
V	Gangrena extendida	Todo el pie afectado, efectos sistémicos

HOJA DE REGISTRO DE PACIENTES

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	SI	NO
Pacientes con Diabetes Mellitus tipo I y II		
Con úlceras de 8 o mas semanas de evolución desfavorable		
Pacientes mayores de 18 años		
Pacientes que ofrezcan garantías de adhesión al protocolo		
Firmar el Consentimiento Informado		

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	SI	NO
Pacientes embarazadas o en lactancia activa		
Participación en otros ensayos clínicos		
Con neoplasias o signos de infección clínica		
Incapacidad de comprender el Consentimiento Informado		

EVALUACIÓN DE LA ULCERA

PACIENTE:

FECHA:

Rubor	SI	NO
Calor	SI	NO
Inflamación	SI	NO
Tumoración	SI	NO
Cambios Inflamatorios	SI	NO
Zona perilexional		
Aspecto del lecho		
Grado Wagner		
Número de úlceras		
Localización		
Tratamiento ortoprotésico		
Área de la úlcera		
Tiempo		

Observaciones:

Medicación Concomitante:

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE/
REPRESENTANTE LEGAL**

D.Dª.....

en calidad de paciente.

Declaro que el Dr. D.....

como Médico especialista en Cirugía General del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, con DNI.....

me comunica la posibilidad de que el paciente reciba la medicación:.....

Para tratar:.....

Se me ha dado toda la información pertinente adaptada a mi nivel de entendimiento y estoy de acuerdo en recibir la medicación, por lo que por medio de este documento una vez INFORMADO y CONSENTIDO, AUTORIZO a que sea realizado dicho tratamiento por el Servicio de Cirugía del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y al acceso a la información disponible en la historia clínica del hospital respecto al manejo de mi enfermedad.

Toda la información requerida y obtenida será confidencial, según las normas de la deontología médica y según lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y documentos contenidos en el archivo.

El recibir la medicación es voluntario y el paciente puede renunciar a su administración en el momento que estime adecuado.

Fdo.: El paciente o su representante legal.

Nombre y Apellidos

Revocación del consentimiento con fecha

Fdo.