

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA  
EN PATOLOGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR**

**TESIS DOCTORAL**

**ÓSCAR GRIS CASTELLÓN**

---



*A mis padres, a los que debo todo.*

*A Belén y Nacho, por el tiempo que  
esta tesis les ha robado*



El Doctor Alfredo Adán Civera, Profesor Titular de Oftalmología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICA: Que el trabajo titulado “**Trasplante de membrana amniótica en patología de la superficie ocular**” ha sido realizado bajo su dirección por el licenciado D. Óscar Gris Castellón y se encuentra en condiciones de ser leído ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor.

Dr. Alfredo Adán Civera

Barcelona, febrero de 2004



## **AGRADECIMIENTOS**

Los trabajos que forman parte de esta Tesis Doctoral no habrían podido llevarse a cabo sin la colaboración de muchas personas que de manera personal y profesional han participado en su realización. Entre ellas quiero mostrar un especial agradecimiento:

Al Dr. Alfredo Adán, director de esta tesis, por la confianza depositada en mí, por su apoyo, por sus consejos en mi evolución como oftalmólogo y por su estímulo constante en la investigación.

Al Dr. Borja Corcóstegui por todo lo que directa e indirectamente he aprendido de él durante toda mi carrera profesional. Con él como Profesor en la Facultad nació mi interés por la Oftalmología. Como Director del Servicio de Oftalmología del Hospital Vall d'Hebrón durante mi residencia y, posteriormente, como Director del Instituto de Microcirugía Ocular, su influencia desde el año 1993 ha sido constante y decisiva para mí.

Al Dr. José Luis Güell por su amistad y su apoyo durante estos años, y por enseñarme a disfrutar con la córnea. Él me enseñó y me inició en la cirugía de la catarata y de la córnea, y su habilidad y destreza quirúrgica siguen siendo un modelo para mí.

Al Dr. Francesc Tresserra y al Dr. Pedro J Grases por su interés y su ayuda en la disección de la primera placenta, así como su posterior colaboración en la obtención de tejido y en los estudios histológicos realizados.

Al Dr. Antonio López-Navidad y al Dr. Francisco Caballero, del Servicio de Obtención de Órganos y Tejidos y Banco de Tejidos del Hospital de Sant Pau, por su colaboración en la obtención y distribución de la membrana amniótica. Por sus sugerencias y por su ayuda en los trabajos que hemos realizado en los últimos años. Por supuesto, gracias también al resto de integrantes de este Servicio.

Al Dr. Enrique Lerma, del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Sant pau, por su paciencia y por su gran ayuda en todos los estudios histológicos relacionados con el trasplante de membrana amniótica y con la córnea.

A todos los médicos, enfermeras, optometristas y personal de administración del Instituto de Microcirugía Ocular y del Servicio de Oftalmología del Hospital de Sant Pau por las muchas horas de trabajo compartidas. En especial a “la insaturable” Enriqueta, y a mis compañeras en la Unidad de Córnea, la Dra. Anna Bruix, la Dra. Zoraida del Campo y la Dra. Carmen Rodríguez. También al Dr. Rafael Navarro por su amistad y por el inestimable apoyo logístico (informático y audiovisual).

A la Dra. Charlotte Wolley-Dod por su colaboración y su gran ayuda en la traducción al inglés de los trabajos. Thank you, Lottie.

A la Dra. Marta Calatayud, por compartir “penas y alegrías” en el mundo de la córnea y de la superficie ocular.

Finalmente, a todas las donantes de placenta que permiten, con su colaboración desinteresada, realizar los trasplantes de membrana amniótica.







## **INDICE**

<b>1.- JUSTIFICACIÓN</b>	15
<b>2.- INTRODUCCIÓN</b>	19
<b>2.1.- ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR</b>	21
2.1.1.- CONJUNTIVA	21
2.1.1.1.- anatomía	21
2.1.1.2.- histología	24
2.1.1.3.- vascularización	28
2.1.1.4.- drenaje linfático	29
2.1.1.5.- inervación	29
2.1.1.6.- flora conjuntival habitual	30
2.1.2.- Córnea	31
2.1.2.1.- anatomía y propiedades ópticas	31
2.1.2.2.- histología y fisiología	33
2.1.2.3.- aporte vascular	42
2.1.2.4.- aporte de oxígeno y nutrientes	43
2.1.2.5.- inervación	43
2.1.3.- LIMBO ESCLEROCORNEAL. ANATOMÍA Y FUNCIÓN	44
2.1.4.- PELÍCULA LAGRIMAL. ANATOMÍA Y FUNCIÓN	45
<b>2.2.- REGENERACIÓN TISULAR EN LA SUPERFICIE OCULAR</b>	47
2.2.1.- REGENERACIÓN DEL EPITELIO CORNEAL	48
2.2.1.1.- mantenimiento del epitelio corneal en situación basal	48
2.2.1.2.- mecanismo de reparación epitelial	48
2.2.1.3.- factores que favorecen la regeneración epitelial	50
2.2.1.4.- factores que dificultan la regeneración epitelial	51

2.2.2.- REGENERACIÓN DEL ESTROMA CORNEAL	52
2.2.2.1.- mecanismo de regeneración estromal	52
2.2.2.2.- factores que favorecen la regeneración estromal	53
2.2.2.3.- factores que dificultan la regeneración estromal	54
<b>2.3.- MEMBRANA AMNIÓTICA. FUNDAMENTOS</b>	<b>55</b>
2.3.1.- ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA PLACENTA	55
2.3.1.1.- características generales y funciones de la placenta	55
2.3.1.2.- anatomía de la placenta	56
2.3.2.- HISTOLOGÍA DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA	58
2.3.3.- INMUNOLOGÍA DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA	59
2.3.4.- OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA	60
2.3.4.1.- selección de las donantes de placenta	60
2.3.4.2.- obtención, procesamiento y conservación de la membrana amniótica	61
<b>2.4.- APLICACIONES DEL TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA</b>	<b>62</b>
2.4.1.- EL TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA EN MEDICINA	62
2.4.2.- EL TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA EN OFTALMOLOGÍA	63
2.4.3.- MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA	64
2.4.3.1.- epitelio amniótico	65
2.4.3.2.- membrana basal	66
2.4.3.3.- matriz estromal	67
2.4.4.- EFECTOS CLÍNICOS TRAS EL TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA	68
2.4.5.- INDICACIONES DEL TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA EN PATOLOGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR	69
2.4.5.1.- membrana amniótica como injerto en la reconstrucción de la conjuntiva	69

2.4.5.2.- membrana amniótica como injerto en la reconstrucción de la superficie corneal	70
2.4.5.3.- membrana amniótica como recubrimiento	73
2.4.5.4.- membrana amniótica como sustrato para el cultivo de células germinales epiteliales del limbo esclerocorneal	73
2.4.6.- LIMITACIONES DEL TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA	74
<b>3.- OBJETIVOS</b>	75
<b>4.- TRABAJOS PUBLICADOS</b>	79
<b>4.1.- AMNIOTIC MEMBRANE TRANSPLANTATION FOR OCULAR SURFACE PATHOLOGY: LONG-TERM RESULTS. Transplantation Proceedings 2003; 35: 2031-2035 (O. Gris, A. López-Navidad, F. Caballero, Z. del Campo, A. Adán)</b>	81
<b>4.2.- AMNIOTIC MEMBRANE IMPLANTATION AS A THERAPEUTIC CONTACT LENS FOR THE TREATMENT OF EPITHELIAL DISORDERS. Cornea 2002; 21: 22-27 (O. Gris, Z. del Campo, C. Wolley-Dod, JL. Güell, A. Bruix, M. Calatayud, A. Adán)</b>	93
<b>4.3.- HISTOLOGIC FINDINGS AFTER AMNIOTIC MEMBRANE GRAFT IN THE HUMAN CORNEA. Ophthalmology 2002; 109: 508-512. (O. Gris, C. Wolley-Dod, JL. Güell, F. Tresserra, E. Lerma, B. Corcóstegui, A. Adán)</b>	105
<b>4.4.- CONJUNCTIVAL HEALING AFTER AMNIOTIC MEMBRANE GRAFT OVER ISCHEMIC SCLERA. Cornea 2003; 22: 675-678. (O.Gris, Z. del Campo, C. Wolley-Dod, JL. Güell, F. Velasco, A. Adán)</b>	115
<b>5.- DISCUSIÓN</b>	123
<b>6.- CONCLUSIONES</b>	133
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA</b>	137



## **1.- JUSTIFICACIÓN**





La superficie ocular se encuentra formada por la conjuntiva (palpebral, bulbar y fondos de saco), la córnea (epitelio y estroma subyacente), el limbo esclerocorneal (zona anatómica de transición entre la conjuntiva y la córnea) y la película lagrimal. Todas estas estructuras se comportan como una verdadera unidad funcional de manera que una alteración significativa en una de ellas con frecuencia acaba afectando al resto.

Las alteraciones de la conjuntiva y de la córnea representan una parte muy importante en la patología de la superficie ocular y en la oftalmología.

En los últimos años se ha producido un gran avance en los conocimientos de la fisiopatología y la terapéutica de las enfermedades de la superficie ocular, y ello ha permitido mejorar los resultados en distintas patologías de la conjuntiva y de la córnea. Sin embargo, algunas de ellas siguen representando un verdadero reto terapéutico.

Distintos trabajos publicados en los últimos años sobre el trasplante de membrana amniótica han mostrado resultados satisfactorios desde el punto de vista clínico en múltiples situaciones patológicas de la conjuntiva y de la córnea.

Tras la resección de lesiones conjuntivales extensas, el lecho escleral que resulta expuesto debe ser cubierto para evitar complicaciones importantes como la infección, necrosis o cicatrización excesiva. En este sentido, la membrana amniótica parece un sustrato ideal para la regeneración conjuntival, con resultados en principio superiores a los que ofrecen otras alternativas quirúrgicas disponibles hasta ahora.

Las úlceras corneales neurotróficas que no responden al tratamiento médico convencional presentan importantes dificultades para su curación, llegando muchas de ellas a la perforación ocular. En estos casos, y en otros tipos de defecto tisular del estroma corneal, el injerto de membrana amniótica ha demostrado también en algunas series su utilidad, aunque con periodos de seguimiento limitados.

Finalmente, los defectos epiteliales persistentes constituyen también un grupo de lesiones corneales que, cuando no responden al tratamiento médico, presentan un difícil manejo. En estos casos, que con frecuencia evolucionan hacia la ulceración, con

aparición de leucomas permanentes o incluso perforación, el trasplante de membrana amniótica podría también ser útil.

Los tres grupos mencionados incluyen patologías de difícil manejo con los tratamientos existentes hasta la fecha, y en los que el trasplante de membrana amniótica parece representar una alternativa terapéutica eficaz.

En los artículos presentados en este trabajo de investigación se recogen todos los casos de trasplante de membrana amniótica realizados por el autor en estas patologías durante los años 1999 y 2000 (en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y en el Instituto de Microcirugía Ocular), con el objeto de conocer la eficacia, seguridad y estabilidad de los resultados obtenidos con las distintas formas de implante, y con un periodo de seguimiento superior al de los trabajos publicados anteriormente. Asimismo, se analizan desde el punto de vista anatomopatológico algunos de los tejidos receptores meses después del implante, para conocer el comportamiento histológico de la membrana amniótica y sus mecanismos de reabsorción.

## **2.- INTRODUCCIÓN**



## **2.1.- ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR**

### **2.1.1.- CONJUNTIVA**

La conjuntiva es una membrana mucosa que recubre la superficie interna del párpado y la superficie anterior del globo ocular. Se compone de la conjuntiva palpebral, la conjuntiva de los fondos de saco y la conjuntiva bulbar, y es imprescindible para el mantenimiento de la integridad ocular. Además de proteger al globo ocular permite los movimientos de éste, y funciona como un reservorio de lágrimas. Ello, junto a la mucina secretada por las células caliciformes, permite la correcta lubricación de la superficie ocular. Por último, junto a la protección mecánica, la conjuntiva asegura también el aporte de agentes antimicrobianos y elementos inmunológicos. Por estos motivos, las alteraciones que se produzcan en la conjuntiva pueden conducir a la restricción de los movimientos oculares, a anomalías en la composición o la función de la película lagrimal, y disminuir la resistencia frente a agentes infecciosos. Además, si estas alteraciones son importantes, van a provocar también patología en el resto de las estructuras que componen la superficie ocular.

#### **2.1.1.1.- Anatomía de la conjuntiva**

La conjuntiva se extiende desde el limbo esclerocorneal hasta la unión mucocutánea del margen palpebral. Los fondos de saco conjuntivales permiten un movimiento independiente del globo ocular y el párpado. Los pliegues de la superficie conjuntival aumentan el área total de la conjuntiva y disminuyen el área de contacto entre conjuntiva bulbar y palpebral, reduciendo por tanto el roce que se produce entre ambas con los movimientos oculares.

El fondo de saco superior, mayor que el inferior, se mantiene por unas finas fibras musculares que van desde la superficie profunda del músculo elevador del párpado hasta la conjuntiva. Ello evita que la conjuntiva del fondo de saco superior caiga bloqueando la visión en los desplazamientos superiores del globo ocular. La conjuntiva temporal queda fijada también por unas finas fibras al tendón del músculo recto lateral, lo cual mantiene la posición de la conjuntiva en los movimientos horizontales. En la zona nasal no existe un verdadero fondo de saco, excepto en los movimientos de aducción. A este nivel, unas finas cintas fibrosas del tendón del músculo recto medio se insertan profundamente en el pliegue semilunar y la carúncula. Con la contracción del recto medio estas fibras se tensan y forman un fondo de saco medial durante la aducción. La superficie total del saco conjuntival en el adulto incluyendo la córnea es de 16 cm<sup>2</sup> en cada ojo (Records RE, 1994).

La carúncula está formada por un tejido carnososo, blando de unos 4-5 mm de ancho y unos 3-4 mm de alto, localizado en la zona interna de la fisura palpebral. Está adherida al recto medio y sigue al pliegue semilunar en los movimientos oculares. Presenta de 15 a 20 folículos pilosos asociados a glándulas sebáceas, y puede también contener acinos de las glándulas lagrimales accesorias, lóbulos de grasa, fibras de músculo liso, y raramente cartílago. Bajo la carúncula se encuentran algunas glándulas sebáceas, similares a las de Meibomio, que se abren a su superficie. El pliegue semilunar es, como su nombre indica, un pliegue de conjuntiva localizado a nivel del tercio interno de la conjuntiva bulbar y que se extiende hasta la carúncula. De hecho, correspondería a un fondo de saco evertido, y la ausencia de dicho fondo de saco en la zona medial es la que permite la eliminación de las lágrimas de la superficie ocular de una manera efectiva. El pliegue semilunar mide de 3 a 6 mm y puede contener un nódulo aberrante de cartílago, un lóbulo de grasa y melanocitos.

A nivel de la unión mucocutánea del margen palpebral existe una abrupta transición entre un epitelio escamoso, estratificado, queratinizado y el epitelio mucoso no queratinizado de la conjuntiva palpebral. A través de la transparente conjuntiva palpebral pueden observarse las glándulas de Meibomio como estructuras lobuladas amarillentas en el tarso del párpado superior e inferior, y con un trayecto perpendicular al margen palpebral. Sobre la unión mucocutánea se encuentra una banda hidrofóbica de lípidos secretados por las glándulas de Meibomio, y que separa la porción anterior seca y queratinizada del párpado, de la parte posterior húmeda y no queratinizada. La unión mucocutánea puede variar en relación a los orificios de las glándulas de Meibomio según cambios en la posición del párpado, ya que estos pueden alterar el área cubierta por el menisco lagrimal.

La conjuntiva tarsal se encuentra fuertemente adherida al tarso, por lo que no existe un plano tisular accesible para la disección. A lo largo de la superficie tarsal, y dos milímetros posterior al margen palpebral, se encuentra el surco subtarsal. Este surco corre paralelo al margen palpebral ocupando la mayor parte de la longitud del tarso. Entre el margen palpebral y el surco tarsal existen múltiples crestas y surcos que comunican con invaginaciones de las células caliciformes del epitelio conjuntival y que reciben el nombre de criptas de Henle. Las criptas son más numerosas en la conjuntiva nasal y alrededor del pliegue semilunar. Las glándulas lagrimales accesorias se localizan en la conjuntiva de los fondos de saco (glándulas de Krause) y en la conjuntiva palpebral por encima o dentro del tarso (glándulas de Wolfring).

La conjuntiva bulbar es más lisa y está menos adherida a los tejidos subyacentes que la conjuntiva tarsal. A nivel del limbo esclerocorneal se observan una serie de crestas dispuestas de forma radial desde la córnea hacia fuera y que reciben el nombre de empalizadas de Vogt. Estas crestas están formadas por elevaciones del epitelio y

condensaciones del estroma subyacente y pueden retener pequeños cuerpos extraños entre ellas.

#### 2.1.1.2.- Histología de la conjuntiva

El epitelio conjuntival varía en espesor y apariencia desde el margen palpebral hasta el limbo. A diferencia de otros epitelios escamosos estratificados, las células caliciformes se encuentran dispersas y adheridas a las células epiteliales adyacentes. La localización de las células germinales para el epitelio conjuntival y las células caliciformes sigue aún sin conocerse con certeza.

##### - Conjuntiva palpebral y de los fondos de saco.

El epitelio conjuntival de los fondos de saco se compone de dos o tres capas celulares en el tarso superior y de cuatro o cinco capas celulares en el tarso inferior. A nivel de los fondos de saco el epitelio tiende a ser más columnar, mientras que el epitelio conjuntival palpebral es más cuboide. Con frecuencia se observan quistes intraepiteliales producidos por la oclusión de las criptas de Henle, conteniendo en su interior mucina secretada por las células caliciformes.

##### - Conjuntiva bulbar

El epitelio de la conjuntiva bulbar es de tipo escamoso estratificado y lo componen de seis a nueve capas de células dispuestas unas sobre otras de una manera irregular. Las células epiteliales basales e intermedias contienen más y mayores mitocondrias que el epitelio corneal, lo cual sugiere un mayor nivel de metabolismo oxidativo. Las membranas celulares epiteliales presentan abundantes pliegues e interdigitaciones



incompletas con las células adyacentes. Esta configuración causa amplios espacios intercelulares en los cuales pueden acumularse anticuerpos y células inflamatorias procedentes de los vasos subyacentes. Además, tanto elementos infecciosos como las sustancias aplicadas tópicamente pueden acceder a los espacios intracelulares y de allí a los capilares subconjuntivales y a la circulación sistémica. En la superficie de las microvellosidades o interdigitaciones que forma el epitelio conjuntival se encuentra un glucocálix secretado por unas vesículas intraepiteliales que contienen mucina (Dilly PN, et al.1981). Sus moléculas glucoproteicas de cadena larga mantienen la estabilidad de la película lagrimal anclando la mucina producida por las células caliciformes a la superficie conjuntival. El epitelio de la conjuntiva bulbar se encuentra adherido a una fina lámina basal, discontinua en algunos lugares, con relativamente pocos hemidesmosomas. Esta configuración permite el paso de otras células al estroma conjuntival o epitelio, de manera que podemos encontrar linfocitos, melanocitos, y células de Langerhans en la región suprabasal del epitelio.

- Limbo esclerocorneal

Al igual que ocurre en el margen palpebral, a nivel del limbo se produce una transición gradual del epitelio columnar, estratificado, no queratinizado de la conjuntiva al epitelio escamoso, estratificado, no queratinizado de la córnea.

Presenta de siete a diez capas celulares, con unas adherencias célula-célula y célula-sustrato similares a las de la córnea. Las zonas de epitelio escamoso estratificado a nivel del margen palpebral y limbo corresponden a las áreas de contacto más frecuente y mayor presión entre la superficie palpebral y bulbar. Este factor mecánico de movimiento palpebral y presión aposicional podría ser el principal estímulo para la formación de un epitelio escamoso estratificado en el margen palpebral y limbo (Podhorany G, et al. 1967). En la capa basal del limbo esclerocorneal residen las células germinales del epitelio corneal.

- Células caliciformes conjuntivales

Las células caliciformes son glándulas unicelulares secretoras de mucina, y representan aproximadamente del 5 al 10 % de las células basales. No se sabe si estas glándulas son holocrinas o apocrinas, y tampoco se conoce si existen precursores o células germinales para las células caliciformes ni el lugar donde éstos podrían residir. El núcleo y los orgánulos citoplasmáticos se encuentran desplazados hacia la zona basal de la célula, mientras que la zona apical contiene acúmulos de mucina que dan el aspecto de copa o cáliz. Existen fuertes adhesiones entre ellas y las células adyacentes.

La densidad de células caliciformes se encuentra entre 1000 y 56.000 células / mm<sup>2</sup> y se pueden encontrar aisladas o formando grupos. Son más numerosas en la conjuntiva tarsal y bulbar inferonasal (Kessing SV. 1968, Allansmith MR, et al. 1981) y escasas en la zona temporal y limbo. La mayor densidad de células caliciformes se encuentra en los adultos jóvenes y posteriormente disminuye hasta los 30 años, edad a partir de la cual permanece más o menos constante (Kessing SV. 1968). La densidad de células caliciformes se encuentra reducida en algunas enfermedades oculares locales (queratoconjuntivitis sicca, penfigoide ocular cicatricial, síndrome de Stevens-Johnson, y causticaciones) (Ralph RA. 1975, Nelson JD, et al. 1984) y puede verse influenciada por distintos factores ambientales externos (humedad, temperatura, polución) (Waheed MA, et al. 1970). La pérdida de células caliciformes es un signo precoz de metaplasia escamosa (Tseng SCG, et al. 1984).

- Sustancia propia

La conjuntiva descansa sobre un tejido conectivo fibrovascular, que varía en grosor y densidad. En la conjuntiva palpebral la sustancia propia es fina y compacta, y se adhiere al tarso de una manera más firme en el párpado superior que en el inferior. En los fondos de saco es gruesa y poco adherida al globo ocular y al septo orbitario. En la zona temporal se extiende hasta el canto externo y en la zona nasal hasta el pliegue semilunar. En el limbo esclerocorneal es fina y compacta, y a este nivel se fusiona con la cápsula de Tenon y los tejidos epiesclerales.

La sustancia propia puede dividirse en dos capas: superficial y profunda. La capa superficial se compone de tejido conectivo poco denso. Esta capa no se encuentra presente en el momento del nacimiento y empieza a formarse a las 8–12 semanas de vida. En el adulto hay una capa de unas 50 –70 micras de espesor compuesta por linfocitos (capa adenoide), más prominente en la zona inferior. En la conjuntiva normal, sin inflamación, no existen unos verdaderos folículos con centros germinales; sin embargo, los linfocitos pueden ser estimulados y formar folículos reactivos con centro germinal. Los folículos tienden a elevar el epitelio conjuntival formando pequeños nódulos redondeados. El crecimiento de un vaso en el centro del folículo hace que este cambie y pase a convertirse en una papila, la cual generalmente indica una reacción inflamatoria de mayor cronicidad.

La capa profunda, fibrosa, contiene nervios y vasos sanguíneos y linfáticos. Los capilares proceden de las arterias ciliares anteriores, las cuales son rama de la arteria oftálmica, y drenan al plexo epiescleral. Los vasos linfáticos drenan en el plexo epiescleral, el cual se une al sistema de drenaje de los párpados que a su vez drena en los ganglios submandibular y preauricular. La inervación sensorial procede de la división oftálmica del nervio trigémino ( $V_1$ ).

### 2.1.1.3.- Vascularización de la conjuntiva

La conjuntiva palpebral y los párpados poseen una vascularización común que procede de las ramas terminales de la arteria oftálmica: arterias dorsal, nasal, frontal, supraorbitaria y lacrimal. Las arterias facial, superficial, temporal e infraorbitaria, ramas de la arteria facial, también aportan un suplemento vascular.

En la conjuntiva bulbar el aporte vascular procede de ramas de las arterias ciliares anteriores, que a su vez son continuación de ramas musculares que vascularizan a los músculos rectos, y que forman el plexo marginal superficial del limbo. Ramas del sistema arterial ciliar anterior bulbar se anastomosan en los fondos de saco con vasos recurrentes que proceden de la conjuntiva palpebral. Los vasos conjuntivales mantienen su distribución superficial, y una circulación más profunda proporciona el aporte vascular a las arcadas corneales periféricas, iris y cuerpo ciliar. Los procesos inflamatorios de la conjuntiva producen una congestión o hiperemia de los vasos superficiales, más intensa al alejarse del limbo; mientras que los procesos inflamatorios de la córnea, iris o cuerpo ciliar van a producir una dilatación de los vasos profundos, más intensa alrededor del limbo.

Los capilares conjuntivales son en general fenestrados, a excepción de algunos de los vasos profundos. La fenestración permite un paso más rápido del contenido luminal durante los procesos inflamatorios. En la irritación, inflamación o infección conjuntival, y en la inflamación intraorbitaria severa, se produce una pérdida de proteínas plasmáticas de los capilares conjuntivales más rápida de lo que el fluido puede pasar entre las células epiteliales. Este proceso causa un engrosamiento del epitelio y una quemosis de la conjuntiva (Lockard I, et al. 1967). La dilatación vascular también varía durante el ciclo menstrual (Landesman R, et al. 1953).

El drenaje venoso de la conjuntiva palpebral se produce a partir de las venas postarsales del párpado, que se unen a las ramas faciales profundas de la vena facial anterior y el plexo pterigoideo. Las venas de la conjuntiva bulbar drenan al plexo venoso episcleral, el cual a su vez drena al plexo intraescleral.

#### 2.1.1.4.- Drenaje linfático de la conjuntiva

La conjuntiva contiene una rica red anastomótica de vasos linfáticos que drena al plexo episcleral. Muchos pequeños e irregulares vasos linfáticos nacen a 1 mm del limbo y se anastomosan formando grandes vasos colectores en la capa profunda de la sustancia propia. Ocasionalmente, éstos pueden visualizarse como vasos muy dilatados e irregulares denominados linfangiectasias. Los vasos linfáticos de la conjuntiva se unen a los de los párpados y drenan medialmente a los ganglios linfáticos submandibulares y lateralmente a los ganglios preauriculares.

#### 2.1.1.5.- Inervación de la conjuntiva

La inervación sensorial de la conjuntiva es esencial para mantener una conjuntiva y una superficie ocular sana. La conjuntiva está ricamente inervada por terminaciones nerviosas libres que procedentes de las ramas lacrimonasal, supraorbitaria, supratroclear e infraorbitaria, que a su vez son rama de la rama oftálmica del nervio trigémino ( $V_1$ ). El umbral para la sensibilidad táctil conjuntival es 100 veces superior al que existe en el centro de la córnea. Hay menor sensibilidad en el área perilimbal y mayor sensibilidad en la conjuntiva palpebral marginal (Records RE. 1994). La sensación de dolor puede aparecer cuando existe inflamación, un defecto epitelial o ante una situación de hipoxia, ya que todos ellos causan una alteración de las terminaciones nerviosas.

Algunos péptidos de pequeño tamaño producidos en las situaciones de inflamación pueden estimular las terminaciones nerviosas y aumentar el dolor. Además la inflamación puede también disminuir el umbral de dolor. Las sensaciones más comunes que refieren los pacientes son picor, quemazón, y sensación de cuerpo extraño.

#### 2.1.1.6.- Flora conjuntival habitual

La conjuntiva dispone de una buena protección frente a las infecciones. Los principales mecanismos de defensa incluyen el barrido mecánico que produce el parpadeo, y la presencia de lisozima, lactoferrina y otros factores antimicrobianos en la lágrima. También la llegada de anticuerpos y células inflamatorias al epitelio conjuntival procedentes de la circulación sistémica ayuda a aumentar la protección frente a las infecciones. Estos mecanismos de defensa permiten la presencia de algunos gérmenes en la superficie ocular sin que produzcan patología. Sin embargo, cualquier alteración en los mecanismos de defensa conduce a un aumento en el número y severidad de las infecciones oculares.

En la conjuntiva de sujetos sanos se encuentra con frecuencia *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus viridans*. Además, un 10% de adultos, un 5% de niños y un 1% de recién nacidos presentan cultivos positivos a hongos (Hammeke JC, et al. 1960). Cuando se encuentra un organismo en un ojo, normalmente el cultivo es también positivo para el mismo germen en el ojo contralateral.

## 2.1.2.- CÓRNEA

La córnea es la única porción de la túnica externa del globo ocular que es transparente lo cual le permite tener una función refractiva. Además posee una gran resistencia mecánica y actúa de barrera químicamente impermeable entre el ojo y el ambiente. Respecto a la visión, la córnea se encuentra especializada estructural y funcionalmente para conseguir las propiedades ópticas requeridas. Es una estructura avascular que absorbe el oxígeno del ambiente en la superficie corneal anterior y que obtiene la mayoría de nutrientes adicionales a partir del humor acuoso en la superficie corneal posterior. Algunas de las funciones protectoras y de las propiedades ópticas de la córnea dependen de los tejidos adyacentes, como la conjuntiva y las glándulas lagrimales. La mucina y la lágrima que éstas producen se extiende sobre la córnea gracias al movimiento de parpadeo, resultando en una superficie corneal anterior lisa. La resistencia mecánica de la córnea se debe a su matriz de colágeno, distinta a la de la piel o a la de la esclera contigua, y que requiere la presencia de mecanismos que regulen la hidratación para mantener la transparencia. Para la función de protección, la córnea se encuentra dotada de una inervación extraordinariamente sensitiva. A diferencia de la piel, que posee unas terminaciones nerviosas anatómicamente complejas, la córnea cuenta con terminaciones nerviosas libres, ya que receptores neurales especializados podrían comprometer la transparencia corneal.

### 2.1.2.1.- Anatomía de la córnea y propiedades ópticas

La córnea es un tejido avascular, transparente que se encuentra expuesto al ambiente externo. La superficie corneal anterior está cubierta por la película lagrimal mientras que la superficie posterior está directamente bañada por el humor acuoso. La córnea transparente se continua con la esclera opaca y con la conjuntiva semitransparente. La

zona de transición entre la córnea y la esclera es el limbo, altamente vascularizado y en el que se encuentra el reservorio de células germinales del epitelio corneal. La forma de la superficie corneal anterior es convexa y esférica. Esta superficie anterior es transversalmente oval como resultado de una esclerización en la zona superior e inferior.

La córnea de un adulto mide de 11 a 12 mm horizontalmente y de 9 a 11 mm verticalmente. Su grosor es aproximadamente de 0.55 mm en el centro, y aumenta gradualmente hacia la periferia de la córnea donde tiene alrededor de 0.7 mm. El radio de curvatura no es constante en toda la superficie corneal, siendo más curvo en el centro y más plano en la periferia, lo cual da lugar a una superficie esférica. El radio de curvatura es de 7.5 – 8.0 mm en la zona óptica de los 3 mm centrales, donde la superficie es casi esférica. El poder refractivo de la córnea es de 40 a 44 dioptrías. De esta manera, la córnea proporciona aproximadamente  $\frac{2}{3}$  del poder refractivo total del ojo.

Las propiedades ópticas de la córnea vienen determinadas por distintos factores: contorno, transparencia, regularidad de su superficie e índice refractivo. El factor fundamental en la transparencia es la disposición de las fibras de colágeno en el estroma. Tanto el diámetro medio de las fibras de colágeno como la distancia media entre ellas es muy homogéneo y mide menos de la mitad de la longitud de onda de la luz visible (400 a 700 nm). Esta relación anatómica se cree que es la responsable de que la luz dispersada por cada fibra de colágeno cuando incide un rayo sea anulada por la interferencia de otros rayos dispersados, lo cual permite el paso de la luz a través de la córnea. Si el diámetro de las fibras de colágeno o la distancia entre ellas varía (como en la fibrosis o el edema), la córnea pierde su transparencia y se produce la dispersión de los rayos de luz incidentes.



El epitelio corneal y la película lagrimal contribuyen de una manera crucial en el mantenimiento de una superficie corneal lisa y regular. En los pacientes con síndrome de ojo seco la pérdida de una lubricación adecuada conduce a la queratopatía punteada superficial, y por tanto a una superficie irregular. Por último, la superficie esfero cilíndrica de la córnea normalmente posee un eje de mayor y otro de menor curvatura, situados a 90°. Si el contorno corneal se ve alterado por alguna circunstancia patológica (cicatrización, adelgazamiento, queratocono...) aparecerá el astigmatismo, ya sea en su forma regular o irregular.

#### 2.1.2.2.- Histología y fisiología de la córnea

Las células que encontramos en la córnea son las células epiteliales, los queratocitos (fibroblastos estromales) y las células endoteliales. Las células epiteliales derivan del ectodermo epidermal, mientras que los queratocitos y las células endoteliales tienen su origen en la cresta neural (neuroectodermo). La córnea está formada por tres capas celulares y dos interfases: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (figura 1). Los distintos componentes interactúan entre ellos para mantener la integridad y función de estructura.

##### - Epitelio corneal

El epitelio corneal se compone de células epiteliales escamosas, estratificadas, no queratinizadas. El grosor del epitelio es de unas 50  $\mu\text{m}$ , lo cual representa aproximadamente un 10 % del espesor corneal total. Dicho grosor se mantiene constante en toda la superficie corneal. Sin embargo, si se produce un adelgazamiento estromal (por ejemplo tras la ablación del estroma con láser excimer o tras una ulceración) el grosor del epitelio sí que aumenta mediante una hiperplasia epitelial, en

un intento de mantener la superficie epitelial a la misma altura (Hanna KD, et al. 1989). Según este dato, probablemente el grosor del epitelio corneal venga regulado, no por el número de capas celulares, sino por el estado del estroma subyacente.

El epitelio corneal se compone de cinco a siete capas de tres tipos diferentes de células epiteliales: de dos a tres capas de células superficiales, dos a tres capas de células aladas, y una monocapa de células basales columnares. Éstas últimas se encuentran adheridas a la membrana basal, que a su vez descansa sobre la membrana de Bowman. La estructura del epitelio corneal es similar a la de la piel, aunque sin queratina. Sólo las células basales tiene actividad proliferativa, y las células hijas gradualmente emergen hacia la superficie de la córnea diferenciándose primero en células aladas y posteriormente en células superficiales. Este proceso de diferenciación tarda entre 7 y 14 días antes de que las células superficiales sean descamadas a la película lagrimal (Hanna C, et al. 1961).

El epitelio, junto a la película lagrimal, contribuye al mantenimiento de una superficie corneal ópticamente lisa. En los pacientes con síndrome de ojo seco la superficie corneal se deshidrata, lo que conduce a la aparición de extensas irregularidades en ella. Esta falta de regularidad en la superficie epitelial degrada la imagen óptica y produce visión borrosa. Otra importante función fisiológica del epitelio corneal es actuar como una barrera a las agresiones externas biológicas y químicas. La presencia de fuertes adhesiones intercelulares dificulta el paso de sustancias químicas a las capas más internas de la córnea. De la misma manera dificulta que la lágrima pueda penetrar fácilmente en el estroma, lo cual produciría un edema estromal que interferiría con la transmisión de la luz a través de la córnea. El epitelio, por ser la capa más externa de la córnea, está continuamente expuesto a la agresión o invasión de agentes infecciosos y por ello son tan importantes las fuertes adhesiones intercelulares y la rápida regeneración celular.



**Figura 1.** Corte histológico de las capas de la córnea: epitelio (1), membrana de Bowman (2), estroma (3), membrana de Descemet (4) y endotelio (5)

Los componentes celulares del epitelio también juegan un papel importante en la inmunología corneal. Las células de Langerhans se encuentran en abundancia en la proximidad del limbo esclerocorneal, mientras que no se han encontrado en la zona central de córneas normales (Hacket DJ, et al. 1981, Gillette TE, et al. 1982). Las células de Langerhans son macrófagos especializados que derivan de la médula ósea y se cree que tienen un papel importante en el procesamiento de los antígenos. Estas células expresan los antígenos linfocitarios humanos (HLA) de clase II, y parece ser que participan en el brazo aferente de la respuesta inmune ocular presentando el

antígeno al huésped (Rubsamen PE, et al. 1984). Su número aumenta en condiciones de inflamación ocular y disminuye con el uso de corticoides (Whitsett CF, et al. 1984). Ante lesiones de la córnea central, las células de Langerhans periféricas migran hacia el centro.

- **células superficiales:** en la superficie del epitelio corneal se encuentran de dos a tres capas de células en estado terminal de diferenciación. Se trata de células poligonales, extremadamente planas, con un diámetro de 40 a 60  $\mu\text{m}$  y un grosor de 2 a 6  $\mu\text{m}$ . La superficie de estas células se encuentra cubierta de microvellosidades que aumentan el área total de superficie y permiten un mayor intercambio activo de oxígeno y nutrientes entre la célula y la lágrima.

La membrana celular epitelial es una bicapa lipídica e hidrofóbica. En ella se localizan numerosas moléculas glucolipídicas o glucoproteicas, y estas partículas a su vez se encuentran cubiertas por oligosacáridos. Colectivamente, esta estructura se denomina glucocálix y mantiene las propiedades hidrofílicas de las células epiteliales. El glucocálix interactúa con la capa mucosa de la película lagrimal. La estructura normal en tres capas de la película lagrimal depende de la presencia de glucocálix y mucina para su interacción con la córnea. La pérdida de glucocálix en las células del epitelio corneal y de células caliciformes en el epitelio conjuntival produce inestabilidad de la película lagrimal.

Como ya se ha comentado anteriormente, las células superficiales se encuentran fuertemente adheridas entre ellas mediante desmosomas y complejos de unión, lo cual previene la penetración de sustancias a través de los espacios intercelulares. Si se interrumpe la continuidad del epitelio corneal el material acuoso puede fácilmente penetrar en el estroma. Estas características anatómicas representan la función de barrera mecánica del epitelio corneal, que a su vez puede ser evaluada midiendo las cantidades de fluoresceína en el estroma corneal mediante

fluorofotometría. En algunos casos, como la diabetes, esta barrera se encuentra alterada.

- **células aladas:** por debajo de las células superficiales encontramos de dos a tres capas de células llamadas aladas por su forma, y que se encuentran en un estado intermedio de diferenciación entre las células basales y las superficiales. Las células aladas presentan interdigitaciones entre ellas, y sus organelas citoplasmáticas son relativamente escasas.
- **células basales:** la monocapa de células basales columnares, cuboides, descansa sobre la membrana basal. De entre los diferentes tipos de células epiteliales corneales, sólo las células basales poseen actividad mitótica, formándose a partir de ellas las células aladas y superficiales. Como corresponde a unas células con gran actividad mitótica, contienen mayor cantidad de organelas intracelulares, ribosomas libres, retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, centriolos, microfilamentos, microtúbulos, y gránulos de glucógeno que las células aladas o superficiales. El núcleo de las células basales se encuentra desplazado anteriormente. Existen interdigitaciones en las zonas apical y lateral, además de distintos mecanismos de unión: desmosomas, complejos de unión (zonula adherens). La superficie posterior de las células basales es plana, y se une a la membrana basal mediante hemidesmosomas unidos a fibras de anclaje de colágeno tipo VII (Gipson IK, et al. 1987). El colágeno tipo VII, una molécula larga e infrecuente, es secretado por las células basales epiteliales. Las fibras de anclaje penetran la membrana basal y llegan al estroma, donde forman placas de anclaje con colágeno de tipo I, el cual representa el principal componente del estroma corneal. Estas fibras de anclaje son básicas para mantener la adhesión de las células basales con la membrana basal y el estroma.

- **membrana basal:** como en otras localizaciones del cuerpo, las células basales del epitelio corneal secretan y forman una membrana basal de aproximadamente 40 a 60 nm de espesor. Con microscopía electrónica de transmisión se diferencian dos zonas en su interior: la lámina lúcida (capa más pálida, adyacente a la membrana celular) y la lámina densa (capa más oscura). Los principales componentes de la membrana basal son el colágeno tipo IV y la laminina. La membrana basal constituye un excelente sustrato sobre el que las células pueden migrar, y su presencia entre el epitelio basal y el estroma subyacente fija la polaridad de las células epiteliales. Por este motivo se cree que la membrana basal es importante en el mantenimiento de un epitelio corneal estratificado y bien organizado, y por tanto juega un importante papel en los procesos de reparación epitelial. Tras una desepitelización, la nueva membrana basal tarda más de una semana en formarse, y la fibronectina es la sustancia que temporalmente actúa como matriz durante este periodo. Por tanto, la fibronectina juega un importante papel en la fase aguda, mientras que la laminina y el colágeno tipo IV son esenciales en el mantenimiento epitelial definitivo.

- Membrana de Bowman:

La membrana de Bowman es una estructura acelular que se encuentra en la interfase entre el epitelio corneal y el estroma corneal de los humanos y otros mamíferos. En realidad no es exactamente una membrana sino una simple condensación de fibras de colágeno y proteoglicanos, con unas 12  $\mu\text{m}$  de espesor. Las fibras de colágeno en la membrana de Bowman son primariamente colágeno de tipo I y III, y su diámetro es de 20 – 30 nm, aproximadamente dos tercios del grosor que encontramos en el estroma corneal.

La membrana de Bowman se considera la porción anterior de la córnea, con sus fibras de colágeno dispuestas al azar. La superficie anterior de la membrana de Bowman,

sobre la que se encuentra la membrana basal epitelial, es totalmente lisa y puede independizarse del epitelio corneal. Las fibras de colágeno de la membrana de Bowman están sintetizadas por los queratocitos estromales, y por tanto existe una continuidad entre las fibras de colágeno estromales y las de la membrana de Bowman. Se cree que la membrana de Bowman tiene una función importante en el mantenimiento de la estructura epitelial, aunque su función fisiológica sigue representando una incógnita. Las funciones biológicas que clásicamente se habían atribuido a ésta, hoy se le atribuyen a la membrana basal epitelial. La membrana de Bowman no se regenera tras una lesión, y recientes trabajos con fotoablación con láser excímer han demostrado que el epitelio normal se puede formar y mantener incluso ante una ausencia de membrana de Bowman. Además, algunos mamíferos que no poseen membrana de Bowman también presentan una estructura epitelial bien organizada.

#### - Estroma

El estroma representa más del 90% del espesor corneal, y las principales características de la córnea (como su resistencia física y su transparencia) dependen principalmente del estroma corneal.

El estroma corneal se compone de matrices extracelulares, queratocitos (fibroblastos corneales) y fibras nerviosas. Los componentes celulares ocupan sólo el 2% al 3% del volumen total del estroma, mientras que el resto está formado por varias matrices extracelulares, principalmente colágeno y glicosaminoglicanos. El colágeno representa más del 70% del peso seco de la córnea, siendo principalmente colágeno tipo I, con menores cantidades de colágeno tipo III, V y VI (Birk DE, et al. 1986, Yue BYJT, et al. 1986, Kern P, et al. 1991).

Las fibras de colágeno en el estroma corneal presentan una distribución extremadamente regular, lo cual contribuye a su transparencia. El diámetro de las fibras es totalmente uniforme (de 22.5 nm a 35 nm) (Komai Y, et al. 1991), y la distancia entre las fibras es también uniforme y constante ( $41.4 \pm 0.5$  nm). Cualquier alteración en la uniformidad de la distancia interfibras, como ocurre en el edema o la cicatrización estromal, puede conducir a la pérdida de la transparencia corneal. Las fibras de colágeno forman aproximadamente unas 300 lamelas en el estroma corneal, y cada una de estas lamelas se dispone paralela a la superficie corneal, de limbo a limbo (Hamada R, et al. 1972).

Los queratocitos tiene una forma alargada y se encuentran entre las lamelas de colágeno formando mallas. Estas mallas o redes tridimensionales se originan por las numerosas uniones intercelulares que se producen en los extremos de los procesos del queratocito. A través de estas uniones los queratocitos intercambian información, de manera que todas ellas funcionan como un sistema celular único. Cuando se produce una lesión en el estroma corneal (incisión, queratectomía, fotoablación con láser, ...) los queratocitos que se hallan próximos a la zona lesionada pierden sus conexiones con la red celular y pasan a tener un comportamiento independiente. Estos queratocitos activados juegan un papel esencial en los procesos de curación estromal y en la patogénesis de las ulceraciones corneales. Los queratocitos son los responsables del mantenimiento de los componentes estromales. Ellos sintetizan las moléculas de colágeno (pro-colágeno) y los glicosaminoglicanos. Al mismo tiempo, los queratocitos sintetizan enzimas colagenolíticas. Por tanto, la homeostasis bioquímica y estructural del estroma corneal se mantiene a través de la regulación celular de la síntesis y degradación de la matriz extracelular. Por ejemplo, en la zona de un defecto epitelial los queratocitos activados pueden aumentar la síntesis y secreción de colagenasas, lo que contribuye a la lisis estromal (Nishida T. 1997). La actividad mitótica de los queratocitos es baja in vivo en condiciones normales, cuando se encuentran rodeados de colágeno organizado. Sin embargo, los queratocitos proliferan



activamente cuando son cultivados in vitro, lo que sugiere que la matriz extracelular que rodea a estas células puede regular su actividad mitótica (Nishida T, et al. 1988). Cuando los queratocitos se cultivan con colágeno, éstos desarrollan una estructura tridimensional con uniones intercelulares y disminuyen su actividad mitótica (Nishida T, et al. 1988), asemejándose a los del estroma in vivo.

- Membrana de Descemet

La membrana de Descemet, que corresponde a la membrana basal del endotelio, está formada básicamente por colágeno tipo IV y laminina, y su grosor aumenta progresivamente desde el nacimiento ( $3\mu\text{m}$ ) hasta la edad adulta ( $8-10\mu\text{m}$ ). Las fibras de colágeno del estroma que en la parte anterior se continúan con la membrana de Bowman, en la parte posterior se mantienen independientes de la membrana de Descemet. La membrana de Descemet es fuerte y resistente a la acción de las colagenasas de manera que en algunas ulceraciones estromales ésta puede permanecer intacta dando lugar a un descematocele.

- Endotelio

La superficie posterior de la membrana de Descemet se encuentra recubierta por una monocapa de células endoteliales corneales formando un mosaico. Estas células tienen una forma hexagonal y un tamaño uniforme en condiciones normales ( $5\mu\text{m}$  de grosor y  $20\mu\text{m}$  de ancho). En el adulto joven normal la densidad celular es de aproximadamente  $3500\text{ células/mm}^2$  y de éstas entre un 70 y un 80 % deben presentar la forma hexagonal.

Las células endoteliales de la córnea humana proliferan en cultivos in vitro pero no lo hacen in vivo, por lo que se cree que algunos factores del humor acuoso o del entorno

celular de la córnea puedan afectar a su capacidad mitótica. Por este motivo la densidad de células endoteliales disminuye progresivamente con la edad. In vivo, cuando por envejecimiento, inflamación mantenida o traumatismo quirúrgico se produce una pérdida endotelial, las células circundantes aumentan su tamaño y se extienden para cubrir la zona descubierta.

La principal función fisiológica del endotelio corneal es regular el contenido en agua del estroma, que normalmente es de aproximadamente el 80 %. Los sistemas de transporte iónico de las células endoteliales contrarrestan el paso osmótico de agua desde el humor acuoso hacia el estroma. Por este motivo una pérdida endotelial importante conduce a un edema corneal estromal y por consiguiente a una disminución de la transparencia de la córnea.

#### 2.1.2.3.- Aporte vascular de la córnea

La córnea es uno de los pocos tejidos avasculares. Sin embargo, aunque la córnea sana no contenga vasos, algunos factores derivados de la sangre juegan un papel importante en el metabolismo corneal y los procesos de reparación tisular. Las arterias ciliares anteriores, ramas de la arteria oftálmica, forman una arcada vascular a nivel del limbo. Esta arcada, a su vez, se anastomosa con terminales de la rama facial, procedente de la arteria carótida externa. Por tanto, los componentes de la sangre que podemos encontrar en la córnea proceden tanto de la arteria carótida externa como de la interna.

#### 2.1.2.4.- Aporte de oxígeno y nutrientes

Las células epiteliales y endoteliales de la córnea son metabólicamente muy activas, y para mantener estas actividades celulares se requiere adenosin trifosfato (ATP) como fuente de energía. Generalmente, la degradación de la glucosa a través de la glucólisis genera ATP bajo condiciones aerobias. Por tanto, el aporte de glucosa y oxígeno es esencial para mantener las funciones normales de la córnea. La glucosa se obtiene por difusión a partir del humor acuoso (incluso las células epiteliales corneales dependen de la glucosa que procede del humor acuoso).

Por otro lado, el aporte de oxígeno procede fundamentalmente de la difusión a partir de la lágrima, que a su vez lo capta del aire ambiental. Por tanto, la exposición directa de la lágrima con la atmósfera es esencial para el aporte de oxígeno a la córnea. Una pequeña parte de las necesidades de oxígeno de la córnea se consiguen a partir de la difusión desde el humor acuoso y la circulación límbica. La pérdida del aporte de oxígeno, como ocurre durante el uso de lentes de contacto, puede producir hipoxia corneal con edema estromal.

#### 2.1.2.5.- Inervación de la córnea

La córnea es una de los tejidos del cuerpo con mayor inervación y mayor sensibilidad, y consecuentemente en ella se encuentran una gran cantidad de terminaciones nerviosas. Los nervios sensoriales proceden de los nervios ciliares de la rama oftálmica del trigémino. Los nervios ciliares largos dan lugar al anillo nervioso perilímbico. Las fibras nerviosas penetran en la córnea de manera radial a nivel del estroma profundo periférico, y desde allí se desplazan anteriormente formando un plexo subepitelial terminal (Hogan MJ, et al. 1971). Las fibras nerviosas pierden su

mielinización poco después de penetrar en córnea clara, atraviesan la membrana de Bowman, y terminan a nivel de las células epiteliales aladas. Desde el punto de vista clínico, la pérdida del epitelio superficial expone las terminaciones nerviosas, produciendo un severo dolor ocular. La córnea también contiene fibras nerviosas del sistema autónomo simpático. Algunos estudios histoquímicos revelan la presencia de varios neurotransmisores, como la sustancia P (Tervo K, et al. 1982), catecolaminas (Toivanen M, et al. 1987) y acetilcolina (Lind GJ, et al. 1993).

### 2.1.3.- LIMBO ESCLEROCORNEAL. ANATOMÍA Y FUNCIÓN

El limbo es la transición anatómica entre la esclera - conjuntiva y la córnea, y en las capas basales de su epitelio se encuentran las células germinales o "stem cells" del epitelio corneal. En el limbo, el epitelio cilíndrico estratificado de la conjuntiva se continúa con el epitelio escamoso estratificado de la córnea, y la sustancia propia vascular del epitelio conjuntival finaliza en un rico plexo vascular límbico. Este plexo vascular se cree que es importante para el aporte de nutrientes y oxígeno a las células germinales, las cuales poseen una importante actividad mitótica.

Muchos son los datos que todavía no se conocen a cerca de estas células germinales del epitelio corneal. Los primeros estudios sobre el tema documentaron un movimiento centrípeto de las células del epitelio corneal desde el limbo hacia la córnea central, sugiriendo que las células precursoras se encontraban en el limbo (Hanna C. 1966). Este dato fue también reforzado al observar que era imposible crear defectos epiteliales permanentes en animales de laboratorio sin lesionar el limbo (Srinivasan BD, et al. 1979). Finalmente, se demostró que el daño de todo el limbo, o de una porción de éste, producía un crecimiento de la conjuntiva sobre la córnea, dando lugar a un epitelio más pálido e irregular, a neovascularización y a erosiones recidivantes o defectos epiteliales persistentes (Chen JJ, et al. 1990, Huang AJ, et al. 1991). Hoy

sabemos que estos signos son debidos a una insuficiencia de las células germinales del limbo, y permiten realizar el diagnóstico clínico de insuficiencia límbica.

#### 2.1.4.- PELÍCULA LAGRIMAL. ANATOMÍA Y FUNCIÓN

Poseer una película lagrimal estable es imprescindible para tener una buena visión y una superficie ocular sana, y su mantenimiento es un proceso muy complejo. Las funciones estructurales de la película lagrimal son proporcionar una superficie refractiva lisa y uniforme, lubricar la superficie ocular y, por tanto, facilitar un movimiento confortable de los párpados, minimizando el trauma mecánico de éstos. Además, la película lagrimal también es un componente importante en la defensa de la superficie ocular contra la invasión microbiana (McNamara NA, et al. 1998) y las agresiones ambientales. La lágrima contiene muchos factores biológicamente importantes como electrolitos, glucosa, inmunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, albúmina y oxígeno. También contiene una gran cantidad de sustancias biológicamente activas como histamina, prostaglandinas, factores de crecimiento e interleuquinas (Ohashi Y, et al. 1989, Van Setten GB, et al. 1994). Por tanto, la película lagrimal no sólo sirve como un lubricante y una fuente de nutrientes para el epitelio corneal sino también como una fuente de factores reguladores para el mantenimiento y reparación del epitelio corneal. Algunas de las sustancias biológicamente activas citadas anteriormente han demostrado capacidad para modular la migración, proliferación y diferenciación del epitelio corneal (Watanabe K, et al.1987, Nishida T, et al. 1992).

El grosor de la película lagrimal es de alrededor de 0.7 mm y el volumen es  $6.5 \pm 0.3$   $\mu$ l (Scherz W, et al. 1974). La película lagrimal se compone de mucina secretada por las células caliciformes y el epitelio de la conjuntiva, un componente acuoso secretado

por las glándulas lagrimales, y lípidos secretados por las glándulas de Meibomio. Los tres componentes se unen formando una estructura trilaminar (Dilly PN. 1994). La mucina forma la capa más próxima a la superficie corneal e interacciona directamente con el glucocálix conjuntival, proporcionando una estructura hidrofílica sobre la cual se encuentra la capa acuosa. La naturaleza hidrofílica de la mucina facilita la distribución de la capa acuosa. La superficie acuosa está a su vez cubierta por lípidos secretados por las glándulas de Meibomio. Esta capa lipídica es esencial para retrasar la evaporación y prevenir una rotura precoz de la película lagrimal. La estructura trilaminar proporciona una estabilidad que permite que el ojo permanezca abierto de 10 a 20 segundos sin interrupción de la película lagrimal en individuos normales (Mengher LS, et al. 1986). Los pacientes con alteraciones en la secreción de mucina o de las glándulas de Meibomio tienen una marcada reducción de la estabilidad lagrimal, lo cual da lugar a problemas de disconfort y visión borrosa (Lemp MA, et al. 1973). El efecto del parpadeo redistribuye una película lagrimal fresca sobre la superficie ocular aproximadamente cada 5-6 segundos (Carney LG, et al. 1982).

La insuficiencia de la película lagrimal puede ocurrir como consecuencia de un déficit en cualquiera de los tres componentes. Sintomáticamente, los pacientes con insuficiencia de la película lagrimal experimentan sensación de cuerpo extraño, enrojecimiento ocular y visión borrosa. La alteración más frecuente de la película lagrimal es el déficit de la capa acuosa, dando lugar a la queratitis sicca. A su vez, las principales causas de queratitis sicca son la disminución en la producción lagrimal relacionada con la edad y las enfermedades autoinmunes como el síndrome de Sjögren o la artritis reumatoide. La cantidad de secreción lagrimal acuosa puede medirse fácilmente en la consulta mediante el test de Schirmer, el cual suele estar reducido en estos pacientes. Por el contrario, los pacientes con un déficit de mucina o una disfunción de las glándulas de Meibomio tienen una producción acuosa normal, y pueden identificarse de una manera simple con el test del tiempo de ruptura lagrimal

que característicamente es inferior a los 10 segundos. Los pacientes con disfunción de las glándulas de Meibomio presentan también una evaporación lagrimal aumentada y una osmolaridad lagrimal elevada (Rolando M, et al. 1985, Mathers WD. 1993).

La glándula lagrimal principal se cree que es responsable de la secreción refleja mientras que las glándulas lagrimales accesorias de Krause y Wolfring son responsables de la secreción basal. Clásicamente se había considerado que el reflejo del lagrimeo no tenía un papel importante en la secreción lagrimal basal. Esta hipótesis ha cambiado tras conocerse que la producción lagrimal está disminuida de manera importante en situaciones de pérdida de sensibilidad corneal. Por ejemplo, se ha documentado una disminución de secreción lagrimal durante el sueño (Baum J. 1990), con anestesia general o tópica (Jordan A, et al. 1980), y en la queratitis neurotrófica (Heigle TJ, et al. 1996). Este dato sugiere que la sensibilidad corneal normal es necesaria para mantener una secreción lagrimal normal, y que el reflejo del lagrimeo es un componente importante de la secreción lagrimal basal.

## **2.2.- REGENERACIÓN TISULAR EN LA SUPERFICIE OCULAR**

La córnea se compone de tres tipos distintos de células (epitelio, queratocitos y endotelio) y de una matriz extracelular formada por colágeno y glicosaminoglicanos. Por este motivo creemos que se debe considerar por separado la morfología y la patología corneal de cada una de las distintas unidades anatómicas y funcionales formadas por las células y la matriz: epitelio y su membrana basal, queratocitos y colágeno del estroma, y endotelio-membrana de Descemet.

## 2.2.1.- REGENERACIÓN DEL EPITELIO CORNEAL

### 2.2.1.1.- Mantenimiento del epitelio corneal en situación basal

En condiciones normales el epitelio corneal se mantiene mediante un balance entre mitosis, migración y descamación. La regeneración epitelial se inicia en las células germinales pluripotenciales del limbo esclerocorneal (Schermer A, et al. 1986). A diferencia de las células de la córnea central, altamente diferenciadas y sin capacidad de división mitótica, las células germinales se mantienen en un estado permanente de relativa indiferenciación. La célula germinal, de gran actividad mitótica, se divide a su vez en una célula germinal (que asegura el mantenimiento de la población de células germinales) y en una célula hija, que migrará desde la periferia hacia el centro de la córnea siguiendo un patrón en espiral. Las células hijas, de morfología cuboide y situación basal en el inicio, migran desde la periferia hacia el centro de la córnea y desde las capas basales a las capas superficiales, para finalmente descamarse y eliminarse a través de la lágrima. En este trayecto las células van aplanándose y aumentando de superficie, a la vez que disminuye su actividad bioquímica. El ciclo completo de renovación celular para el epitelio corneal oscila entre los 7 y 14 días.

### 2.2.1.2.- Mecanismo de reparación epitelial

Las lesiones que afectan únicamente al epitelio corneal se regeneran mediante una combinación de tres componentes distintos: migración, mitosis y diferenciación. Entre 1 y 4 horas después de la agresión, las membranas plasmáticas de las células epiteliales basales que se encuentran en los márgenes de la lesión se aplanan y empiezan a extenderse sobre la matriz extracelular desnuda. Moléculas de



fibronectina procedentes de la lágrima se depositan sobre la membrana basal expuesta y el estroma descubierto. La fibronectina posee unas zonas de unión para adherirse a los componentes de la matriz extracelular, así como para fijarse a las células epiteliales, de manera que actúa como enlace entre ambas estructuras. Por otro lado, los polimorfonucleares neutrófilos que llegan a partir de la lágrima ayudan a eliminar los restos celulares en la zona. Aproximadamente 6 horas después de la agresión se observa una monocapa de células basales que empieza a migrar sobre la superficie de la herida, desplazándose a una velocidad de  $0.75 \mu\text{m}/\text{minuto}$ . Durante la regeneración epitelial, las células epiteliales pueden migrar recubriendo varios milímetros de membrana basal o estroma expuestos. Este fenómeno implica un proceso simultáneo de formación y destrucción de los anclajes entre las células epiteliales y los componentes de la matriz extracelular. En la rotura de estos anclajes juegan un papel importante distintas proteasas presentes en las células epiteliales (Zieske JD, et al. 1991). Para reemplazar aquellas células que han migrado a la zona del defecto epitelial se produce un aumento en la actividad mitótica de las células periféricas, varios milímetros por detrás del margen de avance. Una vez que el defecto epitelial se ha cerrado, las células epiteliales basales recuperan sus complejos de adhesión, el epitelio aumenta en espesor y las células superficiales finalizan su diferenciación.

En ausencia completa de epitelio y células germinales corneales, el epitelio conjuntival puede recubrir el estroma corneal a una velocidad de  $1 \text{ mm}^2 / \text{hora}$ , de manera que la epitelialización completa se produce entre 5 – 7 días en el conejo (Friend J, et al. 1981) . Aunque se había pensado que este epitelio conjuntival sobre el estroma corneal podía llegar a adquirir las características de un epitelio corneal normal (transdiferenciación), hoy sabemos que esto no es cierto, y que el epitelio transdiferenciado no reúne las características ni histológicas ni bioquímicas del epitelio corneal sano (Thoft RA, et al. 1977).

### 2.2.1.3.- Factores que favorecen la regeneración epitelial

#### - Factores de crecimiento

Distintos estudios han demostrado que algunos factores de crecimiento endógenos, sus receptores y proteínas de la matriz extracelular, tienen un papel importante en la regulación y estimulación de la regeneración epitelial de la córnea. Las células epiteliales corneales expresan receptores para distintas clases de factores de crecimiento incluyendo el EGF (epidermal growth factor), TGF- $\alpha$  (transforming growth factor alpha), FGF (fibroblast growth factor) y TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta). Los de mayor importancia, el EGF y el TGF- $\alpha$ , son sintetizados por las células epiteliales corneales y por la glándula lagrimal, y se encuentran en la lágrima en concentraciones importantes de manera fisiológica (Van Setten GB, et al. 1991). La reducción de los niveles de ambos se han relacionado con la aparición de defectos epiteliales (Van Setten GB, et al. 1991, Mann GB, et al. 1993). El EGF y el FGF estimulan la mitosis y la migración quimiotáctica en cultivos de células epiteliales (Watanabe K, et al. 1987). In vivo, también numerosos estudios realizados en los últimos años han demostrado que el tratamiento con factores de crecimiento mejora la regeneración epitelial en lesiones de origen muy diverso, tanto en animales como en humanos (Reim M, et al. 1988, Tripathi RC, et al. 1990, Pastor JC, et al. 1992, Scardovi C, et al. 1993).

#### - Proteínas de la matriz extracelular

Los componentes de la matriz extracelular juegan un papel importante en la regeneración epitelial ya que favorecen la migración y adhesión celular. La

fibronectina, una proteína importante en la adherencia de las células epiteliales, aparece rápidamente en la superficie de la matriz extracelular tras una lesión epitelial, a la vez que el EGF estimula la síntesis de fibronectina y colágeno (Gipson IK, et al.1993). Estudios in vitro con córneas de conejo han demostrado que la adición de fibronectina aumenta la migración de las células epiteliales (Watanabe K, et al. 1987). Incluso, el efecto estimulador del EGF sobre la migración de las células epiteliales corneales depende de la fibronectina ya que los anticuerpos antifibronectina inhiben la migración estimulada por el EGF (Nishida T, et al. 1990). A pesar de los efectos conocidos de la fibronectina endógena sobre la adhesión y migración de las células epiteliales, el papel de la fibronectina exógena en la regeneración epitelial in vivo ha presentado resultados contradictorios. Mientras que algunos estudios han mostrado eficacia (Nishida T, et al. 1985, Spigelman AV, et al. 1987), otros no han podido demostrar diferencias entre los ojos tratados con fibronectina y los del grupo control (Boisjoly HM, et al. 1991, Gordon J, et al. 1992).

#### 2.2.1.4.- Factores que dificultan la regeneración epitelial

##### - Conservantes de productos farmacológicos

Los conservantes utilizados en productos farmacológicos para uso tópico pueden lesionar el epitelio previamente sano y pueden retrasar la regeneración epitelial (Burstein NL. 1985, Collin HB, et al. 1982). Algunos conservantes muy utilizados como el cloruro de benzalconio y el timerosal han demostrado toxicidad epitelial in-vitro e in-vivo por lo que no deben administrarse con demasiada frecuencia en pacientes con defectos epiteliales persistentes. Además, algunos de ellos, como el cloruro de benzalconio a una concentración de 0,01%, alteran la estabilidad de la película

lagrimal por lo que deben utilizarse con precaución en pacientes con síndrome de ojo seco (Burstein NL, 1985).

- Antibióticos

Los antibióticos utilizados con frecuencia para tratar o prevenir las infecciones corneales también pueden afectar a la regeneración epitelial. Por este motivo deben ser administrados siempre en la menor dosis posible, especialmente en pacientes con lesiones epiteliales persistentes. A su vez, algunos antibióticos han demostrado mayor toxicidad in-vitro que otros. La penicilina, tetraciclina, cefalosporinas, eritromicina y cloramfenicol no retrasan significativamente la migración epitelial en la córnea de conejo, mientras que los aminoglicósidos, polimixina B, fosfomicina y algunas quinolonas sí que la retrasan significativamente (Nakamura M, et al. 1993)

- Otros fármacos

Distintos fármacos tópicos como antivíricos (Lass JH, et al. 1984) y timolol (Nork TM, et al. 1984) han demostrado un efecto tóxico sobre el epitelio corneal y deben evitarse siempre que sea posible en pacientes con alteraciones epiteliales. También los corticoides retrasan el proceso de regeneración epitelial.

## 2.2.2.- REGENERACIÓN DEL ESTROMA CORNEAL

### 2.2.2.1.- Mecanismo de regeneración estromal

Las heridas del estroma corneal se regeneran más lentamente que otros tejidos conectivos, probablemente por la ausencia de vasos sanguíneos. Tras una herida

incisional la matriz estromal absorbe agua, dando lugar a un edema en el tejido circundante. Los queratocitos situados a pocos cientos de micras de la lesión mueren, dando lugar a una zona hipocelular adyacente a los márgenes de la lesión. Más allá de la zona de queratolisis, los queratocitos que se encuentran normalmente latentes pasan a un estado de activación, convirtiéndose en fibroblastos y migrando al lugar de la lesión. También otras células como monocitos pueden llegar a la zona de la herida y convertirse en fibroblastos (Schultz GS. 1997). En conejos, la fibrina rápidamente rellena la herida, actuando como un soporte temporal en el que migrarán los fibroblastos. En humanos el acúmulo de fibrina es menor y las células epiteliales migran al interior de la herida, de manera que en heridas incisas no suturadas las células epiteliales forman un tapón que puede persistir durante meses o años. Se cree que estas células epiteliales probablemente secretan factores que modulan la función de los fibroblastos. Durante el proceso de reparación se sintetiza colágeno tipo I, III, V y VI , con predominio del tipo I. En las primeras semanas las nuevas fibras de colágeno van acumulándose con una orientación al azar, de manera que a los 4-6 meses no se identifica ningún patrón en su disposición. A los dos años de la lesión ya se reconoce de nuevo un patrón con disposición lamelar, aunque con lamelas más cortas y estrechas. Las cicatrices corneales estromales nunca alcanzan la transparencia ni la firmeza del tejido estromal no lesionado.

#### 2.2.2.2.- Factores que favorecen la regeneración estromal

##### - Factores de crecimiento

La administración tópica de distintos factores de crecimiento como el EGF y el TGB- $\beta$  han demostrado un aumento en la resistencia de las incisiones corneales mediante la influencia sobre procesos clave de la formación de las cicatrices: aumentando la

migración de los fibroblastos corneales al lugar de la lesión (Grant MB, et al. 1992), aumentando la mitosis de los fibroblastos (Woost PG, et al. 1985) y estimulando la síntesis de colágeno y fibronectina (Ohji M, et al.1993).

- Inhibidores de las proteasas

En las ulceraciones estromales, ya sean estériles o infecciosas, un objetivo común durante el tratamiento es reducir el nivel de enzimas en la córnea con capacidad para producir la lisis de colágeno. Distintos agentes que pueden inhibir la actividad de las metaloproteinasas in vitro han sido usados como agentes in vivo para el tratamiento de ulceraciones estériles en causticaciones. Entre ellos se encuentran el EDTA (Brown SI, et al. 1969), la cisteína y la acetilcisteína (Slansky HH, et al. 1970), la medroxiprogesterona y las tetraciclinas (Seedor JA, et al. 1987). También otros inhibidores de las metaloproteinasas han sido probados en modelos animales de causticación ocular o , asociados a antibióticos, en modelos de infección ocular.

2.2.2.3.- Factores que dificultan la regeneración estromal

Los corticoesteroides a menudo se asocian en la clínica a un retraso en la regeneración estromal y una aceleración de los procesos de ulceración corneal. Los corticoesteroides reducen la síntesis de DNA en la regeneración de los fibroblastos estromales, y también reducen la síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos.

## 2.3.- MEMBRANA AMNIÓTICA. FUNDAMENTOS

### 2.3.1- ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA PLACENTA

#### 2.3.1.1 - Características generales y funciones de la placenta:

La placenta es un órgano temporal cuya función es la nutrición del feto durante el embarazo, y que se desarrolla en relación íntima con el revestimiento del útero. Aunque su origen es básicamente fetal, está compuesta por células derivadas de dos individuos diferentes (y en consecuencia con dos genotipos diferentes). Se compone de una **parte fetal** (derivada originalmente del cigoto) y una **parte materna**. Cuando está plenamente desarrollada tiene la forma de una torta plana blanda (lat. *placenta*, torta o pastel), de unos 15 cm de diámetro y 3 cm de grosor. Su función principal es permitir que las sustancias disueltas en la sangre materna difundan hacia la sangre del feto y viceversa, y su anatomía permite que ello ocurra en una superficie extensa. En circunstancias normales las corrientes sanguíneas del feto y de la madre no se mezclan una con otra, ya que siempre están separadas por lo que se llama barrera placentaria. En la placenta, los alimentos y el oxígeno, disueltos en la sangre materna, difunden a través de la barrera placentaria para llegar a la corriente sanguínea del feto. De manera análoga, el dióxido de carbono y los productos de deshecho atraviesan la barrera de la sangre del feto a la de la madre y son eliminados por los órganos de excreción maternos. Anticuerpos, hormonas, fármacos y microorganismos infecciosos pueden también atravesar la barrera placentaria. Además la placenta es también un importante órgano endocrino que produce y secreta distintas hormonas como gonadotrofina coriónica humana (HCG), tirotrófina coriónica humana (HCT),

somatomamotrofina coriónica humana (HCS) o lactógeno placentario humano (HPL), progesterona y estrógenos.

#### 2.3.1.2.- Anatomía de la placenta:

La placenta se compone del cordón umbilical, las membranas (amnion y corion), las vellosidades y la decidua. El cordón umbilical y el amnios son las dos estructuras que en la actualidad tienen importancia como tejido donante.

##### - Cordón umbilical:

El cordón umbilical normal es de color blanco perlado y algo traslúcido. Su longitud aumenta a medida que la gestación avanza, de manera que la longitud normal del cordón umbilical a término es de entre 55 y 65 cm (Gardiner JP.1922). En el examen histológico podemos diferenciar varias capas. En la superficie encontramos una monocapa de epitelio amniótico. Este epitelio es escamoso, pero en la región de la inserción del cordón al feto encontramos un epitelio poliestratificado muy parecido al de la epidermis contigua (Hoyes AD. 1969). Por debajo del epitelio amniótico encontramos la gelatina de Wharton, compuesta principalmente por mucopolisacáridos. En el interior de la gelatina de Wharton se encuentran los vasos umbilicales, compuestos normalmente por dos arterias y una vena. Aunque los vasos umbilicales son de gran calibre no hay vasa vasorum ni canales linfáticos. Estudios mediante microscopía electrónica han demostrado que normalmente no hay presencia de nervios en el cordón umbilical (Nadkarni BB.1970). La inserción normal del cordón en la placenta puede ser central o excéntrica. El patrón de ramificación vascular en el corion se describe como magistral (caracterizado por vasos de gran diámetro, que se extienden radialmente disminuyendo su calibre hacia la periferia de la placenta) o disperso (caracterizado por múltiples pequeños vasos emanando directamente desde la zona de inserción del cordón). Las ramas primarias de la vascularización umbilical



atraviesan el plato coriónico estableciendo la circulación de las ramificaciones vasculares primarias y finalizando en las vellosidades terminales.

#### - Membranas:

Las membranas fetales están compuestas por el amnion y el corion. El **amnion** constituye la capa más interna de la cavidad embrionaria y recubre a la placenta colocándose sobre el corion. Su aspecto macroscópico es liso, de un color gris-azulado y avascular. La placenta normal puede contener zonas de metaplasia escamosa en la superficie del amnion visibles a simple vista y que, en casos severos, puede incluso formar placas y nódulos. Estos nódulos metaplásicos se distinguen del *amnion nodosum* en que no pueden ser fácilmente eliminados de la superficie mediante una simple presión. El amnion nodosum se caracteriza por la presencia de múltiples pequeñas pápulas sobre la superficie amniótica, que son fácilmente eliminadas y que histológicamente están compuestas por escamas degeneradas. El origen de estas células es la epidermis fetal, y su presencia se relaciona con la aposición de la superficie amniótica y la piel del feto en situaciones de oligohidramnios. Por debajo del amnion se encuentra la siguiente membrana, el **corion**. El plato coriónico tiene un característico color azulado, y está formado por tejido conectivo. Por su cara interna se relaciona con el amnion mientras que por su cara externa limita con las vellosidades. Los vasos sanguíneos fetales llegan al corion por el cordón (en su cara interna), circulan por el plato coriónico atravesándolo, y finalizan en las vellosidades.

#### - Vellosidades:

El parénquima velloso es discoide y se encuentra situado bajo el plato coriónico. La sustancia del parénquima es roja y carnosa, y su textura es completamente homogénea en la placenta sana. En la placenta completamente formada suele haber de 8 a 15 vellosidades, en cuyo interior se localizan los vasos fetales. Entre las

vellosidades se encuentra el espacio intervilloso que contiene la sangre materna. A este nivel se produce el intercambio de sustancias entre la sangre fetal y la materna sin que exista en ningún momento mezcla de las dos circulaciones.

- Decidua basal:

La última capa de la placenta, situada bajo el parénquima veloso, es la decidua basal. Esta capa procede del endometrio y es, por tanto, la única porción de la placenta de origen materno. Después de que la placenta se expulse a término, esta capa se advierte únicamente como fragmentos poco definidos de membrana.

### 2.3.2.- HISTOLOGÍA DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA

El amnion, la capa más interna de la cavidad amniótica, está formado por una monocapa de células epiteliales que asientan sobre una membrana basal. Esta membrana basal se encuentra, a su vez, adherida a una fina capa de tejido conectivo subyacente (Danforth DM, et al. 1958). El amnion, aunque se encuentra adyacente al corion, no está completamente fusionado con él, de manera que ambos pueden separarse fácilmente mediante disección roma. La estructura histológica del amnion varía desde la concepción hasta el momento del parto. A continuación describiremos el amnion maduro que se encuentra en las embarazadas a término, ya que éste es el único que se utiliza para trasplante.

Mediante microscopía óptica se observa una monocapa de células cuboides, parecidas a las de la epidermis, sobre la membrana basal. Este epitelio se encuentra sobre una capa de mesénquima que contiene abundante colágeno y escasas células, las cuales corresponden predominantemente a fibroblastos. La altura de las células epiteliales amnióticas varía ampliamente en las distintas zonas. Así, a nivel del amnion placentario encontramos células columnares mientras que en el amnion

extraplacentario se observan células cuboides o aplanadas. Las células epiteliales del amnion maduro presentan numerosas microvellosidades en la superficie y paredes laterales (Mukaida T, et al. 1977). Estas microvellosidades forman, en la parte inferior de las membranas laterales, unos canalículos intercelulares de tipo laberinto. Estos canalículos contribuyen a la unión intercelular, junto a desmosomas que encontramos también en las membranas laterales de las células (Bartels H, et al. 1983). Por su cara inferior, las células epiteliales amnióticas se unen a la membrana basal mediante hemidesmosomas (Robinson HL, et al. 1984).

La presencia de metaplasia escamosa es un hallazgo común en el epitelio amniótico, especialmente en la zona de la inserción del cordón umbilical. Se cree que ello es debido a una irritación de la superficie epitelial amniótica, aunque estos cambios pueden llegar a encontrarse en más de la mitad de las placentas a término (Benirschke K, et al. 1990).

Por debajo de la membrana basal del epitelio amniótico encontramos el estroma de tejido conectivo, dividido en una *capa compacta* y otra *fibroblástica*. Entre el tejido colágeno pueden identificarse macrófagos, especialmente durante el primer trimestre del embarazo (Schwarzacher HG. 1960).

### 2.3.3.- INMUNOLOGÍA DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA

Mediante técnicas de inmunofluorescencia se ha observado que las células epiteliales amnióticas humanas no expresan en su superficie los antígenos HLA-A, B, C y DR (Adinolfi M, et al. 1982). Ello puede explicar por qué en distintos trabajos se ha observado que el implante de membrana amniótica no produce respuestas inmunológicas significativas locales en el lugar del implante, ni se han detectado anticuerpos HLA en el suero de los receptores (Akle CA, et al. 1981)

El amnion humano implantado como autoinjerto subcutáneo en el propio recién nacido queda incluido en los tejidos como un injerto permanente (Trelford JD, et al. 1975), sin llegar a vascularizarse y nutriéndose, probablemente, mediante difusión simple. Cuando el amnion se implanta subcutáneamente como aloinjerto se comporta de la misma manera durante los primeros 14-17 días. Posteriormente el injerto se va reabsorbiendo lentamente con una reacción inflamatoria muy leve (Trelford JD, et al. 1975). Otros autores (Akle CA, et al. 1981), utilizando también el amnion como aloinjerto subcutáneo, no han observado signos locales de rechazo en el implante, demostrando además que las células epiteliales amnióticas sobreviven o incluso pueden proliferar 30 días después del injerto. Este último dato traduce que la respuesta inmune contra el injerto, si existe, es ciertamente leve e inefectiva.

Por el contrario, cuando el corion se utiliza como aloinjerto provoca una reacción inflamatoria importante con neovascularización, que conduce finalmente a un fenómeno típico de rechazo del receptor contra el injerto (Douglas B, et al. 1954). Recientemente se ha conocido que este tejido posee una considerable antigenicidad que provoca una intensa respuesta celular y una menor respuesta con anticuerpos.

#### 2.3.4.- OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA

##### 2.3.4.1.- Selección de las donantes de placenta

Las donantes de placenta deben ser mujeres sanas, sin antecedentes patológicos significativos y que hayan sido controladas durante el embarazo sin presentarse ninguna complicación. Justo antes del parto se debe proceder a un estudio serológico de la donante para descartar la infección por virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y sífilis. Al tratarse de

un donante vivo y para cubrir el periodo ventana de estas infecciones, se debe repetir el estudio serológico 3 meses después del parto. En el caso de realizarse estudios mediante PCR este intervalo puede reducirse a 2-3 semanas.

Previamente al parto la donante debe haber firmado el consentimiento informado autorizando la extracción de muestras de sangre para el estudio serológico y la donación de la placenta con fines de trasplante.

#### 2.3.4.2.- Obtención, procesamiento y conservación de la membrana amniótica

La placenta puede obtenerse en partos mediante cesárea o por vía vaginal. Sin embargo, se ha demostrado que el grado de contaminación bacteriana es superior en número y patogenicidad en las placentas obtenidas por la vía vaginal (Addis PJ, et al. 2001). Por este motivo todas las placentas destinadas a trasplante deberían obtenerse mediante cesárea electiva.

La placenta se obtiene en quirófano durante la cesárea bajo estrictas condiciones de esterilidad y es posteriormente procesada en el banco de tejidos. Nosotros preparamos y conservamos la membrana amniótica según el método descrito por Tseng y colaboradores (Tseng SCG, et al. 1998). Bajo una campana de flujo laminar la placenta se limpia de restos de sangre y coágulos con una solución salina balanceada estéril que contiene 50µl/ml de penicilina, 50µl/ml de estreptomicina, 100 µl/ml de neomicina y 2.5 µl/ml de anfotericina B. Posteriormente el amnios se separa del corion mediante disección roma a través de los espacios virtuales situados entre estos dos tejidos y se extiende sobre papel de nitrocelulosa, colocando la superficie del epitelio-membrana basal hacia arriba. Los discos de papel de nitrocelulosa con el fragmento de membrana amniótica son, posteriormente, almacenados a – 80 ° C en viales estériles que contienen medio de Eagle modificado por Dulbecco (Life Technologies

Ltd. Paisley, Escocia) y glicerol en una proporción 1/1 (vol / vol). También puede utilizarse el dimetilsulfóxido como sustancia crioprotectora, en lugar del glicerol.

Se recomienda remitir un pequeño fragmento de membrana amniótica para estudio microbiológico realizando cultivos para bacterias y hongos. Sólo deberían ser utilizadas para trasplante aquellas placentas con cultivos microbiológicos negativos y con serologías negativas en la donante.

De esta manera podemos conservar la membrana amniótica congelada y disponible para su uso durante un mínimo de 12 meses, aunque probablemente sea viable con garantías durante más tiempo. Para utilizarla basta con extraerla del congelador 10 – 15 minutos antes de la cirugía, ya que en poco tiempo se produce la descongelación a temperatura ambiente.

## **2.4.- APLICACIONES DEL TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA**

### **2.4.1.- EL TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA EN LA MEDICINA**

Según la literatura fue Davis, en 1910, (Davis JW. 1910) el primer autor que utilizó las membranas fetales en el trasplante de piel. Posteriormente, Stern (Stern M. 1913) y Sabella (Sabella N. 1913) publicaron sus resultados utilizando la membrana amniótica en el tratamiento de ulceraciones y quemaduras de la superficie cutánea. Utilizando la membrana amniótica como sustituto de los implantes cutáneos, observaron una ausencia de infecciones en las heridas limpias, una importante reducción del dolor, y un aumento en la velocidad de reepitelización de la superficie cutánea traumatizada. Posteriormente, diferentes autores han empleado con éxito la membrana amniótica en la reconstrucción de heridas cutáneas de distintas etiologías (Kubanyi A. 1948, Colocho G, et al. 1974, Chuntrasakal C. 1977, Prasad JK, et al. 1986) , y otros

(Robson MC, et al. 1972, 1973, 1974) han demostrado con sus investigaciones que dicha membrana es equivalente al autoinjerto de piel y superior al aloinjerto. Sin embargo, durante este periodo no sólo se ha utilizado la membrana amniótica en la reconstrucción de lesiones cutáneas por parte de cirujanos plásticos y traumatólogos, sino que se han descrito también indicaciones en otras especialidades de la medicina. Entre otras aplicaciones, la membrana amniótica ha sido utilizada con éxito en la reconstrucción de la vagina tras causticaciones o vaginectomías (Tancer ML, et al. 1978), como sustituto del peritoneo en procedimientos exenterativos y reconstructivos pélvicos (Trelford-Sauder M, et al. 1977), como recubrimiento biológico en omfaloceles (Seashore JH. 1975), en la reconstrucción de tendones (Pinkerton MC. 1942), en la reconstrucción quirúrgica tras una glosectomía total (Kothary P. 1974), en la reconstrucción de la mucosa nasal y el tímpano (Zohar Y , et al. 1987), de la uretra (Brandt FT, 2001), etc.

#### 2.4.2.- EL TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA EN OFTALMOLOGÍA

De Rotth en 1940 (De Rotth A. 1940) fue el primer autor en la literatura que utilizó las membranas fetales en oftalmología. De Rotth implantó las membranas fetales en fresco (incluyendo tanto el amnion como el corion) para la reconstrucción de la superficie conjuntival. De los seis casos con simbléfaron y defectos conjuntivales que trató sólo consiguió el éxito en uno, probablemente por el hecho de incluir el corion en el injerto. En 1941, Brown (Brown AL. 1941) propuso usar el peritoneo de conejo como recubrimiento temporal de la superficie ocular tras causticaciones agudas, en un intento de acelerar la epitelización y frenar o evitar la necrosis tisular. Basándose en esta idea, en 1946 y 1947, Sorsby y colaboradores (Sorsby A, et al. 1946, 1947) emplearon la membrana amniótica preservada (a la que denominaron “amnioplastina”) como recubrimiento temporal en el tratamiento de las causticaciones oculares agudas.

Con esta técnica consiguieron resultados favorables aunque observaron que, con frecuencia, la amnioplastina debía ser aplicada repetidamente. También demostraron que cuanto antes se aplicaba la membrana amniótica más se acortaba el tiempo de curación. Sin embargo, por razones que no quedan claras, el uso de la membrana amniótica desapareció de la literatura oftalmológica durante un extenso periodo de tiempo. Algunos autores creen que ello podría deberse a problemas en la preservación del tejido.

En 1995 Kim y Tseng (Kim JC, Tseng SCG. 1995) reintroducen el uso de la membrana amniótica en oftalmología. En un modelo animal con conejos demostraron que un 40% de córneas con insuficiencia límbica severa podían ser reconstruidas reemplazando la superficie conjuntivalizada por membrana amniótica humana preservada. A partir de los trabajos de estos autores renace un interés generalizado por el uso de la membrana amniótica en oftalmología, y aparecen numerosos trabajos sobre su eficacia en distintas patologías de la superficie ocular.

#### 2.4.3.- MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA

La membrana amniótica preservada puede utilizarse en un gran número de indicaciones, ya sea como injerto, como recubrimiento, o como una combinación de ambos. Cuando se implanta como **injerto** rellena un defecto tisular, reemplazando la matriz estromal ausente y proporcionando una membrana basal para que la epitelización se produzca sobre ella. Cuando se utiliza como **recubrimiento** actúa protegiendo la superficie ocular de posibles insultos externos y aportando sustancias biológicas que reducen la inflamación y favorecen la regeneración epitelial bajo el implante. Los mecanismos de acción potenciales de la membrana amniótica que han sido publicados están resumidos en la Tabla 1, y explican los efectos clínicos que se pueden conseguir tras el implante.



Tabla 1: Mecanismos de acción de la membrana amniótica trasplantada

- 
- Prolonga la supervivencia y la capacidad de clonación de las células progenitoras epiteliales
  - Promueve la diferenciación de las células epiteliales no caliciformes
  - Promueve la diferenciación de las células epiteliales caliciformes en presencia de fibroblastos conjuntivales
  - Excluye células inflamatorias con propiedades anti-proteasa
  - Suprime el sistema de señalización mediante TGF- $\beta$  y la diferenciación miofibroblástica de los fibroblastos normales
- 

Adaptada de: Tseng SCG y Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. En: Holland EJ, Mannis MJ, ed. Ocular Surface Disease. Medical and surgical management. New York: Springer-Verlag, 2002.

#### 2.4.3.1.- Epitelio amniótico

El papel del epitelio de la membrana amniótica preservada todavía no se conoce completamente. Algunos datos de laboratorio sugieren que contiene una cantidad importante de factores de crecimiento, ya que la membrana amniótica preservada con el epitelio intacto ha demostrado poseer mayor cantidad de factores de crecimiento que la membrana amniótica desnuda de su epitelio (Koizumi N, et al. 2000). Además, el epitelio de la membrana amniótica podría proporcionar citoquinas que jueguen un papel importante en el mantenimiento del microambiente de las células germinales del

epitelio corneal (Grueterich M, et al. 2003). En cultivos de células epiteliales germinales del limbo, la membrana amniótica con epitelio intacto ha demostrado ser un mejor sustrato que la membrana amniótica sin epitelio, ya que sólo la primera consigue mantener un fenotipo epitelial poco diferenciado comparable al que encontramos en el epitelio basal del limbo humano (Grueterich M, et al. 2002).

#### 2.4.3.2.- Membrana basal

La membrana basal de la membrana amniótica contiene colágeno tipo IV, laminina 1, laminina 5, fibronectina, y colágeno VII. Su composición es muy similar a la de la conjuntiva (Fukuda K, et al. 1999) y las lamininas son particularmente efectivas en mejorar la adhesión de las células epiteliales de la córnea (Kurpakus MA, et al. 1999). En general la membrana basal de la membrana amniótica facilita la migración de las células epiteliales, refuerza las adhesiones de las células epiteliales basales, promueve la diferenciación epitelial y previene la apoptosis. También, la membrana basal de la membrana amniótica constituye un sustrato ideal para el crecimiento de las células epiteliales germinales, prolongando su vida y manteniendo su comportamiento clonal. Estas acciones explican por qué el trasplante de membrana amniótica puede ser usado para estimular las células germinales residuales del limbo y las células amplificadoras transitorias de la córnea periférica en el tratamiento de las insuficiencias parciales del limbo (Tseng SCG, et al. 1998) y para facilitar la epitelización en los defectos epiteliales corneales persistentes con ulceración estromal (Lee SH, et al. 1997, Kruse FE, et al. 1999, Chen HJ, et al. 2000). En cultivos tisulares, la membrana amniótica ha demostrado también ser un buen sustrato para el crecimiento de células epiteliales cultivadas (Schwad IR. 1999, Koizumi N, Fullwood NJ, et al. 2000), manteniendo la diferenciación y morfología epitelial normal (Meller D, et al. 1999). Posteriormente, la membrana amniótica junto a las células epiteliales que

han crecido sobre ella ha podido reimplantarse con éxito para la reconstrucción de superficies corneales lesionadas tanto en humanos (Schwab IR. 1999, Tsai RJF, et al. 2000) como en animales (Schwab IR. 1999, Koizumi N, Inatomi T, et al. 2000). La membrana amniótica puede ser utilizada también para promover la diferenciación de las células caliciformes del epitelio conjuntival (Meller D, et al. 1999). Estos datos explican por qué, in vivo, tras el trasplante de membrana amniótica en la superficie conjuntival, el epitelio regenerado sobre el injerto presenta una mayor densidad de células caliciformes (Prabhasawat P, et al. 1997).

#### 2.4.3.3.- Matriz estromal

La porción estromal de la membrana amniótica contiene un componente de la matriz que suprime la señalización mediante el TGF- $\beta$  , así como la proliferación y diferenciación de los miofibroblastos de la córnea humana normal y de los fibroblastos del limbo (Tseng SCG, et al. 1999). Este componente también suprime la proliferación y diferenciación de los fibroblastos de la conjuntiva normal y de los fibroblastos del cuerpo del pterigion (Lee S-B, et al. 2000). Estas acciones explican por qué el trasplante de membrana amniótica reduce la formación de cicatrices cuando se utiliza en la reconstrucción de la superficie conjuntival (Tseng SCG, et al. 1997, Azuara-Blanco A, et al. 1999), previene la cicatrización recidivante tras la resección del pterigion (Prabhasawat P, Barton K, et al. 1997, Shimazaki J, et al. 1998, Ma DH-K, et al. 2000, Solomon A, et al. 2001), y reduce la opacidad estromal tras la queratectomía fototerapéutica y la queratectomía fotorefractiva (Choi YS, et al. 1998, Park WC, et al. 2000, Wang MX, et al. 2001). Aunque estos efectos son más potentes cuando los fibroblastos están en contacto directo con la matriz estromal, también se ha constatado un efecto menor cuando los fibroblastos se encuentran separados de la membrana por una moderada distancia (Tseng SCG, et al. 1999), lo que sugiere que probablemente

algún factor de los que se encuentran en la matriz estromal de la membrana tiene capacidad de difundir y actuar a distancia.

La matriz estromal de la membrana amniótica puede también atrapar las células inflamatorias (Shimmura S, et al. 2001) excluyéndolas del resto de los tejidos, y llevándolas a una rápida apoptosis (Wang MX, et al. 2001). También contiene proteínas antiinflamatorias y antiangiogénicas (Hao Y, et al. 2000) y sustancias inhibitoras de varias proteasas (Na BK, et al. 1999). Estas propiedades explican por qué la inflamación estromal (Lee S-H, et al. 1997, Tseng SCG, et al. 1997) y por qué la neovascularización corneal (Kim JC, et al. 1995) se reducen tras el trasplante de membrana amniótica. Ambas acciones tienen una gran importancia en que el estroma se encuentre preparado antes de recibir un trasplante de células germinales del limbo (Tseng SCG, et al. 1998, Shimazaki J, et al. 1998, Tsubota K, et al. 1999), y explican también por qué tras el trasplante de membrana amniótica se reduce la apoptosis de los queratocitos, y por tanto la opacidad estromal residual, en las ablaciones corneales con láser excimer (Choi YS, et al. 1998, Park WC, et al. 2000, Wang MX, et al. 2001). Finalmente, se han identificado distintos factores de crecimiento en la membrana amniótica (Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, et al. 2000) que también contribuyen a facilitar la epitelización de los tejidos .

#### 2.4.4.- EFECTOS CLÍNICOS TRAS EL TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA

Todas estas propiedades biológicas que presenta la membrana amniótica podemos resumirlas en una serie de efectos clínicos, que son los que podemos esperar tras el trasplante de membrana amniótica en la superficie ocular:

a).- **Facilita la epitelización** de los tejidos (córnea y/o conjuntiva) a partir del epitelio sano circundante, manteniendo siempre el fenotipo epitelial presente en la zona.

- b).- **Reduce la inflamación** en los tejidos, bajo el implante y en la vecindad.
- c).- **Reduce la neovascularización** en el estroma corneal.
- d).- **Reduce las cicatrices** residuales tras la regeneración tisular, tanto en la conjuntiva como en la córnea.

#### 2.4.5.- INDICACIONES DEL TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA EN PATOLOGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR

En base a las propiedades y efectos clínicos de la membrana amniótica podemos enumerar una serie de indicaciones clínicas que quedan resumidas en la Tabla 2.

##### 2.4.5.1.- Membrana amniótica como injerto en la reconstrucción de la conjuntiva

Ya hemos comentado que el trasplante de membrana amniótica facilita la epitelización manteniendo el fenotipo epitelial normal (con células caliciformes cuando se realiza en la conjuntiva), y reduce la inflamación, la neovascularización y la formación de cicatrices. Por estos motivos la membrana amniótica puede utilizarse en la reconstrucción de la superficie conjuntival. Implantada como injerto en zonas con un defecto tisular conjuntival, la membrana amniótica ayuda a restaurar un estroma normal y proporciona una membrana basal adecuada para una nueva proliferación y diferenciación epitelial. Los trabajos publicados en los últimos años demuestran que el trasplante de membrana amniótica puede utilizarse en la reconstrucción de la superficie conjuntival como alternativa al trasplante de conjuntiva tras la resección de extensas lesiones conjuntivales. Ha sido utilizado con éxito en el tratamiento del pterigium (Prabhasawat P, Barton K, et al. 1997, Shimazaki J, et al. 1998, Ma DH-K, et al. 2000, Solomon A, et al. 2001), de tumores conjuntivales (Tseng SCG, et al. 1997,

Paridaens D, et al. 2001), cicatrices conjuntivales y simbléfaron (Tseng SCG, et al. 1997, Azuara-Blanco A, et al. 1999), y conjuntivochalasis (Meller D, et al. 2000). De esta manera pueden reconstruirse extensas zonas de resección siempre que el lecho estromal no se encuentre necrótico ni isquémico, y los márgenes de la resección posean un epitelio y un estroma conjuntival normal.

Como sustituto de un autoinjerto de conjuntiva, el injerto de membrana amniótica puede usarse para el cierre de ampollas de filtración de glaucoma perforadas (Budenz DL, et al. 2000) y, junto a un injerto de esclera, puede ayudar a reparar perforaciones esclerales (Rodríguez-Ares MT, et al. 1999). La membrana amniótica también puede ser una buena alternativa a los autoinjertos de conjuntiva o de membrana mucosa en cirugía palpebral (Ti S-E, et al. 2001) y cirugía orbitaria (Yamada M, et al. 2001).

#### 2.4.5.2.- Membrana amniótica como injerto en la reconstrucción de la superficie corneal

En los últimos años se han producido diferentes avances sobre el diagnóstico y tratamiento de las insuficiencias del limbo esclerocorneal, destacando el trasplante de limbo y el trasplante de membrana amniótica. En los casos de hipofunción límica o déficit parcial, la membrana amniótica restablece el entorno de las células germinales en el estroma del limbo esclerocorneal, reduciendo la inflamación y estimulando la proliferación de estas células. En las situaciones en que el déficit de células germinales es total, se hace imprescindible el trasplante de limbo que restablece la población de las células germinales del limbo. Algunos trabajos han demostrado la eficacia de este tratamiento combinado en distintos grados de insuficiencia límica (Tseng SCG, et al. 1998).

Un gran avance conseguido con la membrana amniótica ha sido que las insuficiencias límicas parciales pueden en la actualidad ser tratadas con esta técnica sin necesidad

de realizar un trasplante de limbo (Tseng SCG, et al. 1998, Anderson DF, Ellies P, et al. 2001), y por tanto sin necesidad de que el paciente reciba tratamiento sistémico inmunosupresor durante largos periodos de tiempo.

Un segundo avance es la importante reducción en el porcentaje de rechazo de los aloinjertos de limbo que se consigue cuando, además de la inmunosupresión sistémica, se realiza un trasplante de membrana amniótica como procedimiento previo para restaurar el microambiente del estroma del limbo esclerocorneal (Tseng SCG, et al. 1998). Este efecto se atribuye a la disminución de la inflamación en el estroma de la zona. Además, la membrana amniótica cuando se implanta asociada al trasplante de limbo, aumenta la proliferación y actividad de las células germinales, mejorando sustancialmente los resultados en este tipo de patología.

La membrana amniótica aplicada como injerto es también útil en el tratamiento de patologías de la superficie corneal, promoviendo la curación de úlceras corneales persistentes de distinta etiología (Lee SH, et al. 1997, Kruse FE, et al. 1999, Chen HJ, et al. 2000, Peris-Martínez C, et al. 2001, Anderson DF, Prabhasawat P, et al. 2001). En estos casos la técnica con injerto de membrana amniótica aporta un estroma y una membrana basal sobre la que se favorece la epitelización, consiguiendo el cierre de la úlcera. Además, tiene la ventaja, frente a otras alternativas quirúrgicas como la tarsorrafia o el autoinjerto de conjuntiva, de que la apariencia estética del ojo del paciente es mucho más aceptable. Un estudio multicéntrico reciente demuestra que el trasplante de membrana amniótica puede ser también útil en el tratamiento de la queratopatía bullosa sintomática en casos de afaquia, pseudofaquia o fracaso de injerto corneal previo (Pires RTF, et al. 1999). Estos pacientes presentan dolor, erosiones recurrentes y riesgo de infección y con este tratamiento pueden aliviarse los síntomas en los casos en que la queratoplastia penetrante no puede realizarse.

Tabla 2: Indicaciones clínicas del trasplante de membrana amniótica

---

**- Como injerto en patología conjuntival**

- pterigion
- reconstrucción de la conjuntiva bulbar tras la resección de lesiones o cicatrices extensas
- lisis de simblefaron
- conjuntivochalasia

Asociada o no a esclera o pericardio preservados para:

- cierre de ampollas de filtración conjuntival
- lisis escleral
- reconstrucción palpebral o de la órbita

**- Como injerto en patología corneal**

- defectos epiteliales corneales persistentes con ulceración
- insuficiencia límbica parcial
- insuficiencia límbica completa (asociado a trasplante de limbo)
- causticaciones oculares, síndrome Stevens-Johnson
- queratopatía bullosa dolorosa
- queratopatía en banda

**- Como recubrimiento**

- fase aguda de causticaciones oculares o síndrome Stevens-Johnson
- prevención de cicatrices tras queratectomía con láser excimer (refractiva o terapéutica)

**- Como sustrato para la expansión de células germinales epiteliales Ex vivo**

- insuficiencia límbica
- 

Adaptada de: Tseng SCG y Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. En: Holland EJ, Mannis MJ, ed. Ocular Surface Disease. Medical and surgical management. New York: Springer-Verlag, 2002.



#### 2.4.5.3.- Membrana amniótica como recubrimiento

La membrana amniótica puede utilizarse para recubrimiento, de manera temporal o prolongada. Cuando se utiliza como recubrimiento la membrana amniótica reduce las opacidades corneales que pueden aparecer tras la ablación estromal con el láser excimer (Choi YS, et al. 1998, Park WC, et al. 2000, Wang MX, et al. 2001). Además, también reduce la inflamación, facilita la epitelización y previene la formación de cicatrices causadas por causticaciones químicas agudas, tanto en animales (Kim JS, et al. 1998) como en humanos (Meller D, Pires RTF, et al. 2000). Finalmente, el recubrimiento con membrana amniótica también se ha usado con éxito en el la fase aguda del síndrome de Stevens-Johnson (John T. 1999) y, en general, para disminuir la inflamación en distintas enfermedades de la superficie ocular.

#### 2.4.5.4.- Membrana amniótica como sustrato para el cultivo de células germinales epiteliales del limbo esclerocorneal

El hecho de que la membrana amniótica ayude a la preservación y proliferación de las células germinales epiteliales del limbo esclerocorneal indica que también puede ser utilizada como soporte para el crecimiento de éstas en cultivos in vitro. Esta nueva técnica representa un gran avance en el tratamiento de pacientes con insuficiencia límbica severa en un ojo pero que mantienen zonas de limbo sano en el ojo contralateral. En estos pacientes se puede obtener una pequeña muestra de tejido en el limbo sano y posteriormente cultivar estas células sobre membrana amniótica preservada. Tres o cuatro semanas después se dispone de un fragmento de membrana amniótica cubierto por gran cantidad de células germinales del limbo que puede implantarse como autoinjerto en el ojo afectado para restaurar la superficie corneal. Esta técnica, que evita el riesgo de rechazo y la necesidad de

inmunosupresión sistémica, ha sido ya utilizada tanto en animales (Koizumi N, et al. 2000) como en humanos (Schwab IR. 1999, Tsai RJF, et al.2000, Schwab IR, et al. 2000).

#### 2.4.6.- LIMITACIONES DEL TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA

Hemos enumerado una serie de propiedades que hacen que la membrana amniótica sea útil en el tratamiento de distintas patologías de la superficie ocular. Sin embargo, no hay que pensar que este tejido puede restaurar cualquier alteración de la superficie ocular. Como todas las técnicas quirúrgicas tiene sus indicaciones pero también sus limitaciones, y un implante realizado en un caso inadecuado puede, no sólo ser inefectivo, sino incluso perjudicial, empeorando el estado de la superficie ocular.

La membrana amniótica trasplantada actúa como un sustrato para la epitelización y, por tanto, no puede ser utilizado para tratar patologías en las que exista un **déficit completo de células germinales epiteliales** (corneales o conjuntivales) ya que no existe la fuente de la que puedan proliferar las células epiteliales. En estos casos, como ya se ha comentado, es imprescindible asociar un trasplante con tejido que proporcione células germinales.

La membrana amniótica, como cualquier otro tejido trasplantado, no es eficaz cuando se utiliza en casos con un **déficit severo de lágrima**, con **alteraciones severas en la dinámica palpebral**, con **problemas neurotróficos importantes**, y sobre **tejidos necróticos o isquémicos** (Tseng SCG, et al. 2002).

### **3.- OBJETIVOS**



### **3.1.- OBJETIVOS DEL PRIMER TRABAJO**

1. Conocer la eficacia del trasplante de membrana amniótica en distintas patologías de la superficie ocular.
2. Conocer la seguridad del trasplante de membrana amniótica en distintas patologías de la superficie ocular.
3. Conocer la estabilidad de los resultados obtenidos a largo plazo.

### **3.2.- OBJETIVOS DEL SEGUNDO TRABAJO**

1. Valorar la eficacia y seguridad del recubrimiento con membrana amniótica en los defectos epiteliales de la córnea.
2. Valorar la respuesta al tratamiento con distintas formas de implante.

### **3.3.- OBJETIVOS DEL TERCER TRABAJO**

1. Conocer, desde el punto de vista histológico, las características de la epitelización corneal tras el injerto de membrana amniótica.
2. Conocer los mecanismos de reabsorción de la membrana amniótica.

### **3.4.- OBJETIVOS DEL CUARTO TRABAJO**

1. Conocer la eficacia del injerto de membrana amniótica sobre un lecho escleral isquémico para la regeneración conjuntival.

#### **4.- TRABAJOS PUBLICADOS**





**TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA EN PATOLOGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR: RESULTADOS A LARGO PLAZO.**

**AMNIOTIC MEMBRANE TRANSPLANTATION FOR OCULAR SURFACE PATHOLOGY: LONG-TERM RESULTS.**

**Gris O**, López-Navidad A, Caballero F, del Campo Z, Adán A.

Transplantation Proceedings 2003; 35: 2031-2035



## COMENTARIO

Este trabajo analiza los resultados globales obtenidos con el trasplante de membrana amniótica en distintas patologías de la superficie ocular y con un periodo de seguimiento medio de 32 meses (rango 24-48 meses). El trabajo incluye 53 casos que fueron divididos en tres grupos en función de la patología y del tipo de implante realizado. En el grupo 1 se incluyeron 24 ojos con patología conjuntival que precisaban de una extensa resección y en los que posteriormente se realizó un injerto de membrana amniótica para conseguir una rápida regeneración tisular (del estroma y epitelio) con las mínimas cicatrices residuales. En el grupo 2 se incluyeron 19 ojos con patología corneal y en los que la membrana amniótica se utilizó también como injerto. Este grupo estaba formado básicamente por casos con un defecto tisular en el estroma y epitelio corneal producido por una ulceración neurotrófica o tras la resección de una amplia zona de degeneración cálcica. En este grupo también se incluyeron 5 casos de queratopatía bullosa que presentaban dolor ocular y en los que la queratoplastia penetrante fue descartada por el mal pronóstico visual. Finalmente, el grupo 3 estaba formado por 10 casos con defecto epitelial corneal (sin ulceración estromal) que no habían respondido al tratamiento médico y en los que la membrana amniótica se implantó como recubrimiento. Durante todo el periodo de seguimiento no se presentó ninguna complicación intra o postoperatoria relacionada con el implante. Tampoco se observaron recidivas de las lesiones en ninguno de los casos en los que el trasplante de membrana amniótica consiguió la curación. En el grupo 1 se observó una rápida regeneración conjuntival en todos los casos con mínimas cicatrices residuales. En el grupo 2 se obtuvo una respuesta favorable tras el injerto en 16 de los 19 casos que previamente habían fracasado al tratamiento médico. En el grupo 3 la eficacia estuvo relacionada con el tiempo de permanencia del implante sobre la superficie ocular, y los resultados globales fueron peores por la caída precoz del

implante en varios de los casos. Cuando el implante se mantuvo durante 2 ó más semanas la epitelización se consiguió en el 75% de los casos, mientras que no se obtuvo respuesta en ninguno de los casos en los que la membrana amniótica se desprendió durante la primera semana. En conclusión, el trasplante de membrana amniótica es una técnica eficaz y segura para el tratamiento de distintas patologías de la superficie ocular, siendo sus resultados estables a largo plazo. Tras la resección de lesiones conjuntivales extensas el injerto de membrana amniótica es en la actualidad el tratamiento de elección. En la patología corneal el trasplante de membrana amniótica es un procedimiento terapéutico eficaz, y puede considerarse como una alternativa quirúrgica útil para aquellos casos en que el tratamiento médico conservador ha fracasado.



# Amniotic Membrane Transplantation for Ocular Surface Pathology: Long-Term Results

O. Gris, A. López-Navidad, F. Caballero, Z. del Campo, and A. Adán

---

## ABSTRACT

Amniotic membrane transplantation has been used for >90 years for cutaneous and mucous lesions for regeneration of tissues. In recent years its effectiveness has been demonstrated in the treatment of diseases of the ocular surface. We present our experience with 53 amniotic membrane transplantations for different ocular pathologies with two different forms of implantation. The 53 cases were divided into three groups according to pathology and type of implant. Group 1 included 24 eyes with amniotic membrane grafts after resection of extensive conjunctival lesions. Group 2 included 19 eyes with amniotic membrane grafts for corneal pathology, and group 3 consisted of 10 eyes with amniotic membrane patches for corneal epithelial defects without ulceration. No intra- or postoperative complications were observed during an average follow-up period of 32 months (24–48 months). Group 1 demonstrated rapid healing of the lesions with minimal scarring in all cases. In group 2 a favorable response was observed in 16 of 19 cases. In group 3 complete healing was achieved in only 3 of 10 cases, and the time for which the graft remained was related to the success of the treatment. The primary intention was to achieve prolonged fixation of the implant. Finally, amniotic membrane transplantation is a safe and effective technique for the treatment of different pathologies of the ocular surface. After the resection of extensive conjunctival lesions it is currently the preferred treatment. In corneal pathology, it represents an additional therapeutic alternative when conservative medical treatments fail.

---

**T**HE AMNIOTIC MEMBRANE is the innermost layer of the placenta and consists of an avascular stromal matrix, a thick basement membrane, and a single layer of epithelial cells, that is rich in growth factors. This structure and the nature of these growth factors give the amniotic membrane its unique properties, the most important of which are its low immunogenicity and its considerable capacity for favoring the epithelialization of the tissues, reducing inflammation, scarring, and pain.<sup>1</sup> For these reasons, amniotic membrane transplantation has been used in different medical specialties for almost a century. In 1910, Davis was the first to describe the use of fetal membranes in skin transplantation.<sup>2</sup> Many investigators have subsequently used amniotic membrane transplantation to treat very different pathologies. Amniotic membrane transplantation has been used in the repair of cutaneous wounds and lesions of different etiologies<sup>3–5</sup> in the reconstruction of tendons,<sup>6</sup> vagina,<sup>7</sup> urethra,<sup>8</sup> nasal mucosa and tympanum,<sup>9</sup> the abdominal cavity,<sup>10</sup> etc. In ophthalmology, the first to use fetal membranes were De Rotth<sup>11</sup> in 1940 and Sorsby<sup>12</sup>

in 1947, for the reconstruction of the conjunctival surface. Subsequently, for almost 50 years, no new works were published using the amniotic membrane, probably due to problems with the processing and preservation of the tissue. In 1995, Kim and Tseng<sup>13</sup> reintroduced the use of the amniotic membrane in ophthalmology, reviving interest in this tissue for this specialty.

Over the last 5 years numerous articles have been published on amniotic membrane transplantation for the treatment of different pathologies of the ocular surface, both of the cornea<sup>14–19</sup> and the conjunctiva.<sup>20–23</sup> The amniotic membrane can be implanted as a graft or as a patch. The

---

From the Department of Ophthalmology (O.G., Z.d.C., A.A.) and Department of Organ and Tissue Procurement for Transplantation and Tissue Bank (A.L.N., F.C.), Barcelona, Spain.

Address reprint requests to Oscar Gris, MD, Department of Ophthalmology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Avinguda Sant Antoni M Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail: ogrisc@hsp.santpau.es

amniotic membrane, when used as a graft to cover conjunctival defects or corneal ulcers, acts like a basement membrane. Due to its structure and the presence of growth factors,<sup>24</sup> it favors the growth of epithelial tissue over it, thus restoring the ocular surface. However, when implanted in this manner, the epithelium grows over the amniotic membrane, which remains trapped within the stroma for months, affecting the transparency of the cornea. Alternatively, the amniotic membrane can also be used as a "patch," completely covering the ocular surface affected. In these cases it is intended to achieve a reduction in the inflammation and an increase in the epithelialization under the membrane. Thus, when we remove the fixation sutures, the membrane detaches completely without any remains of the implant staying on the ocular surface.

In this study we present our experience with 53 amniotic membrane transplants in patients with different pathologies of the ocular surface.

## MATERIALS AND METHODS

Between January 1999 and December 2000 we performed 53 amniotic membrane transplants on 53 eyes of 48 patients with different pathologies of the ocular surface. In the cases in which an absence of tissue (epithelium and stroma) existed or had been surgically induced at the level of the conjunctiva or the cornea, the amniotic membrane was implanted as a graft. In cases with epithelial defect alone, the amniotic membrane was implanted as a "patch." The 53 cases were divided into three groups according to the original pathology of the recipient and the type of implant carried out.

### Recipient Selection

*Group 1.* Twenty-four eyes were included from 19 patients with conjunctival lesions, which were surgically removed and in which the amniotic membrane was used as a graft after the resection. The pathologies included in this group were: superior limbic keratoconjunctivitis (n = 10); pterygium (n = 7); conjunctival nevus (n = 4); conjunctival intraepithelial neoplasia (n = 2); and conjunctival lymphoma (n = 1). All these conjunctival lesions were >5 mm and, after the resection, amniotic membrane grafting was carried out for epithelialization and regeneration of the tissue with minimal scarring.

*Group 2.* Nineteen eyes were included from 19 patients with corneal lesions in which the amniotic membrane was implanted as a graft. In 14 cases, the epithelium and the stroma were affected, and the amniotic membrane was used to achieve epithelialization and regeneration of the absent corneal stroma. The pathologies were neurotrophic corneal ulcer (n = 11) and calcific degeneration (n = 3). The other five cases included in this group were patients with bullous keratopathy and ocular pain for which penetrating keratoplasty had been ruled out as they presented with a poor visual prognosis.

*Group 3.* Ten eyes were included from 10 patients with corneal pathology that affected only the epithelium and in which the amniotic membrane was used as a "patch." All patients presented corneal epithelial defects of long duration that did not respond to conventional topical treatment using preservative-free artificial tears. The implant was intended to achieve epithelialization and thus avoid evolution toward corneal ulceration. Prior to the operation, a serologic study was performed on all the recipients for

hepatitis B (HBV) and C (HCV) viruses, human immunodeficiency virus (HIV), and syphilis.

### Placenta Donor Selection

The donors were healthy women, without a pathologic background of interest, who had been controlled during the period of pregnancy at our hospital and who had been programmed for elective cesarean. In the days prior to the cesarean placental donation was requested for transplantation purposes, in addition to procurement of serum for serologic study, by means of a written document that the donor signed.

The serologic and viral status of all donors was determined with respect to HBV, HbsAg, and anti-core IgG; HCV, anti-HCV IgG, and HCV-RNA; HIV, anti-HIV 1 and 2 IgG, and proviral HIV-DNA; and syphilis, RPR, and TPHA.

### Procurement and Preservation of Amniotic Membrane

The placenta was obtained in the operating theater during the cesarean under strict conditions of sterility and subsequently processed in the tissue bank.

First, a fragment of amniotic membrane from each placenta was sampled for microbiologic culture for bacteria and fungi. The amniotic membrane was then prepared and preserved using a method previously described by Tseng and colleagues.<sup>18</sup> The placenta was washed under a laminar flow hood with a sterile solution containing 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  penicillin, 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  streptomycin, 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  neomycin, and 2.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  amphotericin B. The amnion was bluntly dissected from the chorion. It was then mounted on fragments of nitrocellulose paper, with the epithelium uppermost. The fragments of amniotic membrane were preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  in sterile recipients containing equal amounts of Dulbecco's modified Eagle medium (Life Technologies, Ltd, Paisley, UK) and glycerol.

All amniotic membranes used for transplantation had presented a negative result in the microbiologic cultures and all the donors proved negative for all viral serologic markers and syphilis.

### Surgical Technique

All surgeries were performed by the same surgeon (O.G.) under peribulbar local anesthesia. In all transplantations performed, both grafts and patches, the amniotic membrane was implanted with the surface of the epithelium-basement membrane uppermost.

*Group 1: conjunctival graft.* Resection of the conjunctival lesion was performed and then the fragment of amniotic membrane of the same size as the defect area created was implanted. This area was always of greater size than the initial lesion, due to the retraction that occurs in the rest of the conjunctiva after the resection. The graft was sutured directly onto the conjunctiva, edge-to-edge, using interrupted 8-0 reabsorbable sutures. In the cases of neoplasia (lymphoma and conjunctival intraepithelial neoplasia), in addition to the resection of the lesion, cryotherapy was applied to the base and the margins of the resected area before proceeding with the graft.

*Group 2: corneal graft.* The amniotic membrane was also implanted as a graft in the tissue defect area and was fixed using separate radial sutures of 10-0 nylon. In all cases the implant did not extend beyond the margins of the healthy epithelium, so that epithelialization would occur over the graft. In the cases of neurotrophic corneal ulcer, the membrane was implanted in the area of the ulceration, after debriding any necrotic tissue at the edges and base of the ulcer, and removing any poorly adherent surrounding epithelium. In the cases of calcific degeneration, the

**Table 1. Amniotic Membrane Graft After Resection of Conjunctival Lesions**

Conjunctival pathology	Eyes (n)	Patient age (y)	Outcome	Follow-up (mo)
SLKC	10 (5 patients)	50 (29–59)	Successful	29.8 (25–35)
Pterygium	7	57 (32–73)	Successful	32.7 (24–45)
Nevus	4	30 (21–47)	Successful	37 (27–48)
CIN	2	57 (42–73)	Successful	28.5 (27–30)
Lymphoma	1	58	Successful	32

CIN, conjunctival intraepithelial neoplasia; SLKC, superior limbic keratoconjunctivitis.

surgery began by performing a lamellar keratectomy to eliminate all calcified tissue and the amniotic membrane graft was then implanted in the resultant defect area. The sutures were carried out edge-to-edge, as in the cases of corneal ulcer. In the patients with bullous keratopathy, the whole edematous and poorly adherent epithelium of the corneal surface was removed and the membrane was implanted by positioning its edges under the margins of the peripheral epithelium. The amniotic membrane was also fixed using interrupted 10-0 nylon sutures.

**Group 3: corneal patch.** The whole swollen and poorly adherent surrounding epithelium was removed. In these cases the implant was positioned as a “patch,” completely covering the cornea and therefore extending beyond the limits of the healthy epithelium that had been maintained. The amniotic membrane was fixed to the peripheral corneal stroma using interrupted 10-0 nylon sutures.

In all patients, chloramphenicol and dexamethasone ointments were applied at the end of the surgery, with ocular occlusion for the first 12 to 24 hours. Postoperative treatment consisted of topical dexamethasone and chloramphenicol. In group 1 it began to be administered four times per day and, subsequently, the doses were progressively reduced until withdrawal after 8 weeks. In groups 2 and 3 it began to be administered three times per day and, subsequently, the doses were progressively reduced until withdrawal after 4 weeks.

## RESULTS

The average follow-up period was 32 months (range 24–48). No intra- or postoperative complications occurred in any of the 53 eyes operated, and no worsening of the state

of the ocular surface was observed after the amniotic membrane implant.

### Group 1: Conjunctival Graft

Complete epithelialization on the amniotic membrane graft was achieved in all cases in the first week (Table 1). A progressive reabsorption of the amniotic membrane was subsequently observed until it completely disappeared, showing scarce signs of fibrosis or residual scarring 3 months after surgery.

### Group 2: Corneal Graft

The results varied according to pathology (Table 2). In the cases with neurotrophic corneal ulcer, the amniotic membrane graft achieved a cure in 9 of the 11 cases. In the 9 cases with good response, epithelialization occurred in the first 16 days after the implant, and a slow disappearance of the amniotic membrane included under the epithelium was subsequently observed. Reabsorption of the amniotic membrane was faster in those eyes that presented preoperative stromal vascularization in the cornea. The amniotic membrane was replaced by newly formed stromal tissue that allowed partial recovery of the corneal thickness. Rapid epithelialization over the graft was achieved in the three cases with calcific degeneration. Progressive reabsorption of the amniotic membrane graft subsequently occurred, also being replaced by stromal tissue, thus contributing to increased corneal thickness in the area thinned by the resection. Complete epithelialization on the amniotic membrane graft was achieved in the 5 cases with bullous keratopathy in the first 14 days after the implant. A significant improvement in pain and ocular discomfort was observed in 4 of the 5 patients operated on after the amniotic membrane implant, although the symptoms did not disappear completely. In 1 case there was no clinical improvement after the graft.

### Group 3: Corneal Patch

The results were related to the time for which the implant remained in place (Table 3). The amniotic membrane

**Table 2. Amniotic Membrane Graft in Lesions of Epithelium and Corneal Stroma**

Corneal lesion	Primary pathology	Number of cases	Age (y)	Outcome	Follow-up (mo)
Neurotrophic corneal ulceration	Herpes keratitis	5	72 (57–83)	Successful	31 (25–41)
	Pars plana vitrectomy (retinal detachment)	2	45 (28–62)	No healing	35.5 (32–39)
	Penetrating keratoplasty (penetrating trauma)	1	52	Successful	37
Bullous keratopathy	Cataract surgery	2	30 (29–31)	Successful	37.5 (31–44)
	Penetrating keratoplasty	1	51	Successful	36
	Penetrating keratoplasty	4	60 (42–75)	Improvement	33 (26–38)
Calcific degeneration	Penetrating keratoplasty	1	73	No improvement	32
	Chemical burn	2	52 (41–64)	Successful	27.5 (26–29)
	Pars plana vitrectomy (retinal detachment)	1	67	Successful	27

**Table 3. Amniotic Membrane (AM) Patch in Persistent Corneal Epithelial Defects**

Primary pathology	Patients (n)	Age (y)	AM fixation (d)	Outcome epithelialization	Follow-up (mo)
Radiotherapy	1	55	19	Complete	27
	1	49	6	Partial	30
	1	63	6	No	38
Pars plana vitrectomy	1	67	14	Complete	33
	1	45	5	Partial	29
	1	28	4	No	24
Penetrating keratoplasty	1	51	7	Partial	35
	1	74	20	No	32
Chemical burn	1	47	13	Complete	40
	1	23	3	No	26

became spontaneously detached during the first week in 6 of the 10 cases transplanted. Complete epithelialization was not achieved in any of these. However, in 3 of the 4 cases in which the amniotic membrane remained fixed for  $\geq 2$  weeks, complete epithelialization was achieved.

## DISCUSSION

In recent years, amniotic membrane transplantation has become the treatment of choice for some pathologies of the ocular surface. In other pathologies, with effective medical treatment, it represents a therapeutic alternative when these conservative medical treatments fail. In any case, amniotic membrane transplantation is currently an expanding surgical technique in ophthalmology.

A transplanted amniotic membrane induces epithelialization of the tissues, and reduces inflammation and scarring. The amniotic membrane favors growth, adhesion, and differentiation of the epithelial cells, in addition to preventing their apoptosis.<sup>25</sup> The thick basement membrane represents an excellent substratum for epithelialization. Reduction in inflammation in the tissues after amniotic membrane implant<sup>15,16</sup> and reduction in scarring<sup>20</sup> have also been highlighted by numerous researchers. These findings may be explained by other studies showing that the amniotic membrane attracts and traps inflammatory cells infiltrating the ocular surface,<sup>26</sup> contains various forms of protease inhibitors,<sup>27</sup> and suppresses transforming growth factor- $\beta$  signaling and proliferation and myofibroblast differentiation of normal human corneal and limbal fibroblasts.<sup>28</sup>

The amniotic membrane can be implanted in two different ways depending on the objectives sought. In cases with a tissue defect (neurotrophic corneal ulcers or after resections of corneal and/or conjunctival tissue), the amniotic membrane is used as a graft. In these cases the objective is to obtain epithelialization over the basement membrane of the amniotic membrane graft to achieve closing of the wound as quickly as possible. Subsequently, the transplanted amniotic membrane fragment remains trapped under the epithelium and is progressively reabsorbed and replaced by newly formed stromal tissue.<sup>29</sup> When faced with

a corneal lesion with an epithelial defect alone, and the Bowman layer intact without stromal tissue defect, the implantation technique varies. In such cases, epithelialization must occur to prevent evolution toward ulceration, but the epithelium should not be permitted to grow over the graft as the amniotic membrane fragment would remain under the epithelium for months, reducing corneal transparency and affecting vision. In these cases, the amniotic membrane is implanted as a "patch," covering the epithelial defect and extending beyond its limits. The amniotic membrane thus acts by protecting the lesion from the mechanical trauma of blinking (like a therapeutic contact lens) and, moreover, provides the biologic properties previously discussed to favor epithelialization.<sup>19</sup> With this form of implantation the epithelium grows under the implant. Once epithelialization has been achieved, the amniotic membrane can be completely removed, such that corneal transparency is not affected.

The results obtained after amniotic membrane transplantation vary depending on pathology and type of implant. After resection of extensive conjunctival lesions (group 1), the amniotic membrane graft achieved a rapid healing with minimal scars in all cases. In small-sized lesions, spontaneous healing or approximation of the edges with sutures is sufficient, and no implantation is required. However, after resection of extensive conjunctival lesions, the underlying sclera should not be left exposed, as this could cause excessive scarring or even scleral necrosis. Until recently, therapeutic options included covering the exposed sclera with oral mucosa (with differing physiologic behavior and aesthetic appearance) or with conjunctiva from the contralateral eye (which transfers the problem of extensive resection to the other eye). With the amniotic membrane implant, results in these cases have improved significantly, achieving rapid healing of the lesions originating from the surrounding healthy tissue, with minimal residual scarring. This is currently our technique of choice after resection of extensive conjunctival lesions, especially when localized in the interpalpebral area, because, due to its exposure, it will tend to heal with more scarring.

In group 2 we used the amniotic membrane as a graft for corneal pathology. Eleven cases corresponded to neurotrophic corneal ulcers that did not respond to conventional medical treatment. The amniotic membrane graft achieved epithelialization in 9 of the 11 cases. This can be considered as a very good result, given the difficulty in favorable resolution of such cases. In the 9 cases with good response we observed how, after epithelialization over the graft, the amniotic membrane fragment remained in the corneal stroma for months, and underwent progressive reabsorption until it disappeared completely. The speed of reabsorption of the amniotic membrane was related to the presence of neovascularization in the corneal stroma.

We recently described histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea.<sup>29</sup> We observed how the intrastromal amniotic membrane fragment does not cause an inflammatory reaction or rejection in avascular



corneas and that reabsorption in these patients is slow. However, in corneas with considerable neovascularization, reabsorption occurs faster, as the lymphocytes and histiocytes easily arrive from the blood vessels. After reabsorption of the amniotic membrane, a newly formed stromal tissue appeared in all cases, partially reducing the thinning caused by the ulcers. The response was favorable in the three cases with calcific degeneration, with proper healing being achieved that originated from the surrounding healthy tissue following lamellar keratectomy. As with cases of corneal ulcer, the newly formed stroma recovered part of the thickness lost in the resection of the lesion. Four of the five patients with symptomatic bullous keratopathy experienced a notable reduction in pain and considerable relief from their symptoms. One patient experienced no clinical improvement after implant. The discomfort did not, however, completely disappear in any of the cases, and the long-term duration of the effect is currently unknown.

The effectiveness of the amniotic membrane patch in patients with nonulcerated corneal epithelial lesions was variable. In these patients the effectiveness of the treatment was related to the time the implant remained in place. Complete epithelialization was achieved in three of the four cases in which the membrane was maintained for  $\geq 2$  weeks. Although there were few cases in this group, this percentage is important given the difficulty in epithelialization of these cases. In contrast, complete epithelialization was not achieved in any case when the membrane became detached within the first week. The main problem with the amniotic membrane patch is that of maintaining it fixed for  $> 2$  weeks. This problem does not exist when we implant the amniotic membrane as a graft, because as soon as the surrounding epithelium begins to grow over the membrane the latter becomes fixed. However, when the implant is of a "patch" type, the epithelium grows under the membrane and only the sutures can fix it. Despite having tried different types of suture (continuous vs interrupted, corneal fixation vs corneal-conjunctival fixation), the continuous mechanical effect of blinking may detach the implant in the initial days. In our experience that best way to maintain the amniotic membrane in these cases is with an implant that covers the whole cornea without extending beyond the sclerocorneal limbus, using a peripheral cornea suture with 10-0 nylon. A therapeutic contact lens is then applied postoperatively, which protects the implant from blinking.<sup>19</sup>

In conclusion, amniotic membrane transplantation is currently an expanding surgical technique in ophthalmology. The amniotic membrane graft in conjunctiva and cornea, after resection of conjunctival lesions and after lamellar keratectomy (as in the case of calcific degeneration), achieves excellent results. In these cases we consider it the preferred procedure because it surpasses the results obtained with the other therapeutic alternatives. The amniotic membrane graft is useful in the treatment of neurotrophic corneal ulcers. However, because most cases respond to suitable medical treatment, the amniotic membrane graft should always be reserved as a second

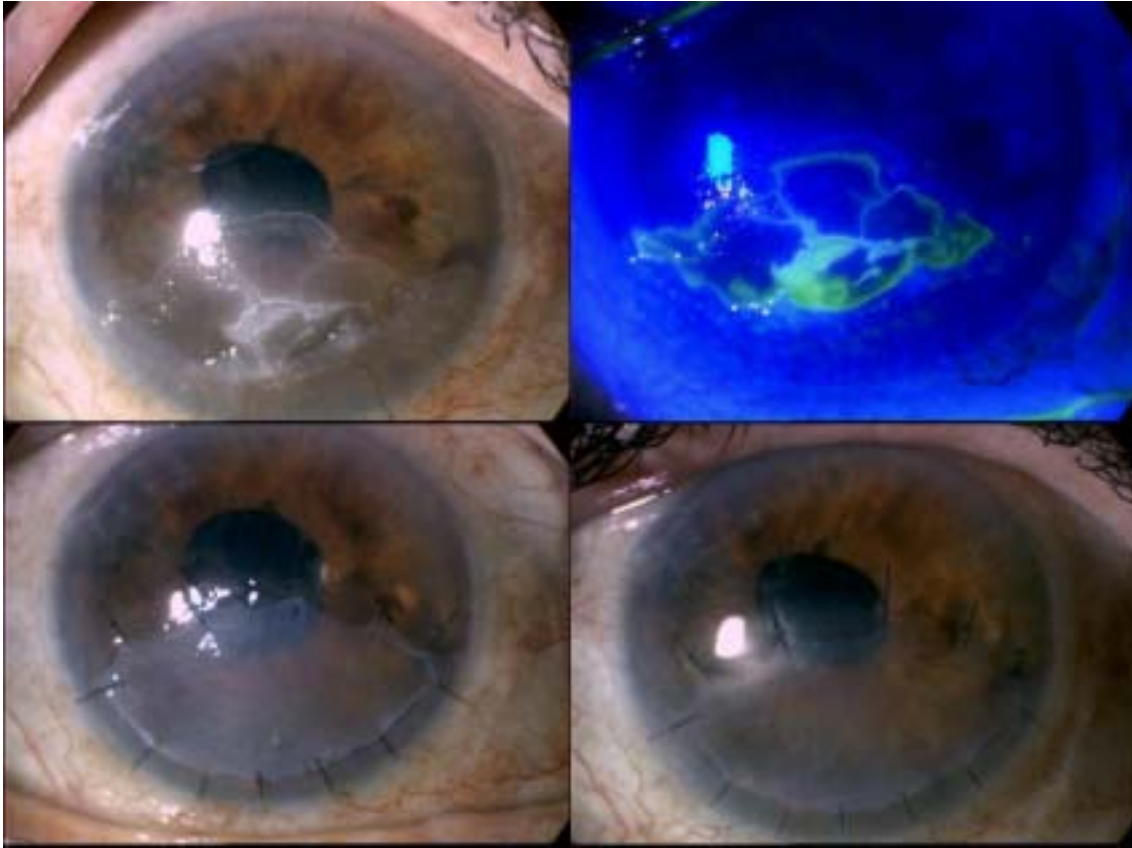
option, together with other surgical alternatives, such as tarsorrhaphy. In cases with bullous keratopathy, the definitive treatment for both pain and visual recovery consists in corneal transplantation. Nevertheless, the amniotic membrane graft may be useful in those patients who reject the transplantation option due to low potential visual acuity, or in those in which transplantation cannot be carried out. In cases with epithelial defect without corneal ulceration, the situation is similar to those cases with neurotrophic corneal ulcer. Given that many patients respond to suitable medical treatment, this constitutes the first choice. However, if there is no response, surgical treatments should be tried before the lesion progresses to ulceration or even perforation. In these difficult-to-resolve cases, the amniotic membrane implant used as a patch may be an effective therapeutic alternative.

## REFERENCES

1. Trelford JD, Trelford-Sauder M: *Am J Obstet Gynecol* 134:833, 1979
2. Davis JW: *Johns Hopkins Med J* 15:307, 1910
3. Colocho G, Graham WP, Greene AE, et al: *Arch Surg* 109:370, 1974
4. Chuntrasakal C: *Med Assoc Thailand J* 60:66, 1977
5. Prasad JK, Feller I, Thomson P: *J Trauma* 26:945, 1986
6. Pinkerton MC: *Lancet* 1:70, 1942
7. Tancer ML, Katz M, Perez Veridiano N: *Obstet Gynecol* 54:345, 1979
8. Brandt FT, Albuquerque CD, Lorenzato FR: *Int J Surg Invest* 1:409, 2001
9. Zohar Y, Talmi YP, Finkelstein Y, et al: *Laryngoscope* 97:978, 1987
10. Trelford-Sauder M, Trelford JD: *Surg Gynecol Obstet* 145:699, 1977
11. De Roth A: *Arch Ophthalmol* 23:522, 1940
12. Sorsby A, Symons HM: *Br J Ophthalmol* 30:337, 1946
13. Kim JC, Tseng SCG: *Cornea* 14:473, 1995
14. Lee S, Tseng SCG: *Am J Ophthalmol* 123:303, 1997
15. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE: *Ophthalmology* 106:1504, 1999
16. Chen HJ, Pires RTF, Tseng SCG: *Br J Ophthalmol* 84:826, 2000
17. Pires RT, Tseng SC, Prabhasawat P, et al: *Arch Ophthalmol* 117:1291, 1999
18. Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, et al: *Arch Ophthalmol* 116:431, 1998
19. Gris O, del Campo Z, Wolley-Dod C, et al: *Cornea* 21:22, 2002
20. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee S: *Am J Ophthalmol* 124:765, 1997
21. Shimazaki J, Yang H, Tsubota K: *Ophthalmology* 104:2068, 1997
22. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS: *Br J Ophthalmol* 83:399, 1999
23. Meller D, Pires RT, Mack RJ, et al: *Ophthalmology* 107:980, 2000
24. Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, et al: *Curr Eye Res* 20:173, 2000
25. Boudreau N, Werb Z, Bissell MJ: *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3500, 1996
26. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, et al: *Cornea* 20:408, 2001
27. Kim JS, Kim JC, Na BK, et al: *Exp Eye Res* 70:329, 2000
28. Tseng SCG, Li D-Q, Ma X: *J Cell Physiol* 179:325, 1999
29. Gris O, Wolley-Dod C, Güell JL, et al: *Ophthalmology* 109:508, 2002



**Figura 2.** Aspecto preoperatorio de un pterigion recidivado (imagen superior izquierda). Primer día postoperatorio tras la resección del pterigion con injerto de membrana amniótica (superior derecha). Tres semanas (inferior izquierda) y tres meses (inferior derecha) después de la cirugía se observa una correcta regeneración conjuntival sin recurrencia de la lesión.



**Figura 3.** Degeneración cálcica en un ojo ambliope (imágenes superiores). Aspecto postoperatorio 1 semana después de la cirugía (inferior izquierda) y 2 meses después (inferior derecha).

**IMPLANTE DE MEMBRANA AMNIOTICA COMO LENTE DE CONTACTO  
TERAPÉUTICA EN EL TRATAMIENTO DE LESIONES EPITELIALES**

**AMNIOTIC MEMBRANE IMPLANTATION AS A THERAPEUTIC CONTACT LENS  
FOR THE TREATMENT OF EPITHELIAL DISORDERS**

**Gris O**, del Campo Z, Wolley-Dod C, Güell JL, Bruix A, Calatayud M, Adán A.

Cornea 2002; 21: 22-27



## COMENTARIO

Este trabajo analiza la eficacia y seguridad del recubrimiento con membrana amniótica en defectos epiteliales de la córnea, sin ulceración estromal. El estudio incluye 20 pacientes que fueron divididos en dos grupos en función de la etiología de la lesión. El grupo 1 estaba constituido por 10 pacientes con defectos epiteliales persistentes que no habían respondido previamente al tratamiento médico y que, por tanto, planteaban una dificultad terapéutica importante. En el grupo 2 se incluyeron 10 pacientes con defectos epiteliales que habían sido inducidos quirúrgicamente y los cuales, aunque se acompañaban de una patología de base que teóricamente podía dificultar la epitelización (problema neurotrófico o hipofunción del limbo esclerocorneal), presentaban un mejor pronóstico que el grupo 1. En todos ellos se realizó un recubrimiento con membrana amniótica ya que la ausencia de ulceración estromal permitía evitar el trasplante en modo de injerto. No se observó ninguna complicación intra o postoperatoria, y tras el implante en todos los pacientes se evidenció una disminución significativa de la hiperemia en los primeros días del postoperatorio. En el grupo 1, que planteaba un problema terapéutico importante, se consiguió la epitelización completa en 3 de los 4 casos en los que la membrana amniótica permaneció durante 2 o más semanas. Por el contrario, cuando el implante se desprendió durante la primera semana, no se produjo la epitelización en ninguno de los casos. En el grupo 2 se observó una rápida y homogénea epitelización de todas las córneas independientemente del tiempo de permanencia del implante de membrana amniótica.

En el trabajo también se evaluaron tres formas distintas de implante: el tipo C+L (que recubría toda la córnea sobrepasando el limbo en unos 3 mm y que se fijaba con suturas en córnea periférica y esclera), el tipo C (que recubría la córnea sin sobrepasar el limbo y se fijaba con suturas en córnea periférica), y el tipo C protegido

a su vez por una lente de contacto terapéutica. La permanencia global media del implante sobre la córnea fue de 12.5 días (rango 3-34 días). La permanencia media por tipos de implante fue de 8.6 días para el tipo C+L, de 10.4 días para el tipo C, y de 22.6 días para el tipo C asociado a lente de contacto.

En conclusión, el recubrimiento con membrana amniótica es eficaz en el tratamiento de defectos epiteliales corneales que no respondan al tratamiento médico. En los casos de difícil respuesta la eficacia está relacionada con el tiempo de permanencia de la membrana. El implante que consiguió una mayor permanencia fue el tipo C asociado a lente de contacto terapéutica. No se observaron diferencias entre el implante C y el C+L.

# Amniotic Membrane Implantation as a Therapeutic Contact Lens for the Treatment of Epithelial Disorders

Oscar Gris, M.D., Zoraida del Campo, M.D., Charlotte Wolley-Dod, M.D., José L. Güell, M.D., Anna Bruix, M.D., Marta Calatayud, M.D., and Alfredo Adán, M.D.

**Purpose.** To evaluate the efficacy and safety of amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens in the treatment of different epithelial defects without stromal ulceration. **Methods.** We used amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens in 20 consecutive patients with epithelial defects. Group 1 included 10 patients with persistent epithelial defects that did not respond to medical treatment. Group 2 included 10 patients with surgically induced epithelial defects. **Results.** No intra- or postoperative complications were observed. The amniotic membrane implant remained in place for a mean of 12.5 days (range, 3–34). In 11 of the 20 patients, the amniotic membrane implant became detached within the first 8 days. When the corneal implant was postoperatively covered with a soft contact lens, this time increased. In group 1, complete epithelialization was achieved in three of the four cases in which the amniotic membrane remained in place for 2 or more weeks. There were no cases of complete epithelialization in which the implant remained in place for less than 1 week. In group 2, epithelialization was achieved in all cases, regardless of the time that the implant remained in place. **Conclusion.** Amniotic membrane implanted as a therapeutic contact lens can be an effective and safe option for the treatment of different epithelial defects. In patients with persistent epithelial defects, the number of cases with complete postoperative epithelialization was higher when the amniotic membrane remained in place longer. The early detachment of the amniotic membrane implant remains a major problem, even with the use of multiple fixation sutures.

**Key Words:** Epithelial defect—Persistent epithelial defect—Amniotic membrane—Therapeutic contact lens—Soft contact lens—Bandage contact lens.

There are various pathologies that can affect the ocular surface resulting in epithelial defect formation that may become persistent if normal epithelialization processes fail. In these cases, a delay in

epithelialization can lead to the formation of permanent anterior stromal opacification, corneal ulceration with thinning, or even perforation. Therefore, treatment must be initiated as soon as an epithelial defect has been diagnosed to achieve epithelialization as quickly as possible and to try to prevent possible complications. Initially, all possible causes of epithelial defect must be identified and avoided. If this is not possible, preservative-free artificial tears should be used and all other possible topical medication stopped to decrease epithelial toxicity.<sup>1</sup> If, despite these measures, epithelialization does not occur, therapeutic contact lenses have been the treatment of choice before proceeding to more aggressive surgical interventions or less aesthetically satisfactory techniques, such as lateral tarsorrhaphy. Several studies have demonstrated the efficacy of therapeutic contact lenses for the treatment of persistent epithelial defects.<sup>2</sup> However, they are not always effective, and there are numerous potentially serious complications from their use. These include infection and corneal stroma neovascularization in more inflamed eyes.<sup>3</sup>

In recent years, following the works of Kim and Tseng,<sup>4</sup> interest in the use of amniotic membrane in ocular surface pathology has been revived, achieving favorable results in the treatment of different corneal and conjunctival pathologies.<sup>5–12</sup> Amniotic membrane, when used as a graft to cover conjunctival defects or corneal ulcers, acts like a basement membrane. Because of its structure and the presence of growth factors,<sup>13</sup> it favors the growth of epithelial tissue over it, thus restoring the ocular surface. However, implanted in this manner, the epithelium grows over the amniotic membrane, which remains trapped within the stroma for months, affecting the transparency of the cornea. Recently, some authors have used amniotic membrane as a patch. A patch has been used to improve corneal healing in cases of chemical or thermal burns,<sup>14</sup> in cases of neurotrophic ulcer with or without previous amniotic membrane corneal graft,<sup>15</sup> and after excimer laser photoablation.<sup>16–18</sup> In theory, amniotic membrane could also act as a therapeutic contact lens if used to cover the entire corneal surface in patients with a persistent epithelial defect. In this way, the mechanical advantages afforded by a soft contact lens<sup>3</sup> combine with the biologic properties of the amniotic membrane.<sup>5,8,13</sup> In addition, because the entire cornea is covered, extending beyond the edges of the epithelial defect, epithelialization occurs underneath the amniotic membrane. The membrane is neither trapped within the cornea nor affects the transparency of the cornea once it has been eliminated.

Submitted April 24, 2001. Revision received September 5, 2001. Accepted September 11, 2001.

From the Department of Ophthalmology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (O.G., Z.D.C., C.W.D., A.B., A.A.) and Instituto de Microcirugía Ocular (O.G., J.L.G., M.C., A.A.), Barcelona, Spain.

The authors have no proprietary interest in the material presented in this article.

Address correspondence and reprint requests to Dr. O. Gris, Department of Ophthalmology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret, 167, Barcelona 08025, Spain.

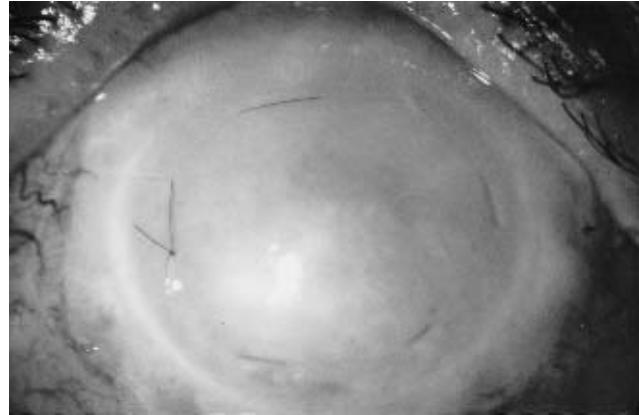


In this report, we present our results using amniotic membrane as a therapeutic contact lens for the treatment of epithelial defects without stromal ulceration, both in persistent epithelial defects and in some cases with surgically induced epithelial defects.

**MATERIALS AND METHODS**

From January to December 1999, we used the amniotic membrane implant as a therapeutic contact lens in 20 eyes of 20 consecutive patients with epithelial defects without stromal ulceration. They were divided into two groups depending on the nature of the epithelial defect. In group 1, we included 10 eyes with persistent epithelial defects unresponsive to medical therapy (clinical and demographic data are summarized in Table 1). In all patients, topical medications had been discontinued and preservative-free artificial tears were used for a minimum of 4 weeks. If this therapy failed to achieve complete epithelialization, we performed amniotic membrane implantation. All patients with limbal stem cell deficiency diagnosed on clinical examination or impression cytology were excluded. The mean duration of the epithelial defect before surgery was 6.6 weeks (range, 4–10). The persistent epithelial defects occurred after penetrating keratoplasty (three cases), pars plana vitrectomy (two cases), ocular chemical burns (two cases), and radiotherapy (three cases). In five of these 10 patients, the amniotic membrane was implanted covering the entire cornea without extending beyond the limbal region (C), and in the other five patients, the amniotic membrane was used to cover the entire cornea extending beyond the limbus by 3 mm in 360 degrees (C+L) (Fig. 1).

In group 2, we included 10 eyes with surgically induced corneal epithelial defects (clinical and demographic data are summarized



**FIG. 1.** Implantation technique of the amniotic membrane (C + L). The amniotic membrane covers the entire corneal surface extending beyond the limbus by 3 mm in 360°. A running 10-0 nylon suture is used at the peripheral cornea in addition to interrupted 9-0 Vicryl sutures to secure the limits of the implant at the conjunctiva.

in Table 2). These included three cases of Salzmann’s degeneration and two of congenital aniridia. They had raised degenerative subepithelial lesions or corneal pannus that affected visual acuity and caused ocular discomfort. A superficial keratectomy respecting Bowman’s membrane was performed in these five patients, followed by an amniotic membrane implant to cover the entire cornea extending beyond the limbus by 3 mm in 360 degrees (C+L). The other five cases corresponded to neurotrophic corneal ulcers treated with an amniotic membrane graft. In these cases, in the same surgical procedure, an amniotic membrane patch was implanted that covered the graft and the entire cornea without extending beyond the limbus (C) (Fig. 2).

**TABLE 1.** Persistent epithelial defects

Patient no.	Age (y)	Gender	Primary diagnosis	Secondary diagnosis	PED (wk)
1	47	F	PED after chemical burn	Amblyopia	6
2	55	F	PED after radiotherapy	Graves thyroid ophthalmopathy	7
3	51	F	PED after PK	SLE/dry eye, previous PK	8
4	67	F	PED after 2 PPV	Diabetes mellitus	7
5	74	M	PED after PK	PDR ABK (2 PK) glaucoma	8
6	49	M	PED after radiotherapy	Cranial base tumor/floppy eyelid	6
7	45	F	PED after PK	2 previous PPV	4
8	23	F	PED after chemical burn		10
9	28	M	PED after 2 previous PPV	High myopia	4
10	63	M	PED after radiotherapy	Sebaceous carcinoma of eyelid	6

Patient no.	Treatment	Postoperative SCL	AM duration (d)	Outcome after first AM implant	Additional surgical procedures after AM
1	AM (C+L)	No	13	Complete epithelialization	
2	AM (C+L)	No	19	Complete epithelialization	
3	AM (C)	No	7	Partial epithelialization	AM (C) with postop SCL → complete epithelialization (23 d)
4	AM (C)	Yes	14	Complete epithelialization	
5	AM (C)	No	20	No epithelialization	
6	AM (C)	Yes	6	Partial epithelialization	Lateral tarsorrhaphy
7	AM (C+L)	No	5	Partial epithelialization	AM (C) with postop SCL → no epithelialization (3 d)
8	AM (C+L)	No	3	No epithelialization	
9	AM (C)	No	4	No epithelialization	
10	AM (C+L)	No	4	No epithelialization	

PED, persistent epithelial defect; SCL, soft contact lens; AM, amniotic membrane; PK, penetrating keratoplasty; PPV, pars plana vitrectomy; SLE, systemic lupus erythematosus; PDR, proliferative diabetic retinopathy; C+L, implant covers cornea and limbus; C, implant covers cornea.

TABLE 2. Surgically induced epithelial defects

Patient no.	Age (y)	Gender	Diagnosis	Surgical treatment	AM patch	Postop SCL	AM duration (d)	Outcome
11	62	M	Salzmann's degeneration	Superficial keratectomy	AM (C+L)	No	21	Complete epithelialization
12	65	M	Salzmann's degeneration	Superficial keratectomy	AM (C+L)	No	5	Complete epithelialization
13	32	F	Corneal pannus in congenital aniridia	Superficial keratectomy	AM (C+L)	No	6	Complete epithelialization
14	57	M	Salzmann's degeneration	Superficial keratectomy	AM (C+L)	No	7	Complete epithelialization
15	23	M	Corneal pannus in congenital aniridia	Superficial keratectomy	AM (C+L)	No	3	Partial epithelialization
16	58	M	Neurotrophic corneal ulcer (postherpetic)	AM graft	AM (C)	No	13	Complete epithelialization
17	28	M	Neurotrophic corneal ulcer (post-PK)	AM graft	AM (C)	No	8	Partial epithelialization
18	27	M	Neurotrophic corneal ulcer (post-PPV)	AM graft	AM (C)	Yes	28 (removed)	Complete epithelialization
19	83	M	Neurotrophic corneal ulcer (post-PK)	AM graft	AM (C)	Yes	34 (removed)	Complete epithelialization
20	68	M	Neurotrophic corneal ulcer (postherpetic)	AM graft	AM (C)	Yes	31 (removed)	Complete epithelialization

AM, amniotic membrane; C+L, implant covers cornea and limbus; C, implant covers cornea; PK, penetrating keratoplasty.

The amniotic membrane was prepared and preserved using the method previously described by Tseng and colleagues.<sup>8</sup> The human placenta is obtained from elective cesarean sections in women who have been previously screened with serologic tests for human immunodeficiency virus, hepatitis B, hepatitis C, and syphilis. The placenta is washed under a laminar flow hood with a sterile solution containing 50  $\mu$ L/mL penicillin, 50  $\mu$ L/mL streptomycin, 100  $\mu$ L/mL neomycin, and 2.5  $\mu$ L/mL amphotericin B. The amnion is bluntly dissected from the chorion. It is then mounted on fragments of nitrocellulose paper, with the epithelium uppermost. The fragments of amniotic membrane are preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  in sterile recipients containing equal amounts of Dulbecco's modified Eagle medium (Life Technologies Inc., Paisley, Scotland) and glycerol.

The same surgeon carried out all the surgical interventions (O.G.) under peribulbar anesthesia. In the 10 cases of persistent epithelial defect, any poorly adhered epithelium was removed from the margins of the defect using microsponges and a 0.12 forceps. The amniotic membrane was implanted with the epithelial side uppermost. When the membrane was used to cover the entire

cornea without extending beyond the limbus (C), it was secured using interrupted 10-0 nylon sutures parallel to and 0.5 mm from the limbus, with the knots buried (Fig. 2). When the amniotic membrane implant was applied to the entire cornea extending beyond the limbus in 360 degrees by 3 mm (C+L), it was doubly secured using both continuous 10-0 nylon sutures on the peripheral cornea and interrupted 9-0 Vicryl sutures at the conjunctiva with episcleral bites (Fig. 1). In all patients, chloramphenicol and dexamethasone ointments were applied at the end of the surgery, with ocular occlusion for the first 24 hours. A therapeutic contact lens was fitted once the occlusion had been removed in five of the 10 cases in which the amniotic membrane covered the cornea alone to maintain the membrane in position longer. In the remaining five cases and in the additional 10 cases in which the membrane exceeded the limbus, therapeutic contact lenses were not used. Postoperative treatment consisted of dexamethasone drops twice daily and chloramphenicol drops three times daily in the patients fitted with a therapeutic contact lens, and the same in ointment form in those without.

A second implant was used that did not extend beyond the limbus (C) combined with a therapeutic contact lens to maintain the membrane in place longer in cases in which improvement had been shown but not complete epithelialization, after early loss of the original amniotic membrane implant (cases 3 and 7 in Table 1). In case 6 (Table 1), in which early detachment of the implant with partial epithelialization had also occurred, we preferred to perform a lateral tarsorrhaphy. In this case, we opted for a lateral tarsorrhaphy instead of a second amniotic membrane implant because the patient presented with a mild floppy eyelid syndrome.

## RESULTS

There were no intra- or postoperative complications. In the early postoperative period, all cases showed a decrease in ocular hyperemia, which included the uncovered conjunctiva surrounding the amniotic membrane. The amniotic membrane implant remained in place for a mean of 12.5 days (with a minimum of 3 days and a maximum of 34 days). In group 1, which consisted of 10 patients with persistent epithelial defect, complete epithelialization occurred in three cases and partial epithelialization in three. There

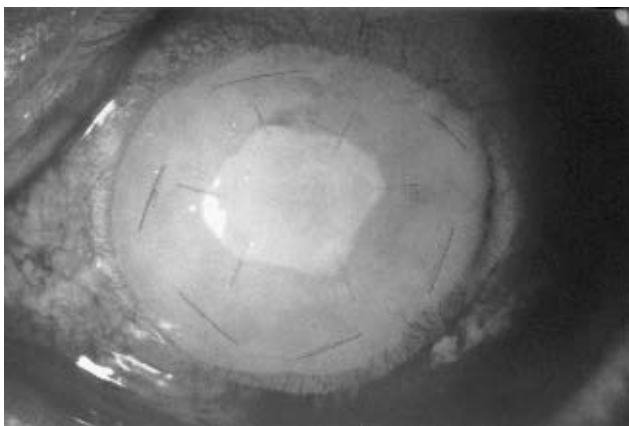
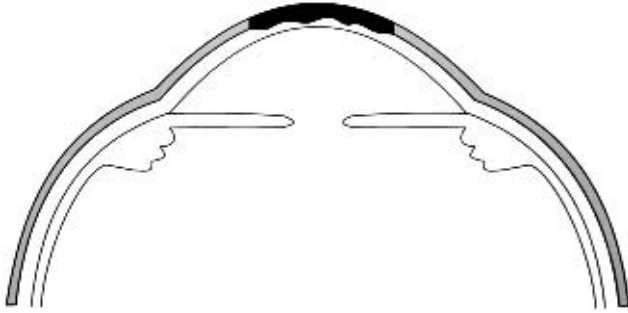


FIG. 2. Implantation technique of the amniotic membrane (C) in a patient with a neurotrophic ulcer. In this patient, the amniotic membrane covers the entire corneal surface (and the previous graft) without extending beyond the limbus. It is secured at the peripheral cornea with interrupted 10-0 nylon sutures, in parallel to and 0.5 mm from the limbus. The knots must be buried with care.



**FIG. 3.** Implantation of amniotic membrane as a graft in a case of corneal ulceration. The amniotic membrane is grafted on the stromal defect (in one or more layers) and sutured without extending beyond the borders of the ulcer. The epithelialization in these cases will occur over the amniotic membrane, which remains trapped within the stroma until reabsorption is completed (amniotic membrane is shown in black and corneal-conjunctival epithelium in gray).

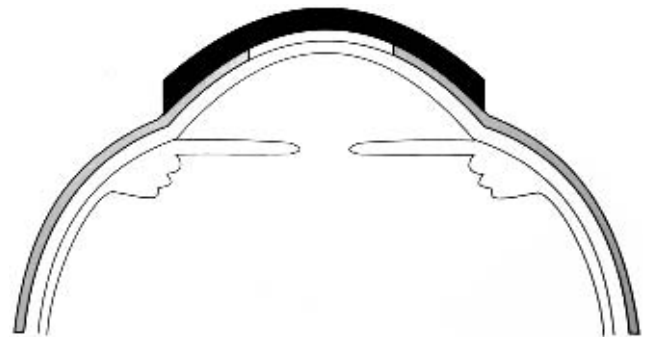
was no response in four cases. The amniotic membrane implant detached within the first week in six of the 10 cases and in the remaining four cases between 2 and 3 weeks. Complete epithelialization was achieved in three of the four cases in which the amniotic membrane remained in place for 2 or more weeks. In contrast, complete epithelialization occurred in none of the six cases in which the amniotic membrane implant was lost during the first week. Of these patients, half showed no response, and half achieved only partial epithelialization. Of the cases in which only partial epithelialization occurred, one patient achieved complete epithelialization after a second implant (case 3), another patient showed no change despite another implant (case 7), and the third patient, with an associated floppy eyelid, proceeded to tarsorrhaphy (case 6). A therapeutic contact lens was applied postoperatively in two of the five cases with type C implants. In case 4, the implant remained in situ for 14 days with complete epithelialization achieved, whereas in case 6, the implant became detached on day 6, probably owing to an associated floppy eyelid.

In the second group, consisting of 10 patients with surgically induced epithelial defects, complete epithelialization was achieved irrespective of the length of time the amniotic membrane implant remained in place. Complete epithelialization was observed in eight of the 10 cases at the time of detachment or removal of the amniotic membrane. Partial epithelialization was observed in the two remaining cases when the implant became detached (at 3 and 8 days). However, both achieved complete spontaneous epithelialization within a few days. The application of a therapeutic contact lens postoperatively over the amniotic membrane in the five cases of this group in which the implant did not extend beyond the limbus (C) increased the time the amniotic membrane remained in situ. In cases 16 and 17, in which a contact lens was not used, the amniotic membrane became detached within 2 weeks. In cases 18, 19, and 20, the contact lens and amniotic membrane remained in place for more than 4 weeks, until both were removed. The mean follow-up period was 17 months (range, 12–23). No recurrence of the epithelial defect occurred in any of the cases that had responded to the amniotic membrane implant.

## DISCUSSION

In recent years, various studies have shown the amniotic membrane graft to be effective in the treatment of a variety of patholo-

gies: corneal ulcers,<sup>5,10,15</sup> bullous keratopathy,<sup>11</sup> and in the reconstruction of the ocular surface in cases of partial limbal stem cell deficiency.<sup>8</sup> The surgical technique used in all these situations involves covering the epithelial-stromal defect with a fragment of amniotic membrane, occasionally using more than one layer of amniotic membrane. This amniotic membrane fragment was sutured edge to edge to the surrounding healthy epithelium (Fig. 3), without extending beyond the margins of the epithelial defect. In this way, the amniotic membrane acts as a basal membrane, allowing reepithelialization over it, stemming from the surrounding healthy epithelium. Thus, we can treat corneal ulcers before they progress to perforation,<sup>5,10</sup> improve the symptoms in bullous keratopathy associated with poor visual potential,<sup>11</sup> or reconstruct in cases with severe ocular surface pathology.<sup>8</sup> However, with this technique, the amniotic membrane becomes trapped beneath the newly formed epithelium, which can considerably affect corneal transparency for several months at least. Therefore, this technique should not be used in cases in which an epithelial defect alone is involved or in those in which reepithelialization could achieve a full recovery of the visual acuity. In this report, we present our results using amniotic membrane implantation as a patch. The entire corneal surface is covered with the amniotic membrane, overlapping the edges of the epithelial defect, so that epithelialization occurs beneath the amniotic membrane (Fig. 4). In this way, corneal transparency is completely restored once the amniotic membrane either detaches or dissolves. The amniotic membrane used in this manner provides many of the advantages given by a therapeutic contact lens in that it helps to stabilize the corneal epithelium, protect against rubbing of the eyelids, decrease symptoms, and avoid drying of the cornea.<sup>3</sup> It also has a variety of biologic properties that have been previously demonstrated to favor epithelialization, which include high growth factor concentrations,<sup>13</sup> along with a reduction in inflammation and scarring.<sup>11</sup> This combination of mechanical and biologic effects suggests, at least theoretically, that the amniotic membrane implant could be a superior option to the therapeutic contact lens. However, the length of time that this type of implant remained in situ was the main problem found in our study. The amniotic membrane implant became detached within the first week in more than half of the cases, despite the use of more fixation sutures in some of these patients.



**FIG. 4.** Implantation of amniotic membrane as a therapeutic lens in a case of persistent epithelial defect. Bowman's membrane is conserved in these cases, and the amniotic membrane is used to cover the entire corneal surface, extending beyond the epithelial defect. Epithelialization will occur underneath the membrane (amniotic membrane is shown in black and corneal-conjunctival epithelium in gray).

This was probably owing to the mechanical effect of the eyelids because the epithelialization had taken place beneath the amniotic membrane and it was not tethered. We did not observe any differences in corneal epithelialization or length of time that the amniotic membrane remained in place between the two implantation techniques (C and C+L). Nevertheless, in those patients in whom the amniotic membrane did not extend beyond the limbus (C), the application of a therapeutic contact lens postoperatively succeeded in increasing the time that the implant remained in place. On examining the results of the 20 cases of the two groups, we found that four of five cases retained the membrane for 2 or more weeks with this implantation technique.

There was a difference in the degree of epithelialization between the two groups of patients. Group 1 comprised patients who showed difficulty in epithelialization. In these patients, we observed a relationship between the length of time that the amniotic membrane implant remained in place and a successful outcome. Complete epithelialization was achieved in three of the four patients in whom the amniotic membrane implant remained in place for 2 or more weeks (cases 1, 2, 4, and 5). The opposite was true when the membrane remained in place for less than a week, which was not long enough for complete epithelialization in all cases.

Because most cases of persistent epithelial defect respond to medical treatment with preservative-free lubricants or therapeutic contact lenses, these should be used as first-line treatments. Only when these options fail should surgical treatment be considered. In such cases, a corneal amniotic membrane implant (C) combined with a therapeutic contact lens could be a therapeutic option that some patients may prefer as an alternative to tarsorrhaphy.

Group 2 included patients with surgically induced epithelial defects. These patients presented fewer problems with regard to epithelialization than the patients in group 1. Epithelialization was achieved in all group 2 patients, regardless of the time that the implant remained in place. At the same time, two distinct groups of patients can be found in group 2. The first five patients (cases 11 to 15) presented with subepithelial corneal degeneration associated with congenital aniridia or Salzmann's degeneration. Epithelialization is also achieved in these patients without the use of an amniotic membrane implant on the epithelial defect left after superficial keratectomy.

However, these patients show a certain degree of hypofunction at the limbal stem cell level, and we frequently obtain a whirlwind-type pattern of epithelialization. With the use of the amniotic membrane implant to cover the cornea and limbus (C+L), we have seen more rapid and smoother epithelialization, especially in the cases of Salzmann's degeneration. This could be explained by the presence of growth factors<sup>15</sup> and the anti-inflammatory properties<sup>11</sup> of the amniotic membrane. Finally, in cases 16 to 20 of group 2, a corneal implant that did not overlap the limbus (C) was used to cover an amniotic membrane graft in the treatment of neurotrophic corneal ulcers. Various studies have demonstrated that a small graft at the site of the ulcer, consisting of one or more layers, can achieve corneal epithelialization.<sup>5,10</sup> In these cases, we always use the remaining fragment of amniotic membrane to cover the graft and corneal surface. In this way, the second implant acts as a therapeutic contact lens by protecting the original graft and providing larger quantities of growth factors and anti-inflammatory substances. Thus, epithelialization is promoted over the stromal graft and beneath the implant, which acts like a patch.

There is still dispute as to how the amniotic membrane should be implanted, with either the basement membrane or the stromal surface uppermost. When we want the epithelialization to occur over the amniotic membrane (as in corneal ulcers and conjunctival defects), the amniotic membrane should undoubtedly be placed with the basement membrane uppermost, where it acts as an excellent substrate for epithelialization. However, when used as a therapeutic contact lens, with the aim of inducing epithelial growth beneath it, it remains unclear which is the better implantation method. A recent study<sup>14</sup> used the amniotic membrane to cover the entire ocular surface including the conjunctival fornices in the treatment of acute chemical burns. The amniotic membrane was applied with the stromal surface uppermost in five eyes and the basement membrane uppermost in eight. Although the results in general were favorable, the criteria used in choosing the cases were not specified in the article nor were the results for each group given separately. We obtained favorable results in our series with the application of the amniotic membrane with the basement membrane uppermost in all cases. We have also applied the amniotic membrane with the stromal surface uppermost in subsequent cases (unpublished data). Although only a few patients were involved with a short follow-up time, little variation was observed with respect to epithelialization, decrease in inflammation, or the length of time that the amniotic membrane remained in place. In our view, there is probably little difference between the two forms of implantation in these cases because the basement membrane plays a less important role, and growth factors and anti-inflammatory substances can diffuse to the surrounding tissues. However, further studies using a larger number of cases will help to clarify this point.

Despite the small number of cases in the study, we believe that three significant conclusions can be made. First, the amniotic membrane implant used as a patch can be useful and safe to achieve healing in some cases of persistent epithelial defect that have not responded to medical treatment. Second, when the amniotic membrane implant remains in place longer, the number of successful cases appears to increase. Finally, the implantation technique C plus postoperative soft contact lens achieved longer duration of the amniotic membrane implant than the other possible implantation techniques (C and C+L). However, we should remember that this is a surgical approach. For this reason, we consider that the treatment of a persistent epithelial defect should be primarily medical with the use of preservative-free artificial tears, with or without therapeutic contact lens. This treatment is usually successful in most cases. In cases in which medical treatment has failed, an amniotic membrane implant can be a safe and useful alternative that some patients may prefer over tarsorrhaphy. Actually, our preferred technique of implantation is to use an amniotic membrane corneal implant without extending beyond the limbus with a postoperative soft contact lens to increase the time that the implant remains in place.

To evaluate whether amniotic membrane implantation is superior to other alternative therapies (soft contact lens alone or tarsorrhaphy), prospective comparative studies with larger case numbers should be performed.

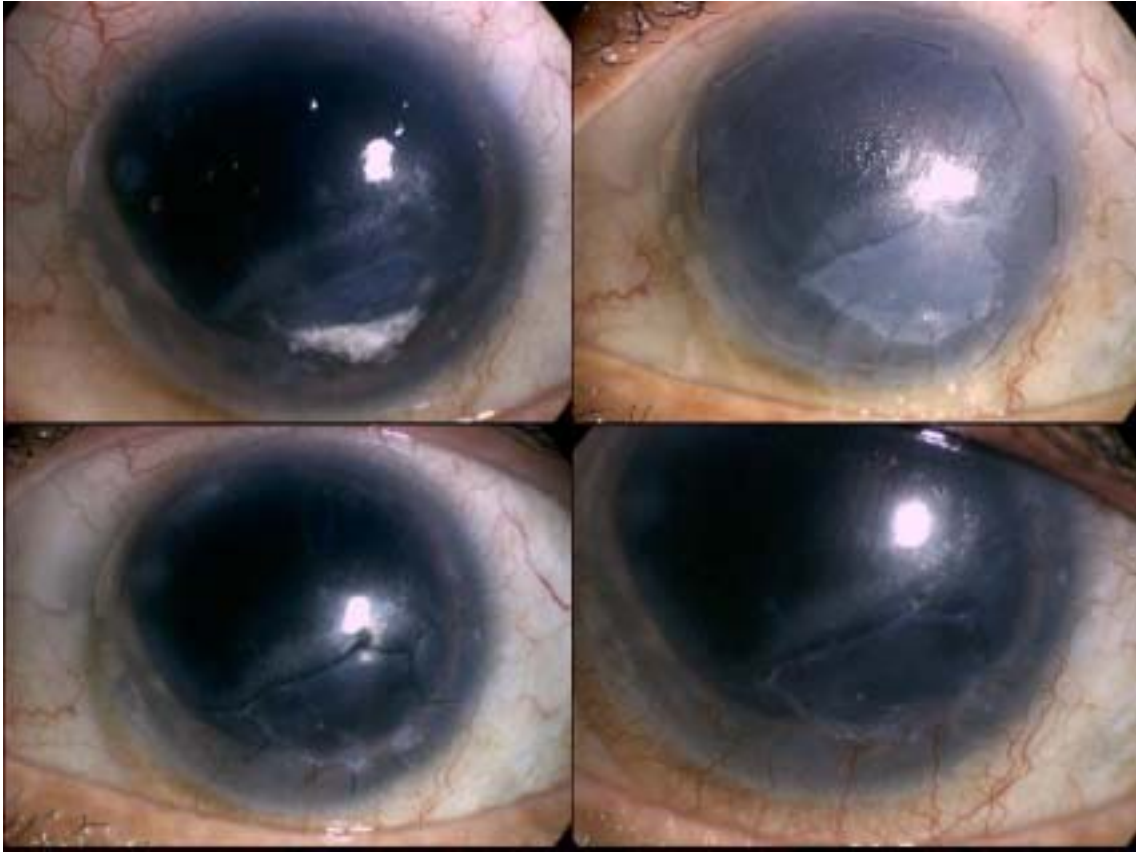
In the same way, amniotic membrane can be used like a therapeutic contact lens to protect another underlying amniotic membrane graft or to help epithelialization after corneal surgery in cases of superficial keratectomy or in which extensive deepithelialization has occurred.

## REFERENCES

1. Macaluso DC, Feldman ST. Pathogenesis of sterile corneal erosions and ulcerations. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea. Fundamentals of cornea and external disease, vol. 1*. St. Louis: Mosby, 1997:199–214.
2. Smiddy WE, Hamburg TR, Kracher GP, et al. Therapeutic contact lenses. *Ophthalmology* 1990;97:291–5.
3. McDermott ML, Chandler JW. Therapeutic uses of contact lenses. *Surv Ophthalmol* 1989;33:381–94.
4. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995;14:473–84.
5. Lee S, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997;123:303–12.
6. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee S. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997;124:765–74.
7. Shimazaki J, Yang H, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997;104:2068–76.
8. Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, et al. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998;116:431–41.
9. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999;83:399–402.
10. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999;106:1504–11.
11. Pires RTF, Tseng SCG, Prabhasawat P, et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol* 1999;117:1291–7.
12. Su CY, Lin CP. Combined use of an amniotic membrane and tissue adhesive in treating corneal perforation: a case report. *Ophthalm Surg Lasers* 2000;31:151–4.
13. Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20:173–7.
14. Meller D, Pires RT, Mack RJ, et al. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000;107:980–90.
15. Chen HJ, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol* 2000;84:826–33.
16. Choi YS, Kim JY, Wee WR, et al. Effect of the application of human amniotic membrane on rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Cornea* 1998;17:389–95.
17. Park WC, Tseng SCG. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2906–14.
18. Wang MX, Gray TB, Park WC, et al. Reduction in corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:310–9.



**Figura 4.** Degeneración nodular de Salzmann, aspecto preoperatorio (imagen superior izquierda). Aspecto postoperatorio un día después de realizar la queratectomía superficial y el recubrimiento con membrana amniótica (superior derecha). Epitelización normal y ausencia de inflamación en la superficie ocular 3 semanas después de la cirugía, tras retirar el implante de membrana amniótica (imágenes inferiores)



**Figura 5.** Úlcera corneal trófica sin respuesta al tratamiento médico (imagen superior izquierda). Tras la limpieza quirúrgica de la base y los márgenes de la lesión se realizó un injerto de membrana amniótica en la zona del defecto tisular y un recubrimiento con membrana amniótica protegiendo toda la superficie corneal hasta el limbo.

**HALLAZGOS HISTOLÓGICOS TRAS EL INJERTO DE MEMBRANA AMNIÓTICA  
EN LA CórNEA HUMANA**

**HISTOLOGIC FINDINGS AFTER AMNIOTIC MEMBRANE GRAFT IN THE HUMAN  
CORNEA**

**Gris O**, Wolley-Dod C, Güell JL, Tresserra F, Lerma E, Corcóstegui B, Adán A.

Ophthalmology 2002; 109: 508-512.





## COMENTARIO

En este estudio se describen por primera vez los hallazgos histológicos tras el injerto de membrana amniótica en la córnea, y los posibles mecanismos de reabsorción de ésta en dos situaciones clínicas diferentes. Se incluyeron dos pacientes con úlcera corneal neurotrófica (uno con ausencia de vascularización corneal y otro con una significativa neovascularización estromal) en los que el injerto de membrana amniótica consiguió la curación, y que 3 y 7 meses después del implante requirieron de una queratoplastia penetrante. Las córneas extraídas permitieron el estudio anatomopatológico.

En ambos casos se constató una epitelización normal en la zona del injerto sobre la membrana basal de la membrana amniótica. La membrana amniótica se identificó como una banda de un material homogéneo, acelular y eosinofílico, de unas 70  $\mu\text{m}$  de espesor. En las zonas en las que la membrana amniótica había sido reabsorbida, ésta fue sustituida por un tejido fibrótico de reparación que ayudó a la recuperación parcial del estroma perdido pero que no presentaba la transparencia del estroma corneal normal. En la córnea avascular del caso 1 se evidenció, mediante estudios histológicos e inmunohistoquímicos, una ausencia de reacción inflamatoria o de rechazo en el estroma corneal. En estos casos de córnea avascular creemos que los queratocitos activados, con capacidad de fagocitosis y de síntesis de colagenasas, son los responsables de un lento proceso de reabsorción. Por el contrario, en la córnea del caso 2 que presentaba una neovascularización estromal importante, la reabsorción de la membrana amniótica se produjo con mayor rapidez. Los estudios histológicos demostraron una gran cantidad de células inflamatorias en la zona, que mediante técnicas de inmunohistoquímica fueron identificadas como histiocitos y linfocitos T en su gran mayoría (y en menor grado linfocitos B).

En conclusión, el injerto de membrana amniótica consigue una epitelización adecuada sobre su membrana basal y tras la reabsorción es sustituida por un tejido de características fibróticas. En ausencia de vasos estromales no hay reacción inflamatoria ni de rechazo alrededor del injerto por lo que el proceso de reabsorción es lento. En presencia de neovasos estromales la reabsorción es rápida por la llegada de abundantes células inflamatorias a la zona.

# Histologic Findings after Amniotic Membrane Graft in the Human Cornea

Oscar Gris, MD,<sup>1,2</sup> Charlotte Wolley-Dod, MD,<sup>2</sup> José L. Güell, MD,<sup>1</sup> Francesc Tresserra, MD,<sup>3</sup> Enrique Lerma, MD,<sup>4</sup> Borja Corcostegui, MD,<sup>1</sup> Alfredo Adán, MD<sup>1,2</sup>

**Objective:** To describe the histopathologic findings in the human cornea several months after a stromal amniotic membrane graft. To show the clinicopathologic correlation after the graft in two cases with different follow-up times.

**Design:** Two interventional case reports with clinicopathologic correlation.

**Participants:** Two patients with neurotrophic corneal ulcer unresponsive to medical treatment (one with stromal vascularization and the other without stromal vascularization).

**Intervention:** Amniotic membrane graft was performed in both patients to treat the neurotrophic ulcer. Three and 7 months after amniotic membrane grafting, a penetrating keratoplasty was needed, and the removed corneas were analyzed.

**Main Outcome Measures:** Clinical and histopathologic examinations, including routine histopathologic and immunohistochemical studies.

**Results:** Complete epithelialization was observed on histologic examination over the basement membrane of the amniotic membrane graft. The amniotic membrane was slowly reabsorbed in the cornea without stromal vascularization with no inflammatory reaction produced. In the cornea that had stromal vascularization the amniotic membrane was rapidly reabsorbed because of the presence of abundant inflammatory cells. Once reabsorbed, the amniotic membrane was replaced by new fibrotic stroma, that was different from that found in the rest of the cornea but that helped to maintain corneal thickness.

**Conclusions:** The amniotic membrane graft allows for correct epithelialization in cases of neurotrophic corneal ulcer. Once the amniotic membrane is reabsorbed, it is replaced by a new fibrotic stroma, which can reduce corneal transparency. In corneas that have no stromal vascularization, the graft may remain in the stroma for many months, compromising corneal transparency during this period. *Ophthalmology* 2002;109:508–512 © 2002 by the American Academy of Ophthalmology.

In recent years the amniotic membrane has been proposed as a useful treatment option for a variety of ocular surface diseases,<sup>1–7</sup> and its clinical use has increased enormously around the world. Its important properties include the ability to favor epithelialization,<sup>1,5,8</sup> and its antiinflammatory and healing effects.<sup>6,7,9</sup> The amniotic membrane graft has proven to be an effective treatment for noninfectious corneal ulcers otherwise unresponsive to medical therapy. In these cases the amniotic membrane acts as a basement membrane, favoring an overlying epithelialization, thereby achieving healing with an increase in corneal thickness in

areas where thinning has occurred.<sup>1–3</sup> However, we do not know how the amniotic membrane behaves several months after implantation within the human stroma on a histologic level. We report on the histologic findings in two human corneas, which required penetrating keratoplasty several months after an amniotic membrane graft for the treatment of a neurotrophic corneal ulcer. In the first case there was no stromal vascularization of the cornea, which was removed 3 months after an amniotic membrane graft. In the second case the cornea had considerable stromal vascularization and was removed 7 months after amniotic membrane grafting. As far as we are aware, there have been no previously reported histologic studies that analyze amniotic membrane behavior in the human cornea.

Originally received: May 21, 2001.

Accepted: August 14, 2001.

Manuscript no. 210339.

<sup>1</sup> Instituto de Microcirugía Ocular (IMO), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Department of Ophthalmology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>3</sup> Institut Dexeus, Department of Pathology, Barcelona, Spain.

<sup>4</sup> Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Department of Pathology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

The authors have no proprietary interest in the material presented in this article.

Reprint requests to Oscar Gris, MD, Instituto de Microcirugía Ocular (IMO), Munner, 10, 08022 Barcelona, Spain.

## Case Reports

### Patient 1

A 51-year-old man with a single eye was referred to us in September 1999 with a total retinal detachment with multiple breaks in four quadrants. Surgery was performed with the placement of a 4-mm silicone band, pars plana vitrectomy with lensectomy, endolaser photocoagulation, and intraocular silicone oil injection. Although the retina was attached after surgery, 4 weeks later an

extensive corneal epithelial defect was observed. Epithelialization did not occur despite the interruption of all topical medication except preservative-free artificial tears, and a neurotrophic corneal ulcer subsequently formed. It measured 4 mm in diameter and was approximately 20% of the corneal thickness in depth. In January 2000 we decided to perform an amniotic membrane graft. The amniotic membrane was extracted and processed using the previously described protocol.<sup>1</sup> With the use of peribulbar anesthesia the ulcer base and edges were debrided with a microsponge and fine forceps, and the poorly adherent epithelium adjacent to the edge of the ulcer was removed. An amniotic membrane graft of the same dimensions as the ulcer was sutured (epithelial surface uppermost), using separate radial sutures of 10-0 nylon. Tobramycin drops three times a day were prescribed postoperatively, and sutures were removed 4 weeks later. By this time the corneal surface had completely epithelialized, and the amniotic membrane graft could be seen beneath the epithelium filling the stromal defect of the ulcer (Fig 1). Three months after the graft, the patient had a new tractional retinal detachment. Although partial reabsorption of the amniotic membrane was observed, a substantial fragment of amniotic membrane remained subepithelially (Fig 2). A combined penetrating keratoplasty and pars plana vitrectomy was performed; because of the lack of corneal transparency, a temporary Eckardt keratoprosthesis was used during the retinal surgery. The removed cornea with the intrastromal amniotic membrane was sent for histologic examination.

### Histopathologic Findings

The histopathologic findings of the removed cornea included the complete epithelialization of the corneal surface and a uniform stromal thickness. The more peripheral epithelialization that had occurred over the amniotic membrane seemed normal, with five to seven cell layers. Centrally, however, the squamous epithelium was thinner, only two to three cells thick (Fig 3). Bowman's layer was normal in appearance except centrally, in the area of the corneal ulcer, where it was absent. A 70- $\mu$ m-thick acellular eosinophilic homogenous band was observed in the central cornea. This band of tissue corresponded to the amniotic membrane graft, which did not stain with periodic acid-Schiff or Congo red but did stain green with Gomori's trichrome. No inflammatory reaction or graft rejection was seen. No giant cells were observed, and immunohistochemical stains (antibodies MAC 387, CD68, and lysozyme) were negative for monocytic or histiocytic cells around the graft. On histologic examination, we observed that tissue reabsorption produced discontinuities in the amniotic membrane graft, which were filled by fibroblasts and collagen through a process of repair (Fig 4). A basal membrane was observed between the epithelium and the amniotic membrane (Fig 3), pertaining to the latter. This basement membrane was not seen where the epithelium had grown over healthy stroma. No alterations to the endothelium, subendothelium, or Descemet's membrane were observed.

### Patient 2

A 69-year-old man with a 5-month history of keratitis in the left eye was referred to us in July 2000. The patient had an unremarkable medical history, with no previous ocular diseases or surgeries. A corneal neurotrophic ulcer was observed on slit-lamp examination, measuring 3 mm in diameter and approximately one-third corneal thickness in depth. Stromal vascularization, which reached the superior and inferior margins of the ulcer, was also observed. Preservative-free artificial tears were prescribed, and all previous topical medications were suspended. Despite this treatment, no significant change was noted after 2 weeks, and the patient went on

to surgery, using a technique similar to that described in case 1. The amniotic membrane was extracted and processed using the previously described protocol.<sup>1</sup> With the use of peribulbar anesthesia, the ulcer base and edges were debrided with a microsponge and fine forceps, and the poorly adherent epithelium adjacent to the edge of the ulcer was removed. An amniotic membrane graft of the same dimensions as the ulcer was sutured (epithelial surface uppermost), using separate radial sutures of 10-0 nylon. Tobramycin drops three times a day were prescribed postoperatively, and sutures were removed 3 weeks later. By this time the corneal surface had completely epithelialized, and the amniotic membrane graft could be seen beneath the epithelium filling the stromal defect of the ulcer (Fig 5).

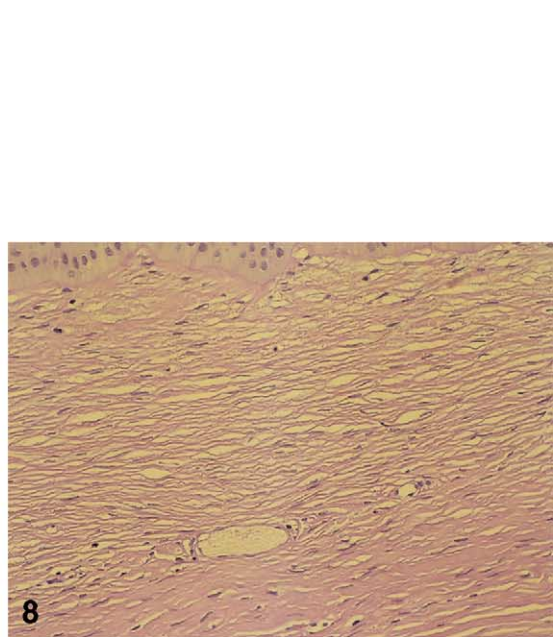
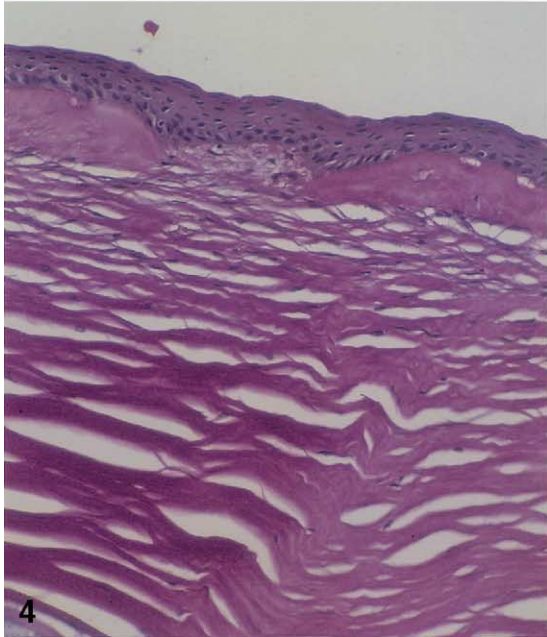
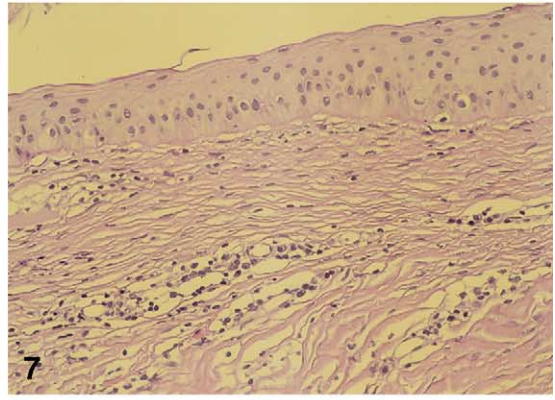
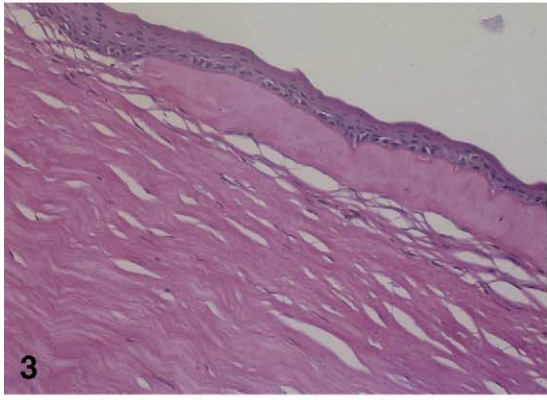
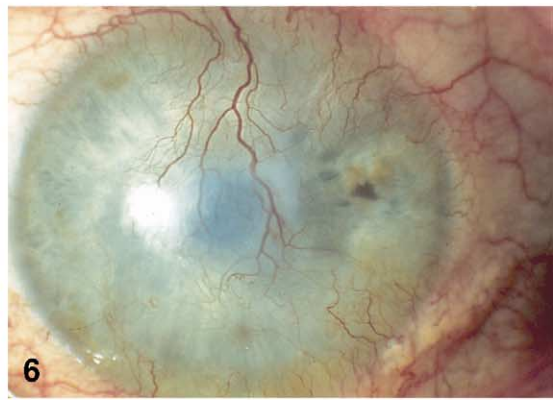
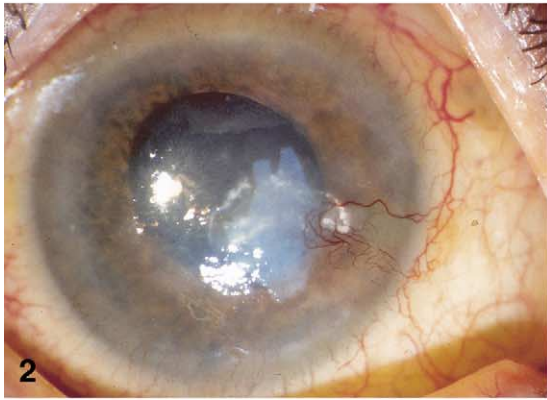
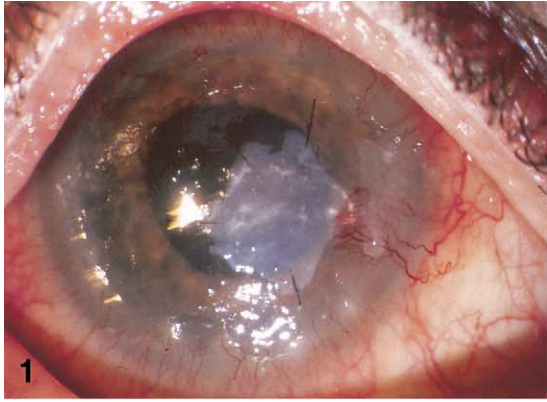
At the postoperative visits, the superficial vascularization that only reached the margins of the corneal ulcer preoperatively, was observed to grow, along with the epithelium, over the amniotic membrane graft. Four months after grafting, the ulcer was completely epithelialized, and partial recuperation of the stromal thickness was observed. On slit-lamp examination a residual stromal haze was noted, although no amniotic membrane remnants could be identified, and superficial vascularization was observed extending across the central cornea over the amniotic membrane graft site (Fig 6). Seven months after the grafting, a penetrating keratoplasty was performed to improve the visual acuity reduced by the corneal opacity. The removed cornea was sent for histologic examination.

### Histopathologic Findings

As in case 1, the histopathologic findings of the removed cornea included the complete epithelialization of the corneal surface with a partial recuperation of the stromal thickness. The peripheral corneal epithelium seemed normal, with five to six cell layers and a normal basement membrane and Bowman's layer. However, Bowman's layer was absent in the area of the ulcer, where stromal thinning was observed along with epithelial hyperplasia attempting to compensate for the stromal thinning (Fig 7). Amniotic membrane remnants could not be identified beneath the epithelium at the site where the amniotic membrane graft had been implanted 7 months previously. A wide band of newly formed fibrous tissue, different from that of the adjacent corneal stroma, was observed in its place (Fig 8). In contrast to case 1, vascularization and a large inflammatory cell infiltrate were observed in the corneal stroma of this patient (Fig 7). Immunohistochemical stains (CD-68, Pan T CD-3 y, Pan B CD-20) identified the infiltrate to be largely composed of histiocytes and T-lymphocytes, with a lesser proportion of B-lymphocytes. The endothelium and Descemet's membrane were normal.

### Discussion

Neurotrophic corneal ulcer is one of the most important indications for the use of amniotic membrane among the possible applications that have emerged in recent years. In these cases amniotic membrane acts as a substrate for epithelialization, along with the help of its abundant growth factors.<sup>8</sup> The amniotic membrane has also been shown clinically to help in the restoration of lost stromal thickness caused by ulceration.<sup>2</sup> However, the histologic changes that occur in this process have not been documented. In this study the histologic findings and clinical aspects of two cases of neurotrophic corneal ulcer treated with amniotic membrane grafts are presented some months after implantation of the grafts. These two cases basically differed in the



**Figure 1.** Amniotic membrane graft 4 weeks after surgery for the treatment of a neurotrophic ulcer in case 1. The figure shows intrastromal amniotic membrane graft with complete epithelialization over it.

**Figure 2.** Amniotic membrane graft 3 months after surgery in case 1. The figure shows the partial reabsorption of the graft without surrounding inflammatory reaction.

**Figure 3.** Eosinophilic subepithelial band corresponding to the amniotic membrane in case 1. The epithelium over the amniotic membrane was thinner in the central area. There was a basement membrane between the epithelium and the amniotic membrane. The basement membrane was absent in those areas in which the epithelium did not cover the amniotic membrane (stain, periodic acid–Schiff; original magnification,  $\times 200$ ).

**Figure 4.** Amniotic membrane graft shows a central discontinuity being replaced by new corneal stroma in case 1 (stain, periodic acid–Schiff; original magnification,  $\times 100$ ).

**Figure 5.** Amniotic membrane graft 3 weeks after surgery for the treatment of a neurotrophic corneal ulcer in case 2. The figure shows intrastromal amniotic membrane graft with complete epithelialization over it.

**Figure 6.** Appearance of the cornea in case 2, 4 months after surgery. No amniotic membrane remnants can be identified, although a residual stromal opacity is observed. The superficial vascularization that was limited to the margins of the original ulcer has grown, along with the epithelium, over the amniotic membrane.

**Figure 7.** Histologic findings of the cornea in case 2, 7 months after grafting of the amniotic membrane. Epithelial hyperplasia and a discontinuity in Bowman's layer are observed at the ulcer site. No remnants of amniotic membrane can be identified, and a newly formed stroma with abundant inflammatory cells can be seen in its place (stain, periodic acid–Schiff; original magnification,  $\times 400$ ).

**Figure 8.** Stroma of the cornea in case 2 after the reabsorption of the amniotic membrane. The observed blood vessel is located in the ulcer base and separates the newly formed fibrotic stroma (above) from the original normal stroma (below) (stain, periodic acid–Schiff; original magnification,  $\times 400$ ).

time that the amniotic membrane remained in the stroma and in the presence or absence of stromal vascularization. These two factors should therefore be taken into account when analyzing the differences in behavior of the graft in each case. In case 1, of a cornea with no stromal vascularization, the amniotic membrane could be observed almost in its entirety 3 months after grafting, without signs of clinically significant inflammation. In case 2, on the other hand, in which the original grafted cornea had stromal vascularization, no remnants of the amniotic membrane graft could be identified on slit-lamp examination 4 months after grafting. Furthermore, superficial vascularization that had reached the ulcer margins before grafting was observed to grow readily, along with the epithelium, over the amniotic membrane. From a histopathologic viewpoint we observed that, in both cases, complete epithelialization occurs over the amniotic membrane within a few weeks, making use of its basement membrane. In case 1, with 3 months of follow-up, the peripheral squamous epithelium had a normal thickness, whereas in the center, only two to three layers of cells were observed. This is probably because the normal centripetal epithelialization is slowed over the amniotic membrane, especially in patients with neurotrophic problems. In case 2, with 7 months of follow-up, epithelial hyperplasia can be observed at the site of the ulcer. In this case a larger than normal number of cell layers could be observed because of the longer evolution in an attempt to increase the corneal thickness. With regard to stromal healing, the amniotic membrane, after initially filling the defect, was replaced by fibroblasts and collagen in both cases, partially maintaining the stromal thickness. However, we observed two important differences between the two cases: first, the speed with which the amniotic membrane was absorbed, and second, the presence or absence of an inflammatory cell infiltrate. In case 1, 3 months after implantation, some fragments of the amniotic membrane graft had disappeared. However, in this avascular stroma, an important portion of the initial implant was still present. Giant cells, which are often present in a foreign body reaction, were not observed,

and the immunohistochemical studies did not reveal monocyte or histiocytic cells surrounding the graft (which would be expected to be involved in a resorptive process). Activated keratocytes are known to have phagocytic properties against foreign body material and could contribute to stromal collagen dissolution through an increase in synthesis and secretion of collagen-degrading enzymes.<sup>10</sup> This could account for the observed reabsorption of the amniotic membrane in this case without stromal vascularization. In addition, no inflammation or graft rejection was observed around the implant. In case 2, no remnants of the amniotic membrane could be identified 7 months after grafting. The stromal vascularization aids the migration of inflammatory cells to the graft site, possibly explaining why the amniotic membrane was more rapidly absorbed.

In summary, the histologic findings illustrate that the amniotic membrane achieved a sufficient epithelialization of the tissues over its basement membrane. Once the amniotic membrane is reabsorbed, it is replaced by new fibrotic stromal tissue that partially conserves the corneal thickness but does not possess the same transparency of healthy stroma. In corneas with stromal vascularization, the graft is rapidly reabsorbed because of the abundance of inflammatory cells. The opposite occurs in avascular corneas, in which the reabsorption of the amniotic membrane is slow, and no type of inflammatory reaction is produced.

It should be remembered that the graft remains within the stroma for months, which could affect corneal transparency during this period. Therefore, we do not recommend the amniotic membrane graft as the first therapeutic option in cases in which accurate visualization of the retina will be required in the postoperative period (possible intraocular surgery or laser therapy). This is especially important in those patients that have more shallow corneal ulceration or when preoperative corneal transparency is not compromised. In these cases, other alternatives such as temporal tarsorrhaphy can better preserve corneal transparency and should first be considered.

## References

---

1. Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997;123:303–12.
2. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999;106:1504–11.
3. Chen HJ, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol* 2000;84:826–33.
4. Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, et al. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998;116:431–41.
5. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999;83:399–402.
6. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997;124:765–74.
7. Pires RTF, Tseng SCG, Prabhasawat P, et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol* 1999;117:1291–7.
8. Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20:173–7.
9. Choi YS, Kim JY, Wee WR, Lee JH. Effect of the application of human amniotic membrane on rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Cornea* 1998;17:389–95.
10. Nishida T. Cornea. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, eds., *Cornea*. St Louis: Mosby, 1997; v. 1, chap 1.



**REGENERACIÓN CONJUNTIVAL TRAS UN INJERTO DE MEMBRANA  
AMNIÓTICA SOBRE ESCLERA ISQUÉMICA**

**CONJUNCTIVAL HEALING AFTER AMNIOTIC MEMBRANE GRAFT OVER  
ISCHEMIC SCLERA**

**Gris O**, del Campo Z, Wolley-Dod C, Güell JL, Velasco F, Adán A.

Cornea 2003; 22: 675-678



## COMENTARIO

Este caso clínico presenta la evolución y el resultado de un injerto de membrana amniótica sobre la esclera isquémica en un paciente con antecedente de causticación ocular por ácido sulfúrico. El injerto de membrana amniótica había demostrado previamente su eficacia en la regeneración conjuntival tras extensas resecciones de tejido, aunque siempre sin presencia de isquemia ni necrosis en los márgenes ni la base de la resección. Este paciente presentó tras la causticación una necrosis importante a nivel de la conjuntiva, esclera y córnea, produciéndose posteriormente una calcificación de todo este tejido. Tras eliminar quirúrgicamente una extensa placa de tejido calcificado y cualquier resto de tejido necrótico o isquémico en los márgenes y base de la lesión se procedió al implante de un injerto de membrana amniótica. En el postoperatorio se consiguió una lenta pero completa epitelización sobre el injerto a partir de la conjuntiva sana circundante.

Este caso clínico demuestra, por primera vez, que el injerto de membrana amniótica puede conseguir la regeneración de zonas extensas de conjuntiva incluso sobre un lecho escleral severamente isquémico. Esta técnica permite evitar la utilización de otros procedimientos más agresivos y menos satisfactorios como son el autoinjerto de mucosa bucal o extensos injertos de conjuntiva.

# Conjunctival Healing after Amniotic Membrane Graft over Ischemic Sclera

Oscar Gris, MD, Zoraida del Campo, MD, Charlotte Wolley-Dod, MD, José L. Güell, MD, Fortino Velasco, MD, and Alfredo Adán, MD

## Abstract

### Purpose:

To present a case of chemical injury associated with calcification and severe conjunctival and scleral ischemia, in which tissue regeneration was achieved using an amniotic membrane graft.

### Methods:

A 65-year-old man presented to our department 8 weeks after suffering a chemical injury of his left eye with sulfuric acid. There was extensive calcification of the cornea and conjunctiva, associated with severe ischemia of the adjacent sclera. After resection of the calcified tissue and nonviable tissue, amniotic membrane was grafted to cover the extensive zone of scleral ischemia.

### Results:

In the weeks following grafting, slow epithelialization and revascularization was observed over the amniotic membrane, stemming from the surrounding healthy conjunctiva.

### Conclusion:

Although the presence of ischemia at the base of the graft has been considered a contraindication for amniotic membrane transplantation, this case demonstrates that, provided that the surrounding tissue is not affected, a graft may be useful. In such cases an amniotic membrane graft could be attempted before other alternatives, such as conjunctival or oral mucosal autografts.

**Key Words:** amniotic membrane transplantation, amniotic membrane graft, ocular surface reconstruction, chemical injury, stromal ischemia

(*Cornea* 2003;22:675-678)

Amniotic membrane transplantation has been used for almost 100 years to aid in tissue regeneration of cutaneous and mucosal lesions. In recent years its efficiency has been demonstrated in the reconstruction of the ocular surface.<sup>1-6</sup> When the amniotic membrane is used as a graft in the reconstruction

of tissue defects, it aids epithelialization of the tissues over its basal membrane in both the conjunctiva<sup>1-2</sup> and the cornea,<sup>7-10</sup> reducing inflammation and scarring. However, it may not be useful in certain pathologic conditions. The presence of stromal ischemia has been considered a contraindication for the use of amniotic membrane graft.<sup>11</sup> We present a case of a chemical ocular injury associated with tissue necrosis in which conjunctival regeneration was achieved using an amniotic membrane graft following resection of the necrotic calcified tissue. This case demonstrates that the amniotic membrane graft can achieve conjunctival regeneration, even over extensive areas of scleral ischemia.

## CASE REPORT

A 65-year-old man presented to our department 8 weeks after suffering a chemical injury with sulfuric acid to his left eye. A medical report of the accident described a complete deepithelialization of the cornea and nasal, inferior, and temporal bulbar conjunctiva along with corneal stromal edema and severe ischemia of the bulbar conjunctiva and nasal, inferior, and temporal sclerocorneal limbus. Treatment had consisted of copious irrigation of the ocular surface with normal saline solution in the acute phase followed by topical antibiotics, corticosteroids, and cycloplegic and hypotensive agents.

When we examined the patient 8 weeks after the injury, a visual acuity of 20/25 in the right eye and 20/300 in the left eye was recorded. On slit lamp examination of the right eye no abnormalities were found.

Received for publication August 16, 2002; accepted June 17, 2003.

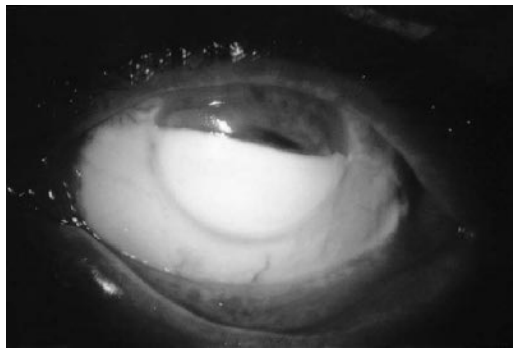
From the Department of Ophthalmology (Drs Gris, del Campo, Wolley-Dod, and Adán), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; and Instituto de Microcirugía Ocular (Drs Gris, Güell, Velasco, and Adán), Barcelona, Spain

The authors have no proprietary interest in the material presented in this article.

Reprints: Oscar Gris, MD, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Department of Ophthalmology, Sant Antoni Maria Claret, 167, Barcelona 08025, Spain (e-mail: ogrisc@hsp.santpau.es).

Copyright © 2003 by Lippincott Williams & Wilkins

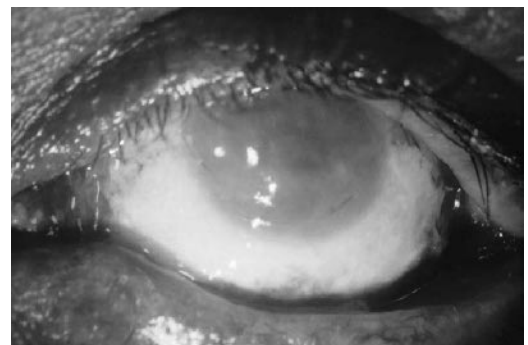
In the left eye, the surface of the lower half of the cornea (including the anterior stroma), the inferior, nasal, and temporal bulbar conjunctiva, and the superficial sclera were calcified (Fig. 1). Through the superior half of the cornea, which had been protected by the superior eyelid during the incident, a mature cataract and an irregular pupil secondary to posterior synechiae were observed. Although the intraocular pressure could not be evaluated with applanation tonometry, digital pressure appeared normal. Surgical intervention was decided on to remove the thick plaque of calcium, and, although the area of ischemic conjunctiva and sclera was extensive, we initially chose to use an amniotic membrane graft to avoid the need for an oral mucosa or conjunctival autograft from the contralateral eye. A lamellar keratectomy and lamellar sclerectomy were performed under peribulbar anesthesia to remove all calcified tissue. An effort was made to preserve the surrounding viable tissue. Once the calcium plaque had been completely removed, the remains of necrotic conjunctiva surrounding the lesion were also resected, ensuring that only healthy conjunctiva remained. Subsequently, a single fragment of amniotic membrane was used as a graft on the conjunctival defect and as a patch over the cornea. The amniotic membrane was prepared and preserved using the method previously described by Tseng and colleagues.<sup>5</sup> The cryo-



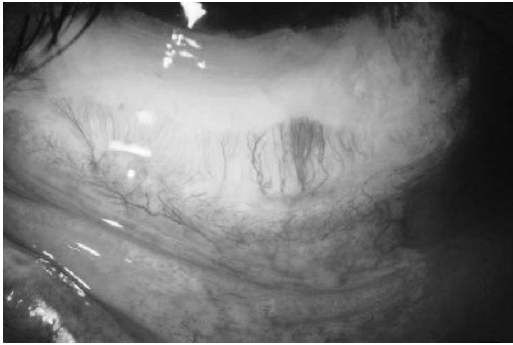
**FIGURE 1.** Eight weeks after the chemical burn, the eye presented with calcification of the ocular surface that affected the epithelium and anterior stroma of the cornea and the superficial sclera and conjunctiva.

preserved amniotic membrane graft was placed epithelial side up over the bare ischemic sclera and was sutured edge-to-edge to the surrounding healthy conjunctiva with single 9-0 absorbable sutures. The remaining part of the same fragment of amniotic membrane was applied as a patch over the entire cornea and sutured with single sutures parallel to the limbus with 10-0 nylon. Finally, dexamethasone and chloramphenicol ointment were applied, and the eye was occluded for 24 hours.

Postoperatively, chloramphenicol ointment three times daily and dexamethasone ointment twice daily were prescribed until complete conjunctival epithelialization was achieved, 8 weeks after surgery. On the second postoperative day it was possible to observe the extensive area of ischemic sclera beneath the amniotic membrane graft (Fig 2). Although subsequent tissue regeneration was slow, at 2 weeks a small degree of conjunctival growth could be observed over the amniotic membrane graft. At 4 weeks, over half of the graft was epithelialized and vascularized (Fig. 3), and at 6 weeks only a small area near the nasal limbus remained unvascularized (Fig. 4). Within the first 3 weeks following surgery complete epithelialization of the cornea was achieved beneath the patch, from the superior limbus. However, an epithelial corneal defect recurred several days after the detachment of the amniotic membrane patch. Four months after surgery complete epithelialization of the bulbar conjunctiva as



**FIGURE 2.** On the first postoperative day the amniotic membrane graft can be observed with the underlying severely ischemic sclera.

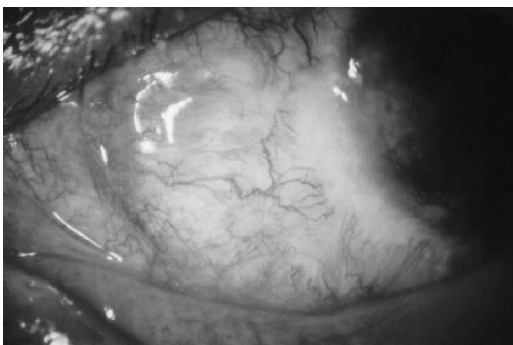


**FIGURE 3.** Four weeks following surgery, epithelialization and vascularization can be observed over half of the graft.

far as the sclerocorneal limbus was observed, along with a discrete conjunctivalization of the inferior peripheral cornea. In the lower half of the cornea a small epithelial defect could be observed, with underlying stromal haze and edema. Slit lamp examination showed posterior synechiae, an irregular pupil, and a mature cataract, which limited vision to hand motion. The intraocular pressure was 16 mm Hg by applanation tonometry. At this time the sclerocorneal limbus was sufficiently vascularized to allow for further surgery consisting of limbal and corneal transplant with cataract extraction.

## DISCUSSION

Amniotic membrane can be used as a graft or as a patch. When employed as a patch, its objective is to protect the underly-



**FIGURE 4.** Six weeks following surgery, the graft has almost achieved conjunctivalization over the whole area of ischemic sclera.

ing epithelium and aid its regeneration. It increases the lubrication of the ocular surface, reduces inflammation, and protects the epithelium from the continual trauma of blinking, thereby promoting epithelialization beneath the patch.<sup>12</sup> Implanted as a graft over a tissue defect, the amniotic membrane provides the missing stromal matrix and encourages epithelialization over its basement membrane.<sup>7-9</sup> Once epithelialization has been achieved, the fragment of amniotic membrane remains trapped beneath the epithelium and is progressively reabsorbed in exchange for newly formed stroma. The mechanism and speed of reabsorption vary, depending on the presence or absence of vascularization.<sup>10</sup> However, there are a number of clinical situations in which the amniotic membrane alone is not effective, and its use is not advisable. These situations include a total deficit of epithelial stem cells, severe dry eye syndrome, absence of blinking in severe neurotrophic cases, and stromal ischemia.<sup>11</sup>

In conjunctival lesions the amniotic membrane graft aids epithelialization while maintaining the normal epithelial phenotype (with goblet cells).<sup>13</sup> It also reduces inflammation and scarring. Published studies have shown that the amniotic membrane graft can be used as an alternative to conjunctival autografts in the reconstruction of the conjunctival surface following the extensive resection of conjunctival lesions such as pterygion,<sup>14</sup> tumors and intraepithelial neoplasias,<sup>1</sup> scarring and simblepharon,<sup>1,3</sup> and conjunctivochalasis.<sup>2</sup> The authors of these studies demonstrated that the area for reconstruction could indeed be very extensive provided that the underlying floor was not ischemic and the marginal conjunctiva possessed a normal epithelium and stroma.<sup>11</sup>

Because our patient presented with severe ischemia of the sclera in temporal, nasal, and inferior areas, he might not have been considered good candidate for an amniotic membrane graft. Nevertheless, once the calcified tissue had been resected, the bare ischemic sclera needed to be covered. The other

alternatives included conjunctival or oral mucosa autograft. The first option was ruled out because of the large extent of the lesion, which would have left an extensive defect in the contralateral donor eye, and we considered the oral mucosal graft to be neither esthetic nor physiologic. Therefore, the amniotic membrane graft was chosen as a first option to attempt physiologic regeneration of the conjunctiva. Our prime objective during the surgery was to completely eliminate all necrotic tissue both at the margins and on the floor of the lesion while attempting to preserve the maximum amount of healthy tissue. In this way, although the graft overlays ischemic sclera, the epithelium and conjunctival vessels were able to grow from the surrounding healthy tissue over the amniotic membrane.

Our case demonstrates that an amniotic membrane graft can be useful even in the regeneration of conjunctiva over large areas of ischemic sclera. Although the ischemic floor may retard the healing process, if the surrounding tissues are healthy, the amniotic membrane can act as an adequate substrate for the epithelialization and revascularization of the defect. When the amniotic membrane graft fails, other alternatives such as conjunctival or oral mucosal autograft can be employed as second options.

#### REFERENCES

1. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol*. 1997;124:765-774.
2. Meller D, Maskin SL, Pires RT, et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic conjunctivochalasis refractory to medical treatments. *Cornea*. 2000;19:796-803.
3. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:399-402.
4. Shimazaki J, Yang H, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology*. 1997;104:2068-2076.
5. Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, et al. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol*. 1998;116:431-441.
6. Letko E, Stechschulte SU, Kenyon KR, et al. Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. *Arch Ophthalmol*. 2001;119:659-663.
7. Lee S, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol*. 1997;123:303-312.
8. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology*. 1999;106:1504-1511.
9. Chen HJ, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol*. 2000;84:826-833.
10. Gris O, Wolley-Dod C, Güell JL, et al. Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea. *Ophthalmology*. 2002;109:508-512.
11. Tseng SCG, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. In: Holland EJ, Mannis MJ, eds. *Ocular Surface Disease*. New York: Springer-Verlag, 2002:226-231.
12. Gris O, del Campo Z, Wolley-Dod C, et al. Amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens for the treatment of epithelial disorders. *Cornea*. 2002;21:22-27.
13. Prabhasawat P, Tseng SC. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. *Arch Ophthalmol*. 1997;115:1360-1367.
14. Solomon A, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation following an extensive removal of primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology*. 2001;108:449-460.

## **5.- DISCUSIÓN**





Los cuatro trabajos que se presentan analizan los resultados obtenidos con el trasplante de membrana amniótica en patología de la córnea y de la conjuntiva, utilizando las diferentes formas de implante. En los casos con defecto tisular que incluía epitelio y estroma (tanto a nivel de la conjuntiva como de la córnea) la membrana amniótica se implantó siempre como injerto. En estos casos se buscaba la epitelización completa sobre el implante a la vez que la matriz estromal de la membrana amniótica rellenaba el defecto estromal del tejido receptor. En los casos con defecto epitelial corneal sin ulceración, en los que la membrana de Bowman se encontraba conservada el implante se realizó como recubrimiento sobrepasando los límites de la lesión. En estos casos el objetivo era conseguir la epitelización completa de la córnea bajo el implante.

En todos los casos intervenidos el trasplante de membrana amniótica se mostró como una técnica segura ya que en ningún caso se presentaron complicaciones intra o postoperatorias, ni se observó un empeoramiento de la lesión tras el trasplante. Asimismo, los resultados obtenidos fueron estables tras un periodo de seguimiento medio de 32 meses (rango entre 24 y 48 meses). Durante este periodo de seguimiento, que fue superior al realizado en otros trabajos publicados anteriormente, no se observaron recurrencias de ninguna de las lesiones en las que se obtuvo inicialmente la curación.

Sin embargo, los resultados obtenidos en cuanto a la eficacia sí fueron distintos en función de la patología. Tras la resección de lesiones conjuntivales el injerto de membrana amniótica consiguió una rápida regeneración de la conjuntiva con mínimas cicatrices residuales en todos los casos. En lesiones de pequeño tamaño la cicatrización espontánea o la aproximación quirúrgica de los bordes de la herida son, habitualmente, suficientes para conseguir un buen resultado. Sin embargo, tras la resección de lesiones conjuntivales extensas una porción importante de la esclera subyacente queda descubierta, lo cual puede conducir a la aparición de complicaciones importantes como infecciones, necrosis escleral o cicatrización

excesiva. Para evitar esta situación clásicamente se han utilizado los recubrimientos con mucosa oral o los autoinjertos con conjuntiva del ojo contralateral. No obstante, ninguna de las dos opciones ofrece un resultado completamente satisfactorio. La mucosa oral es un tejido bastante más grueso que la conjuntiva con características histológicas distintas, por lo que los resultados no son satisfactorios ni desde el punto de vista estético ni funcional. Por el contrario, el autoinjerto de conjuntiva procedente del ojo contralateral traslada el problema del ojo receptor al ojo donante. Distintos trabajos han demostrado la eficacia de la membrana amniótica en estos casos (Tseng SCG, et al. 1997, Prabhasawat P, Barton K, et al. 1997, Shimazaki J, et al. 1998, Meller D, et al. 2000, Paridaens D, et al. 2001), consiguiendo una rápida epitelización (con una población epitelial y de células caliciformes normal), junto a una disminución de la inflamación y de la formación de cicatrices. En nuestra serie los resultados coinciden con los trabajos previamente publicados consiguiéndose una completa epitelización de la conjuntiva sobre el injerto en todos los casos durante la primera semana. Posteriormente se produjo una rápida y progresiva reabsorción del injerto (en un tiempo inferior a los tres meses) con mínima formación de cicatrices residuales. Estos resultados hacen que, en nuestra opinión, el injerto de membrana amniótica sea en la actualidad la técnica de elección para el tratamiento de defectos conjuntivales extensos. Lesiones de menor tamaño pero localizadas en la zona interpalpebral, presentan una mayor tendencia a la formación de cicatrices por su continua exposición y podrían, probablemente, beneficiarse también de este tratamiento. Aunque la necrosis del lecho sobre el que se implanta la membrana amniótica había sido descrita como una limitación para su uso (Tseng SCG, et al. 2002), el caso clínico de nuestro cuarto trabajo demuestra que, cuando la conjuntiva circundante es viable, el injerto de membrana amniótica puede ser eficaz en la regeneración tisular incluso sobre esclera isquémica.

Los resultados utilizando la membrana amniótica como injerto en patología corneal también fueron, en general, satisfactorios. La úlcera neurotrófica es un proceso

patológico debido a una hipoestesia corneal, en general producida por alteraciones en la innervación sensitiva desde el núcleo del trigémino hasta las terminaciones nerviosas (cirugía del nervio trigémino, neurinomas del acústico, traumatismos faciales, lesiones por herpes simple o zoster, etc). Ello conduce a una disminución en la producción de la lágrima junto a una inhibición de los procesos de regeneración epitelial (Gras EB. 1997). También se ha relacionado con un abuso de fármacos tóxicos y conservantes a nivel de la superficie ocular (Rosenwasser GOD. 1989, Weissman SS, et al. 1990). Los casos de úlcera corneal neurotrófica que no responden al tratamiento médico con lubricantes sin conservantes presentan un difícil manejo y, en ausencia de un tratamiento efectivo evolucionan, con mayor o menor rapidez, hacia el adelgazamiento estromal severo o incluso perforación. En nuestra serie, con el injerto de membrana amniótica conseguimos la curación definitiva en un porcentaje importante de los casos (9 de 11). Estos resultados coinciden con los descritos en otros trabajos publicados (Lee SH, et al. 1997, Kruse FE, et al. 1999, Chen HJ, et al. 2000), y sitúan al injerto de membrana amniótica entre las opciones terapéuticas quirúrgicas más eficaces en el tratamiento de las úlceras corneales neurotróficas. El injerto de membrana amniótica es superior en el resultado estético para el paciente a otras técnicas quirúrgicas utilizadas con éxito en estos casos, como la tarsorrafia o el recubrimiento conjuntival. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios comparativos en cuanto a la eficacia de la técnica entre los distintos procedimientos quirúrgicos mencionados. En los casos con buena respuesta observamos durante los días posteriores al implante una progresiva epitelización sobre el injerto, quedando éste atrapado bajo el epitelio en el estroma corneal durante meses. Este hecho hace que la transparencia corneal quede reducida de manera importante durante el tiempo que el fragmento de membrana amniótica permanece en el estroma corneal, dificultando por tanto la visualización de las estructuras intraoculares. Ello debe tenerse en cuenta en pacientes que puedan necesitar durante las semanas o meses posteriores al implante un examen detallado de la retina, así como tratamientos con láser o cirugía intraocular.

En estos casos, probablemente deberían considerarse inicialmente otras opciones terapéuticas como la tarsorrafia lateral.

Hasta ahora sólo había sido descrito el comportamiento clínico del injerto en base a las exploraciones realizadas en la lámpara de hendidura (Lee SH, et al. 1997, Kruse FE, et al. 1999, Chen HJ, et al. 2000). En el tercer trabajo, el análisis anatomopatológico de dos córneas receptoras permitió conocer, por primera vez, el comportamiento de la membrana amniótica tras el implante en el estroma corneal humano desde el punto de vista histológico, estableciendo así una correlación clínico-patológica. Comprobamos cómo la membrana amniótica fue un excelente sustrato para la epitelización en estas úlceras, consiguiéndose sobre su membrana basal el crecimiento de un epitelio corneal de características normales. En ausencia de neovascularización corneal el fragmento de membrana amniótica permaneció en el estroma durante meses sin dar lugar a ningún tipo de reacción inflamatoria o de rechazo. Por este motivo la reabsorción del injerto en estos casos es tan lenta, y probablemente se deba a procesos de fagocitosis y colagenolisis a partir de los queratocitos activados circundantes. Por el contrario, en la córnea con neovascularización estromal se observó un abundante infiltrado inflamatorio (compuesto básicamente por histiocitos y linfocitos T) que llegó fácilmente a la zona a partir de los neovasos y que condujo a una rápida reabsorción del injerto. En ambas situaciones, tras la reabsorción de la membrana amniótica, el espacio que ésta inicialmente rellenaba fue posteriormente sustituido por estroma corneal neoforado de características fibróticas. Aunque éste ayudaba a recuperar parte del espesor corneal perdido con la ulceración, no poseía la transparencia que presenta el estroma corneal normal.

En los casos con degeneración cálcica el injerto de membrana amniótica tras una resección completa de la lesión fue también eficaz en todos los casos. El defecto estromal resultante tras la queratectomía lamelar quedó ocupado por el estroma de la membrana amniótica y el epitelio creció rápidamente en todos los casos sobre el

injerto a partir del tejido sano circundante. Al igual que en las úlceras neurotróficas la membrana amniótica quedó atrapada bajo el epitelio durante meses y su reabsorción se produjo con mayor o menor rapidez en función de la presencia o no de neovasos estromales.

Algunos autores recomiendan el trasplante de membrana amniótica en ojos con queratopatía bullosa dolorosa y mal pronóstico visual, en los que la queratoplastia penetrante no está indicada. Según estos autores (Espana EM, et al. 2003, Pires RT, et al. 1999) el trasplante de membrana amniótica es una técnica eficaz para reducir la sintomatología en estos casos y, en estudios comparativos (Mejia LF, et al. 2002), se ha mostrado como una opción superior a la desepitelización aislada. Otros trabajos (Siennicka A, et al. 2003), sin embargo, califican al procedimiento como ineficaz. En nuestra serie cuatro de los cinco pacientes intervenidos experimentaron una mejoría de su sintomatología tras la cirugía, aunque en ningún caso las molestias desaparecieron completamente. En estos casos de queratopatía bullosa dolorosa sin posibilidad de mejoría visual y en los que se busca únicamente un alivio sintomático nuestros resultados han sido superiores, a medio y largo plazo, con el recubrimiento conjuntival total. Sin embargo, en casos en los que la disección conjuntival no sea posible por la presencia de cicatrices conjuntivales (antecedentes de cirugía de glaucoma, de retina, causticaciones, etc), el injerto de membrana amniótica puede ser la única alternativa quirúrgica posible. También el aspecto estético con el trasplante de membrana amniótica es superior al que se obtiene con un recubrimiento conjuntival y ello puede hacer que, algunos pacientes, opten inicialmente por intentar la primera opción.

Los defectos epiteliales persistentes se producen por una alteración en el mecanismo de regeneración epitelial, normalmente debido a un problema neurotrófico de base, a una insuficiencia límbica (total o parcial) o a un exceso de toxicidad farmacológica en la superficie ocular. En los casos con insuficiencia límbica el tratamiento de elección es el trasplante de limbo esclerocorneal. En el resto de casos, al margen de eliminar el

agente etiológico cuando esto es posible, el tratamiento médico con lubricantes tópicos sin conservantes y en algunos casos el uso de una lente de contacto terapéutica suele ser suficiente para conseguir la curación. Cuando no se obtiene respuesta con el tratamiento médico mencionado deben considerarse sin demora las opciones quirúrgicas, para evitar la progresión hacia la opacificación o la ulceración estromal. En este sentido el recubrimiento con membrana amniótica representa un alternativa a la tarsorrafia lateral o medial.

Desde el punto de vista teórico la membrana amniótica podría ser más eficaz que una lente de contacto terapéutica cuando se usa recubriendo completamente la superficie corneal en pacientes con un defecto epitelial persistente. La membrana amniótica proporciona las ventajas mecánicas de la lente terapéutica ya que ayuda a estabilizar el epitelio corneal, lo protege del roce constante del parpadeo, evita la desecación de la superficie corneal y disminuye los síntomas. Pero además, aporta una serie de propiedades biológicas que han sido previamente descritas como facilitadoras de la epitelización. Entre ellas destacan su elevada concentración en factores de crecimiento (Koizumi N, et al. 2000) y su capacidad para reducir la inflamación y la formación de cicatrices (Park WC, et al. 2000, Wang MX, et al 2001).

En nuestra serie, la eficacia del recubrimiento con membrana amniótica en los defectos epiteliales persistentes estuvo relacionada claramente con el tiempo de permanencia del implante sobre la superficie corneal. Cuando la membrana se mantuvo durante 2 ó más semanas la epitelización completa se produjo en tres de los cuatro casos. Ello debe considerarse como un resultado muy positivo teniendo en cuenta las dificultades terapéuticas que plantean estos pacientes. Por el contrario, cuando el implante se desprendió durante la primera semana, la epitelización no se consiguió en caso alguno. El principal problema que encontramos en estos pacientes fue la caída precoz del implante, debido al trauma constante que produce el parpadeo sobre la membrana amniótica. En el segundo trabajo se ensayaron distintas formas de implante y de sutura, sin encontrarse diferencias en la epitelización ni en el tiempo de

permanencia entre el recubrimiento corneal "C" (con fijación en córnea periférica) y el recubrimiento corneal y conjuntival "C+L" (con fijación en córnea periférica y conjuntiva). Sin embargo, sí se consiguió aumentar el tiempo de permanencia del implante cuando el recubrimiento tipo "C" se asoció a una lente de contacto terapéutica postoperatoria. Mientras que el implante tipo "C" consiguió un tiempo medio de permanencia de 10.4 días y el tipo "C+L" de 8.6 días, con el implante "C" + lente de contacto la permanencia media fue de 22.6 días. Aunque el número de casos incluido en el estudio era limitado el aumento tan importante en el tiempo medio de permanencia que se obtuvo con la lente de contacto postoperatoria hizo que desde entonces ésta sea nuestra técnica de elección en los defectos epiteliales persistentes.

Un tema todavía en discusión es la mejor forma de colocar el implante cuando la membrana amniótica se utiliza como recubrimiento. Cuando ésta se utiliza como injerto no hay duda de que la membrana basal de la membrana amniótica debe orientarse hacia arriba con el fin de que el epitelio crezca sobre ella. Sin embargo, cuando se utiliza como recubrimiento con el objeto de conseguir la epitelización bajo el implante no está claro si es mejor colocar hacia arriba la cara de la membrana basal o la cara del estroma. En los pacientes incluidos en estos trabajos la membrana amniótica se implantó con la cara de la membrana basal hacia arriba, obteniéndose unos resultados favorables. En casos posteriores hemos utilizado también el implante como recubrimiento con la cara de la membrana basal hacia abajo, sin observar diferencias en los resultados en cuanto a la epitelización, la disminución de la inflamación o el tiempo de permanencia del implante. Otros trabajos (Meller D, et al. 2000) han obtenido también resultados satisfactorios utilizando la membrana amniótica como recubrimiento con ambos tipos de implante. En nuestra opinión, probablemente no existan diferencias entre los dos tipos de implante cuando la membrana amniótica se utiliza como recubrimiento ya que en estos casos la membrana basal no tiene un papel importante y los factores de crecimiento y sustancias antiinflamatorias pueden difundir a los tejidos vecinos. Sin embargo, no existen hasta el momento estudios



comparativos publicados para conocer con seguridad este dato, al igual que no existen estudios comparando la eficacia del recubrimiento con membrana amniótica y la tarsorrafia en los defectos epiteliales persistentes.

En el segundo trabajo también se analizaron los resultados con el recubrimiento con membrana amniótica en defectos epiteliales inducidos quirúrgicamente. Todos los pacientes incluidos presentaban algún grado de insuficiencia límica o alteración neurotrófica de base, que podía provocar problemas en la epitelización. Aunque estos pacientes suelen epitelizar completamente sin el uso de membrana amniótica, con frecuencia presentan una epitelización más lenta e irregular. Con el recubrimiento observamos en todos los casos una regeneración epitelial rápida y una superficie corneal completamente lisa. También en este trabajo se incluyeron pacientes con úlcera neurotrófica tratada con un injerto de membrana amniótica. En todos ellos el asociar un recubrimiento corneal con membrana amniótica pareció acelerar la epitelización sobre el injerto subyacente.

Los resultados obtenidos en estos trabajos sitúan al trasplante de membrana amniótica como una técnica quirúrgica eficaz en distintas patologías de la superficie ocular. En algunos casos creemos que el trasplante de membrana amniótica representa la técnica terapéutica de elección en la actualidad. En otras situaciones representa una opción para cuando fracasa el tratamiento médico, y constituye una alternativa a otros procedimientos quirúrgicos.

## **6.- CONCLUSIONES**



### **6.1.- Conclusiones del primer trabajo**

1. El injerto de membrana amniótica tras la resección de lesiones conjuntivales consiguió una rápida regeneración tisular con mínimas cicatrices residuales en todos los casos.
2. El trasplante de membrana amniótica en la patología corneal (tanto en defectos estromales como epiteliales) fue eficaz en un número importante de casos y constituye una alternativa terapéutica útil cuando fracasa el tratamiento médico.
3. El trasplante de membrana amniótica se mostró como una técnica segura en el tratamiento de la patología corneal y conjuntival.
4. Los resultados obtenidos con el trasplante de membrana amniótica se mantuvieron estables después del implante, con un seguimiento de hasta 4 años.

### **6.2.- Conclusiones del segundo trabajo**

1. El recubrimiento con membrana amniótica fue una opción terapéutica eficaz y segura en algunos de los casos de defecto epitelial corneal que no habían respondido previamente al tratamiento médico.
2. La eficacia de la técnica estuvo relacionada con el tiempo de permanencia del implante sobre la córnea.

3. La forma de implante que consiguió una mayor permanencia fue el recubrimiento de la córnea (sin sobrepasar el limbo esclerocorneal) asociado a una lente de contacto terapéutica.

### **6.3.- Conclusiones del tercer trabajo**

1. El epitelio que crece sobre la membrana basal de la membrana amniótica presenta unas características histológicas normales.

2. En las córneas avasculares el injerto de membrana amniótica no produce reacción inflamatoria ni de rechazo y su reabsorción se produce de manera lenta y progresiva durante meses.

3. En las córneas con neovascularización estromal la reabsorción de la membrana amniótica se produce de manera más rápida debido a la presencia de abundantes células inflamatorias.

4. Tras la reabsorción de la membrana amniótica ésta es sustituida por un tejido fibrótico neoforado que ayuda a compensar parcialmente el espesor de estroma perdido pero que reduce la transparencia corneal normal.

### **6.4.- Conclusiones del cuarto trabajo**

1. El injerto de membrana amniótica sobre esclera isquémica puede conseguir una regeneración conjuntival completa cuando el tejido circundante es viable.

## **7.- BIBLIOGRAFÍA**



ADDS PJ, HUNT C, HARTLEY S.

Bacterial contamination of amniotic membrane. Br J Ophthalmol 2001; 85: 228-30.

ADINOLFI M, AKLE CA, McCOLL I, et al.

Expression of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. Nature 1982; 295: 325-7.

AKLE CA, ADINOLFI M, WELSH KI, et al.

Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. Lancet 1981; 2 :1003-5.

ALLANSMITH MR, BAIRD GS, GREINER GV.

Density of goblet cells in vernal conjunctivitis and contact lens associated giant papillary conjunctivitis. Arch Ophthalmol 1981; 99: 884-5.

ALLANSMITH MR, OSTLER HB, BUTTERWORTH M.

Concomitance of bacteria in various areas of the eye. Arch Ophthalmol 1969; 82: 37-42.

ANDERSON DF, ELLIES P, PIRES RTF, TSENG SCG.

Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. Br J Ophthalmol 2001; 85: 567-75.

ANDERSON DF, PRABHASAWAT P, ALFONSO E, TSENG SCG.

Amniotic membrane transplantation after the primary surgical management of band keratopathy. Cornea 2001; 20: 354-61.



AZUARA-BLANCO A, PILLAI CT, DUA HS.

Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. Br J Ophthalmol 1999; 83: 399-402.

BARTELS H, WANG T.

Intercellular junctions in the human fetal membranes. Anat Embryol 1983; 166: 103-20.

BAUM J.

A histochemical study of corneal respiratory enzymes. Arch Ophthalmol 1963; 70: 59-68.

BAUM J.

A relatively dry eye during sleep. Cornea 1990; 9: 1

BENIRSCHKE K, KAUFMANN P.

The pathology of the human placenta. 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Springer-Verlag, 1990.

BERGSTROM S.

Surface ultrastructure of human amnion and chorion in early pregnancy. Obstet Gynecol 1971; 38: 513-24.

BIRK DE, FITCH JM, LINSENMAYER TF.

Organization of collagen type I and V in the embryonic chicken cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 1986; 27: 1470-7.

BOISJOLY HM, BEAULIEU A.

Topical autologous fibronectin in patients with recurrent corneal epithelial defects. Cornea 1991; 10: 483-8.

BRANDT FT, ALBUQUERQUE CD, LORENZATO FR.

Female urethral reconstruction with amnion grafts. *Int J Surg Investig* 2001; 1: 409-14.

BROWN AL.

Lime burns of the eye: use of rabbit peritoneum to prevent severe delayed effects. *Arch Ophthalmol* 1941; 26: 754-69.

BROWN SI, AKIYA S, WELLER CA.

Prevention of the ulcers of the alkali-burned cornea. *Arch ophthalmol* 1969; 82: 95-97.

BUDENZ DL, BARTON K, TSENG SCG.

Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. *Am J Ophthalmol* 2000; 130: 580-8.

BURSTEIN NL.

The effects of topical drugs and preservatives on the tears and corneal epithelium in dry eye. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1985; 104: 402-9.

CAMERON JD.

Corneal reaction to injury. En: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, ed. *Cornea. Fundamentals of cornea and external disease*. St Louis: Mosby, 1997; cap 8.

CARNEY LG, HILL RM.

The nature of normal blinking patterns. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1982; 60: 427-33.

CHEN H-J, PIRES RTF, TSENG SCG.

Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 826 –33.

CHEN JJ, TSENG SCG.

Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990; 31: 1301-14.

CHOI YS, KIM JY, WEE WR, LEE JH.

Effect of the application of human amniotic membrane on rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. Cornea 1998; 17: 389-95.

CHUNTRASAKAL C.

Clinical experiences with the use of amniotic membranes as temporary dressing in treatment of burns and other surgical open wounds. Med Assoc Thailand J 1977; 60: 66.

COLLIN HB, GRABSCH BE.

The effect of ophthalmic preservatives on the healing rate of the rabbit corneal epithelium after keratectomy. Am J Optom Physiol Op 1982; 59: 215-22.

COLOCHO G, GRAHAM WP, GREENE AE, et al.

Human amniotic membrane as a physiologic wound dressing. Arch Surg 1974; 109: 370-3.

DANFORTH DM, HULL RW.

The microscopic anatomy of the fetal membranes with particular reference to the detailed structure of the amnion. Am J Obstet Gynecol 1958; 75: 536-50.

DARTT DA, McCARTHY DM, MERCER HJ, et al.

Localization of nerves adjacent to goblet cell in rat conjunctiva. Curr Eye Res 1995; 14: 993-1000.

DAVIS JW.

Skin transplantation with a review of 550 cases at The Johns Hopkins Hospital . Johns Hopkins Med J 1910; 15: 307.

DE ROTTH A.

Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. Arch Ophthalmol 1940; 23: 522-5.

DILLY PN.

Structure and function of the tear film. Adv Exp Med Biol 1994; 350: 239-47.

DILLY PN, MAKIE IA.

Surface changes in the anesthetic conjunctiva in man with special reference to the production of mucus from non-goblet cell source. Br J Ophthalmol 1981; 65: 833-42.

DOUGLAS B, CONWAY H, STARK RB, et al.

The fate of homologous and heterologous chorionic transplants as observed by the transparent tissue chamber technique in the mouse. Plast Reconstr Surg 1954; 13: 125-9.

ELSAS T, EDVINSSON L, SUNDLER F, UDDMAN R.

Neuronal pathways to the rat conjunctiva revealed by retrograde tracing and immunocytochemistry. Exp Eye Res 1994; 58: 117-26.

ESPANA EM, GRUETERICH M, SANDOVAL H, SOLOMON A, ET AL.

Amniotic membrane transplantation for bullous keratopathy eyes with poor visual potential. J Cataract Refract Surg 2003; 29: 279-84.

FUKUDA K, CHIKAMA T, NAKAMURA M, NISHIDA T.

Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea* 1999; 18: 73-9.

GARDINER JP.

The umbilical cord: normal length; length in cord complications ; etiology and frequency of coiling. *Surg Gynecol Obstet* 1922; 34: 252-6.

GILLETTE TE, CHANDLER JW, GREINER JV.

Langerhans cells of the ocular surface. *Ophthalmology* 1982; 89: 700-10.

GIPSON IK, SUPRR-MICHAUD SJ, TISDALE AS.

Anchoring fibrils from a complex network in human and rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28: 212-20.

GIPSON IK, WATANABE H, ZIESKE JD.

Corneal wound healing and fibronectin. *Int Ophthalmol Clinic* 1993; 33: 149-63.

GORDON J, JOHNSON PJ.

Results of a randomized double-masked, multicenter clinical trial of fibronectin in the treatment of persistent epithelial defects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 890.

GRANT MB, KHAW PT, SCHULTZ GS, et al.

Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor and transforming growth factor- $\beta$  on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 3292-301.

GROOS EB Jr.

Neurotrophic keratitis.

En: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ (Eds). CORNEA. Fundamentals of cornea and external disease. St. Louis, Mosby. 1997; 1339-47.

GRUETERICH M, ESPANA E, TSENG SC.

Connexin 43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002; 43: 63-71.

GRUETERICH M, ESPANA E, TSENG SC.

Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. Surv Ophthalmol 2003; 48: 631-46.

GUPTA A, HEIGLE T, PFLUGFELDER SC.

Nasolacrimal stimulation of aqueous tear production. Cornea 1997; 16: 645-8.

HACKET DJ, BAKOS I.

Langerhans cells in the normal conjunctiva and peripheral cornea of selected species. Invest Ophthalmol Vis Sci 1981; 21: 759-65.

HAMADA R, GRIAUD JP, GRAF B.

Etude analytique et statistique des lamelles, des keratocytes, des fibrilles de collagene de la region centrale de la cornee humaine normale. Arch Ophthalmol 1972; 32: 563-70.

HAMMEKE JC, ELLIS PP.

Mycotic flora of the conjunctiva. Am J Ophthalmol 1960; 49: 1174-8.

HANNA C.

Proliferation and migration of epithelial cells during corneal wound repair in the rabbit and the rat. *Am J Ophthalmol* 1966; 61: 55-63.

HANNA C, BICKNELL DS, O'BRIEN JE.

Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol* 1961; 65: 695-8.

HANNA KD, POULIQUE Y, WARING GO III.

Corneal stromal wound healing in rabbits after 193-nm excimer laser surface ablation. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 895-901.

HAO Y, MA DH-K, HWANG DG, KIM WS, ZHANG F.

Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19: 348-52.

HEIGLE TJ, PFLUGFELDER SC.

Aqueous tear production in patients with neurotrophic keratitis. *Cornea* 1996; 15: 135-8.

HOGAN MJ, ALVARADO JA, WEDDELL JE.

Histology of the human eye. WB Saunders. Philadelphia, 1971.

HOYES AD.

Ultrastructure of the epithelium of the human umbilical cord. *J Anat* 1969; 105: 145-62.

HUANG AJ, TSENG SCG.

Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 96-105.

JOHN T.

Transplant successful in Stevens-Johnson syndrome: Human amniotic membrane technique treats acute damage, preserves child's eyesight. *Ophthalmology Times* 1999; 15: 10-13.

JORDAN A, BAUM J.

Basic tear flow. Does it exist?. *Ophthalmology* 1980; 87: 920-30.

KERN P, MENASCHE M, ROBERT L.

Relative rates of biosynthesis of collagen type I, type V and type VI in calf cornea. *Biochem J* 1991; 274: 615-7.

KESSING SV.

Mucous gland system of the conjunctiva. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1968; 95 (suppl): 1-133.

KIM JC, TSENG SCG.

Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14: 473-84.

KIM JC, TSENG SCG.

The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol* 1995; 9: 32-46.

KIM JS, KIM JC, NA BK, et al.

Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits protease activity on wound healing following acute corneal alkali burns. *Exp Eye Res* 1998; 70: 329-37.



KOIZUMI N, FULLWOOD NJ, BAIRAKTARIS G, et al.

Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41: 2506-13.

KOIZUMI N, INATOMI T, QUANTOCK AJ, et al.

Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. Cornea 2000; 19: 65-71.

KOIZUMI N, INATOMI T, SOTOZONO C, et al.

Growth Factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. Curr Eye Res 2000; 20: 173-7.

KOMAI Y, USHIKI T.

The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. Invest Ophthalmol Vis Sci 1991; 32: 2244-58.

KOTHARY P.

Total glossectomy and repair with amniotic membrane. J Indian Med Assoc 1974; 62: 87-8.

KRUSE FE, ROHRSCHEIDER K, VÖLCKER HE.

Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. Ophthalmology 1999; 106: 1504-11.

KUBANYI A.

Trapianto d'amnion sterile ottenuto dal teglio cesareo. Ann Ital Chir 1948; 25: 10.

KURPAKUS MA, DANESHVAR C, DAVENPORT J, KIM A.

Human corneal epithelial cell adhesion to laminins. *Curr eye Res* 1999; 19: 106-14.

LANDESMAN R.

The vascular bed of the bulbar conjunctiva in the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1953; 66: 988-98.

LASS JH, LANGSTON RH, FOSTER CS, PAVAN-LANGSTON D.

Antiviral medications and corneal wound healing. *Antiviral Res* 1984; 4: 143-57.

LEE S-B, LI D-Q, TAN DTH, et al.

Suppression of TGB- $\beta$  signalling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000; 20: 325-34.

LEE S-H, TSENG SCG.

Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997; 123: 303-12.

LEMP MA, HAMILL JR, Jr.

Factors affecting tear film breakup in normal eyes. *Arch Ophthalmol* 1973; 89: 103-5.

LEWIS SH, BENIRSCHKE K.

Placenta

En: Sternberg SS (Ed). *Histology for pathologists*.

New York: Raven Press, Ltd. 1992: 835-63.

LIND GJ, CAVANAGH HD.

Nuclear muscarinic acetylcholine receptors in corneal cells from rabbit. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34: 2943-52.

LOCKARD I, DEBACKER HS.

Conjunctival circulation in relation to circulatory disorders. J S C Med Assoc 1967; 63: 201-6.

MA DH-K, SEE L-C, LIAU S-B, TSAI RJF.

Amniotic membrane graft for primary pterygium: comparison with conjunctival autograft and topical mitomycin C treatment. Br J Ophthalmol 2000; 84: 973-8.

MANN GB, FOWLER KJ, GRAIL D, et al.

Mice with a null mutation of the TGF $\alpha$  gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. Cell 1993; 73: 249-61.

MATHERS WD.

Ocular evaporation in meibomian gland dysfunction and dry eye. Ophthalmology 1993; 100: 347-51.

McNAMARA NA, FLEISZIG SM.

Human tear film components bind Pseudomonas aeruginosa. Adv Exp Med Biol 1998; 438: 653-8.

MEJIA LF, SANTAMARIA JP, ACOSTA C.

Symptomatic management of postoperative bullous keratopathy with non-preserved human amniotic membrane. Cornea 2002; 21: 342-5.

MELLER D, TSENG SCG.

Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40: 878-86.

MELLER D, MASKIN SL, PIRES RT, TSENG SCG.

Amniotic membrane transplantation for symptomatic conjunctivochalasis refractory to medical treatments. Cornea 2000; 19: 796-803.

MELLER D, PIRES RT, MACK RJ, et al.

Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. Ophthalmology 2000; 107: 980- 90.

MENGHER LS, PANDHER KS, BRON AJ.

Non-invasive tear film break-up time : sensitivity and specificity. Acta Ophthalmol (Copenh) 1986; 64: 441-4.

MUKAIDA T, YOSHIDA K, KIKYOKAWAT, SOMA H.

Surface structure of the placental membranes. J Clin Electron Microsc 1977; 10: 447-8.

NA BK, HWANG JH, KIM JC, et al.

Analysis of human amniotic membrane components as proteinase inhibitors for development of therapeutic agent of recalcitrant keratitis. Trophoblast Res 1999; 13: 459-66.

NADKARNI BB.

Innervation of the human umbilical artery: an electron-microscope study. Am J Obstet Gynecol 1970; 107: 303-12.

NAKAMURA M, NISHIDA T, MISHIMA H, OTORI T.

Effects of antimicrobials on corneal epithelial migration. *Curr Eye Res* 1993; 12: 733-40.

NELSON JD, WRIGHT JC.

Conjunctival goblet cell densities in ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 1049-51.

NISHIDA T.

Cornea.

En: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ (Eds). *CORNEA. Fundamentals of cornea and external disease*. St. Louis, Mosby. 1997; 3-27.

NISHIDA T, NAKAGAWA S, MANABE R.

Clinical evaluation of fibronectin eyedrops on epithelial disorders after herpetic keratitis. *Ophthalmology* 1985; 92: 213-6.

NISHIDA T, NAKAMURA M, MISHIMA H, OTORI T.

Differential modes of actino of fibronectin and epidermal growth factor on rabbit corneal epithelial migration. *J Cell Physiol* 1990; 145: 549-54.

NISHIDA T, NAKAMURA M, MISHIMA H, OTORI T.

Interleukin 6 promotes epithelial migration by a fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 1992; 153: 1-5.

NISHIDA T, UEDA A, FUKUDA M, et al.

Interactions of extracellular collagen and corneal fibroblasts: morphologic and biochemical changes of rabbit corneal cells cultured in a collagen matrix. *In vitro Cell Dev Biol* 1988; 24: 1009-14.

NORK TM, HOLLY FJ, HAYES J, et al.

Timolol inhibits corneal epithelial wound healing in monkeys and rabbits. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 1224-8.

OHASHI Y, MOTOKURA M, KINOSHITA Y, et al.

Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 1879-82.

OHJI M, SUNDARRAJ N, THOFT RA.

Transforming growth factor- $\beta$  stimulates collagen and fibronectin synthesis by human corneal stromal fibroblasts in vitro. *Curr Eye Res* 1993; 12: 703-9.

PARIDAENS D, BEEKHUIS H, VAN DEN BOSCH W, et al.

Amniotic membrane transplantation in the management of conjunctival malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 658-61.

PARK WC, TSENG SCG.

Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2906-14.

PASTOR JC, CALONGE M.

Epidermal growth factor and corneal wound healing: a multicenter study. *Cornea* 1992; 11: 311-4.

PERIS-MARTÍNEZ C, MENEZO JL, DÍAZ-LLOPIS M, et al.

Multilayer amniotic membrane transplantation in severe ocular graft versus host disease. *Eur J Ophthalmol* 2001; 11: 183-6.

PINKERTON MC.

Amnioplastin for adherent digital flexor tendons. *Lancet* 1942; 1: 70.

PIRES RTF, TSENG SCG, PRABHASAWAT P, et al.

Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol* 1999; 117: 1291-7.

PODHORANY G, SALLAI V, FEHER J.

A kotohartyaham qualitativ adaptatio keszsege. *Szemeszet* 1967; 104: 276-81.

PRABHASAWAT P, BARTON K, BURKETT G, TSENG SCG.

Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997; 104: 974-85.

PRABHASAWAT P, TSENG SCG.

Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. *Arch Ophthalmol* 1997; 115: 1360-7.

PRASAD JK, FELLER I, THOMSON P.

Use of amnion for the treatment of Stevens-Johnson syndrome. *J Trauma* 1986; 26: 945-6.

RALPH RA.

Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1975; 14: 299-302.

RAO V, FRIEND J, THOFT RA, UNDERWOOD BA, REDDY PR.

Conjunctival goblet cells and mitotic rate in children with retinol deficiency and measles. *Arch Ophthalmol* 1987; 105: 378- 80.

RECORDS RE.

The conjunctiva and lacrimal system. En: Tasman W, Jaeger EA. *Duane's foundations of clinical ophthalmology*. JB Lippincott. Philadelphia, 1994.

REIM M, KEHRER T, LUND M

Clinical application of epiderm growth factor in patients with most severe eye burns. *Ophthalmologica* 1988; 197: 179-84.

ROAT MI, OHJI M, HUNT LE, THOFT RA.

Conjunctival epithelial cell hypermitosis and goblet cell hyperplasia in atopic keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1993; 116: 456-63.

ROBINSON HL, ANHALT GJ, PATEL HP, et al.

Pemphigus and pemphigoid antigens are expressed in human amnion epithelium. *J Invest Dermatol* 1984; 83: 234-7.



ROBSON MC, SAMBURG JL, KRIZEK TJ.

Quantitative comparison of biological dressings. *Surg Forum* 1972; 23: 503-5.

ROBSON MC, KRIZEK TJ, KOSS N, SAMBURG JL.

Amniotic membranes as a temporary wound dressing. *Surg Gynecol Obstet* 1973; 136: 904-6.

ROBSON MC, KRIZEK TJ.

Clinical experiences with amniotic membranes as a temporary biologic dressing. *Conn Med* 1974; 38: 449-51.

RODRIGUEZ-ARES MT, TOURINO R, CAPEANS C, SANCHEZ-SALORIO M.

Repair of scleral perforation with preserved sclera and amniotic membrane in Marfan's syndrome. *Ophthalmic Surg Lasers* 1999; 30: 485-7.

ROLANDO M, REFOJO MF, KENYON KR.

Tear water evaporation and eye surface diseases. *Ophthalmologica* 1985; 190: 147-9.

ROSENWASSER GOD.

Complications of topical anesthetics. *Int Ophthalmol Clin* 1989; 29: 153.

RUBSAMEN PE, McCULLEY J, BERGSTRESSER PR, STREILEIN JW.

On the immunogenicity of mouse corneal allografts infiltrated with Langerhans' cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25: 513-18.

SABELLA N.

Use of the fetal membranes in skin grafting. *Med Rec N Y* 1913; 83: 478.

SCARDOVI C, DE FELIPE GP, GAZZANIGA A.

Epidermal growth factor in the topical treatment of traumatic corneal ulcers. *Ophthalmologica* 1993; 206: 119- 24.

SCHERMER A, GALVIN S, SUN TT.

Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggest limbal origin of corneal stem cells. *J Cell Biol* 1986; 103: 49-62.

SCHERZ W, DOANE MG, DOHLMAN CH.

Tear volume in normal eyes and keratoconjunctivitis sicca. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1974; 192: 141-50.

SCHULTZ GS.

Modulation of corneal wound healing

En: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ (Eds). *CORNEA. Fundamentals of cornea and external disease*. St. Louis, Mosby. 1997; 183-98.

SCHWAB IR.

Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1999; 97: 891-986.

SCHWAB IR, REYES M, ISSEROFF RR.

Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000; 19: 421-6.

SCHWARZACHER HG.

Beitrag zur histogenese des menschlichen amnion. *Acta Anat* 1960; 43: 303-11.

SEASHORE JH, MACNAUGHTON RJ, TALBERT JR.

Treatment of gastroschisis and omphalocele with biological dressings. *J Pediatr Surg* 1975; 10: 9-17.

SEEDOR JA, PERRY HD, McNAMARA TF, et al.

Systemic tetracycline treatment of alkali-induced corneal ulcerations in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1987; 105: 268-71.

SHIMAZAKI J, SINOZAKI N, TSUBOTA K.

Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol* 1998; 82: 235-40.

SHIMMURA S, SHIMAZAKI J, OHASHI Y, TSUBOTA K.

Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001; 20: 408-13.

SIENNICKA A, PECOLD-STEPNIEWSKA H, CZAJKA M.

Transplantation of amniotic membrane for patients with bullous keratopathy and chemical and thermal burns. *Klin Oczna* 2003; 105: 41-5.

SLANSKY HH.

Cysteine and acetylcysteine in the prevention of corneal ulcerations. *Ann Ophthalmol* 1970; 2: 488-91.

SOLOMON A, PIRES RTF, TSENG SCG.

Amniotic membrane transplantation following an extensive removal of primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology* 2001; 108: 449-60.

SORSBY A, SYMONS HM.

Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. Br J Ophthalmol 1946; 30: 337-45.

SORSBY A, HAYTHORNE J, REED H.

Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. Br J Ophthalmol 1947; 31: 409-18.

SPIGELMAN AV, DEUTSCH TA, SUGAR J.

Application of homologous fibronectin to persistent human corneal epithelial defects. Cornea 1987; 6: 128-30.

SRINIVASAN BD, EAKINS KE.

The reepithelialization of rabbit cornea following single and multiple denudation. Exp Eye Res 1979; 29: 595-600.

STERN M.

The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated surfaces, substituting skin grafts. J.A.M.A 1913; 60: 973.

TANCER ML, KATZ M, PEREZ VERIDIANO N.

Vaginal epithelialization with human amnion. Obstet Gynecol 1979; 54: 345-9.

TERVO K, TERVO T, ERANKO L.

Substance P immunoreactive nerves in the human cornea and iris. Invest Ophthalmol Vis Sci 1982; 23: 671-4.

TI S-E, TOW SLC, CHEE S-P.

Amniotic membrane transplantation in entropion surgery. *Ophthalmology* 2001; 108: 1209-17.

TOIVANEN M, TERVO T, PARTANEN M.

Histochemical demonstration of adrenergic nerves in the stroma of human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28: 398-400.

THOFT RA, FRIEND J.

Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16: 14-20.

THOFT RA, FRIEND J, KINOSHITA S, NIKOLIC L, FOSTER CS.

Ocular cicatricial pemphigoid associated with hyperproliferation of the conjunctival epithelium. *Am J Ophthalmol* 1984; 98: 37-42.

TRELFORD JD, HANSON FW, ANDERSON DG, MENDEL VE.

Amnion autografts, permanent structure. *J Med* 1975; 6: 243-7.

TRELFORD JD, HANSON FW, ANDERSON DG, MENDEL VE.

Implanted amniotic membrane as an autograft and as an allograft. *J Med* 1975; 6: 169-80.

TRELFORD-SAUDER M, TRELFORD JD.

Replacement of the peritoneum with amnion following pelvic exenteration. *Surg Gynecol Obstet* 1977; 145: 699-701.

TRIPATHI RC, RAJA SC, TRIPATHI BJ.

Prospects for epidermal growth factor in the management of corneal disorders. *Surv Ophthalmol* 1990; 34: 457-62.

TSAI RJF, LI L-M, CHEN J-K.

Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Eng J Med* 2000; 343: 86-93.

TSENG SC, HIRST LW, MAUMENEE AE, et al.

Possible mechanisms for the loss of goblet cells in mucin-deficient disorders. *Ophthalmology* 1984; 91: 545-52.

TSENG SCG, PRABHASAWAT P, LEE S.

Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997; 124: 765-74.

TSENG SCG, PRABHASAWAT P, BARTON K, et al.

Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 431-41.

TSENG SCG, LI D-Q, MA X.

Suppression of TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3, TGF- $\beta$  receptor II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999; 179: 325-35.

TSENG SCG, TSUBOTA K.

Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. En: Holland EJ, Mannis MJ, ed. Ocular Surface Disease. Medical and surgical management. New York: Springer-Verlag, 2002; cap.20.

TSUBOTA K, NAKAMORI K.

Effects of ocular surface area and blink rate on tear dynamics. Arch Ophthalmol 1995; 113: 155-8.

TSUBOTA K, SATAKE Y, KAIDO M, et al.

Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelial stem-cells transplantation. N Eng J Med 1999; 340: 1697-703.

VAN BEST JA, BENITEZ DEL CASTILLO JM, COULANGEON LM.

Measurement of basal tear turnover using a standardized protocol. European concerted action on ocular fluorometry. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1995; 233: 1-7.

VAN SETTEN GB, TERVO T, VIINIKKA L, et al.

Epidermal growth factor in human tear fluid: a minireview. Int Ophthalmol 1991; 15: 359-62.

VAN SETTEN GB, SCHULTZ GS, MACAULEY S.

Growth factors in human tear fluid and in lacrimal glands. Adv Exp Med Biol 1994; 350: 315-9.

WAHEED MA, BASU MB.

The effect of air pollutants on the eye. I. The effect of an organic extract on the conjunctival goblet cells. *Can J Ophthalmol* 1970; 5: 226-30.

WANG MX, GRAY TB, PARK WC, et al.

Reduction in corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. *J Cat Refract surg* 2001; 27: 310-9.

WATANABE K, NAKAGAWA S, NISHIDA T.

Stimulatory effects of fibronectin and EGF on migration of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28: 205-11.

WEISSMAN SS, ASBELL PA.

Effects of topical timolol (0.5%) and betaxolol (0.5%) on corneal sensitivity. *Br J Ophthalmol* 1990; 74: 409.

WHITSETT CF, STULTING RD.

The distribution of HLA antigens on human corneal tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25: 519-24.

WOOST PG, BRIGHTWELL J, EIFERMAN RA, SCHULTZ GS.

Effect of growth factors with dexamethasone on healing of rabbit corneal stromal incisions. *Exp Eye Res* 1985; 40: 47-60.

XU KP, TSUBOTA K.

Correlation of tear clearance rate and fluorophotometric assessment of tear turnover. *Br J Ophthalmol* 1995; 79: 1042-9.



YAMADA M, SHINODA K, HATAKEYAMA A, et al.

Fat adherence syndrome after retinal surgery treated with amniotic membrane transplantation. *Am J Ophthalmol* 2001; 132: 280-2.

YUE BYJT, SUGAR J, SCHRODE K.

Collagen staining in corneal tissues. *Curr Eye Res* 1986; 5: 559-64.

ZIESKE JD, BUKUSOGLU G.

Effect of protease inhibitors on corneal epithelial migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 2073-8.

ZOHAR Y, TALMI YP, FINKELSTEIN Y, et al.

Use of human amniotic membrane in otolaryngologic practice. *Laryngoscope* 1987; 97: 978-80.