

# Aplicaciones de la membrana amniótica en patología ocular

Z. del Campo  
O. Gris

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Departamento de oftalmología  
Universidad Autónoma de Barcelona  
Instituto de Microcirugía Ocular (I.M.O.). Unidad de córnea y cirugía refractiva  
Universidad Autónoma de Barcelona

Correspondencia:  
Óscar Gris Castellón  
Departamento de Oftalmología  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Avda. Sant Antoni M<sup>o</sup> Claret, 167  
08025 Barcelona

## Resumen

El trasplante de membrana amniótica se ha usado desde hace más de 90 años para favorecer la regeneración tisular en lesiones cutáneas y mucosas. Recientemente se ha demostrado su efectividad en el tratamiento de diferentes patologías de la superficie ocular.

En esta revisión presentamos las propiedades clínicas y los efectos de la membrana amniótica, así como su obtención y conservación, las indicaciones y las diferentes formas de implantación.

## Resum

El transplantament de membrana amniòtica s'ha utilitzat per afavorir la regeneració tissular en lesions cutànies i mucoses, des de fa més de 90 anys. Recentment s'ha demostrat la seva efectivitat en el tractament de diferents patologies de la superfície ocular.

En aquesta revisió presentem les propietats clíniques i els efectes de la membrana amniòtica, així com la seva obtenció i preservació, les indicacions i les diferents formes d'implantació.

## Summary

Amniotic membrane transplantation has been used for over 90 years in cutaneous and mucous lesions to favour the self-regeneration of tissues. Over recent years its effectiveness has been demonstrated in the treatment of diseases of the ocular surface.

In this review we present the clinical properties and effects of amniotic membrane, procurement and preservation, indications for use and the different forms of implantation.

## Introducción

Anatómicamente la superficie ocular se compone del epitelio conjuntival, el limbo corneoescleral, el epitelio corneal y la película lagrimal. Todas estas estructuras se comportan como una unidad funcional, donde la alteración de cualquiera de ellas conlleva una modificación de la funcionalidad normal del conjunto de la superficie ocular. Existen otras estructuras en estrecha relación que son la lamela palpebral, las pestañas y el sistema lagrimal.

Una superficie ocular en estado óptimo se encarga del mantenimiento de la transparencia de la córnea, regulando su hidratación. También protege al globo ocular

de agresiones mecánicas, tóxicas e infecciosas. Además, participa en el movimiento libre del globo ocular contribuyendo a una correcta función visual. Estas funciones se pueden llevar a cabo gracias a diferentes características anatómicas y fisiológicas presentes en la superficie ocular y los tejidos anexos. Cuando se produce una ruptura de los mecanismos de defensa existe una respuesta reparadora procurando una mínima afectación de la transparencia óptica. En una agresión crónica y severa, la superficie ocular responde de forma agresiva para garantizar la supervivencia ocular. Pero esta respuesta puede conllevar una destrucción permanente de la anatomía de la superficie ocular y una degradación de la transparencia corneal con la consiguiente afectación de la visión.

Diferentes patologías pueden afectar a cualquiera de estas estructuras poniendo en peligro la integridad ocular. En estos casos el tratamiento médico es el de elección, pero en ocasiones no es resolutivo y es necesaria una actitud quirúrgica. Diferentes técnicas quirúrgicas se han utilizado, durante décadas, con este objetivo y en estudios recientes se ha demostrado la utilidad de la membrana amniótica preservada en la reconstrucción de la superficie ocular. En los últimos años, el trasplante de membrana amniótica se ha propuesto como una opción terapéutica eficaz en diferentes patologías de la córnea<sup>1</sup> y de la conjuntiva<sup>2</sup>, y su aplicación clínica se ha visto incrementada en todo el mundo.

En la actualidad, el implante de la membrana amniótica es un procedimiento quirúrgico en expansión, en el que todavía no se han establecido la totalidad de sus indicaciones ni las diferentes patologías que pueden beneficiarse. La técnica quirúrgica también constituye un punto en evolución para determinar la mejor forma de implantar el fragmento de membrana en cada entidad clínica, de manera que garantice una adecuada permanencia y proporcione todas las propiedades de la membrana amniótica.

## Historia

Si revisamos la literatura médica vemos que los primeros trabajos en los que se utilizaron membranas fetales se realizaron hace ya casi 100 años. Davis<sup>3</sup>, en 1910, fue el primero en utilizar membranas fetales en el trasplante de piel. Posteriormente, Stern<sup>4</sup> y Sabella<sup>5</sup> en 1913, utilizaron 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, algunos autores emplearon con éxito la membrana amniótica en la reconstrucción de heridas cutáneas por traumatismo o quemadura<sup>6</sup>, y otros<sup>7-9</sup> demostraron que dicha membrana era 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<sup>10</sup>, como sustituto del perito-

neo en procedimientos exantéuticos y reconstructivos pélvicos<sup>11</sup>, en la reconstrucción quirúrgica tras una glosectomía total<sup>12</sup>, como recubrimiento biológico en omfaloceles<sup>13</sup>, etc.

En oftalmología, el primero en utilizar las membranas fetales fue De Rotth en 1940<sup>14</sup>. De Rotth utilizó el amnios y el corion frescos como implante para la reconstrucción de la superficie ocular, obteniendo el éxito sólo en uno de los seis casos en que lo intentó (probablemente estos malos resultados se debieron al hecho de incluir el corion en el trasplante). Posteriormente, Sorsby y colaboradores<sup>15,16</sup> usaron con éxito la "amnioplastina", membrana amniótica procesada químicamente, como recubrimiento temporal, en el tratamiento de quemaduras químicas oculares. A pesar de los buenos resultados obtenidos por Sorsby en 1947, por razones desconocidas, durante un periodo de casi 50 años no se publicaron nuevos trabajos utilizando la membrana amniótica, probablemente por problemas en el procesamiento y conservación del tejido. En 1995, Kim y Tseng<sup>1-2</sup> introducen el trasplante de membrana amniótica preservada en el tratamiento de la patología de la superficie ocular, y con ellos renace un interés generalizado por el uso de este tejido.

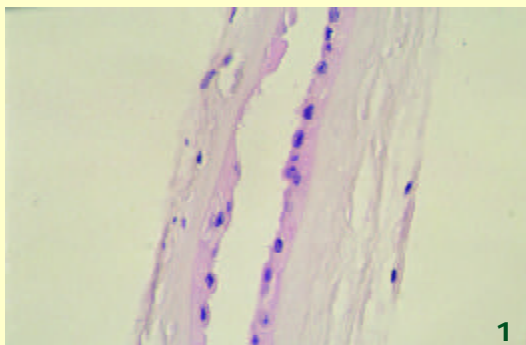
## Histología

La membrana amniótica, o amnion, es una delgada membrana que recubre la placenta por su cara fetal, de manera que constituye la capa más interna de la placenta. Está formada por una monocapa de células epiteliales que asientan sobre una membrana basal continua. Esta membrana basal se encuentra, a su vez, adherida a una fina capa de tejido conectivo subyacente<sup>17</sup> (Figura 1).

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. La altura de las células epiteliales amnióticas varía ampliamente en las distintas zonas anatómicas. Así, a nivel del amnion placentario encontramos células cilíndricas



**Figura 1.** Imagen histológica de dos fragmentos de membrana amniótica enfrentados. Desde la zona central hacia el exterior se observa la monocapa de células epiteliales, la membrana basal y la matriz estromal

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<sup>18</sup>. 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<sup>19</sup>, y son altamente sugerentes de la existencia de un transporte activo. Por su cara inferior, las células epiteliales amnióticas se unen a la membrana basal mediante hemidesmosomas<sup>20</sup>.

Microanatómicamente las células epiteliales están formadas por un núcleo de configuración irregular, con indentaciones en la membrana nuclear y acúmulos periféricos e irregulares de heterocromatina. De forma perinuclear se observa la existencia de vacuolas que revelan la base de la función secretora. Estudios con el microscopio electrónico de transmisión confirman que dichas vacuolas contienen sustancias lipídicas, explicando la rapidez del transporte transcelular de lípidos. También encontramos, intracelularmente, un aparato de Golgi activo que confirma la existencia de un metabolismo celular activo<sup>21</sup>.

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<sup>22</sup>.

Esta complicada ultraestructura epitelial sugiere que el amnion no es una simple membrana que contiene

el líquido amniótico, sino que tiene múltiples funciones específicas a realizar y básicamente tres: efecto mecánico epitelial de recubrimiento, acción secretora activa de diferentes péptidos y transporte intenso intracelular y transcelular que garantiza el manteniendo la homeostasis el fluido amniótico.

Por debajo del epitelio amniótico encontramos la membrana basal de gran grosor y resistencia. Finalmente, la capa más inferior corresponde a la matriz estromal, cuyo espesor puede variar ampliamente entre distintas placentas e incluso entre distintas zonas de la misma placenta, y que se divide en una *capa compacta*, desprovista de células y formada por un tejido compacto, *capa fibroblástica*, formada por fibroblastos y células de Hofbauer, y *capa esponjosa*, formada por el retículo del celoma extraembrionario y que está en contacto con el corion. Esta matriz estromal es totalmente avascular, muy rica en colágeno y mucopolisacáridos y con escasas células, que corresponden predominantemente a fibroblastos. Entre el tejido colágeno pueden identificarse macrófagos, especialmente durante el primer trimestre del embarazo<sup>23</sup>.

## Inmunología

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<sup>24</sup>. 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<sup>25</sup>.

El amnion humano implantado como autoinjerto subcutáneo en el propio recién nacido queda incluido en los tejidos como un injerto permanente<sup>26</sup>, 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<sup>27</sup>. Otros autores<sup>25</sup>, han utilizado también el amnion como aloinjerto subcutáneo no observando signos locales de rechazo en el implante y demostrando, además, que las células epiteliales amnióticas sobreviven o incluso pueden proliferar 30 días después del injerto. Este último dato traduce que el amnion tiene una baja antigenicidad y 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<sup>28</sup>. Recientemente, se ha estudiado este tejido demostrando que posee una considerable antigenicidad que provoca una intensa respuesta celular y una menor respuesta con anticuerpos. Sorprendentemente dicha respuesta se observa tanto en los casos de aloinjerto como en los de autoinjerto, en los primeros 14 días.

La diferencia de inmunogenicidad entre las dos membranas puede estar relacionada con la presencia de fragmentos de decidua maternal a nivel del corion. En animales de experimentación se ha observado que si se aplica en el huésped el corion por su porción mesenquimal y separado del amnion, la respuesta inmunológica es menor<sup>29</sup>.

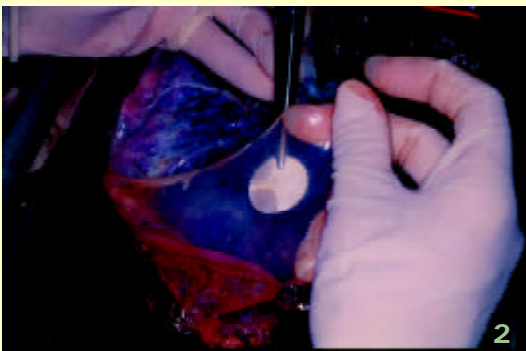
## Obtención y preservación

La placenta se obtiene a partir de partos realizados mediante cesárea electiva. Previamente a la obtención de la placenta se precisa la autorización por escrito de la madre, y se sigue el mismo protocolo que para la donación de otros tejidos. Para evitar la posible transmisión de enfermedades infecciosas en el receptor, se deben realizar estudios serológicos en la donante para virus de la inmunodeficiencia humana, hepatitis B, hepatitis C y sífilis. Al tratarse de un donante vivo es necesario cubrir el periodo ventana para estas enfermedades. Por ello, se debe realizar

el estudio en la donante en el momento del parto y con posterioridad, esperando un mínimo de tres meses si utilizamos serologías, o un mínimo de diez días si el método utilizado es la PCR.

Existen pequeñas diferencias en el protocolo de obtención y preservación de la membrana, nosotros utilizamos la técnica descrita por Tseng. Una vez obtenida la placenta, en condiciones de esterilidad, se procede a su lavado en una solución antibiótica que contiene 50 µg/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 100 µg/ml de neomicina, 2,5 µg/ml de anfotericina B y agua destilada. El amnion se separa del resto de la placenta mediante disección roma (Figura 1) a través del espacio virtual que existe entre las dos membranas, y se coloca sobre fragmentos de papel de nitrocelulosa, con el epitelio hacia arriba y la superficie estromal en contacto con el papel (Figuras 2 y 3). Los fragmentos de membrana amniótica se conservan en recipientes independientes a -80°C, junto a una sustancia crioprotectora. Nosotros, al igual que otros autores<sup>30</sup>, utilizamos el glicerol y un medio de cultivo en una proporción 1:1 (Figura 4). Sin embargo, también se pueden utilizar otras sustancias crioprotectoras como el dimetilsulfóxido<sup>31</sup>.

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 es suficiente con extraerla del congelador 10-15 minutos antes de la cirugía, ya que en poco tiempo se produce la descongelación a temperatura ambiente.

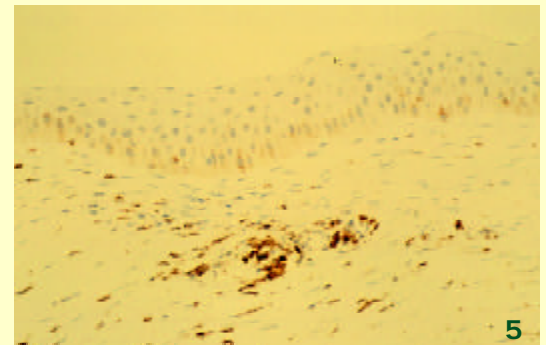


**Figura 2.** Procesamiento de la membrana amniótica. Tras separar el amnion del resto de la placenta mediante disección roma, éste se coloca sobre discos de papel de nitrocelulosa por la parte estromal

**Figura 3.** Discos de papel de nitrocelulosa con membrana amniótica en solución antibiótica previa a su conservación individualizada



**Figura 4.** Introducción de la membrana amniótica con el disco de soporte en solución formada por glicerol y medio de cultivo en proporción 1:1



**Figura 5.** El estudio inmunohistoquímico en un estroma corneal con neovasos, seis meses tras el injerto de membrana amniótica, demuestra la presencia de un infiltrado inflamatorio con predominio de histiocitos y linfocitos T y en menor proporción linfocitos B

## Propiedades clínicas

Los diferentes mecanismos de acción de la membrana amniótica se derivan en varias propiedades clínicas que indican su utilidad en diferentes patologías.

El principal efecto clínico que posee, y por el cual se utiliza en la mayor parte de los casos, es que *favorece la epitelización de los tejidos*. Favorece el crecimiento, adhesión y diferenciación de las células epiteliales, además de prevenir su apoptosis<sup>32</sup>. Al implantar un fragmento de membrana amniótica en una zona con un defecto tisular, ésta actúa como una membrana basal, y como un excelente sustrato para la epitelización sobre ella. Así, a parte de favorecer la epitelización, puede contribuir en la restauración de la pérdida del espesor estromal en casos de úlceras corneales<sup>33</sup>. Histológicamente se ha descrito que, en los casos donde se ha utilizado la membrana amniótica en defectos corneales ulcerativos, como por ejemplo úlceras neurotróficas, una vez reabsorbida la membrana que queda de forma intraestromal cuando se produce la epitelización por encima, ésta se sustituye por un tejido fibrótico neoformado que conserva parcialmente el espesor corneal pero que compromete la transparencia estromal<sup>34</sup>. La velocidad de esta progresiva reabsorción hasta la total desaparición depende de la vascularización corneal. En córneas con neovascularización estromal existe una rápida reabsorción de la membrana debido al importante acceso de células inflamatorias (linfocitos e histiocitos) a partir de los vasos, al contrario sucede en córneas avasculares

donde la reacción inflamatoria y de rechazo es escasa (Figura 5).

La membrana amniótica se ha utilizado como sustrato, in vitro, en el cultivo de diferentes células como los neumocitos o las células endometriales<sup>35,36</sup>, manteniendo la morfología epitelial normal así como su diferenciación. Esto nos sugiere un mecanismo de acción diferente al de otros trasplantes de membranas mucosas, como la bucal o nasal, donde las células epiteliales transplantadas sobreviven y funcionan como sustitutas de la superficie epitelial ocular, sin integrarse en el tejido participando de la epitelización, tal y como ocurre en el caso de la membrana amniótica. También ha demostrado ser un buen sustrato para el crecimiento de células conjuntivales y corneales<sup>37-39</sup>.

Además, la membrana amniótica contiene una gran cantidad de factores de crecimiento<sup>40</sup>, que promueven, aún más, el crecimiento epitelial. Por estos motivos facilita enormemente la regeneración tisular, pero manteniendo siempre el fenotipo epitelial preexistente. Este concepto es importante ya que el epitelio generado procederá de las "stem cells" presentes en esa zona, sin que se produzca transdiferenciación celular. Esto explica la utilidad del implante de membrana amniótica en caso de insuficiencias límbicas parciales<sup>41</sup>. Pero, si utilizamos la membrana amniótica para tratar un defecto epitelial corneal en un paciente con un déficit total de "stem cells" corneales, el resultado será una epitelización de la córnea a partir del tejido circundante, presentando las células un fenotipo conjuntival<sup>42</sup>.



Otro de los efectos clínicos que se consigue con el trasplante de membrana amniótica es una marcada *reducción de la inflamación*. El amnios contiene también una gran cantidad de sustancias que inhiben a distintos mediadores de la inflamación, las proteasas<sup>43</sup>, y también posee la capacidad de precipitar las células inflamatorias a una rápida apoptosis<sup>44,45</sup>. La reducción de la inflamación se consigue, no sólo en los tejidos que quedan localizados bajo el implante, sino también en las zonas próximas no cubiertas por él. Esta disminución de la inflamación favorece a su vez la epitelización, ya que mejora el microambiente en el que se encuentran las "stem cells" y por tanto su actividad.

El trasplante de membrana amniótica también *reduce la formación de cicatrices* durante el proceso de regeneración tisular. El mecanismo por el que se consigue este efecto no es del todo conocido, aunque existen diferentes teorías sobre cuál es la base fisiológica. La membrana amniótica constituye una capa continua de colágeno sobre la esclera que podría actuar como una barrera mecánica ante la formación de fibrosis. Por otro lado, los diferentes factores de crecimiento producidos en las células epiteliales de la membrana amniótica podrían ser los responsables de la modulación de la proliferación y diferenciación de los fibroblastos estromales y conjuntivales, así como de la inhibición de la señal del  $\beta$ -TGF<sup>46</sup>, limitando el proceso de formación de cicatrices. Además, parece que la membrana promueve la epitelización normal y el paso de citoquinas entre las células epiteliales y estromales, que podrían ser las responsables de inhibir la formación de tejido fibrótico<sup>47</sup>. Son necesarios estudios futuros para conocer el mecanismo de acción exacto. Este mecanismo de acción explica la utilidad del implante de membrana amniótica con el objetivo de conseguir la regeneración tisular con mínima cicatrización tras amplias resecciones conjuntivales<sup>30,31</sup>, prevenir la recurrencia del pterigio<sup>48,49</sup> tras su resección y evitar la aparición de opacidades corneales tras PTK y PRK<sup>44,45,50</sup>. Aunque esta acción es más potente cuando los fibroblastos están en contacto con la matriz estromal, también se observa un efecto, aunque menor, cuando los fibroblastos se encuentran separados de la membrana, sugiriendo que algunos factores podrían difundir de los componentes de la matriz<sup>40</sup>.

Finalmente, también se han observado otros efectos clínicos tras el implante de membrana amniótica como una *reducción de la neovascularización* y una *disminución del dolor*. También se ha establecido la posibilidad de cierto poder de *protección frente a las infecciones*. En el líquido amniótico humano exis-

ten múltiples factores antibacterianos, pero se desconoce su permanencia a nivel del amnion aislado<sup>51</sup>. Son necesarios estudios más elaborados para verificar esta impresión clínica.

## Formas de implantar la membrana amniótica

En los últimos cinco años se han publicado múltiples trabajos sobre el trasplante de membrana amniótica en patología de la superficie ocular. Y se han descrito dos formas de implantarla, como injerto o como recubrimiento, según el objetivo deseado porque tienen comportamiento e indicaciones diferentes.

En los casos que se usa como *injerto* el objetivo es que, gracias al efecto mecánico por la propia estructura de la membrana y a la presencia de factores de crecimiento, se produzca un crecimiento del tejido epitelial por encima de la membrana amniótica restableciendo la superficie ocular (Figuras 6 y 7). Es decir, la membrana actúa como una membrana basal, favoreciendo la epitelización sobre ella a partir del epitelio sano circundante y manteniendo el fenotipo epitelial normal (con células caliciformes cuando se trata de epitelio conjuntival)<sup>52</sup>. Además, proporciona una reducción de la inflamación, de la vascularización y de la formación de cicatrices.

Técnicamente, para conseguir este efecto, el fragmento de membrana amniótica se ha de suturar borde a borde con el tejido sano adyacente, sin sobrepasar los márgenes del defecto epitelial.

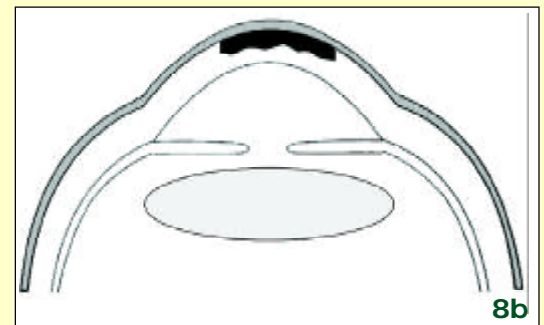
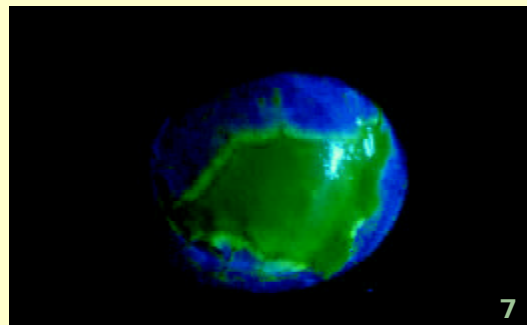
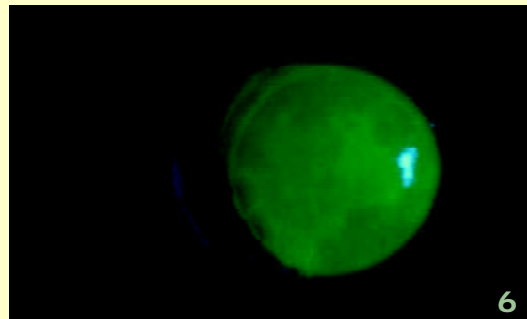
Basándose en estos efectos terapéuticos el injerto de membrana amniótica puede usarse en la reconstrucción de la superficie conjuntival, para restituir el espesor estromal normal y para proporcionar una membrana basal sana para la proliferación y diferenciación epitelial. A nivel de la conjuntiva la literatura ha demostrado que es una alternativa al injerto conjuntival tras resecciones conjuntivales extensas<sup>30</sup>. Los resultados demuestran que el área a reconstruir puede ser extensa siempre que el lecho no esté isquémico y el epitelio de los márgenes sea normal, así como el estroma subconjuntival. A nivel de la córnea se usa en el tratamiento de úlceras corneales que no han respondido al tratamiento médico, con el fin de evitar la progresión a la perforación<sup>31,42,53</sup>. Debemos considerar que cuando se trata de un defecto epitelial con ulceración estromal profunda puede ser conveniente utilizar un injerto multilaminado<sup>33</sup>, con varias capas de membrana amniótica, para conseguir la cicatrización con un grosor estromal esta-

ble. También tiene utilidad para disminuir el dolor en caso de queratopatías bullosas causadas por afaquia, pseudofaquia o fracaso del injerto previo, y asociadas a un mal pronóstico visual potencial que descarta la realización de una queratoplastia penetrante<sup>54</sup>. Se ha usado en la reconstrucción de la superficie ocular en casos con patología de la superficie ocular severa<sup>42</sup>.

Como hemos dicho anteriormente, la membrana actúa como una membrana basal de manera que debemos tener en cuenta que con esta técnica el injerto permanece bajo el nuevo epitelio formado durante un periodo de tiempo más o menos prolongado (Figura 8). En la conjuntiva la reabsorción se lleva a cabo de forma más o menos rápida debido a la presencia de la vascularización que facilita el acceso de células inflamatorias. En la córnea, que normalmente es avascular, el injerto puede permanecer meses limitando la transparencia en mayor o menor

grado. Así, no es un procedimiento que esté indicado en aquellos casos de patología corneal en que únicamente existe un defecto epitelial y en los que la reepitelización facilitará la recuperación prácticamente total de la agudeza visual, o cuando la visualización de la retina pueda ser necesaria en el postoperatorio más o menos inmediato, bien sea por la necesidad de realizar de un tratamiento con láser o una cirugía intraocular (Figura 9).

La segunda opción es el uso de la membrana como un *recubrimiento*. La superficie se recubre con el fragmento de membrana amniótica sobrepasando los márgenes del defecto epitelial, de manera que el objetivo es conseguir reducir el proceso inflamatorio, favorecer la epitelización y disminuir el proceso de cicatrización bajo la membrana. Basándose en estas acciones el recubrimiento de membrana amniótica ha demostrado su utilidad en suprimir la reacción inflamatoria refractaria propia de diferentes



**Figura 6.** Injerto de membrana amniótica en un paciente con queratopatía bullosa. Aspecto postoperatorio

**Figura 7.** A los diez días de la Figura 6 se observa un crecimiento de epitelial sobre la membrana amniótica, persistiendo (en verde) la zona central sin epitelizar

**Figura 8a.** Membrana amniótica (en negro) en un caso de úlcera corneal.

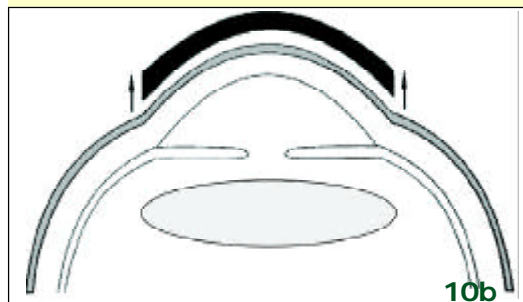
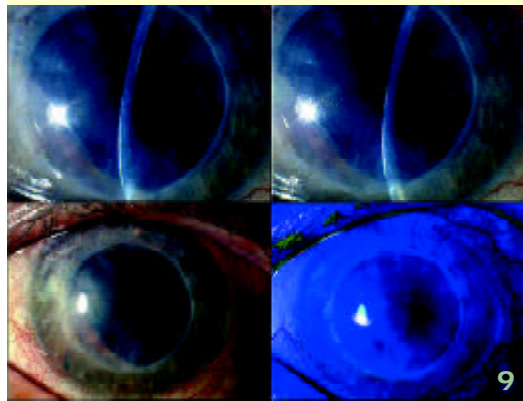
El injerto ocupa el defecto tisular estromal y está suturado borde a borde con el estroma circundante

**Figura 8b:** El injerto de membrana amniótica de la Figura 8a tras conseguirse la epitelización completa de la úlcera. El epitelio corneal (en gris) cubre completamente el injerto (en negro) que se reabsorberá lentamente

patologías de la superficie ocular. Con esta forma de implante, cuando se retiran las suturas que fijan la membrana, ésta cae en su totalidad sin que queden restos en la superficie ocular que pudiesen comprometer la transparencia<sup>55</sup> (Figura 10).

Este uso de la membrana amniótica proporciona las ventajas propias de una lente de contacto terapéutica ayudando a la estabilización del epitelio corneal, protegiendo del roce mecánico y continuo de los párpados, disminuyendo la sintomatología y evitando la sequedad corneal. Pero, por otro lado, también se añade el beneficio de las propiedades biológicas propias de la membrana que se han descrito previamente. Esta combinación de efectos mecánicos y biológicos nos hace pensar que el implante de membrana amniótica sea una mejor opción, al menos desde el punto de vista teórico que el uso de lentes de contacto terapéuticas. De todas maneras, no debemos olvidar que se trata de un procedimiento quirúrgico, por lo que creemos que constituye una buena alternativa en aquellos defectos epiteliales persistentes que no han respondido al tratamiento médico con lágrimas artificiales sin conservantes, con o sin el uso de lentes de contacto terapéuticas, que es el tratamiento de elección.

Cuando usamos la membrana amniótica como recubrimiento la eficacia del procedimiento está directamente relacionada con el tiempo de permanencia del implante en la superficie ocular<sup>55</sup>. Esto constituye uno de los principales problemas, ya que es complicado mantener el implante fijado durante más de dos semanas. Cuando implantamos la membrana como injerto este problema no existe ya que en cuanto el epitelio circundante empieza a crecer sobre la membrana hace que ésta permanezca fijada. Sin embargo, cuando el implante es de tipo recubrimiento el epitelio crece bajo la membrana y lo único que la fija son las suturas. A pesar de que hemos probado distintos tipos de sutura (continua versus discontinua, fijación corneal versus fijación corneal-conjuntival) el efecto mecánico y continuo del parpadeo puede desprender el implante en los primeros días. En nuestra experiencia existen dos formas de mantener la membrana en estos casos: utilizar un implante que cubra toda la córnea sin sobrepasar el limbo esclerocorneal, utilizando una sutura en córnea periférica con nylon 10-0, y colocando postoperatoriamente una lente de contacto terapéutica que proteja el implante del parpadeo o la realización de una tarsorrafia lateral temporal tras el implante de la membrana; son necesarios estudios prospectivos con un elevado número de pacientes para poder concluir qué alternativa es más efectiva.



**Figura 9.** Injerto de membrana amniótica en un paciente con queratopatía bullosa. Seis meses después del implante se observa una epitelización completa con ausencia de bullas y restos subepiteliales focales de membrana amniótica

**Figura 10a:** Recubrimiento con membrana amniótica en un caso de defecto epitelial persistente.

El implante de membrana amniótica (en negro) cubre el defecto epitelial extendiéndose más allá de los márgenes de la lesión (epitelio corneal en gris)

**Figura 10b:** El caso de la Figura 10a tras la epitelización completa después de la extracción de las suturas.

El implante de membrana amniótica (en negro) queda completamente liberado de la superficie ocular



## Indicaciones

Las indicaciones oftalmológicas del trasplante de membrana amniótica pueden incluirse en dos grandes grupos: patologías en las que se precisa reconstruir la superficie conjuntival, y patologías en las que se precisa reconstruir la superficie corneal.

A nivel *conjuntival* podemos utilizar la membrana amniótica para reconstruir la superficie ocular tras la resección de lesiones conjuntivales extensas, como tumores o neoplasias intraepiteliales<sup>30</sup>, pterigium<sup>48</sup>, conjuntivochalasis<sup>30,56</sup>, o cicatrices conjuntivales y simblefaron<sup>30</sup>. Con el implante de membrana amniótica conseguimos facilitar la epitelización, manteniendo el fenotipo epitelial normal (con células caliciformes), y reducimos la inflamación, la vascularización y la cicatrización.

Tras la resección de una lesión conjuntival (por ejemplo un tumor) queda una zona de esclera descubierta, que si es extensa puede llevar a un proceso de cicatrización importante con abundante tejido de granulación. Esta cicatrización puede desembocar, en casos extremos, en una restricción de la motilidad ocular, o más raramente en problemas de necrosis. La alternativa, hasta hace poco tiempo, para evitar esta potencial complicación era utilizar implantes de mucosa bucal<sup>157,58</sup> o autoinjertos de conjuntiva<sup>59</sup> y así recubrir el defecto resultante. Estas técnicas no estaban exentas de limitaciones, en el caso de la mucosa bucal se planteaba un problema de comportamiento fisiológico distinto y también un problema estético importante, y en los autoinjertos conjuntivales se trasladaba el problema a una amplia resección del ojo contralateral. Con el implante de membrana amniótica los resultados en estos casos han mejorado significativamente, consiguiendo una rápida curación de las lesiones a partir del tejido sano circundante, con mínimas cicatrices residuales. Actualmente, ésta es nuestra técnica de primera elección tras la resección de lesiones conjuntivales extensas, sobre todo si se localizan en la zona interpalpebral ya que por su exposición suelen curar con mayor cicatrización (Figura 11).

Algunos trabajos han demostrado la utilidad del implante de membrana amniótica tras la resección del pterigio, especialmente en el pterigio primario. Sin embargo, el autoinjerto de conjuntiva sigue teniendo un índice de recidivas menor tras la resección del pterigio primario o recurrente<sup>48</sup>.

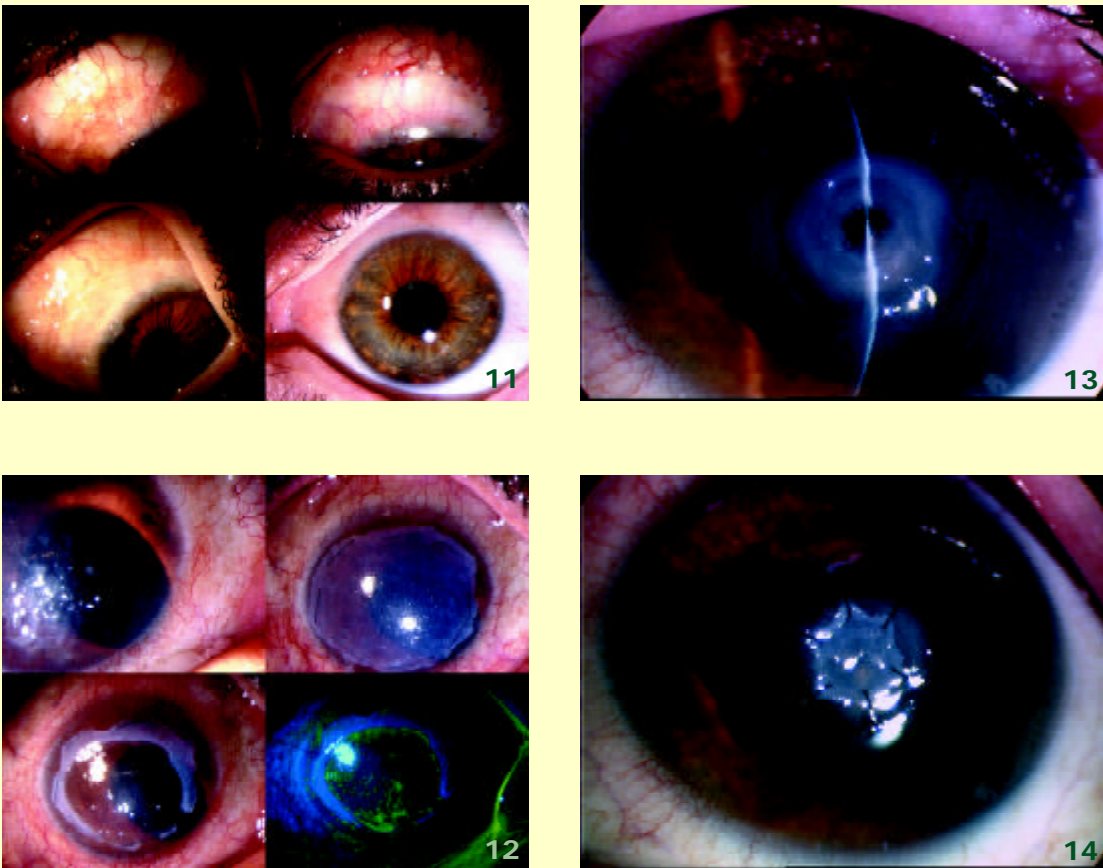
Finalmente, también se ha descrito la utilidad del implante de membrana amniótica tras la resección de simblefaron y cicatrices conjuntivales, tanto en

pacientes con penfigoide ocular cicatricial o síndrome de Stevens-Johnson<sup>60</sup>, como en pacientes con causticaciones<sup>42</sup>. Conjuntamente con injertos-recubrimientos esclerales, la membrana amniótica se ha utilizado en casos de perforación escleral en el síndrome de Marfan<sup>61</sup>. También puede usarse en casos de seidel en la ampolla de filtración en cirugía del glaucoma<sup>62</sup>.

A nivel *corneal* la membrana amniótica ha demostrado ser útil en el tratamiento de defectos epiteliales corneales<sup>2,33,53,55,63,64</sup> (con o sin ulceración estromal), en la reconstrucción de la superficie corneal en algunos casos de insuficiencia de stem cells límbicas<sup>41</sup> y, según algunos autores<sup>54</sup>, en la reducción del dolor en pacientes con queratopatía bullosa cuando la queratoplastia penetrante no está indicada o no es posible realizarla (Figura 12).

Diferentes factores exógenos: sequedad, infecciones, traumatismos; pueden conducir a una alteración de la superficie epitelial que, a su vez, puede verse agravada por diferentes condiciones endógenas: exposición, alteración dinámica palpebral. Cuando existe una respuesta inflamatoria exagerada o un fallo a nivel de los procesos reparadores, la alteración epitelial puede progresar a una úlcera corneal estéril. En ocasiones estas úlceras corneales pueden persistir y evolucionar a la perforación, sin responder al tratamiento convencional. El implante de membrana amniótica tipo injerto es una alternativa en el tratamiento de los defectos epiteliales corneales persistentes con ulceración corneal estéril (Figuras 13 y 14). Existen defectos epiteliales, con o sin ulceración estromal, provocados quirúrgicamente con finalidad terapéutica (queratectomía lamelar) en diferentes patologías corneales, como la degeneración nodular de Salzmann o la queratopatía cálcica. En estos casos el implante de membrana amniótica es útil para facilitar la epitelización tras la resección del tejido afectado (Figuras 15 y 16).

En lo referente a la utilidad del trasplante de membrana amniótica en los casos de insuficiencia límbica se ha de considerar que ante una sospecha clínica de déficit de stem cells es conveniente realizar un estudio de la superficie corneal mediante citología de impresión<sup>65</sup> para confirmar si ésta existe, y para conocer su severidad. En los casos de insuficiencia parcial o hipofunción de las "stem cell" el implante de membrana amniótica puede conseguir, por los mecanismos ya comentados, estimular la actividad de estas células, y por tanto ser suficiente para conseguir la mejoría clínica. Esto constituye uno de los mayores avances en las indicaciones del implante de membrana amniótica, al ofrecer una alternativa en



**Figura 11.**

*Superior-izquierda: Imagen preoperatorio de un nevus conjuntival que se extiende desde las 8 hasta las 2 horas.*

*Superior-derecha: Aspecto de la zona superior un día después del injerto de membrana amniótica.*

*Inferior-izquierda: Aspecto de la zona nasal superior un mes después del implante de membrana amniótica.*

*Se observa una epitelización completa sobre la membrana sin signos inflamatorios.*

*Inferior-derecha: Imagen postoperatoria a los tres meses de la cirugía. Se ha producido la reabsorción de la membrana con mínima cicatrización residual*

**Figura 12.**

*Superior-izquierda: Queratopatía bullosa en un paciente con neuropatía óptica severa y muy baja agudeza visual potencial.*

*Superior-derecha: Imagen postoperatoria, dos días después de un injerto de membrana amniótica.*

*Inferior-izquierda: Tres meses después del implante se observa una reabsorción completa de la membrana en la zona central con persistencia de restos subepiteliales en la periferia.*

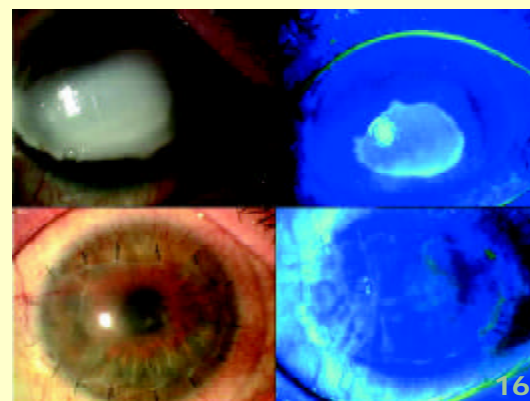
*Inferior-derecha: La tinción con fluoresceína muestra una clara disminución de las bullas epiteliales con respecto al estado preoperatorio aunque no se consigue una superficie epitelial completamente lisa*

**Figura 13.** Úlcera corneal trófica con adelgazamiento severo en paciente con antecedentes de cirugía retiniana (escleral y vitrectomía vía pars plana)

**Figura 14.** Paciente de la figura 13 tres semanas después de un injerto de membrana amniótica. Se observa una epitelización completa sobre la membrana



**Figura 15.**  
*Superior-izquierda: Paciente con degeneración nodular de Salzmann. Se evidencia reacción inflamatoria a nivel del limbo esclerocorneal que compromete su funcionalidad*  
*Superior-derecha: Dos días después de la cirugía (queratectomía superficial y recubrimiento con membrana amniótica) se observa una disminución de la inflamación conjuntival alrededor del implante*  
*Inferior: Resultado un mes después de la cirugía tras retirar el recubrimiento de membrana amniótica*



**Figura 16.**  
*Superior-izquierda: Degeneración cálcica estromal tras causticación ocular.*  
*Superior-derecha: La tinción con fluoresceína muestra un defecto epitelial extenso sobre la placa de calcio.*  
*Inferior-izquierda: Tres semanas después de la cirugía (queratectomía lamelar e injerto de membrana amniótica) el injerto ocupa parte del tejido estromal eliminado*  
*Inferior-derecha: Se observa una completa epitelización sobre el injerto. En la zona izquierda de la imagen, en la que la causticación había afectado al limbo esclerocorneal, se observa una epitelización de origen conjuntival*

estos casos sin la necesidad de un tratamiento posquirúrgico a largo plazo con inmunosupresores sistémicos. Por el contrario, si el déficit de "stem cells" es total será necesario el auto o alotransplante de limbo para conseguir una respuesta satisfactoria. Sin embargo, en estos casos, el implante de membrana amniótica asociado al transplante de limbo puede ayudar a mejorar el resultado final y disminuir la incidencia de rechazo<sup>41</sup>, ya que reduce la inflamación, la vascularización y mejora el entorno perilimbo y la actividad de las "stem cells".

## Limitaciones

El transplante de membrana amniótica cuenta también con una serie de limitaciones, en las cuales él, por sí solo, no es suficiente para conseguir el éxito. La primera de estas limitaciones es el *déficit absoluto de "stem cells"* a nivel del limbo esclerocorneal. Ya hemos comentado que con el transplante de membrana amniótica no se consigue la transdiferenciación de los tejidos, por lo que, en estos casos, el epitelio que crecerá sobre la córnea tendrá un

fenotipo conjuntival. El tratamiento necesario en estos casos es el transplante de limbo, aunque la membrana amniótica asociada puede mejorar los resultados (reduce la inflamación y mejora el entorno estromal para que funcionen las "stem cells" del limbo). Aunque el transplante de membrana amniótica funciona en muchos casos con úlceras neurotróficas, en los ojos con alteraciones tróficas muy importantes, y en los ojos con *necrosis estromales severas* la membrana amniótica puede no ser suficiente para conseguir la curación. De la misma manera, en ojos con *isquemia severa* o con *ausencia de lágrima* el transplante de membrana amniótica no conseguirá restablecer la superficie ocular y, en algunos casos, puede incluso aparecer una infección postoperatoria (no debemos olvidar que estos pacientes carecen de los mecanismos de defensa que proporcionan la lágrima y la sangre). Finalmente, y aunque la membrana amniótica reduce significativamente la inflamación, ésta puede fracasar en ocasiones por una severa inflamación en la superficie ocular. En presencia de una reacción inflamatoria importante la membrana amniótica puede ser reabsorbida rápidamente (tanto en implantes tipo injerto como en implantes tipo recubrimiento). En

estos casos puede ser necesario repetir el implante junto a un tratamiento antiinflamatorio intenso.

## Conclusiones

En conclusión, el trasplante de membrana amniótica es actualmente una de las técnicas quirúrgicas en expansión en oftalmología, cuyos resultados dependen de la patología de base y de la forma de implantarla. El injerto de membrana amniótica tras la resección de lesiones conjuntivales consigue unos resultados excelentes. En estos casos la consideramos como el procedimiento de elección, ya que supera los resultados obtenidos con las restantes alternativas terapéuticas. El injerto de membrana amniótica es útil en el tratamiento de las úlceras corneales neurotróficas. Sin embargo, dado que la mayoría responden a un tratamiento médico adecuado, la opción quirúrgica debe reservarse siempre como segunda opción junto a otras alternativas quirúrgicas como la tarsorrafia. En los casos con queratopatía bullosa el tratamiento definitivo, tanto del dolor como de la recuperación visual, consiste en el trasplante de córnea. El injerto de membrana amniótica puede tener su indicación en aquellos pacientes que rechacen la opción del trasplante por una baja agudeza visual potencial, o en los que el trasplante no pueda efectuarse; sin embargo, estos pacientes representan un número reducido de casos. Finalmente, en los casos con defecto epitelial sin ulceración corneal la situación es parecida a los casos con úlcera corneal neurotrófica. Dado que muchos pacientes responden a un tratamiento médico adecuado, éste constituye la primera elección. Sin embargo, si la respuesta no se produce deben intentarse los tratamientos quirúrgicos antes de que la lesión progrese hacia la opacidad estromal, la ulceración o incluso la perforación. En estos casos, de difícil solución, el implante de membrana amniótica como recubrimiento puede ser una alternativa terapéutica eficaz.

## Bibliografía

- Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14:473-84.
- Lee S, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997;123:303-12.
- Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at The Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J* 1910;15:307.
- Stern M. The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated surfaces, substituing skin grafts. *JAMA* 1913;60:973.
- Sabella N. Use of the fetal membranes in skin grafting. *Med Rec N Y* 1913;83:478.
- Kubanyi A. Trapianto d'amnion sterile ottenuto dal teglio cesareo. *Ann Ital Chir* 1948;25:10.
- Robson MC, Samburg JL, Krizek TJ. Quantitative comparison of biological dressings. *Surg Forum* 1972; 23:503.
- Robson MC, Krizek TJ, Koss N, Samburg JL. Amniotic membranes as a temporary wound dresssing. *Surg Gynecol Obstet* 1973;136:904.
- Robson MC, Krizek TJ. Clinical experiences with amniotic membranes as a temporary biologic dressing. *Conn Med* 1974;38:449.
- Tancer ML, Katz M, Pérez Veridiano N. Vaginal epithelialization with human amnion. *Obstet Gynecol* 1979;54:345-9.
- Trelford-Sauder M, Trelford JD. Replacement of the peritoneum with amnion following pelvic exanteration. *Surg Gynecol Obstet* 1977;145:699.
- Kothary P. Total glossectomy and repair with amniotic membrane (preliminary observations). *Indian Med Assoc J* 1974;62:87.
- Seashore JH, MacNaughton RJ, Talbert JR. Treatment of gastroschisis and omphalocele with biological dressings. *J Pediatr Surg* 1975;10:9.
- De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 1940;23:522-5.
- 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.
- 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.
- Mukaida T, Yoshida K, Kikyokawat. Surface structure of the placental membranes. *J Clin Electron Microsc* 1977; 10:447-8.
- Bartels H, Wang T. Intercellular junctions in the human fetal membranes. *Anat Embryol* 1983;166:103-20.
- 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.

21. Van Herendael BJ, Oberti C, Brosens I. Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *Am J Obstet Gynecol* 1978;131:872-80.
22. Benirschke K, Kaufmann P. *The pathology of the human placenta*. 2nd Ed. New York: Springer-Verlag, 1990.
23. Schwarzscher HG. Beitrag zur histogenese des menschlichen amnion. *Acta Anat* 1960;43:303-11.
24. 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.
25. Akle KA, Adolphi M, Welsh KI, et al. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981;2:1003-5.
26. Trelford JD, Hanson FW, Anderson DG, Mendel VE. Amnion autografts, permanent structure. *J Med* 1975;6:243.
27. Trelford JD, Hanson FW, Anderson DG, Mendel VE. Implanted amniotic membrane as an autograft and as allograft. *J Med* 1975;6:169.
28. 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.
29. Trelford JD, Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 1979;134:833-45.
30. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997;124:765-74.
31. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999;83:399-402.
32. Boudreau N, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3500-13.
33. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999;106:1504-11.
34. Gris O, Wolley-Dod Ch, Güell JL, et al. Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea. *Ophthalmology* 2002;109:508-12.
35. Lwebuga-Musaka JS, Thulin G, Madri JA, et al. An acellular human amniotic membrane model for in vitro culture of type II pneumocytes: the role of the basement membrane in cell morphology and function. *J Cell Physiol* 1984;121:215-25.
36. Van der Linden PJQ, Erkers HWH, de Goeij AFPM, et al. Endometrial cell adhesion in an in vitro model using intact amniotic membranes. *Fertil Steril* 1996;65:76-80.
37. 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.
38. Schwab IR. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1999;97:891-86.
39. 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.
40. 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.
41. Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. 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.
42. Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997;104:2068-76.
43. 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;13:173-7.
44. 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;Feb;27(2):310-19.
45. Park WC, Tseng SC. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;Sep;41(10):2906-14.
46. Tseng SCG, Li D-Q, Tan DTH, et al. Suppression of Transforming Growth Factor isoforms, TGF- $\beta$  receptor II, and myofibroblast differentiation in culture human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999;179:325-35.
47. Li DQ, Tseng SCG. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J Cell Physiol* 1995;163:61-79.
48. Prabhasawat P, Barton K, Burket G, Tseng SCG. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997;104:974-85.
49. 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.



50. Choi YS, Kim JY, Wee WR, Le JH. Effect of the application of human amniotic membrane on rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Cornea* 1998;17:389-95.
51. Galask RP, Snyder IS. Antimicrobial factors in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1970;106:59-65.
52. Pragasawat P, Tseng SCG. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1360-7.
53. Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997;123:303-12.
54. Pires RTF, Tseng SCG, Prabhasawat P, et al. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol* 1999;117:1291-7.
55. 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* 2001; 21(1):22-7.
56. Meller D, Maskin SL, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for symptomatic conjunctivochalasis refractory to medical treatments. *Cornea* 2000;Nov;19(6):796-803.
57. Hosni FA. Repair of trichomatous cicatricial entropion using mucous membrane graft. *Arch Ophthalmol* 1974; 91:49-51.
58. Shore JW, Foster S, Westfall CT, et al. Results of buccal mucosal grafting for patients with medically controlled ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 1992; 99:383-95.
59. Vastine DW, Stewart WB, Schwab IR. Reconstruction of periocular mucous membrane by autologous conjunctival transplantation. *Ophthalmology* 1982; 89:1072-81.
60. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996;22:38-52.
61. Rodríguez-Ares MT, Tourino R, Capeans C, Sánchez-Salorio M. Repair of scleral perforation with preserved scleral amniotic membrane in Marfan's syndrome. *Ophthalmic Surg Lasers* 1999;30:485-7.
62. Budenz DL, Barton K, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. *Am J Ophthalmol* 2000;Nov;130(5):580-8.
63. Gris O, Güell JL, López-Navidad A, et al. Application of the amniotic membrane in ocular surface pathology. *Annals of Transplantation* 1999; 3-4: 82-84.
64. 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;11:183-6.62.- Puangsricharern V, Tseng SCG. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102:1476-85.