

Utilización de Membrana Amniótica en la Reconstrucción de la Superficie Ocular

Luis Fernando Mejía E., M.D.

La membrana amniótica se ha utilizado en medicina con fines terapéuticos desde hace bastantes años. Ha tenido un uso particularmente exitoso en el manejo de heridas extensas y quemaduras de piel ^{1,2}, pero también se ha utilizado para reconstrucción vaginal ³, control de adherencias peritoneales ⁴ y en cirugía de onfalocelo ⁵, entre otros.

En investigación básica ha sido particularmente útil en el estudio de modelos de regeneración neural y de angiogénesis, así como en estudios de modulación del fenotipo epitelial en cultivos tisulares ⁶.

En oftalmología el primer reporte pertenece a De Rötth quien en 1940 publicó su experiencia utilizando Amnios y Corion juntos en el manejo de simblefaron, con éxito parcial ⁷; posteriormente la utilizaron Sorsby y Symons para el manejo de quemaduras corneales por álcali ⁸. Después de esto, la técnica cayó en desuso durante años hasta que el Dr. Juan Battle presentó su experiencia personal en una reunión de exalumnos del Bascom Palmer Eye Institute en 1992; a raíz de esta presentación los doctores Tseng ⁹ y Tsubota ¹⁰ comenzaron una extensa serie de publicaciones sobre investigación básica y clínica utilizando membrana amniótica en oftalmología.

La membrana amniótica tiene dos componentes principales: una matriz avascular estromal, y una membrana basal gruesa que está compuesta fundamentalmente por colágeno tipo IV, V, y Laminina soportando una monocapa de células epiteliales ^{11,12}. Su composición colágena la hace prácticamente igual a la membrana basal conjuntival, pero sólo similar a la corneal.

Profesor, Servicio de Córnea
Instituto de Ciencias de la Salud – CES
Medellín

Correspondencia: Luis Fernando Mejía E.
Clínica SOMA, Consultorio 307 Calle 51 #45-93
Medellín, Colombia . Teléfono 57-4-2317025
FAX 57-4-5137042
E-mail - lfmejia@epm.net.co

Entre sus propiedades más importantes se encuentran la avascularidad y antiangiogenicidad¹³, y la no expresión de antígenos de histocompatibilidad^{14,15}, además, tiene propiedades antibacterianas^{16,17} y antiadherentes^{18,19}. A nivel celular favorece la migración de células epiteliales²⁰, refuerza la adherencia de las células epiteliales basales^{21,22}, disminuye su apoptosis^{23,24}, es un excelente sustrato para las células Transitoriamente Amplificadas (TAC)²⁵ y promueve su diferenciación^{26,27,28}, en este sentido el uso de la membrana amniótica se debe comprender como el trasplante de una membrana basal o sustrato de crecimiento celular.

Desde el punto de vista bioquímico, sus células epiteliales producen Factor Básico de Crecimiento de los Fibroblastos, Factor de Crecimiento y transformación Beta, Interleukinas 1 y 10 e inhibidores Tisulares de la Metaloproteinasa 1, 2 y 4, entre otros^{29,30}; la disponibilidad de estas sustancias hace que la membrana amniótica se convierta también en un trasplante bioquímico.

Desafortunadamente, la vitalidad de sus células epiteliales es afectada en mayor o menor grado en los diferentes procesos de preservación, tanto por los químicos a los que son sometidas como por el proceso de congelación/descongelación en sí mismo, perdiendo el efecto farmacológico aportado por las diferentes sustancias descritas^{30,31,32}, razón por la cual algunos autores han preferido la utilización de membrana amniótica no preservada, reportando ojos más tranquilos en el postoperatorio inmediato y mejores resultados a largo plazo^{33,34,35}.

Consecuentemente, el uso de la membrana amniótica para la reconstrucción de la superficie ocular está basado principalmente en su capacidad de promover la epitelización (actuando como trasplante de membrana basal) y de inhibir la fibrosis e inflamación (a través del

diálogo de citoquinas y mediante separación física de superficies adherentes).

Actualmente en Colombia se puede conseguir membrana amniótica tanto preservada como no preservada en diferentes Bancos de Ojos, con disponibilidad inmediata en el primer caso y mediante pedido en el segundo. Cuando empleamos membrana amniótica no preservada, esta es obtenida en una cesárea electiva con previo consentimiento materno y con pruebas serológicas negativas para Sífilis, Hepatitis B y C y HIV.

Bajo condiciones de asepsia la placenta con sus membranas es irrigada abundantemente con Solución Salina Normal, y se procede a obtener una sección pequeña de Amnios separándolo mediante disección roma del Corion (Figura 1A); es fundamental un manejo cuidadoso de este tejido para no traumatizar el frágil epitelio. Se guarda en una caja de Petri con Solución Salina Normal (Figura 1B) y se refrigera en nevera -sin congelar- durante un período no mayor de 24 hrs. No utilizamos soluciones de preservación ni antibióticos en este proceso³³ pues la mayoría de estos últimos son tóxicos para las células epiteliales.

Como con todas las técnicas quirúrgicas novedosas, se han sugerido más usos de los realmente efectivos; las siguientes son algunas de las indicaciones actuales más sedimentadas.

- Cierre de defectos corneales persistentes. Fue uno de los primeros usos publicados, y es realmente efectivo^{33,36,37,38}; se emplea en los casos en los que el manejo médico (reemplazo lagrimal sin preservativos, suero autólogo, oclusión de puntos lagrimales, lente de contacto terapéutico, tarsorrafia marginal) no ha sido suficiente. Bajo anestesia tópica se limpia la base de la úlcera con Weckcel y se desepitelizan los bordes de la misma; acto seguido, se colocan

una o varias capas de membrana amniótica para llenar el defecto, suturando la más superficial a la córnea adyacente con puntos interrumpidos de Nylon 10-0. Se deja un lente de contacto terapéutico durante el postoperatorio temprano, y los puntos se retiran a los 15 días aproximadamente.

Las fotos corresponden a una paciente de 63 años (Figura 2A) quien presentaba un Penfigoide Ocular Cicatricial no diagnosticado, con un defecto epitelial corneal persistente, que no se había resuelto a pesar del uso de lágrimas artificiales, suero autólogo tópico, oclusión de los cuatro puntos lagrimales con tapones de silicona y lente de contacto terapéutico; rechazaba el tratamiento sistémico del Penfigoide Ocular hasta no ver mejoría de su problema corneal.

Se colocó el parche de amniótica sobre el defecto epitelial –previa desepitelización de los bordes del mismo– suturado a córnea con puntos separados de Nylon 10-0 (Figura 2B), y se observó un reemplazo gradual de la membrana amniótica (Figura 2C), con epitelización completa a las 3 semanas. No ha habido recurrencia del defecto desde entonces (48 meses) (Figura 2D). Actualmente se encuentra en inmunosupresión sistémica con Ciclofosfamida para su Penfigoide, el cual está bajo control.

-Reconstrucción de la superficie ocular luego de resecciones extensas de conjuntiva bulbar

^{39, 40}. En estos casos es particularmente útil pues permite realizar resecciones muy amplias de conjuntiva bulbar para retirar la patología presente con un margen amplio de resección; al colocar la membrana amniótica con su cara epitelial hacia arriba, se está realizando un trasplante de membrana basal sobre la cual se van a extender las células epiteliales conjuntivales así como las células mucinosas ("Goblet"); de hecho, se ha observado que el epitelio conjuntival que crece sobre una

membrana amniótica tiene un mayor porcentaje de células mucinosas ²⁵. Luego de realizar la resección de la conjuntiva enferma se procede a realizar hemostasia puntual y cuidadosa pues la sangre debajo de la amniótica no la deja adherirse bien; se sutura la amniótica tratando de dejar sus bordes libres debajo de la conjuntiva del paciente, con puntos separados de nylon 10/0; acto seguido se puede colocar sobre la amniótica una plastia libre de conjuntiva obtenida del ojo contralateral, suturándola a uno de los bordes conjuntivales para garantizarle el aporte vascular uniforme. El proceso de epitelización de la amniótica se sigue mediante tinción con fluoresceína, y los puntos se retiran aproximadamente a los 15 días.

Las fotos corresponden a un hombre de 68 años quien presentaba una masa epibulbar de 12 meses de crecimiento (Figura 3A). Se realizó resección de la lesión con un margen de seguridad de 3 mm, resecando conjuntiva bulbar y limbo entre las 2 y las 12 en sentido horario (300°) y con un diámetro promedio de resección de 7 mm.

La parte corneal se disecó lamelariamente con una espátula fina pues no comprometía Bowman. Se colocó un injerto de amniótica sobre el limbo resecado y cubriendo todo el defecto conjuntival, y sobre la amniótica se colocó un autoinjerto limbo-conjuntival de 100% obtenido del ojo contralateral (Figura 3B). Re-epitelizó totalmente en tres semanas (Figura 3C, 3D). El diagnóstico de patología (Dr. Francisco Barraquer C. Instituto Barraquer de América) fue un Carcinoma Escamocelular de Conjuntiva Microinvasivo. El paciente no regresó a control luego del sexto mes post-operatorio.

- Reconstrucción de la superficie ocular en casos con compromiso difuso, con o sin auto o aloinjerto limboconjuntival concomitante ^{25,}

^{31, 41, 42}. En este grupo se incluyen patologías como Síndrome de Stevens-Johnson, Penfigoide Ocular

Cicatricial, y Quemaduras por álcali, entre otros. Esta se ha convertido en una de las más frecuentes indicaciones para la cirugía con membrana amniótica; estos casos usualmente eran sometidos a múltiples cirugías con transplante de mucosa yugal u otras, con resultados poco satisfactorios pues persistían ojos rojos e incómodos, mala visión por compromiso corneal ante la pérdida de las células limbares, simblefaron extensos, queratoconjuntivitis sicca severa, etc; el advenimiento de los injertos limboconjuntivales⁴³ mejoró esta situación, pero en muchos casos sigue siendo insuficiente.

En estos casos hemos observado una evolución más favorable cuando se utiliza membrana amniótica no preservada, probablemente por el franco efecto antiinflamatorio de esta comparada con la preservada además de proveer una nueva membrana basal para la epitelización. Estas son cirugías grandes en las cuales se debe retirar completamente el tejido conjuntival y corneal enfermo, resecar la fibrosis epiescleral usualmente abundante, y realizar una hemostasia epiescleral selectiva y cuidadosa.

Luego de expuesto el lecho epiescleral, se sutura la membrana amniótica, introduciendo sus extremos debajo de la conjuntiva bulbar residual del paciente y suturándola a epiesclera y conjuntiva, cubriendo toda la superficie comprometida; algunos autores cubren la córnea en su totalidad, pero hemos visto que esto demora sustancialmente la rehabilitación funcional del paciente pues la membrana se demora varias semanas en disolverse completamente tiempo durante el cual tiene un aspecto de vidrio esmerilado; por esta razón nosotros preferimos resecar la parte central de la membrana que queda sobre la córnea (como un "donnut") para que el paciente se recupere mas rápidamente.

Es sorprendente el aspecto tranquilo, mínimo edema de tejidos, poca ptosis y la comodidad del

paciente desde el primer día postoperatorio. Hemos podido comprobar cómo autoinjertos limboconjuntivales del ojo contralateral de tan poco como 30° suturados sobre la membrana amniótica son suficientes para repoblar los 360° de limbo enfermo de manera rápida y funcionalmente competente, tal y como lo han reportado otros autores⁴⁴.

En estos casos no dejamos lente de contacto terapéutico por el trauma que ocasiona al limbo, sino que preferimos ocluir al paciente hasta lograr una completa reepitelización lo cual ocurre entre la 2ª y 3ª semana. Inicialmente colocábamos los injertos limboconjuntivales en los cuadrantes superior e inferior pero notamos que con alguna frecuencia el injerto inferior se perdía pues al ser suturado sobre la amniótica laxa subyacente la lágrima se metía debajo del mismo disecándolo y perdiendo su vitalidad; por esta razón actualmente colocamos los injertos en los cuadrantes nasal y temporal

Las fotos corresponden a un paciente de 35 años recibido en el servicio de Córnea 3 meses luego de haber sufrido una quemadura por álcali

Presentaba conjuntivalización corneal total, vascularización estromal profunda, limbo indiferenciado, y una agudeza visual de Movimiento de Manos (Figura 4A). Fue llevado a cirugía realizando una peritomía en 360°, queratectomía superficial con Weckcel y pinzas, colocación de un injerto de membrana amniótica no preservada en forma de "donnut" con el epitelio hacia arriba (extendiéndose unos 10 mm del limbo hacia atrás en 360°, pero respetando la córnea), y colocación de dos plastias limboconjuntivales de 45° c/u obtenidas del ojo contralateral, suturadas sobre la membrana amniótica y ancladas a epiesclera en su extremo limbar (Figura 4B); al terminar el procedimiento se observó una opacidad corneal difusa grado II, que disminuyó lentamente desde entonces hasta desaparecer completamente.

Durante el postoperatorio presentó isquemia de la plastia limboconjuntival temporal, por lo cual toda la re-epitelización se dió a partir del injerto nasal de 45°. Al cabo de 18 días se obtuvo un ojo totalmente re-epitelizado, con un limbo bien diferenciado (Figuras 4C, 4D) y una agudeza visual no corregida de 0.4 y corregida de 0.67

- Cirugía de pterigion. En general, el transplante de membrana amniótica no está indicado en la cirugía de pterigion primario o en la de una recidiva simple sobre una superficie por demás normal. De hecho, los reportes de recidivas utilizando membrana amniótica únicamente ^{45, 46} presentan tasas de recidiva mayores del 10% en pterigion primario y por encima del 35% en pterigion recidivado, lo cual es muy por encima del standard actual.

Sin embargo, en aquellos casos en los que se presentan situaciones complejas por la presencia de pterigiones extensos múltiples, recidivados, en un globo con una superficie ocular por demás enferma o cuando menos comprometida por las previas cirugías, es razonable la utilización de la membrana amniótica como membrana basal sobre la cual pueda crecer un injerto limboconjuntival pequeño; en estos casos se reseca la totalidad del pterigion y la extensa fibrosis epiescleral, se nivela el limbo con el aerotor y se procede a colocar un transplante extenso de amniótica cubriendo toda la esclera desnuda; sobre este transplante de amniótica se procede a suturar una plastia limboconjuntival obtenida del ojo contralateral de tan sólo 30°, teniendo cuidado que uno de sus extremos este conectado con la conjuntiva bulbar sana del paciente para facilitar su vascularización e incorporación.

Esta cirugía tiene el inconveniente de que el post-operatorio es bastante más largo que el de un pterigion simple, y el ojo se demora varias semanas (incluso meses) en recuperar una apariencia normal, lo cual desconcierta y

preocupa a los pacientes; sin embargo el resultado final es excelente.

Las fotos corresponden a un campesino de 50 años con antecedente de cirugía de pterigion nasal y temporal bilateral en años previos, y quien se presentó con pterigion nasal y temporal recidivados en su ojo izquierdo (Figura 5A). Como esta cirugía fue realizada hace varios años cuando no teníamos experiencia con estos casos, operamos primero el pterigion temporal y cuando éste estuvo totalmente recuperado, operamos el nasal (Figuras 5B y 5C), con la técnica descrita.

-Control sintomático de la queratopatía bullosa dolorosa. Esta ha sido una de las más recientes indicaciones para la utilización de membrana amniótica ^{47, 48}. Con el incremento en el número de cirugías para la extracción de catarata en las últimas décadas, la queratopatía bulosa postoperatoria (QBP) se ha convertido en una de las principales indicaciones de queratoplastia penetrante.

En el manejo de la QBP dolorosa por bulas recurrentes se han utilizado diferentes tratamientos médicos (soluciones hipertónicas, disminución de la presión intraocular y lentes de contacto terapéuticos, entre otros) ^{49, 50, 51, 52, 53, 54} y quirúrgicos (la cauterización estromal anterior -Procedimiento de Salleras- ⁵⁵, la punción estromal anterior manual ^{56, 57} o con YAG laser ⁵⁸, la Queratectomía Fototerapéutica ⁵⁹ y el recubrimiento conjuntival ⁶⁰).

Todas estas técnicas tienen ventajas y desventajas, que las hacen más o menos favorables en un momento dado; tienen tasas de éxito variable, costos muy disímiles, diferentes complicaciones y dificultades variables de obtención/aplicación. Como alternativa al manejo médico prolongado o al quirúrgico ya descritos, está la realización de un recubrimiento corneal con membrana amniótica, la cual

proveerá una nueva membrana basal, más resistente a la formación de bulas (efecto de lente terapéutico), y un buen sustrato para el crecimiento del epitelio corneal.

En estos casos inicialmente reservábamos la cirugía para ojos sin potencial visual alguno, pero desde hace algunos años la hemos venido haciendo incluso en ojos que tienen programada una queratoplastia penetrante pero que por una u otra razón no se planea hacer en el futuro cercano y en los cuales el uso de lentes de contacto terapéuticos por tiempo prolongado implica grandes riesgos por la alta incidencia de infecciones.

Este es un procedimiento simple, más fácil de hacer y estéticamente más aceptable que un recubrimiento conjuntival; bajo anestesia tópica se practica una des-epitelización completa de la córnea con espátula plana y se coloca un disco de membrana amniótica de aproximadamente 9 mm de diámetro, dejando 1 mm de córnea periférica descubierta para que las células epiteliales provenientes del limbo se monten en la amniótica y no se vayan por debajo de la misma. Se sutura (Nylon 10-0) con 8 puntos radiales separados y una continua antitorsiión, enterrando los puntos en el estroma corneal.

Es importante tener en cuenta que durante el postoperatorio temprano la amniótica se retrae considerablemente; por esto se debe colocar el mayor injerto que todavía respete el limbo, y suturarlo bien con los puntos interrumpidos y la continua para garantizar su estabilidad y que no sea disecado por la lágrima que se mete por debajo. Es de anotar que no es raro ver bulas en la porción corneal periférica no cubierta por amniótica, más no en la que sí queda cubierta; por esta razón es necesario intentar cubrir tanta superficie corneal como sea posible. El tiempo promedio de re-epitelización es de 11.2 días y se logra el control sintomático en el 80% de los pacientes, comparado con control sintomático

en sólo el 20% de aquellos a los cuales se les realiza una desepitelización vigorosa sin amniótica subsiguiente ⁴⁷.

Las fotos corresponden a un hombre de 50 años, quien consultó por una queratopatía bullosa afáquica dolorosa, en un ojo sin potencial visual, de varios años de evolución (Figura 6A). Se realizó una desepitelización corneal completa, y se colocó la membrana amniótica cubriendo toda la superficie corneal excepto el 1 mm periférico (Figura 6B). Se dejó un lente contacto hasta que re-epitelizó completamente (6 días) y se retiraron suturas a las 2 semanas (Figura 6C). Ha estado asintomático desde la cirugía (24 meses), sin recidiva de las bulas.

-Otras indicaciones. Entre las otras muchas técnicas que se han sugerido dentro del auge de la membrana amniótica en los últimos años, con mayor o menor porcentaje de éxito e indicación se cuentan el sellamiento de ampollas de filtración con escape ^{61, 62}, la corrección de simblefaron ^{39, 42, 63}, la oclusión de puntos lagrimales ⁶⁴, la utilización en trabeculectomía ⁶⁵ y esclerectomía profunda como elemento creador de espacio, la corrección de conjuntivochalasis ⁶⁶ y en el manejo de úlceras corneales infecciosas ⁶⁷, entre otros.

Conclusion

La membrana amniótica posee una matriz estromal avascular, y una membrana basal compuesta por colágeno tipo IV y V, Laminina y una monocapa de células epiteliales ^{11, 12}; entre sus propiedades están la de prevenir la apoptosis de fibroblastos ^{23, 24} reforzar la adhesión de las células epiteliales basales ^{21, 22} y facilitar la migración epitelial ²⁰, características todas que explican su utilidad en la reconstrucción de la superficie ocular sin ser vascularizada o conjuntivalizada en sí misma, sino sirviendo como un sustrato de crecimiento para el epitelio del huésped.

Membrana Amniótica en la Reconstrucción de la Superficie Ocular

Es de anotar lo tranquilos que aparecen estos ojos desde el primer día postoperatorio, probablemente debido a la gran cantidad de citoquinas y factores de inhibición y al efecto de "lente terapéutico" que esta membrana brinda al ojo, a pesar de que algunos ojos duran parcialmente desepitelizados por semanas.

La única diferencia que hemos encontrado cuando comparamos el uso de Membrana Amniótica No Preservada con Membrana Amniótica Preservada es que la primera es un poco más gruesa durante el acto quirúrgico lo cual es de esperarse pues no ha sido sometida al proceso de preservación que implica su deshidratación parcial; de hecho, este mayor espesor la hace más fácil de manejar. Esta diferencia deja de ser aparente hacia el 4 ó 5 día postquirúrgico. Fisiológicamente es más lógico utilizar la Membrana Amniótica No Preservada, ya que se mantiene la viabilidad de las células epiteliales las cuales son las responsables de la producción de citoquinas y diferentes factores de crecimiento y regulación; estas células se ven alteradas en mayor o menor grado (según el protocolo) por los diferentes sistemas de preservación^{31, 32, 30}. Sus costos de obtención son mínimos, y la disponibilidad y bioseguridad amplios.

La utilización de Membrana Amniótica es una alternativa lógica y segura para la reconstrucción de la superficie ocular en casos complicados. Como toda técnica nueva, debe utilizarse racional y críticamente para poder evaluar adecuadamente los resultados en un futuro.

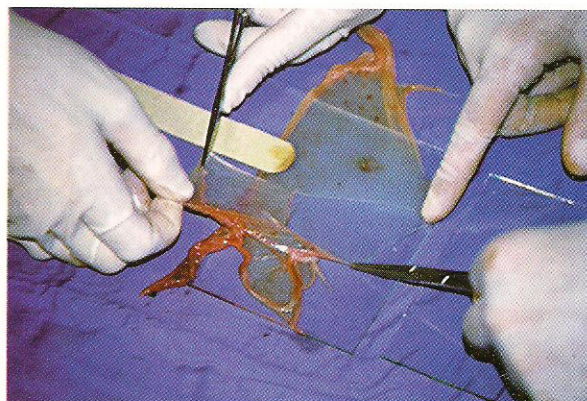


Fig. 1A

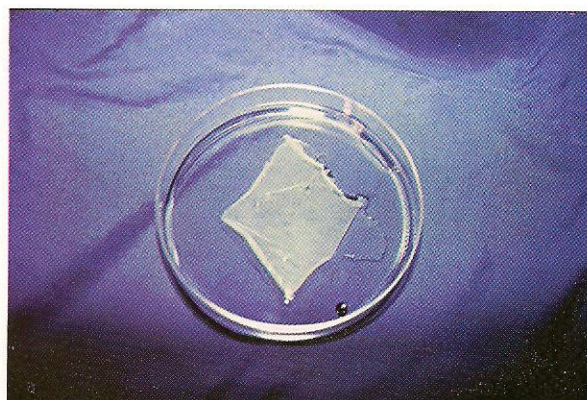


Fig. 1B



Fig. 2A



Fig. 2B



Fig. 2C

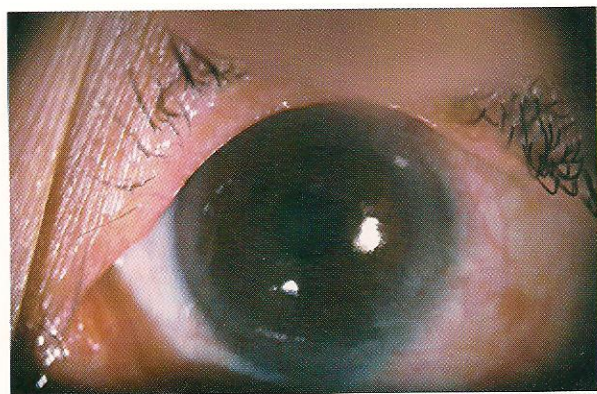


Fig. 2D



Fig. 3A



Fig. 3B

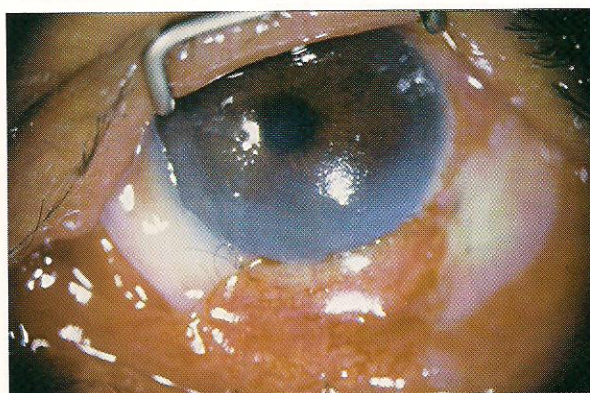


Fig. 3C

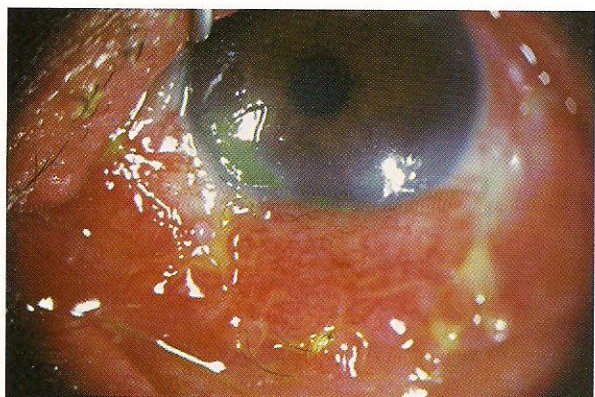


Fig. 3D



Fig. 4A



Fig. 4B

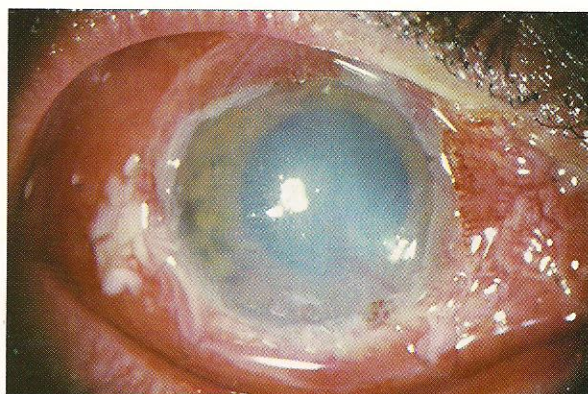


Fig. 4C

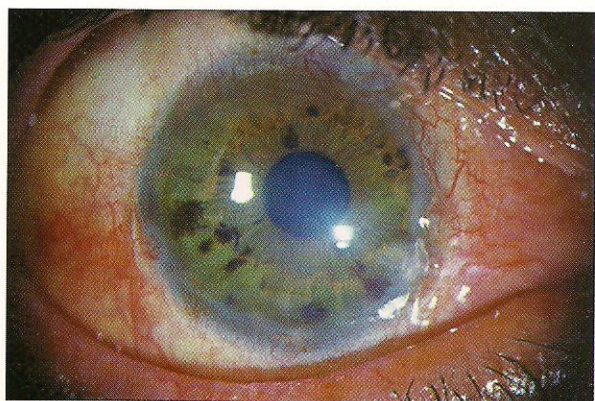


Fig. 4D

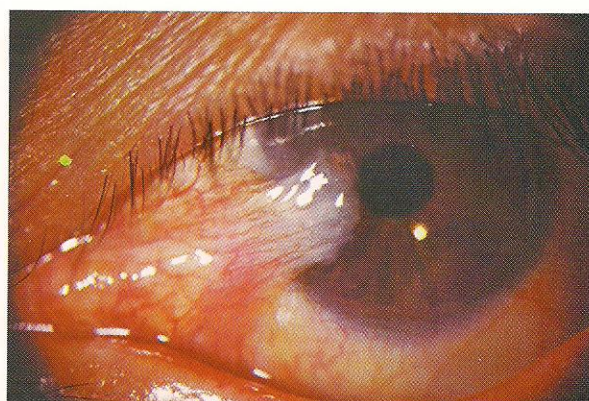


Fig. 5A

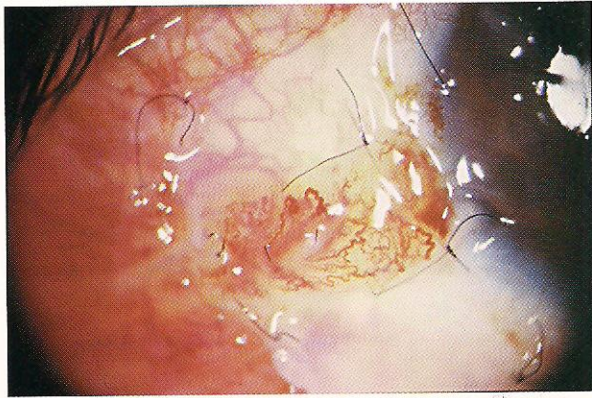


Fig. 5B

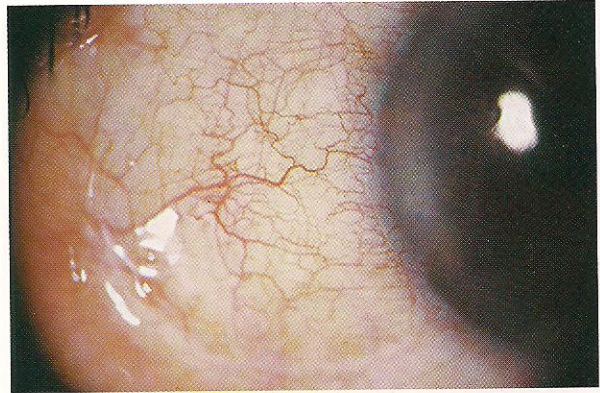


Fig. 5C



Fig. 6A

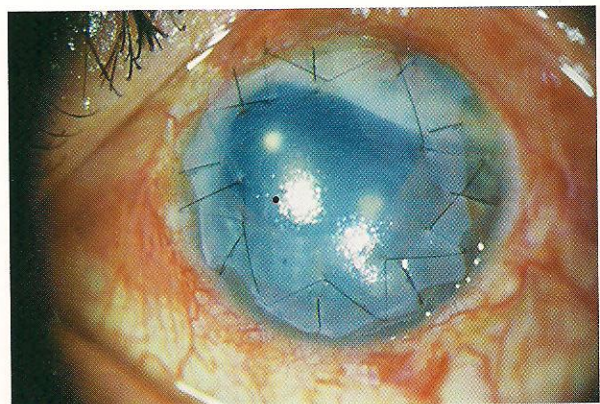


Fig. 6B

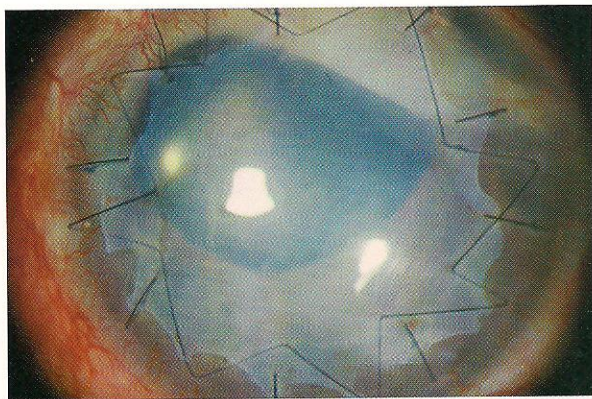


Fig. 6C



Fig. 6D

Referencias

1. Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J* 15: 307-312, 1910
2. Gruss JS, Jirsch DW. Human Amniotic Membrane: a versatile wound dressing. *Can Med Assoc J* 118: 1237-1246, 1978
3. Trelford JD, Trelford-Sauder M. The Amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 134: 833-845, 1979
4. Rennekampff HO, Dohrman P, Fory R, Fandrich F. Evaluation of Amniotic membrane as adhesion prophylaxis in a novel surgical gastroschisis model. *J Inves Surg* 7: 187-193, 1994
5. Yokomori et al. Advantages and pitfalls of amnion inversion repair for the treatment of large unruptured omphalocele: results of 22 cases. *J Ped Surg* 27: 882-884, 19926. Lwebuga-Mukasa et al. An acellular human amnionic membrane model for in vitro culture of type II pneumocytes: the role of the basement membrane in cell morphology and function. *J Cell Physiol* 121: 215-25, 1984
7. De Rötth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 23: 522-525, 1940
8. Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns at the second degree). *Br J Ophthalmol* 30: 337-345, 1946
9. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 14: 473-484, 1995
10. Tsubota K, et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 122: 38-52, 1996
11. Modesti A., Scarpa S., D'Orazi G, et al. Localization of type IV and V collagens in the stroma of human amnion. *Prog Clin Biol Res* 296: 459-463, 1989
12. Van Hereandel BJ, Oberti C., Brosens I. Microanatomy of the human amniotic membrane: a light microscopic, transmission and scanning microscopic study. *Am J Obstet Gynecol* 131:872-880, 1978
13. Russo RG, Thorgeirsson U, Liotta LA. In vitro quantitative assay of invasion using human amnion. In: Liotta RA, Hart IR, editors. *Invasion and metastasis*. Dordred: Nijhoff, Netherlands, 1982: 173-187
14. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, et al. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 2: 1003-1005, 1981
15. Adinolfi M., Akle CA, McColl I, et al. Expression of HLA antigens, β 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 295: 325-327, 1982
16. Talmi YP, Finekelstein Y, Zohar Y. Use of human amniotic membrane as a biologic dressing. *Eur J Plas Surg* 13: 160-162, 1990
17. Talmi YP, Sigler L, Inge E, et al. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 12: 285-288, 1994
18. Van der Linden PIQ, Edrkers HWH, de Goeij AFPM, et al. Endometrial cell adhesion in an in vivo model using intact amniotic membranes. *Fertil Steril* 65: 76-80, 1996
19. Rennekampff HO, Dohrmann P, Föry R, Fändrich F. Evaluation of amniotic membrane as adhesion prophylaxis in a novel surgical gastroschisis model. *J Invest Surg* 7: 187-193, 1994
20. Terranova VP, Lyall RM. Chemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin: a mechanism for epithelial cell apical migration. *J Periodontol* 57: 311-317, 1986
21. Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon KR, Dowling JE. Adhesion of regenerating corneal epithelium: the role of basement membrane. *Am J Ophthalmol* 65: 339-348, 1968
22. Sonnenberg A, Calafat J, Jansen H et al. Integrin α 6/ β 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J Cell Biol* 113: 907-917, 1991
23. Boudreau N, Simpson CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267: 891-893, 1995
24. 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* 93: 3500-3513, 1996
25. Tseng C.G.S., Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without ilmbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 116:431-441, 1998
26. Guo M, Grinnell F. Basement membrane and human epidermal differentiation in vitro. *J Invest Dermatol* 93: 372-378, 1989
27. Streuli CH, Bailey N, Bissell MJ. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol* 115: 1383-1395, 1991
28. Kurpakus MA, Stock EL, Jones JCR. The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev Biol* 150: 243-255, 1992
29. Tseng SCG, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 179 (3): 325-35, 1999
30. Hao et al. Identification of Antiangiogenic and Antiinflammatory Proteins in Human Amniotic Membrane. *Cornea* 19 (3): 348-352, 200031. Dua H, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 83: 748-752, 1999
32. Sato H, Shimazaki J, Shimazaki N, et al. Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: S428, 1998

33. Mejia LF, Acosta C, Santamaria JP. Use of Non-preserved Human Amniotic Membrane for the Reconstruction of the Ocular Surface. *Cornea* 19: 288-291, 2000
34. Panda A. Amniotic Membrane Transplantation in Ophthalmology (fresh vs preserved tissue). *Br J Ophthalmol* 83: 1410-1, 1999
35. Ganatra MA, Durrani KM. Method of obtaining and preparation of fresh human amniotic membrane for clinical use. *J Pak Med Assoc* 46: 126-8, 1996
36. Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 123: 303-312, 1997
37. Kruse FE, Rohrschneider K, Volcker HE. Multilayer Amniotic Membrane Transplantation for Reconstructoin of Deep Corneal Ulcers. *Ophthalmology* 106: 1504-10, 1999
38. Chen HJ, Pires RT, Tseng SC. Amniotic Membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol* 84: 826-33, 2000
39. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 124: 765-774, 1997
40. Pariadens D, Beekhuis H, van Den Bosch W. Maniotic membrane transplantation in the management of conjunctival malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia. *Br J Ophthalmol* 85: 658-61, 2001
41. Shimazaki J, Hao-Yung Y, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 104:2068-2076, 1997
42. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 83: 399-402,1999
43. Barraquer M, José I. In "The first cornea world congress", page 354. King JH, Jr. and McTigue JW, eds. Butterworths, Washington. 1965
44. Tseng SCG. Comunicación personal
45. Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SCG. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 104: 974-985, 1997
46. Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol* 82: 235-240, 1998
47. Mejia LF, Acosta C, Santamaria JP. Symptomatic management of Post-operative bullous Keratopathy with non-preserved human amniotic membrane. *Cornea* 21 (4): 342-345, 2002
48. Pires RT, Tseng SC, Prabhasawat P. Amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous Keratopathy. *Arch Ophthalmol* 117: 1291-1297, 1999
49. Jablonski J, Szafran B, Cichowska M. Treatment of corneal complications after cataract surgery with soft contact lenses. *Klin Oczna* 100: 151-153, 1998
50. Smiddy WE, Hamburg TR, Kracher GP, Gottsch JD, Stark WJ. Therapeutic contact lenses. *Ophthalmology* 97: 291-295, 1990
51. Insler MS, Benefield DW, Ross EV. Topical hyperosmolar solutions in the reduction of corneal edema. *CLAO J* 13: 149-51, 1987
52. Foulks GN. Treatment of recurrent corneal erosion and corneal edema with topical osmotic colloidal solution. *Ophthalmology* 88: 801-803, 1981
53. Coster D. Topical aldose reductase inhibitor. *Br J Ophthalmol* 79: 1064-1065, 1995
54. Lamberts DW. Topical hyperosmotic agents and secretory stimulants. *Int Ophthalmol Clin* 20:163-169, 1980
55. Salleras A. Bullous Keratopathy. In King JH Jr, McTigue JW, editors: *The cornea world congress*, Washington,1965, Butterworths.
56. Cormier G et al. Anterior stromal puncture for bullous keratopathy. *Arch Ophthalmol* 114: 654-658, 1996
57. Hsu J K, Rubinfeld RS, Barry P, Jester JV. Anterior stromal punture. Immunohistochemical studies in human corneas. *Arch Ophthalmol* 111: 1057-1063, 1993
58. Geggel HS, Maza CE. Anterior stromal puncture with the Nd:YAG laser. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1555-1559, 1990
59. Thomann U, Niesen U, Schipper I. Successful phototherapeutic keratectomy for recurrent erosions in bullous keratopathy. *J Refract Surg* 12: S290-S292, 1996
60. Alino AM et al. Conjunctival Flaps. *Ophthalmology* 105: 1120-1123, 1998
61. Barton K, Bundenz DL, Khaw PT, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: S473, 1997
62. Budenz DL, Barton K, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. *Am J Ophthalmol* 130: 580-588, 2000
63. Gabric N, Maravicic I, Dekaris I. Human amniotic membrane in the reconstruction of the ocular surface. *Doc Ophthalmol* 98: 273-283, 1999
64. Murube J, Olivares C, Murube E. Treatment of dry eye by punctum patch. *Orbit* 14: 1-7, 1995
65. Fujishima H, Shimazaki J, shinozaki N. Trabeculectomy with the use of amniotic membrane for uncontrollable glaucoma. *Ophthalmic Surg Lasers* 29: 428-433, 1998
66. Meller D, Maskin SL, Pures RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for symptomatic conjunctivochalasis refractory to medical treatments. *Cornea* 19: 796-803, 2000
67. Kim JS, Kim JC, Hahn TW, Park WC. Amniotic Membrane Transplantation in Infectious Corneal Ulcer. *Cornea* 20 (7): 720-726, 2001