

UTILIZACIÓN DE MEMBRANA AMNIÓTICA NO PRESERVADA EN DEFECTOS COMPLEJOS DE LA SUPERFICIE OCULAR

Luis Fernando Mejía E., M.D. *

Claudia Acosta, M.D. **

Juan Pablo Santamaría, M.D. **

Resumen

Se utilizó Membrana Amniótica No Preservada (MANP) en 9 pacientes con las siguientes patologías de la superficie ocular: falla limbar extensa secundaria a múltiples cirugías, penfigoide ocular cicatricial, carcinoma escamocelular de conjuntiva microinvasivo, defecto epitelial corneal persistente, quemadura severa por álcali y queratopatía bullosa postoperatoria, colocando un auto o aloinjerto limboconjuntival cuando se consideró necesario.

Se logró una reconstrucción adecuada de la superficie corneal, con franca mejoría de los síntomas en todos los pacientes.

La MANP es una opción terapéutica razonable para la reconstrucción de la superficie ocular, en casos difíciles en los cuales las técnicas convencionales han fallado. Desde el punto de vista bioquímico probablemente es más efectiva que la Membrana Amniótica Preservada (MAPr).

* Profesor, Servicio de Córnea
Instituto de Ciencias de la Salud - CES
Clínica SOMA, Calle 51 #45-93 Consultorio 307
Teléfono 57-4-2317025
fax: 57-4-5137042
e-mail: lfmejia@epm.net.co
Medellín, Colombia

** Residentes de Oftalmología
Instituto de Ciencias de la Salud - CES
Medellín

Abstract

Non-preserved Human Amniotic Membrane (MANP) was used in 9 patients pertaining to one of the following groups of ocular surface diseases: extensive limbal failure secondary to multiple surgeries, ocular cicatricial pemphigoid, microinvasive squamous cell conjunctival carcinoma, persisting corneal epithelial defect, severe alkali burn, and postoperative bullous keratopathy, placing a conjunctival auto or allograft when deemed necessary.

An adequate reconstruction of the ocular surface and satisfactory symptoms control was achieved in all patients.

We consider the use of MANP to be a reasonable option for the reconstruction of the ocular surface, particularly in those cases where more conventional surgical techniques have failed. From the biochemical standpoint the Non-preserved probably is more effective than the Preserved one (MAPr).

Introducción

El uso de 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 (a través del diálogo de citoquinas y mediante separación física de superficies adherentes).

Estas propiedades están dadas por su avascularidad y antiangiogenicidad ⁽⁴⁾, la no expresión de antígenos de histocompatibilidad ^(5,6), y por sus propiedades antibacterianas ^(7,8) y antiadherentes ^(9,10). Además, favorece la migración de células epiteliales ⁽¹¹⁾, refuerza la adherencia de las células epiteliales basales ^(12,13), disminuye su apoptosis ^(14,15), y promueve su diferenciación ^(16,17,18).

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, Laminina y una monocapa epitelial ^(1,2,3).

El primer reporte en oftalmología fue hecho por De Rötth en 1940, en cirugía de simbléfaron, utilizando amnios y corion juntos, con éxito parcial ⁽¹⁹⁾. Después de esto cayó en desuso hasta 1995 cuando Tseng y colaboradores comenzaron a publicar sus resultados en conejos y posteriormente en humanos ⁽²⁰⁾; desde entonces se ha utilizado en defectos corneales persistentes ⁽²¹⁾, ampollas de filtración con escape ⁽²²⁾, cirugía de pterigion ^(23,24), corrección de simbléfaron ⁽²⁵⁾ y en la reconstrucción de la superficie ocular en casos con compromiso difuso, con o sin injerto limboconjuntival concomitante ^(26,27,28,29), con buenos resultados en la mayoría de los casos.

Sin embargo, todas estas publicaciones han utilizado Membrana Amniótica Preservada (MAPr), la cual no se encuentra disponible en todas partes, es más costosa, y tiene un epitelio con vitalidad comprometida por el proceso mismo de preservación ^(30, 31).

Nosotros hemos estado utilizando Membrana Amniótica No Preservada (MANP) desde hace más de 2 años, con resultados similares a los publicados por otros autores que utilizan MAPr.

Pacientes y Métodos

La MANP 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. Se guarda en una caja de Petri con Solución Salina Normal y se refrigera en nevera -sin congelar- durante un período no mayor de 24 horas. No utilizamos antibióticos ni soluciones de preservación en este proceso.

En todos los casos -excepto en los de queratopatía bullosa postoperatoria- colocamos la MANP con el lado epitelial hacia arriba, cubriendo el defecto presente y suturada con puntos separados de Nylon 10-0. En los casos de queratopatía bullosa postoperatoria, desepitelizamos la superficie corneal hasta un milímetro del limbo y colocamos la MANP con un diámetro aproximado de 9 mms con el lado epitelial hacia abajo, buscando realizar propiamente un trasplante de membrana basal para que las células limbares la pueblen fácil y rápidamente; en estos casos utilizamos una técnica de sutura mixta: 8 puntos radiales separados de Nylon 10-0 y una continua antitorsión de 8 pases, enterrando los nudos en córnea. Al final de la cirugía todos los pacientes recibieron profilaxis subconjuntival con 100 mg de Cefazolina y 4 mg de Dexametasona (Ver tabla). En el postoperatorio los pacientes recibieron colirio de reemplazo lagrimal cada 2 horas durante el día y colirio de Tobramicina y Dexametasona (Tobradex; Laboratorios Alcon) tres veces al día, los cuales fueron descontinuados al cabo de 2 ó 3 semanas, según su evolución. En los pacientes con Queratopatía Bullosa Postoperatoria se dejó un lente de contacto terapéutico hasta que re-epitelizaron totalmente (promedio 9 días); las

suturas se retiraron en promedio a las dos semanas.

En los casos en que se realizó simultáneamente un injerto limbo-conjuntival, éste se suturó encima de la membrana amniótica, anclando los dos puntos limbares a epiesclera y los restantes a amniótica o amniótica-conjuntiva.

Resultados

Los pacientes evolucionaron satisfactoriamente hasta el último control, con marcada resolución de los signos y síntomas pre-existentes. Todos presentaban ojos muy tranquilos desde el primer día postoperatorio, a pesar de haber sido sometidos a cirugías muy extensas en algunos casos. No se presentó ningún caso de necrosis, pérdida o infección de la MANP.

Algunos ejemplos de las diferentes categorías de pacientes:

El paciente N° 1 (Fig. 1) fue recibido en el servicio, 3 meses luego de haber sufrido una quemadura por álcali. Presentaba conjuntivalización corneal total, vascularización estromal profunda superior e inferior, limbo indiferenciado, y una agudeza visual de Movimiento de Manos. Fue llevado a cirugía realizando una peritomía en 360°, queratectomía superficial con Weckcel y pinzas, colocación de un injerto de MANP en forma de "donnut" (extendiéndose unos 10 mm del limbo hacia atrás en 360°, pero respetando la córnea), y colocación de dos plastias limbo-conjuntivales de 45° c/u obtenidas del ojo contralateral, suturadas sobre la MANP y ancladas a epiesclera en su extremo limbar; al terminar el procedimiento se observó una opacidad corneal difusa grado II, que ha disminuído lentamente, desde entonces sin desaparecer completamente. Durante el postoperatorio presentó isquemia de la plastia limboconjuntival temporal, por lo cual toda la re-epitelización se dio a partir del injerto nasal de 45°. Al cabo de 18 días se obtuvo un ojo tranquilo, totalmente re-epitelizado, con un limbo sin conjuntivalización y una agudeza visual no corregida de 0.4 y corregida de 0.67.

Datos clínicos y demográficos

Pte	Edad	Sexo	Diagnóstico	Cirugía	Resultado	Complicaciones
1	35	M	Quemadura severa por álcali OD	Peritomía 360° + MANP 360° en forma de "donnut" + Autoinjerto de limbo contralateral de 45° nasal y temporal	Exitoso	Epitelialización en 18 días Isquemia del autoinjerto de limbo temporal. Opacidad estromal residual leve
2	68	M	Carcinoma escamocelular de conjuntiva micro-invasivo OI	Resección con margen de 3mm + 300° de MANP en "donnut" + Autoinjerto de limbo contralateral de 100°	Exitoso	Epitelización en 3 semanas Ninguna
3	63	F	Defecto epitelial corneal persistente, secundario a penfigoide ocular OI	Desepitelialización + MANP de aprox. 25mm ² suturada sobre el defecto	Exitoso	Epitelialización Completa en 3 semanas Ninguna
4	65	M	Queratopatía bullosa pseudofáquica dolorosa OI	Desepitelialización +MANP y sutura mixta	Exitoso	Epitelización total a los 6 días Ninguna
5	55	F	Penfigoide ocular cicatricial	Desconjutivalización corneal + MANP 360° en forma de "donnut" + 2 aloinjertos de limbo de 100° cada uno	Exitoso	Ninguna
6	66	F	Déficit difuso de limbo secundario a múltiples cirugías OI	Peritomía superior e inferior y colocación de MANP de 140° en cada uno + autoinjerto limbar de 50° sup e inf.	Exitoso	Ninguna
7	50	M	Queratopatía bullosa pseudofáquica dolorosa OD	Desepitelialización corneal + MANP y sutura mixta	Exitoso	Epitelización en 7 días Desgarro de la MANP a los 15 días . Se repitió la cirugía sin complicaciones
8	31	M	Quemadura bilateral severa por álcali, mayor en OI	Peritomía 360° + MANP en 360° en forma de "donnut" + autoinjerto de limbo contralateral de 90°	Éxito parcial	Conjuntivalización incipiente inferior en la última visita. Isquemia del autoinjerto de limbo inferior
9	88	M	Queratopatía bullosa pseudofáquica dolorosa OD	Desepitelización corneal + MANP y sutura mixta	Exitoso	Epitelización a los 12 días Ninguna

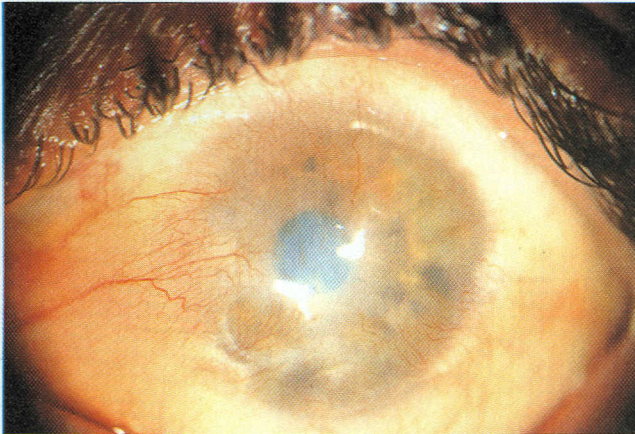
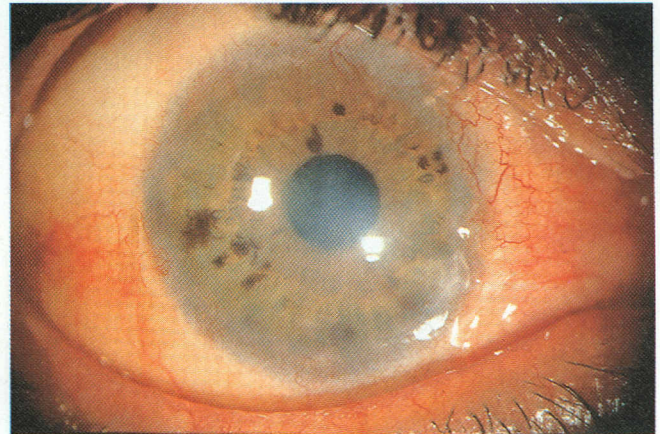


Fig. 1. Paciente N° 1.a. Foto preoperatoria. Conjuntivalización corneal externa. Limbo mal definido. Vascularización estromal superior e inferior.



1.b. Postoperatorio, 4 semanas. Limbo adecuadamente reconstruido. Tenue opacidad corneal estromal residual.

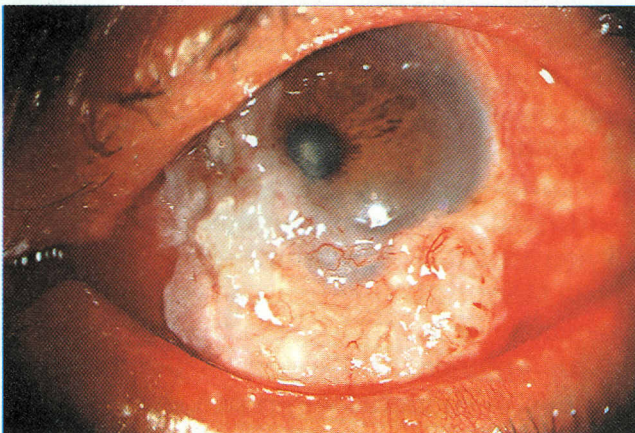
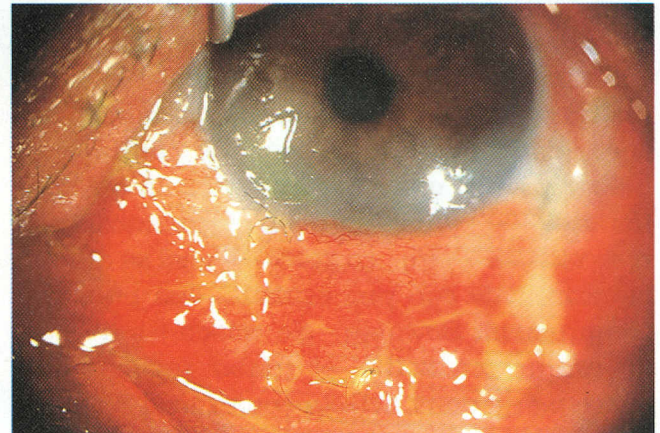


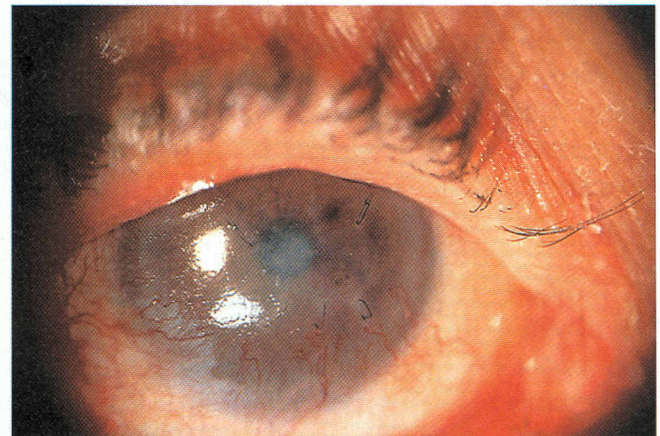
Fig. 2. Paciente N° 2.a. Foto preoperatoria. Masa conjuntival que compromete 300 grados de limbo.



2.b. Postoperatorio, 3 semanas. Obsérvese la plastia de limbo inferior, vital, sobre la amniótica.



Fig. 3. Paciente N° 3.a. Foto preoperatoria, luego de 6 semanas de tratamiento médico. Obsérvese defecto epitelial persistente de aproximadamente 20 mm².



3.b. Postoperatorio, 4 semanas. Sin defecto epitelial. La MANP ya no es visible.

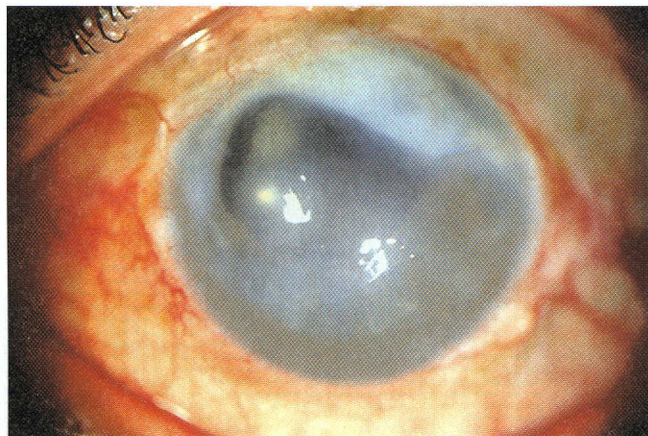
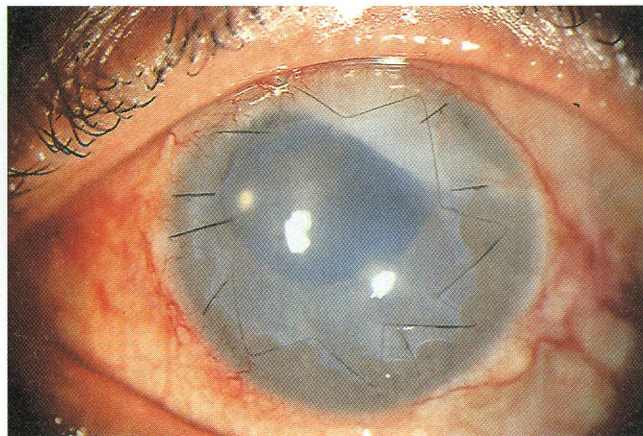


Fig. 4. Paciente N° 4. a. Foto preoperatoria. Queratopatía Bullosa.



4.b. Postoperatorio, 10 días. Córnea epitelizada. Amniótica aún claramente visible, con suturas.

El Paciente N° 2 (Fig. 2) presentaba una masa epibulbar de 12 meses de crecimiento. 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 limboconjuntival de 100° obtenido del ojo contralateral. Re-epitelizó totalmente en tres semanas. El diagnóstico de patología (Dr. Francisco Barraquer. Instituto Barraquer de América) fue un Carcinoma Escamocelular de Conjuntiva Microinvasivo. El paciente no regresó a control luego del primer mes postoperatorio.

El Paciente N° 3 (Fig. 3) 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 homólogo al 10% 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 y se observó un reemplazo gradual de la MANP, con epitización completa a las 3 semanas. No ha habido recurrencia del defecto desde entonces (11 meses). Actualmente se encuentra en inmunosupresión sistémica con Ciclofosfamida para su Penfigoide, el cual está bajo control.

El Paciente N° 4 (Fig. 4), campesino, consultó por una queratopatía bullosa afáquica dolorosa, en un ojo sin potencial visual, de varios años de evolución. Se realizó una desepitelización corneal completa, y se colocó la membrana amniótica con el epitelio hacia abajo, cubriendo toda la superficie corneal excepto 1 mm periférico para permitir que el epitelio proveniente del limbo creciera sobre ella y no por debajo. Se suturó con 8 puntos interrumpidos radiales y una continua antitorsión de 8 pases con Nylon 10-0. Se dejó un lente de contacto hasta que re-epitelizó completamente (6 días) y se retiraron suturas a las 2 semanas. Ha estado asintomático desde la cirugía (6 meses), sin recidiva de las bulas.

Discusión

El tratamiento de los pacientes con enfermedad compleja de la superficie ocular ha sido difícil y frustrante para los oftalmólogos. Durante décadas estos pacientes han sido sometidos a múltiples técnicas quirúrgicas con la finalidad, primero, de lograr ojos tranquilos no dolorosos y, segundo, de alcanzar y mantener una agudeza visual aceptable.

Inicialmente se utilizaron técnicas muy sencillas como esclera desnuda, con o sin B-terapia, plastias conjuntivales por rotación, injertos de Tenon o mucosa oral e incluso injertos libres de conjuntiva con resultados poco alentadores en estas patologías complejas. Uno de los mayores avances ha sido el injerto limbo-conjuntival para la reconstrucción de la superficie ocular, basado en la teoría de las células limbares pluripotenciales (Stem Cells) propuesto por primera vez por el Dr. José Ignacio Barraquer Moner⁽³²⁾, cual sigue siendo la piedra angular en el manejo de este grupo de enfermedades.

Sin embargo, hay casos que presentan daño extenso de la superficie ocular en los cuales el injerto limbo-conjuntival aislado no es suficiente, y se hace necesario reconstruir un porcentaje importante de la misma, uni o binocularmente; es acá donde los injertos de membrana amniótica están jugando un papel cada vez más importante, sirviendo como membrana basal trasplantada (sustrato de crecimiento) y como agente anti-inflamatorio (citoquinas, factores de crecimiento, factores inhibidores de fibrosis).

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^(1,2,3); entre sus propiedades están la de prevenir la apoptosis de fibroblastos^(14,15), reforzar la adhesión de las células epiteliales basales^(12,13) y facilitar la migración epitelial⁽¹¹⁾, 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.

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 duraron parcialmente desepitelizados por semanas.

La única diferencia que hemos encontrado cuando comparamos el uso de MANP con MAPr 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 lleva implícita su deshidratación parcial; de hecho, este mayor espesor la hace más fácil de manejar. Esta diferencia deja de ser aparente hacia el cuarto o quinto día postquirúrgico.

Hemos tenido algunas dificultades con la sutura de los injertos limbo-conjuntivales sobre la membrana amniótica, debido a que ésta ofrece una superficie laxa y elástica y la lágrima se puede deslizar debajo del injerto conjuntival, a pesar de haber sido suturado aparentemente con suficiente tensión; esto hace que en algunos casos (casos 1 y 8) la vitalidad de estos injertos haya sido deficiente, sin haber llegado a comprometer el éxito de la cirugía; en la actualidad evitamos colocarlos en el limbo inferior pues la probabilidad de éxito de los mismos es baja.

Es sorprendente la capacidad de extensión lateral de los injertos limbo-conjuntivales sobre la amniótica. Esta capacidad ya había sido anotada por otros cirujanos en casos de cirugía sin membrana amniótica⁽³³⁾, y en nuestra serie hemos observado cómo plastias de 45° son suficientes para repoblar los 360° de limbo sin dificultad. Esto podría disminuir la necesidad de aloinjertos de limbo en el futuro, con su obligatoria, costosa y prolongada inmunosupresión sistémica.

En los casos de queratopatía bullosa postquirúrgica reservamos su utilización para aquellos en los que no hay una visión potencial útil, la posibilidad de una queratoplastia penetrante es baja en el futuro mediano y no se desea correr el riesgo de un lente de contacto terapéutico por tiempo prolongado, sobre todo si las condiciones socio-culturales del paciente

anticipan un manejo inadecuado del mismo; creemos que es más sencilla, estética y menos traumática que el recubrimiento conjuntival para estos casos.

Fisiológicamente es más lógico utilizar la MANP, 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^(30, 31).

No consideramos razonable el empleo de membrana amniótica como elemento de primera mano en la cirugía de pterigion primario no complicado (recidivas del 10.9%)⁽²³⁾, en la cual los resultados obtenidos con la resección completa de la lesión y una reconstrucción anatómica adecuada con una plastia limbo-conjuntival⁽³³⁾ son muy superiores (recidiva 2-4%)

Nuestros resultados son similares a los publicados por los autores que emplean MAPr, siendo nuestros costos de obtención mínimos y la disponibilidad y bioseguridad enormes.

Consideramos que la utilización de MANP 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.

Agradecimientos

Los autores agradecemos la colaboración brindada por el Dr. Francisco Barraquer Coll en el análisis histopatológico del paciente que presentó el Carcinoma Escamocelular Microinvasivo de Conjuntiva.

Referencias

1. 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* 1989; 296: 459-463
2. 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* 1978; 131: 872-880
3. 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
4. Tseng SCG. Personal communication
5. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, et al. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981; 2: 1003-1005
6. Adinolfi M., Akle CA, McColl I, et al. Expression of HLA antigens, β_2 -microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 1982; 295: 325-327
7. Talmi YP, Finekelstein Y, Zohar Y. Use of human amniotic membrane as a biologic dressing. *Eur J Plast Surg* 1990; 13: 160-162
8. Talmi YP, Sigler L, Inge E, et al. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 1994; 12: 285-288
9. Van der Linden PJQ, Edrkers HWH, de Goeij AFPM, et al. Endometrial cell adhesion in an in vivo model using intact amniotic membranes. *Fertil Steril* 1996; 65: 76-80
10. Rennekampff HO, Dohrmann P, Föry R, Fändrich F. Evaluation of amniotic membrane as adhesion prophylaxis in a novel surgical gastroschisis model. *J Invest Surg* 1994; 7: 187-193
11. Terranova VP, Lyall RM. Chemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin: a mechanism for epithelial cell apical migration. *J Periodontol* 1986; 57: 311-317

12. Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon KR, Dowling JE. Adhesion of regenerating corneal epithelium: the role of basement membrane. *Am J Ophthalmol* 1968; 65: 339-348
13. Sonnenberg A, Calafat J, Jansen H et al. Integrin $\alpha 6/\beta 4$ complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J Cell Biol* 1991; 113: 907-917
14. Boudreau N, Sympton CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995; 267: 891-893
15. 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: 3500-3513
16. Guo M, Grinnell F. Basement membrane and human epidermal differentiation in vitro. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 372-378
17. Streuli CH, Bailey N, Bissell MJ. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol* 1991; 115: 1383-1395
18. Kurpakus MA, Stock EL, Jones JCR. The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Dev Biol* 1992; 150: 243-255
19. De Rötth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 1940; 23: 522-525
20. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14: 473-484
21. Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997; 123: 303-312
22. Barton K, Bundenz DL, Khaw PT, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: S473
23. Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SCG. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997; 104: 974-985
24. Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol* 1998; 82: 235-240
25. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997; 124: 765-774
26. Shimazaki J, Hao-Yung Y, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997; 104: 2068-2076
27. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 399-402
28. Tseng C.G.S., 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: 431-441
29. Dua H, Azuara-Blanco A. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 748-752
30. Tsubota K, et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996; 122: 38-52
31. Sato H, Shimazaki J, Shimazaki N, et al. Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: S428
32. Barraquer M, José I. In "The first cornea world congress", page 354. King JH, Jr. and McTigue JW, eds. Butterworths, Washington. 1965
33. Barraquer C, Francisco. Comunicación personal