

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA (UNIDAD DOCENTE DE
OFTALMOLOGÍA)

TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA EN LA
RECONSTRUCCIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR

CRISTINA PERIS MARTÍNEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 25 d'Octubre de 2004 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Francisco Javier Romero Gómez
- Dra. D^a. Pilar Ivorra Lahuerta
- Dr. D. José Belmonde Martínez
- Dr. D. Ramón Hueso Abancens
- Dra. D^a. Antonia Fons Romero

Va ser dirigida per:

Dr. D. José Luis Menero Rozalén

Dr. D. Manuel Díaz Llopis

©Copyright: Servei de Publicacions
Cristina Peris Martínez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-1457-3

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE MEDICINA



UNIDAD DOCENTE DE OFTALMOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

TESIS DOCTORAL

“TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA EN LA RECONSTRUCCIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR”

Presentada por:

Cristina Peris Martínez

Dirigida por:

Prof. José Luis Menezo Rozalén

Prof. Manuel Díaz Llopis

VALENCIA 2003

AGRADECIMIENTOS



*A Juan,
A mis padres,*

por su incondicional apoyo y estímulo.

Al Profesor D. José Luis Menezo Rozalén, director de esta Tesis, figura indiscutible de la Oftalmología reconocido internacionalmente por su labor científica, y mi principal maestro del que he intentado aprender su entusiasmo y su espíritu innovador y pionero.

Al Profesor D. Manuel Díaz Llopis, director de esta Tesis, por su incondicional apoyo en la elaboración de esta monografía y por sus ideas para mejorarla.

A la Dra. Amparo Navea Tejerina por su enorme generosidad y estímulo durante los años de residencia y con posterioridad.

Al Dr. Javier Mendicute del Barrio por su amable y desinteresada ayuda, especialmente en la elaboración del modelo experimental.

A los Dres. Cisneros y Rafael Martínez-Costa por sus orientaciones y apoyo moral.

Al Prof. Francisco José Vera Sempere por su inestimable ayuda en el estudio histológico.

Al Dr. Carlos Vila, veterinario del Centro Investigación del hospital “La Fe”, y sus colaboradores Cecilio y Amparo, por haberme proporcionado todas las facilidades para disponer de los animales de experimentación, instruirme en las técnicas anestésicas más adecuadas y en el manejo óptimo de los animales para la consecución de la investigación experimental.

Al resto de doctores del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario “La Fe” que de una manera u otra han contribuido a que esta Tesis llegara a su fin: Dr. Juan Taboada, Dr. Enrique Ferrer, Dr. Enrique España, Dr. Emilio Vila, Dra. Amparo Illueca, Dr. Andrés Riquelme, Dr. Juan Francés, Dra. Mercedes Hurtado, Dr. Felipe Gómez, Dra. Patro Falomir, Dr. Miguel Harto y Dra. Inmaculada Serra.

Al equipo de fotógrafos del Hospital "La Fe", en especial a Boro, por su inmensa ayuda y consejos en la elaboración de la iconografía de esta Tesis. Sólo Dios sabe lo que nos ha costado

Al resto de mis compañeros residentes, en especial al Dr. Pedro Rísueño, compañero de fatigas durante la residencia, José Belda, Eva Salinas, Tarek, Vicente Rodríguez, Arturo Quijada, Mariano Tovar, José Juan Mondéjar, Rita García, Ester Francés, Enrique López, Ali Moussa, Rami Borghol, Virginia Calleja, Carlos Pérez, Mari Carmen Desco y Juan Ramos, a los que deseo la mejor fortuna.

Al resto de los miembros del Servicio de Oftalmología del Hospital "La Fe" de Valencia: médicos, personal auxiliar y de enfermería, por su ayuda durante los cuatro años de residencia y con posterioridad.

A mi Padre, por su incondicional apoyo y ayuda en la manipulación de los animales de experimentación, así como por su constante insistencia y aliento al término de esta Tesis, especialmente en horas bajas.

A Juan, por su infinita paciencia.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

	<i>Página</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. SUPERFICIE OCULAR	1
I.2. ANATOMÍA y FISIOLOGÍA DE LA CÓRNEA	6
I.2.1. Epitelio corneal	7
I.2.2. Estroma corneal	13
I.2.3. Endotelio corneal	16
I.2.4. Anatomía del limbo	19
I.3. INERVACIÓN CORNEAL	20
I.4. RESPUESTA CORNEAL ANTE UNA AGRESIÓN	22
I.4.1. RENOVACIÓN EPITELIAL CORNEAL	24
I.4.1.1. Hipótesis X, Y, Z	24
I.4.1.2. Papel del limbo en la regeneración del epitelio corneal	25
a) Movimiento celular centrípeto	26
b) Descamación preferencial	28
I.4.2. LA CONJUNTIVA EN LA CICATRIZACIÓN CORNEAL	29
I.5. CARACTERÍSTICAS ESPECIALES DEL OJO DEL CONEJO	32
I.6. QUEMADURAS QUÍMICAS DE LA SUPERFICIE OCULAR	35
I.7. CAUSTICACIONES POR ÁLCALIS	39
I.7.1. Clasificación	41
I.7.2. Patogenia	49
I.7.3. Manifestaciones clínicas	52
I.7.4. Tratamiento	56
I.8. ANATOMÍA DE LA PLACENTA	70
I.8.1. Estructura macroscópica	70
I.8.2. Estructura microscópica	75
I.8.3. Membrana amniótica	77
I.9. ANTECEDENTES DE UTILIZACIÓN MEMBRANA AMNIÓTICA	82
I.10. PROPIEDADES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA	86

I.11. INDICACIONES EN OFTALMOLOGÍA	94
I.11.1. Alteraciones principalmente corneales	94
I. 11. 1.1.Tratamiento de defectos epiteliales persistentes	94
I. 11.1.2. Tratamiento perforaciones y microperforaciones	95
I.11.1.3. Queratopatía en banda	96
I.11.1.4. Tratamiento de haze en pacientes con PRK	96
I.11.2. Alteraciones principalmente conjuntivales	97
I.11.2.1.Reconstrucción superficie ocular dañada	97
I.11.2.2.Cirugía de filtración	97
I.11.2.3. Tratamiento del pterigion primario y recidivante	98
I.11.2.4. Simbléfaron	99
I.11.3. Deficiencia límbica	99
I.12. INDICACIONES NO OFTALMOLÓGICAS	100
I.12.1. Cirugía plástica	100
I.12.2. Ginecología	101
I.12.3. Cirugía general	101
I.12.4. Endocrinología	102
I.12.5. Cirugía ortopédica	103
I.12.6. Otorrinolaringología	103
I.12.7. Urología	104
I.12.8. Neurología	104
I.13. PROTOCOLO DE OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA	105
I.14. SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA	107
I.15.TÉCNICAS QUIRÚRGICAS CON EL EMPLEO DE MEMBRANA AMNIÓTICA	108
II. JUSTIFICACIÓN	116

III. OBJETIVOS	
III.1. Investigación experimental	118
III.2. Investigación clínica	118
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	120
IV.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y MATERIAL	122
IV.1.1 Animales	122
IV.1.2 Aparataje e instrumental	123
IV.1.3 Material fungible	127
IV.2. MÉTODOS	131
IV.2.1. Estabulación	131
IV.2.2. Anestesia	131
IV.2.3. Causticaciones	132
IV.2.4. Protocolo de obtención y preparación de la membrana amniótica	138
IV.2.5. Trasplante de membrana amniótica	147
IV.2.6. Seguimiento clínico	148
IV.2.7. Sacrificio de los animales	149
IV.2.8. Estudio Histológico	150
IV.2.9. Tratamiento médico	153
IV.2.10. Grupos de estudio	153
IV.2.11. Metodología estudio estadístico	155
IV.2.12. Experiencia clínica	160
V. RESULTADOS	162
V.1. METODOLOGÍA del ESTUDIO ESTADÍSTICO	162
V.1.1. Identificación animales	162
V.1.2. Estadística descriptiva	162
V.1.3. Estadística analítica	163
V.2. RESULTADOS	163
V.2.A. Descripción modelo experimental	164

V.2.A.1. Peso de los animales de experimentación	165
V.2.A.2. Peso de los filtros Whatman # 3 secos	168
V.2.A.3. Peso de los filtros Whatman # 3 humedecidos	169
V.2.A.4. Peso del cáustico (Na OH 1 N)	170
V.2.A.5. Área de opacidad corneal	171
V.2.A.6. Úlcera corneal	176
V.2.A.7. Área total de neovasos	179
V.2.A.8. Superficie conjuntival alterada	182
V.2.A.9. Paquimetrías	184
V.2.A.10. Estudio histológico	193
V.2.B. Comparaciones grupo control-grupo trasplante	195
V.2.B.1. Peso de los animales de experimentación	196
V.2.B.2. Peso de los filtros Whatman # 3 secos	198
V.2.B.3. Peso de los filtros Whatman # 3 humedecidos	198
V.2.B.4. Peso del cáustico (Na OH 1 N)	199
V.2.B.5. Opacidad corneal	200
V.2.B.6. Úlcera corneal	204
V.2.B.7. Superficie conjuntival alterada	206
V.2.B.8. Área total de neovasos	208
V.2.B.9. Paquimetrías	212
V.2.B.10. Estudio histológico	218
V.2.C. Comparaciones grupo control, grupos TMA 1d, 7d y 30d	227
V.2.C.1. Peso de los animales de experimentación	228
V.2.C.2. Peso de los filtros Whatman # 3 secos	230
V.2.C.3. Peso de los filtros Whatman # 3 humedecidos	230
V.2.C.4. Peso del cáustico (Na OH 1 N)	231
V.2.C.5. Opacidad corneal	232
V.2.C.6. Úlcera corneal	235
V.2.C.7. Superficie conjuntival alterada	238

V.2.C.8. Área total de neovasos	241
V.2.C.9. Paquimetrías	244
V.2.D. Experiencia clínica	250
VI. DISCUSIÓN	271
VI.1. Elección de un modelo experimental de causticación corneal reproducible para valorar en efecto del TMA	271
VI.1.1. Elección del tipo cáustico	273
VI.1.2. Concentración del cáustico	274
VI.1.3. Empleo de filtros	275
VI.1.4. Tiempo empapado filtro en solución	276
VI.1.5. Tiempo exposición al cáustico	276
VI.1.6. Elección zona causticación	277
VI.1.7. Técnicas de seguimiento clínico	278
VI.1.8. Condiciones experimentales iniciales	279
VI.2. Células Stem	280
VI.3. Trasplante de membrana amniótica en la causticación corneal con compromiso límbico	285
VI.3.1. Condiciones experimentales iniciales	288
VI.3.2. Seguimiento clínico	289
VI.3.3. Utilidad del trasplante de MA	296
VI.3.4. Momento óptimo práctica TMA	299
VI.4. Aplicaciones clínicas en oftalmología	303
VII. CONCLUSIONES	309
VII.1. Investigación experimental	309
VII.2. Investigación clínica	310
VIII. BIBLIOGRAFÍA	312

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
FIGURAS - I. INTRODUCCIÓN	
Figura I.1.: Esquema de la superficie ocular y cámara anterior ojo humano	5
Figura I.2.: Figura Esquema microestructuras de adherencia	10
Figura I.3.: Esquema estructura de unión entre epitelio corneal y membrana basal	11
Figura I.4.: Esquema estructura corneal superficial	12
Figura I.5.: Esquema estructura corneal profunda	12
Figura I.6a, b, c.: Esquema Histología corneal	15 y 18
Figura I.7.: Inervación superficie ocular	21
Figura I.8.: Esquema de la hipótesis X, Y, Z de movimiento celular	25
Figura I.9.: Esquema de las células epiteliales de la superficie ocular	31
Figura I.10.: Fotografía de feto humano de 16 semanas in situ	69
Figura I.11.: Esquema membranas fetales	70
Figura I.12.: Esquema de la cara materna y fetal de la placenta	72
Figura I.13a: Circulación placentaria	73
Figura I.13b: Esquema de la circulación placentaria	74
Figura I.14.: Anatomía patológica (microscopía electrónica) de la placenta humana	77
Figura I.15.: Dibujo esquemático de la estructura microscópica de la membrana amniótica humana.	80
Figura I.16.: Histología de la membrana amniótica (3 capas) y corion.	81
Figura I.17.: Gráfico de uso de la MA en Oftalmología.	85
Figura I.18.: Esquema técnica de MA como injerto	110
Figura I.19.: Esquema técnica de MA como parche	112
Figura I.20.: Esquema de técnica de empleo de MA en múltiples capas	113
Figura I.21.: Esquema de técnica de empleo de MA como soporte para la proliferación de células madre	115

FIGURAS - IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Figura IV.1.: Equipo fotográfico empleado para realizar fotografías de polo anterior a los ojos de los animales de experimentación	125
Figura IV.2.: Detalle del objetivo macro de la cámara fotográfica	125
Figura IV.3.: Detalle de la carátula de los filtros empleados para producir las causticaciones en los animales de experimentación	128
Figura IV.4.: Superficie anterior del animal de experimentación con el filtro de papel humedecido con sosa cáustica 0,1 N depositado para provocar la causticación	134
Figura IV.5.: Aspecto de la causticación ocular inmediatamente tras la retirada del filtro embebido con sosa cáustica	134
Figura IV.6.: Medida del área y diámetro blanco-blanco de la superficie ocular causticada	135
Figura IV.7.: Aspecto de la superficie ocular tras causticación experimental, inmediatamente tras el trasplante de MA	135
Figura IV.8.: Animal con microperforación corneal y formación de bullas en el proceso de reparación tras causticación estándar. Caso excluido del estudio	137
Figura IV.9.: Aspecto de uno de los ojos del experimento al que se le aplicó el mismo modelo estándar de causticación que se complicó con endoftalmitis e hipopion. Se excluyó del estudio	137
Figura IV.10.: Aspecto en fresco de la placenta humana completa tras cesárea electiva	140
Figura IV.11.: Imagen de la placenta en contenedor estéril	140
Figura IV.12.: Lavado de la membrana amniótica liberándola de coágulos hemáticos	141
Figura IV.13.: Placenta extraída sumergida en solución de suero fisiológico con antibióticos	141
Figura IV.14.: Arriba izquierda: Campana de flujo laminar. Arriba derecha: Filtrado del medio	142
Figura IV.15.: Disección roma para separar corion de amnios	142
Figura IV.16.: Fragmento de membrana amniótica	143
Figura IV.17.: Otro fragmento de membrana amniótica extendida recién separada del corion mediante disección roma	143
Figura IV.18.: Pegado del filtro referenciador de 0,45 micras a la cara	

estromal de la membrana amniótica	144
Figura IV.19.: Placas de Petri estériles conteniendo el medio de cultivo de mantenimiento	144
Figura IV.20.: Modo de colocar el fragmento de membrana amniótica del tamaño deseado dentro del medio de cultivo	145
Figura IV.21.: Membrana amniótica adherida al papel de filtro por la cara estromal	145
Figura IV.22.: Placas de Petri embaladas herméticamente y numeradas previamente a su congelación	146
 FIGURAS – V. RESULTADOS	
Figura V.2.A.1.: Evolución de peso en g de los animales de experimentación	167
Figura V.2.A.5.1.: Área de opacidad corneal total (mm ²)	173
Figura V.2.A.5.2.: Opacidad corneal inmediatamente tras la causticación	174
Figura V.2.A.5.3.: Opacidad corneal a los 7 días tras la causticación de la superficie ocular	174
Figura V.2.A.5.4.: Opacidad corneal a los 30 días tras la causticación de la superficie ocular	175
Figura V.2.A.5.5.: Opacidad corneal a los 90 días tras la causticación de la superficie ocular	175
Figura V.2.A.6.: Superficie de úlcera corneal total (mm ²)	178
Figura V.2.A.7.: Área total de neovasos (mm ²)	181
Figura V.2.A.8.: Superficie conjuntival alterada (mm ²)	183
Figura V.2.A.9.1.: Espesor corneal (mm) en zona A	186
Figura V.2.A.9.2.: Espesor corneal (mm) en zona B	189
Figura V.2.A.9.3.: Espesor corneal (mm) en zona C	192
Figura V.2.B.1.: Evolución de peso en g de los animales de experimentación	197
Figura V.2.B.5.1.: Área de opacidad corneal total (mm ²)	201
Figura V.2.B.5.2.: Opacidad corneal tras causticación (Grupo control)	202
Figura V.2.B.5.3.: Opacidad corneal tras causticación (Grupo trasplante de MA)	202
Figura V.2.B.5.4.: Opacidad corneal 90 días tras la causticación (Grupo Control)	203

Figura V.2.B.5.5.: Opacidad corneal 90 días tras la causticación (Grupo TMA)	203
Figura V.2.B.6.: Superficie de úlcera corneal total (mm ²)	205
Figura V.2.B.7.: Superficie conjuntival alterada	207
Figura V.2.B.8.1.: Superficie de los neovasos totales	209
Figura V.2.B.8.2.: Área total de neovasos a los 90 días tras la causticación (Grupo Control, conejo nº 7 del experimento. Ojo derecho).	210
Figura V.2.B.8.3.: Área total de neovasos a los 90 días tras la causticación (Grupo trasplante MA 7 días, conejo nº 12 del experimento. Ojo derecho)	210
Figura V.2.B.8.4.: Área total de neovasos a los 30 días tras la causticación (Grupo trasplante MA 7 días, conejo nº 26 del experimento. Ojo derecho)	211
Figura V.2.B.8.5.: Área total de neovasos a los 30 días tras la causticación (Grupo trasplante MA 7 días, conejo nº 17 del experimento. Ojo derecho)	211
Figura V.2.B.9.1.: Espesor corneal (mm) en zona A	213
Figura V.2.B.9.2: Espesor corneal (mm) en zona B	215
Figura V.2.B.9.3: Espesor corneal (mm) en zona C	217
Figura V.2.B.10.1: Estructura microscópica córnea de conejo de apariencia normal. Microscopía óptica (HE, magnificación x 50). Epitelio, Estroma y Endotelio	222
Figura V.2.B.10.2: Estructura microscópica epitelio y estroma corneal Epitelio regenerado tras la causticación y posterior trasplante de membrana amniótica. Neovascularización estromal leve. Grupo trasplante. Microscopía óptica (HE, magnificación x 25)	223
Figura V.2.B.10.3.: Estructura microscópica epitelio y estroma corneal. Epitelio corneal atrófico. Desestructuración de las fibras de colágeno estromales. Luces vasculares neoformadas Grupo control. Microscopía óptica (HE, magnificación x 50)	223
Figura V.2.B.10.4.: Estructura microscópica corneal. Epitelio corneal con disminución número de capas celulares. Infiltrado inflamatorio crónico linfocitario con infiltrado de eosinófilos. Neovascularización estromal. Grupo control. Microscopía óptica (HE, magnificación x 50)	224
Figura V.2.B.10.5.: Presencia de células calciformes (flechas)	

“tipo epitelio conjuntival” en el epitelio corneal regenerado tras la causticación. Microscopía óptica (HE, magnificación x 50)	224
Figura V.2.B.10.6: Atrofia del epitelio corneal. Infiltrado eosinofílico. Neovascularización estromal. Grupo control microscopía óptica (HE, magnificación x 50)	225
Figura V.2.B.10.7.: Atrofia del epitelio corneal. Infiltrado eosinofílico. Neovascularización estromal. Grupo control Microscopía óptica (HE, magnificación x 50)	225
Figura V.2.B.10.8.: Atrofia del epitelio corneal. Plano de clivaje entre epitelio y estromal infiltrado eosinofílico. Neovascularización estromal. Grupo control Microscopía óptica (HE, magnificación x 50)	226
Figura V.2.C.1.: Peso (gramos) de los animales de experimentación	229
Figura V.2.C.5.: Área de opacidad corneal total (mm ²)	234
Figura V.2.C.6.: Área de úlcera corneal total (mm ²)	237
Figura V.2.C.7.: Superficie conjuntival alterada (mm ²)	240
Figura V.2.C.8.: Área de neovasos totales (mm ²)	243
Figura V.2.C.9.1.: Paquimetría en zona A	245
Figura V.2.C.9.2.: Paquimetría en zona B	247
Figura V.2.C.9.3.: Paquimetría en zona C	249
Figura V.2.D.1.A.: Colocación de marcador de queratotomía radial e instilación de varias gotas de alcohol absoluto al 20%, paso previo a la desepitelización	251
Figura V.2.D.1.B.: Desepitelización mecánica	251
Figura V.2.D.1.C.: Descompensación corneal postfacoemulsificación recubierta con monocapa de membrana amniótica. Sutura continua con Vycril 9/0. Aspecto inmediatamente tras la cirugía	252
Figura V.2.D.2.1.: Imagen previa al TMA mostrando, mediante biomicroscopía	

la degeneración corneal calcárea (gran placa blanquecina y satélite) y una úlcera profunda con microperforación de 1,5 x.2 mm con hernia de iris (flecha roja) en el ojo derecho	256
Figura V.2.D.2.2: Imagen postrasplante de MA en el primer día tras el postoperatorio inmediato con el injerto de 3 capas de MA suturado a limbo	256
Figura V.2.D.2.3.: Imagen postoperatoria tardía 20 meses tras la intervención. Nótese que la microperforación permanece cerrada	257
Figura V.2.D.3.: Microperforación corneal con efecto Seidel positivo tras causticación ácido sulfúrico en la que se realizó trasplante múltiple de MA.	258
Figura V.2.D.4.: Detalle de la cirugía de trasplante de MA en paciente con Microperforación por úlcera metaherpética. Triple capa MA	259
Figura V.2.D.5.1.: Queratoplastia penetrante con dehiscencia de la sutura continua. Úlcera corneal profunda inferior con comienzo de autólisis del injerto corneal. Un mes post-trasplante corneal	260
Figura V.2.D.5.2.: Imagen del mismo paciente. Corte anteroposterior en la lámpara de hendidura	261
Figura V.2.D.5.3.: Aspecto inmediatamente tras el trasplante múltiple de MA	263
Figura V.2.D.5.4.: Aspecto del mismo ojo 2 semanas tras la cirugía cuando se van desintegrando las capas más superficiales de MA	264
Figura V.2.D.5.5.: Aspecto del mismo ojo 4 meses tras la cirugía. La microperforación permanece sellada formando una bulla en el lugar por donde antes se filtraba humor acuoso	265
Figura V.2.D.6.1.: Microperforación superior en megalocórnea. Imagen intraoperatoria tras desepitelización	266
Figura V.2.D.6.2.: El mismo caso durante la intervención aplicando el injerto de MA.	266
Figura V.2.D.7.: Aspecto ojo tras la resección de pterigion y aplicación injerto de MA para cubrir el defecto	268
Figura V.2.D.8.1.: Simblefaron tras causticación con lejía. Imagen preoperatoria	269
Figura V.2.D.8.2: Simblefaron en el momento de la extensión de la MA y creación de un nuevo fondo de saco conjuntival con la MA.	270

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
I. INTRODUCCIÓN	
Tabla I.6.1.: Clasificación de diferentes tipos de sustancias cáusticas alcalinas para la superficie ocular	37
Tabla I.6.2.: Clasificación de agentes reponsables de causticaciones oculares por ácidos	38
Tabla I.7.1.1.: Clasificación de causticaciones oculares según Hughes	47
Tabla I.7.1.2.: Clasificación de causticaciones oculares de Ballen	47
Tabla I.7.1.3 : Clasificación de causticaciones oculares de Roper-Hall	48
Tabla I.7.1.4.: Clasificación de Thoft	48
Tabla I.7.1.5.: Nueva clasificación de causticaciones oculares de Dua	49
Tabla I.15.: Técnicas quirúrgicas de MA	109
V. RESULTADOS	
Tabla V.2.A.1.: Evolución del peso de los animales de experimentación	166
Tabla V.2.A.2.: Peso de los filtros secos	168
Tabla V.2.A.3.: Peso de los filtros húmedos	169
Tabla V.2.A.4.: Peso del cáustico	170
Tabla V.2.A.5.: Área de opacidad corneal	172
Tabla V.2.A.6.: Área de úlcera corneal	177
Tabla V.2.A.7.: Área de neovasos totales	180
Tabla V.2.A.8.: Superficie conjuntival alterada	182
Tabla V.2.A.9.1.: Espesor corneal en zona A	185
Tabla V.2.A.9. 2.: Espesor corneal en zona B	188
Tabla V.2.A.9.3.: Espesor corneal en zona C	191
Tabla V.2.B.1.: Evolución del peso de los animales de experimentación	196
Tabla V.2.B.2.: Peso de los filtros secos	198
Tabla V.2.B.3.: Peso de los filtros húmedos	199

Tabla V.2.B.4.: Peso del cáustico	199
Tabla V.2.B.5.: Área de opacidad corneal	200
Tabla V.2.B.6.: Área de úlcera corneal	204
Tabla V.2.B.7.: Superficie conjuntival alterada	206
Tabla V.2.B.8.: Área de neovasos totales	208
Tabla V.2.B.9.1.: Espesor corneal en zona A	212
Tabla V.2.B.9.2.: Espesor corneal en zona B	214
Tabla V.2.B.9.3.: Espesor corneal en zona C	216
Tabla V.2.C.1.: Evolución de los pesos animales de experimentación	228
Tabla V.2.C.2.: Peso de los filtros secos	230
Tabla V.2.C.3.: Peso de los filtros húmedos	231
Tabla V.2.C.4.: Peso del cáustico	231
Tabla V.2.C.5.: Área (mm ²) de opacidad corneal	233
Tabla V.2.C.6.: Área de úlcera corneal	236
Tabla V.2.C.7.: Área de superficie conjuntival alterada	239
Tabla V.2.C.8.: Área de neovasos totales	242
Tabla V.2.C.9.1.: Espesor corneal en zona A	244
Tabla V.2.C.9.2.: Espesor corneal en zona B	246
Tabla V.2.C.9.3.: Espesor corneal en zona C	248

ABREVIATURAS

Å	Amstrong
Coef. Var	Coefficiente de variación
d	día-s
DE	Desviación estándar
etc	etcétera
f	filtro
Faco	facoemulsificación (técnica quirúrgica para la catarata)
FCE	Factor de crecimiento epidérmico
G	Grupo
GC	Grupo control
g	gramo
h	hora
HE	hematoxilina/eosina
Kg	Kilogramo
M	Molar
MA	Membrana amniótica
mm	milímetro
mg	milígramo
N	Normal
nº	número
NS	no significativas
OD	ojo derecho
OI	ojo izquierdo
PMN	Polimorfonucleares
PRK	queratectomía fotorrefractiva
QP	queratoplastia penetrante
TMA	Trasplante membrana amniótica
TAC	células amplificadoras transitorias

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. SUPERFICIE OCULAR

La función principal de la superficie ocular es permitir la visión. El concepto de **superficie ocular**, relativamente reciente, incluye a todas las estructuras y anejos oculares que se encuentran en contacto con el exterior (figura I.1.). Desde el punto de vista anatómico, la superficie ocular se extendería por la zona interna de los párpados, los fórnicas conjuntivales, la conjuntiva bulbar y la córnea (Thoft RA, Friend J 1977). Estos componentes forman un sistema de estructuras integradas con interdependencia entre ellas (Tseng SCG, Tsubota 1997). La integridad de la superficie ocular está asegurada por una fuerte relación entre el epitelio corneal y la película lagrimal precorneal. El epitelio corneal es una estructura muy peculiar que requiere un sistema de mantenimiento y defensa para permitir al ojo su relación con el exterior, y que le provea de una humectación constante. La córnea necesita de unos sistemas protectores y de soporte que constituyen los anejos oculares: la conjuntiva, el aparato lagrimal y los párpados.

I.1.1. Película lagrimal precorneal

También denominada película lagrimal interpalpebral o preocular, y se considera la capa más superficial de la córnea. Es la lámina de lágrima situada delante de la superficie ocular expuesta al exterior. Cuando el ojo permanece abierto, la superficie de la película lagrimal es de 1,5-2 cm². El espesor de la película lagrimal precorneal se ha calculado por diversos métodos oscilando entre 3 y 10 μ m. Cualquiera que sea el espesor, parece ser que es máximo alrededor de 1,2 segundos tras abrir los párpados, y a

partir de ese momento disminuye por evaporación. Esta fina película en condiciones fisiológicas se compone de tres capas. Estas son desde fuera hacia adentro (Wolf E 1946, 1954):

- 1) Capa lipídica.
- 2) Capa acuosa.
- 3) Capa mucínica.

Sin embargo, el concepto de la triestratificación de la película lagrimal está actualmente en revisión, pues la película lagrimal, tal vez no sea un triestrato de lípidos, agua y mucina, sino un gel de mucina con una capa lipídica flotando sobre él.

La capa lipídica de la película lagrimal es producida fundamentalmente por las glándulas de Meibomio que liberan su secreción por el efecto del parpadeo. Es posible que participen en pequeña cantidad las glándulas de Zeiss y de Moll. Esta capa supone un espesor aproximado de $0,1 \mu\text{m}$ (Korb DR 1996) y su función más importante es retrasar la evaporación de la lágrima (Wolff E 1946), además de aportar una superficie de gran calidad óptica. Cuando los párpados se cierran, las moléculas lipídicas se montan unas sobre otras y la capa puede alcanzar $1 \mu\text{m}$ ó más. La capa acuosa supone el 95% del grosor total de la película lagrimal y se forma mediante las secreciones de las glándulas lagrimales principales y accesorias. Aparte del efecto fundamental de la humectación, esta capa contiene proteínas, electrolitos, metabolitos y enzimas para las funciones de defensa y mantenimiento. La capa mucosa de la película lagrimal permite su estabilidad sobre el epitelio córneo-conjuntival. Esta capa procede mayoritariamente de las células mucíparas y minoritariamente de la mucina segregada por las glándulas lagrimales. Esta mucina se adsorbe al glicocalix o mucina epitelial, que es una

arborización glicoproteica que las células epiteliales no secretoras de la córnea y la conjuntiva desarrollan hacia el exterior como parte de su membrana celular superficial.

I.1.2. Párpados

Son estructuras compuestas de piel, músculos, tejido fibroso, glándulas y conjuntiva destinadas a la protección del ojo y a propiciar la dinámica lagrimal, reformando la película y contribuyendo a su eliminación. Los movimientos palpebrales fundamentales son tres: el parpadeo, la connivencia y el blefarospasmo. La frecuencia del parpadeo es de 5-10 veces por minuto (Schirmer 1903). La función de los párpados es reestablecer una película lagrimal estable por medio del mecanismo del parpadeo. Además, el parpadeo libera la secreción meibomiana y moviliza la lágrima hacia los puntos lagrimales desde donde es aspirada por efecto de la presión negativa del saco lagrimal, al cesar la compresión del ligamento interno en el momento de la apertura palpebral.

I.1.3. Conjuntiva

La conjuntiva es una membrana que recubre la parte posterior de los párpados y se extiende hacia el limbo por la superficie anterior del ojo. Histológicamente se compone de una capa de epitelio estratificado no queratinizado y de sustancia propia. El epitelio tiene un número de capas variable entre tres y siete. La sustancia propia consiste en un tejido conectivo altamente vascularizado con fibroblastos, linfocitos, mastocitos, células plasmáticas y neutrófilos (McClellan KA 1997).

Las funciones principales de la conjuntiva son: aportar la capa mucosa de la

película lagrimal y participar en el sistema de defensa. Las células caliciformes se encuentran distribuidas entre las epiteliales y segregan mucina que es distribuida por la superficie ocular para formar la capa interna de la lágrima (Gipson IK 1977).

Los epitelios corneal y conjuntival tienen FENOTIPOS diferentes y mantienen la superficie ocular húmeda y sana, y la córnea transparente. Constituyen junto con la lágrima estable y los anejos oculares una BARRERA de defensa. La conjuntiva es además la parte del sistema mucoso sistémico, con el que comparte importantes características estructurales e inmunológicas.

Los primeros en apuntar la potencial interdependencia del epitelio corneal y el conjuntival estableciendo el concepto de *"superficie ocular"* fueron Thoft y Friend en 1977. Las relaciones entre el epitelio corneal, el conjuntival y el limbo son motivo de creciente interés. Por evidencias experimentales acumuladas, ha emergido como la fuente de células para la renovación de la superficie corneal. En las capas basales del epitelio límbico, existen unas células primordiales o madre, *"stem cells"* cuya finalidad es la renovación del epitelio corneal (Tseng SCG 1989). Aunque la existencia de estas células no ha podido ser demostrada, existen evidencias clínicas y experimentales que apuntan este hecho como irrefutable.

En la clínica existen algunas alteraciones de la superficie ocular que se originan por el daño o la incapacidad de las células primordiales para mantener su objetivo de conservar el epitelio corneal íntegro (Kruse FE 1994). Esta insuficiencia o fracaso de las células primordiales puede ser un trastorno congénito (aniridia), enfermedad intrínseca (penfigoide ocular cicatricial) o una agresión externa (toxicidad, quemadura química,...). Todas estas entidades tienen en común la alteración crónica epitelial, que se manifiesta

con epitelopatía punteada, defectos persistentes, neovascularización, (“conjuntivalización”),... etc, con grado variable de inflamación (Tseng SCG 1989).

Es necesario en estas lesiones proporcionar a la córnea una fuente de células primordiales que pueda garantizar una renovación epitelial suficiente.

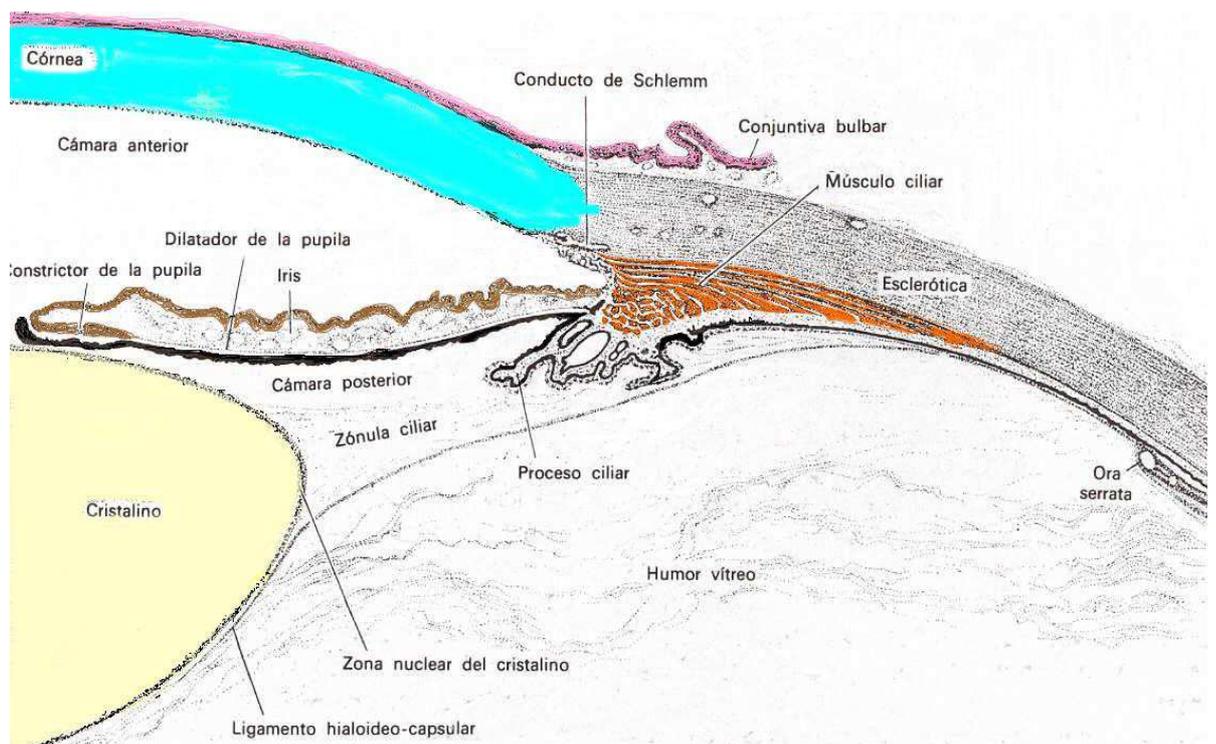


Figura I.1.: Esquema de la superficie ocular y cámara anterior del ojo humano.

I.2. ANATOMO-FISIOLOGÍA DE LA CÓRNEA

La córnea es un tejido altamente diferenciado para permitir la refracción y la transmisión de la luz a su través. Es la porción anterior y transparente de la cubierta externa del ojo, que se corresponde con un vidrio de reloj. Parece esférica, pero es algo elíptica anteriormente, debido a que el limbo es más prominente en sentido vertical. La córnea mide anteriormente aproximadamente 12,5 x 11,5 mm. Estructuralmente consiste en una lente cóncavo-convexa con su cara anterior en contacto íntimo con la película lagrimal precorneal y su cara posterior bañada por el humor acuoso. Son precisamente estas relaciones las que permiten a la córnea carecer de vascularización, pues estos fluidos, lágrima y acuoso, se encargan de mantener sus requerimientos fisiológicos.

La córnea, es más delgada centralmente. Su espesor alcanza casi 1mm en la periferia (650-700 μm) y es algo mayor de 500 μm en la zona central. El tercio central de la córnea, denominada zona óptica, es casi esférico con un radio de curvatura promedio de 7,8 mm. La córnea periférica es menos curva, pero también variable. La superficie corneal posterior, es casi esférica y se ha calculado que su radio de curvatura aproximado es de 6,8 mm (Katz M 1989). El poder de refracción de la superficie anterior de la córnea es de 48,8 dioptrías aproximadamente y el de la superficie posterior es de -5,8 dioptrías. La córnea es el medio transparente del ojo con mayor poder de refracción constituyendo el 70 % del global.

En el neonato, la córnea es relativamente grande, con un promedio de 10 mm de blanco-blanco vertical. Su curvatura es más pronunciada y por tanto su poder dióptrico es mayor (aproximadamente 51 dioptrías en el nacimiento a término)(Donzis PB 1985). La córnea continúa creciendo en diámetro y se aplanan con la edad, alcanzando casi las

medidas adultas después del primer año (Gordon RA 1985).

Estructuralmente se compone de 5 capas que desde el exterior al interior comprenden el epitelio, la membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. El epitelio es pluriestratificado escamoso y no queratinizado, el estroma de tejido conectivo y el endotelio una monocapa celular. Aunque este tejido avascular es aparentemente simple en su composición, la enorme regularidad y uniformidad de su estructura son las que permiten su precisa transmisión y refracción de la luz. Además, la córnea debe cumplir con sus funciones en contacto con el exterior, con todas las agresiones posibles por sequedad, contaminación, bacterias, etc... Para ello necesita de unos sistemas protectores y de soporte que constituyen los anejos oculares: la conjuntiva, el aparato lagrimal y los párpados que anteriormente hemos revisado. Abordaremos cada una de los componentes de la estructura corneal por separado.

I.2.1. EL EPITELIO CORNEAL

El epitelio corneal contiene entre 5 y 7 capas celulares de epitelio escamoso estratificado no queratinizado, con un espesor total de 50 a 56 μm . En la zona periférica el número de capas aumenta a 8-10. Aunque tiene mucho en común con el epitelio conjuntival, se puede decir que son los 123 mm^2 más especializados de la superficie corporal, manteniendo la transparencia y las características refractivas sobre un tejido conjuntivo avascular. Además de estas propiedades, mantiene una actividad metabólica y de barrera a los agentes externos, presentando una fuerte resistencia a la abrasión y una rápida capacidad de cicatrización.

Dentro del epitelio, se distinguen tres tipos de células agrupadas por estratos: escamosas o planas, en la superficie; intermedias o alares y basales o columnares. Entre

todas ellas existen unas uniones intercelulares muy desarrolladas con membranas interdigitadas, que le confieren una gran estabilidad al epitelio. Las células apicales constituyen dos capas. Estas células escamosas son de forma poligonal y tienen dos posibles aspectos al ser estudiadas por microscopía electrónica de barrido: las células claras son células más jóvenes, mientras que las células oscuras se admite que son hiper maduras y próximas a la descamación. Estas células epiteliales superficiales no caliciformes que producen mucina, además expresan las queratinas específicas de la córnea: K₃ y K₁₂ (Moll R 1982, Galvin S 1989). Este marcador es muy importante en estudios de investigación para diferenciarlo del epitelio conjuntival que tiene células epiteliales superficiales que expresan mucina.

En la cara externa de las células superficiales, existen numerosas microproyecciones, denominadas microvilli, que alcanzan una longitud entre 0.5 y 1.2 μm . Existen numerosas uniones estrechas alrededor de todos los bordes laterales de cada célula, que ejercen una función de barrera anatómica al paso de sustancias al espacio intercelular y a resistir las presiones externas. Las moléculas implicadas en la adherencia intercelular que se han descrito son las siguientes:

- 1) *integrinas*, proteínas integradas en la membrana celular, y
- 2) *cadherinas*, glicoproteínas dependientes del calcio.

La capa de células alares o intermedias tienen una profundidad de tres células; cuanto más superficial es la célula, más plano es su aspecto. El núcleo de las células alares es paralelo a la superficie. Existe una extensa interdigitación entre estas células con numerosas uniones desmosómicas.

Las células basales situadas en la profundidad componen una única capa de

células columnares que descansa sobre la membrana basal. Estas células están rodeadas en la superficie anterior por núcleos ovales que se disponen perpendicularmente a la superficie. Se trata de células mitóticamente activas y las células hijas producidas se desplazan anteriormente para transformarse en células intermedias. Las células basales se unen entre sí utilizando microestructuras que además tienen un papel de comunicación y formación de barreras. Son fundamentalmente tres los distintos tipos de estructuras:

- 1) *Desmosomas*, que son interdigitaciones entre las superficies celulares.
- 2) Uniones estrechas (*tight junctions*), que forman un sistema estanco impidiendo el paso de moléculas.
- 3) Uniones comunicantes (*gap junctions*), mayores en las células basales, formando canales de iones y moléculas hidrofílicas.

Las células basales también contienen conjuntos de tonofilamentos para mantener la forma celular. Existen filamentos de actina y pueden desempeñar un papel en la migración celular, como sucede durante la curación de una herida (Gipson IL 1977).

Las células del epitelio corneal están muy adheridas a su membrana basal mediante unos complejos de unión denominados hemidesmosomas (figura I.2.). Estos se fijan a las fibrillas de anclaje situadas en la membrana basal, compuestas por colágeno tipo VII, y que se extienden desde la lámina basal penetrando en la estructura del estroma finalizando en placas localizadas compuestas por colágeno tipo IV y tipo VII, formando un complejo muy entramado (figura I.3.).

Entre las células epiteliales basales podemos encontrar otros tipos celulares como linfocitos y pequeñas células con núcleos oscuros y múltiples prolongaciones

dendríticas. Periféricamente existen células de Langerhans que son células inmunes presentadoras de antígenos. El epitelio central está exento de melanocitos y células dendríticas. Esta característica puede explicar la buena tolerancia inmunológica del injerto corneal. En condiciones patológicas esta situación se suele alterar.

Es habitual en el epitelio, la presencia de fibras nerviosas desprovistas de mielina. Estas fibras suelen encontrarse entre las células basales, pero son raras entre las alares o intermedias. El nervio finaliza sin formar un órgano o receptor sensorial final específico, ya que ello reduciría la transparencia corneal.

Bajo la capa de células basales se encuentra una membrana basal producida por ellas. Tiene un espesor de 500 Å. Mediante microscopía electrónica se ha podido observar que está compuesta por una zona clara anterior, la lámina lúcida y una zona oscura posterior, la lámina densa. La lámina basal junto con sus hemidesmosomas y fibrillas de anclaje, participa en la adherencia de las células epiteliales al estroma corneal.

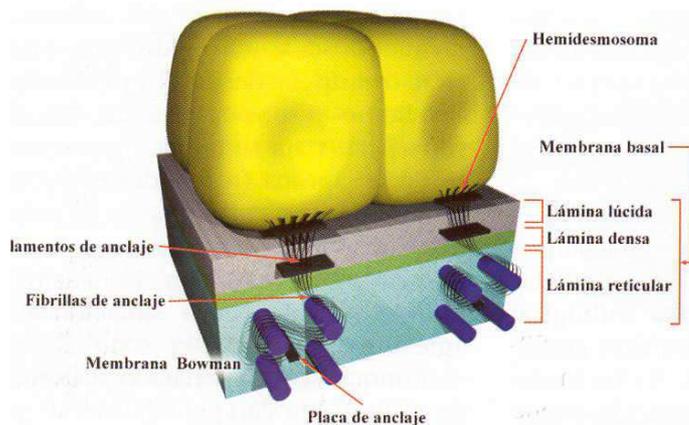


Figura I.2.: Esquema de las microestructuras de adherencias entre el epitelio corneal basal, la membrana basal y la membrana de Bowman.

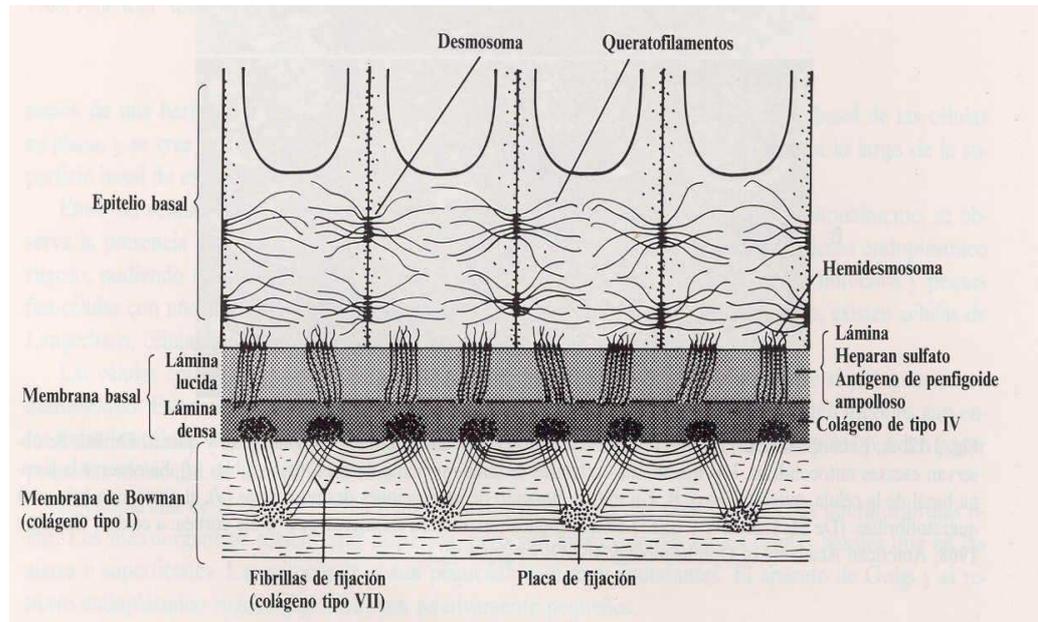


Figura I.3.: Esquema de la compleja estructura de unión del epitelio corneal a la membrana basal.

Membrana de Bowman

La capa de Bowman es una zona acelular, de 8 a 10 μm de espesor, situada debajo de la membrana basal del epitelio. El margen anterior se limita anteriormente por la membrana basal del epitelio y los bordes posteriores emergen en las fibras de colágeno anteriores del estroma (figura I.4, I.5.). Bajo microscopía óptica la capa de Bowman parece homogénea, pero la microscopía electrónica permite observar que está compuesta por fibrillas cortas de colágeno dispuestas al azar. La capa de Bowman es resistente al traumatismo ofreciendo una barrera de invasión corneal por microorganismos y células tumorales. Se ha constatado que la Bowman carece de capacidad regeneradora cuando se lesiona. Durante la curación de una herida, se forma una capa delgada, con una fina estructura idéntica a la membrana de Bowman; sin embargo esta capa secundaria no recupera su espesor original.

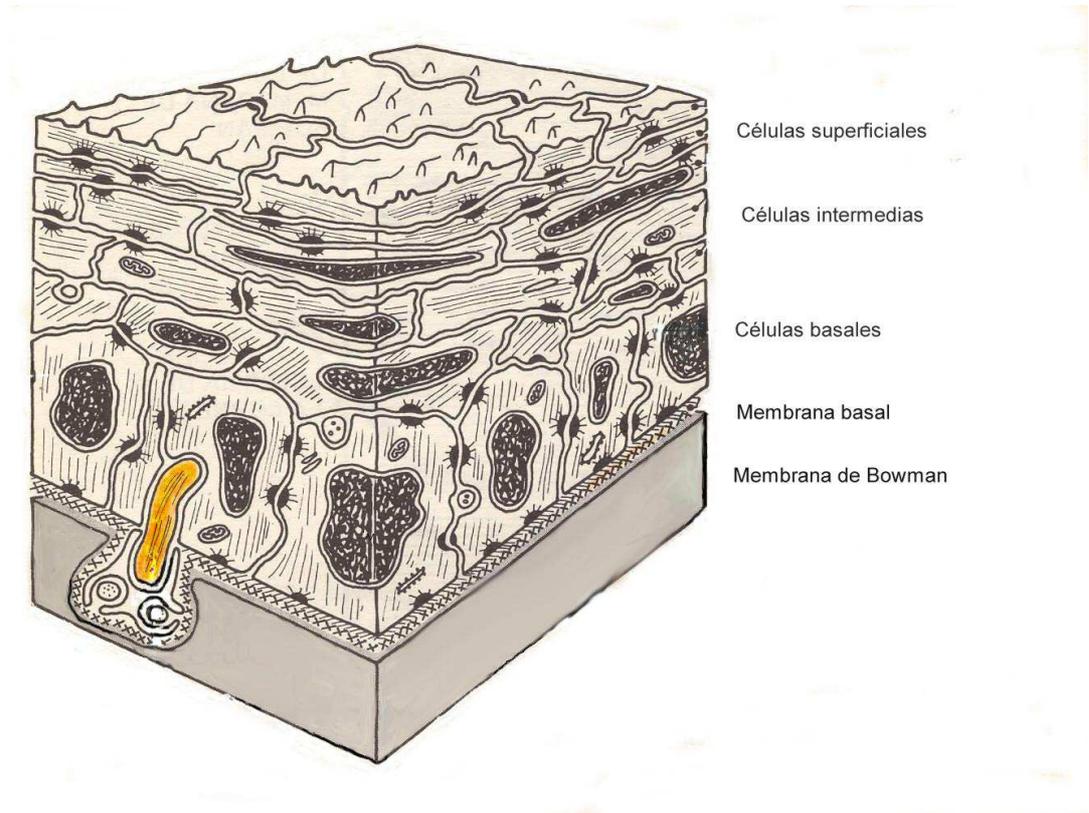


Figura I.4.: Esquema de la estructura corneal superficial.

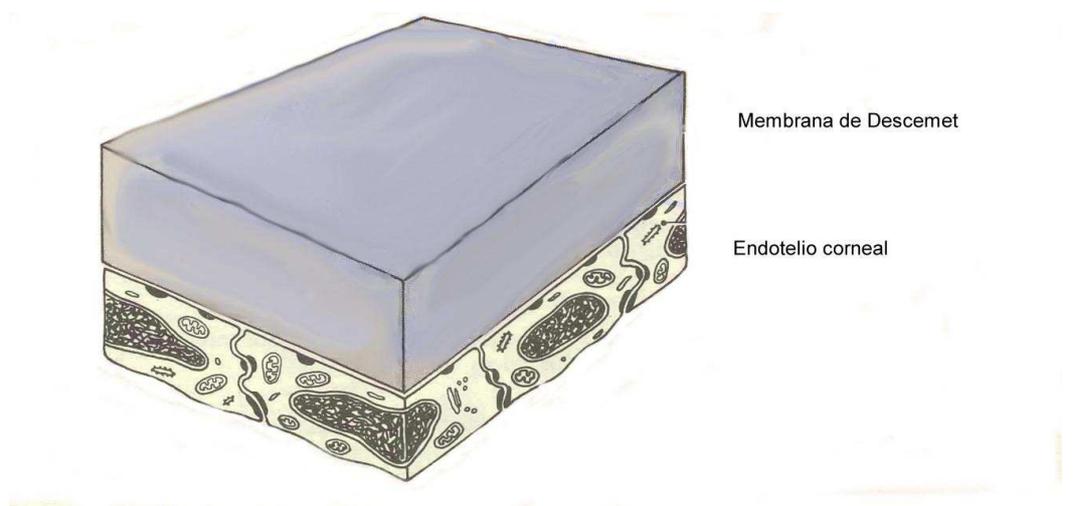


Figura I.5.: Esquema de la estructura corneal profunda.

I.2.2. EL ESTROMA CORNEAL

Su grosor central es de 0.5-0.54 mm, siendo mayor en la periferia en donde alcanza hasta 0.7 mm, lo que constituye el 90% del grosor total corneal (figura I.6a, 6b y 6c). Para ser transparente, el estroma corneal posee una estructura peculiar, conteniendo fibras de colágeno fundamentalmente de los tipos I y V. Estas se ordenan en unas 200 a 250 láminas paralelas a la superficie, teniendo todas las fibras una dirección igual dentro de cada lámina, pero entre las láminas la orientación es oblicua, presentando tendencia a una orientación vertical y horizontal, probablemente para compensar las deformaciones causadas por la musculatura extrínseca. El diámetro estrecho de las fibras (entre 30 y 38 nanómetros) es una característica que contribuye a la transparencia y se debe a la proporción de la molécula de colágeno V.

El espacio interfibrilar contiene proteoglicanos de tipo keratán sulfato y dermatán sulfato, estando más presente el primero en el estroma central y anterior. Su papel en este espacio se explica por la capacidad de atrapar cationes y agua.

Para compensar esta fuerza separadora de las fibras, la presencia de moléculas de colágeno XII pudiera explicar unos puentes de unión, con cierta elasticidad para adaptarse a fuerzas tensionales. También explica la necesidad de ejercer una fuerza para separar las láminas estromales. La característica disposición de las fibras y de las láminas, aunque no se entiendan los mecanismos moleculares que la regulan, asegura una tensión uniforme en toda la estructura de la córnea. Los proteoglicanos se unen a las fibras de colágeno de forma ordenada (un proteoglicano a un punto específico de unión), lo que es esencial para el ordenamiento y el espaciado fibrilar.

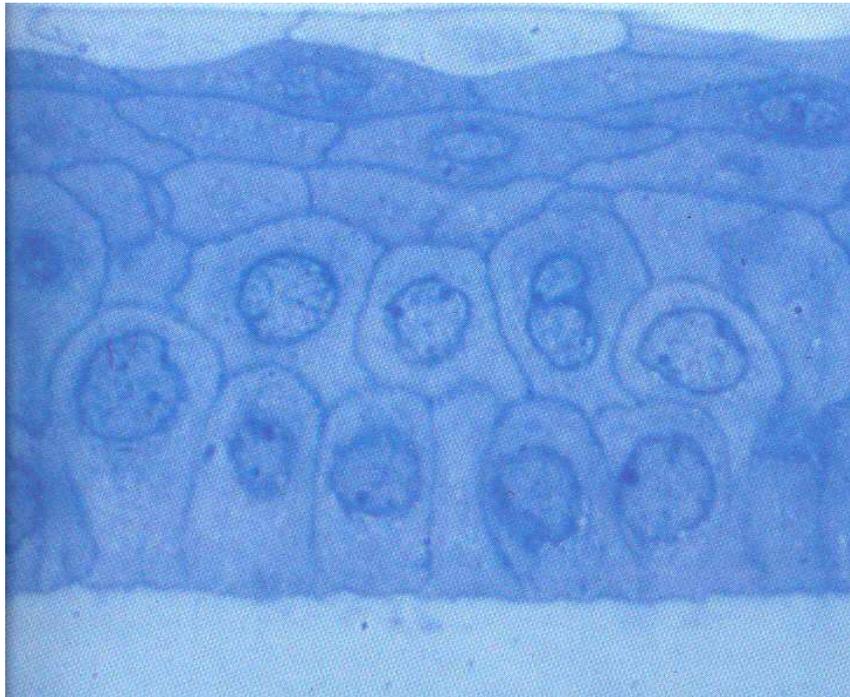
Los queratocitos, componentes celulares principales del estroma, se acomodan

entre las láminas y mantienen la estructura al sintetizar proteoglicanos y colágeno. Se trata de una célula grande y plana con varias prolongaciones que se extienden más allá del cuerpo celular de forma estrellada. Sus prolongaciones suelen mantenerse dentro de un mismo plano, pero ocasionalmente los extremos de las prolongaciones tocan las células vecinas. El queratocito deriva de la cresta neural y contiene el colágeno y la matriz extracelular del estroma corneal. Pueden observarse junto a los queratocitos, pequeños haces fibrilares de colágeno recién sintetizados. Las características enzimáticas de estas células permiten el ensamblaje ordenado del material sintetizado. Ante las agresiones, los queratocitos emigran hacia el lugar de la herida y se transforman en fibroblastos para restaurar las estructuras lesionadas. Estas células transformadas presentan un aumento del retículo endoplásmico rugoso y de aparato de Golgi así como una disminución de las prolongaciones citoplasmáticas. De este modo, contribuyen a la formación de la cicatriz mediante proliferación y formación de colágeno (Robb RM 1962). En el estroma se observa además de los queratocitos una pequeña cantidad de leucocitos polimorfonucleares, células plamáticas y macrófagos que se localizan entre las láminas de las fibras de colágeno.

Las propiedades mecánicas de la córnea han sido estudiadas de forma prioritaria desde los métodos de cirugía refractiva y existe una revisión reciente. Debido a la diferente estructura y distribución de los componentes corneales, se considera a la córnea como un material no isotrópico. En condiciones de edema, la tensión de las fibras posteriores es menor, elongándose las anteriores, que incluso cambian la curvatura de la cara anterior.



Figura I.6a.: Arriba. Histología de las 5 capas de la córnea humana.
Figura I.6b.: Abajo. Detalle del epitelio estratificado no queratinizado
(Cortesía Prof Marshall). Tomado de Spalton. Atlas de Oftalmología.



Membrana de Descemet

La membrana de Descemet tiene un espesor de aproximadamente 8-12 μm en los adultos y se trata de una lámina basal gruesa producida por el endotelio, que se mantiene tenuemente unida al estroma. El anillo de Schwalbe señala el final de la membrana de Descemet. Mediante microscopía electrónica se observa que la membrana de Descemet está compuesta por una zona anterior en banda y posterior homogénea. Contiene colágeno tipo IV y fibronectina (Newsome DA 1981). Esta riqueza en glicoproteínas, laminina y colágeno IV, le confieren una elasticidad y resistencia, mayor que el estroma ante agresiones traumáticas o inflamatorias. Cuando se corta, como ocurre durante algunas intervenciones quirúrgicas, tiende a enrollarse hacia la cámara anterior. Periféricamente aparecen en el ojo normal engrosamientos localizados de la membrana de Descemet, que reciben la denominación de cuerpos de Hassall-Henle.

A diferencia de la capa de Bowman, la membrana de Descemet se desprende del estroma con facilidad, regenerándose con rapidez tras la lesión. En algunos procesos patológicos, se depositan sustancias metálicas en la membrana de Descemet, como por ejemplo, el cobre en la enfermedad de Wilson y la plata en la argirosis. La célula endotelial, cuando se estimula por una inflamación, un traumatismo o alteraciones genéticas, puede producir un exceso de lámina basal anormal (Waring GO 1974), que también contiene colágeno tipo I (Kenney C 1978) dando lugar a un engrosamiento de la membrana de Descemet y a la formación de una verruga de Descemet.

I.2.3 EL ENDOTELIO CORNEAL

Se trata de una monocapa de células cuboideas que forman un mosaico hexagonal. Ultraestructuralmente estas células no muestran uniones especializadas hacia

la membrana de Descemet que la separa del estroma, si bien existen interdigitaciones intercelulares y algunos desmosomas, por lo que no se aprecian espacios intercelulares. Son estas invaginaciones las que facilitan a las células su despliegue para cubrir la pérdida celular constante. (Waring GO 1982). Las células endoteliales, de forma más cuboidea y de una altura aproximada de 10 μm al nacer, se aplanan con la edad hasta aproximadamente 4 μm en los adultos. El endotelio deriva probablemente de la cresta neural.

En su porción apical se encuentra en contacto con el humor acuoso y presenta una superficie lisa, permitiendo así una superficie con buenas condiciones ópticas.

El núcleo es grande y en el citoplasma celular, la presencia de mitocondrias es muy abundante. Para la activación de la energía que controla la hidratación estromal, en los bordes celulares basolaterales hay abundantes acúmulos de ATPasa.

Por lo general no existe actividad mitótica en el endotelio tras el nacimiento. Una característica del endotelio corneal, a diferencia del epitelio corneal es su incapacidad para la renovación celular. Esto origina una pérdida de población celular con la edad, así como una disminución de su grosor al estar obligado a cubrir toda la superficie corneal posterior. Este envejecimiento puede darse de manera exagerada en distrofias y como consecuencia de patología o cirugía ocular. Los estudios del endotelio corneal han sido objeto del mayor interés desde su posibilidad de estudio clínico, que permite el análisis de las estructuras celulares y de su densidad. En el adulto joven existen entre 3.000 y 3.500 células/ mm^2 , estimándose como críticas las cifras entre 500 y 700 células/ mm^2 . La pérdida endotelial se manifiesta además por el polimegatismo (diversidad de tamaño entre las células), pleomorfismo (diversidad de formas) y aumento de la poligonalidad

asociada a un incremento de la permeabilidad.

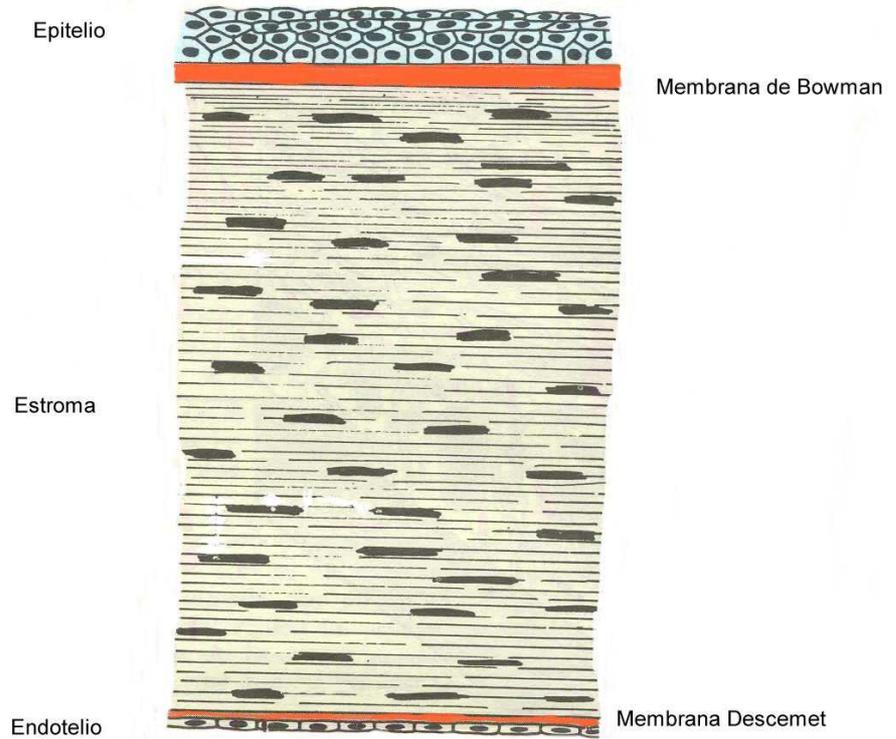


Figura I.6c.: Esquema de la estructura microscópica corneal.

I.2.4. ANATOMÍA DEL LIMBO

Anatómicamente el limbo supone una zona de unión para separar la córnea de la conjuntiva y diferenciar estos dos tejidos. Los tres constituyen la llamada superficie ocular. Bussaca en 1952, definió el limbo como la zona en la que tres tejidos distintos se superponían: la córnea, la conjuntiva y la esclera (Smeler GK 1980). Histológicamente, el epitelio limbar también es único y consiste en más de 10 capas celulares, y es el más grueso de los tres comparándolo con 1-2 capas celulares del epitelio conjuntival y las 4-7 del epitelio corneal. La expresión fenotípica del epitelio limbar es intermedia entre los epitelio corneal y conjuntival. Por ejemplo, en la cicatrización de un defecto corneal epitelial total por el epitelio limbar, el epitelio resultante es morfológicamente similar al corneal pero su contenido en glucógeno y proteína es intermedio entre el epitelio corneal y el conjuntival (Kinoshita S 1982, 83). El análisis ultraestructural del limbo humano sugiere que debe haber criptas abiertas para las células globet (Greiner JV 1979), hecho único del epitelio conjuntival. Todavía es desconocido si este epitelio de unión puede servir de origen a las *células stem* tanto del epitelio corneal como del conjuntival. En los humanos se han identificado en el limbo una zona de especialización de la estructura epitelial y se la ha denominado "Empalizadas limbares de Vogt" (Grayson M 1992). Esta estructura se especuló primero por Davanger y Evensen (1971), como el órgano generador de las células corneales epiteliales. Las células basales de estas empalizadas son presuntamente, algunas de ellas, células primordiales y están estrechamente unidas a la membrana basal subyacente y tienen una rica vascularización (Goldberg MF, Bron AJ 1982).

I.3. INERVACIÓN CORNEAL

I.3.1. Anatomía macroscópica

La inervación de la córnea humana proviene en su mayor parte de la rama oftálmica del ganglio trigémino a través de los nervios nasociliares largos (figura I.7.). Esta rama oftálmica es la primera de las tres ramas del V par craneal y se subdivide a su vez en tres ramas: lagrimal, frontal y nasociliar. Estas tres ramas penetran en la órbita a través de la hendidura orbitaria superior.

I.3.2. Anatomía microscópica

Los nervios nasociliares largos penetran en el estroma corneal a nivel del limbo mediante 10-12 troncos nerviosos. Estos pueden ser mielinizados o no, siendo similares a los troncos nerviosos periféricos. La mielinización desaparece a 2-3 mm del limbo y constituyen el plexo nervioso subepitelial.

La distribución nerviosa intraepitelial ha sido estudiada con precisión por Rozsa y Beuerman (1982) confirmando mediante sus trabajos la gran densidad nerviosa a nivel del epitelio corneal. La relación de fibras nerviosas terminales ha sido estimada de 1 para 1.5 células basales epiteliales, es decir, 1,4 millones de terminaciones intraepiteliales para aproximadamente 2,1 millones de células basales en el conejo. Así, la córnea sería el tejido periférico más ricamente inervado. A título comparativo, la densidad nerviosa corneal sería de 300 a 600 veces mayor que la de la piel.

El estudio de las capas epiteliales sugiere que la zona de distribución, es decir, el campo receptor neuronal de ciertos axones, es muy amplia. Tras su penetración en la capa epitelial, los axones se dividen en un plano horizontal formando ramificaciones. Estas arcadas horizontales se ramifican a lo largo de su trayecto intraepitelial horizontal,

dando ramas verticales formando una red densa y compleja terminando a nivel de las capas celulares más anteriores. Los campos receptores neuronales y las terminaciones libres de éstas arcadas intraepiteliales se superponen de manera importante (Assouline M 1993).

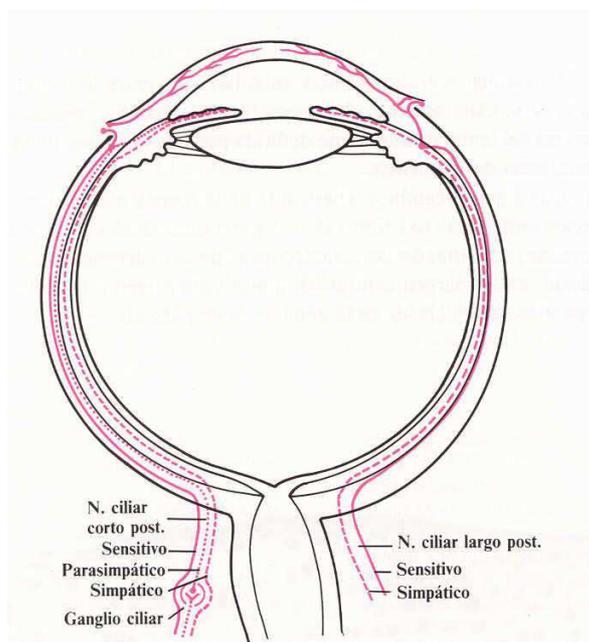


Figura I.7.: Inervación corneal tomado del Grayson.

I.3.3. Tipos de fibras nerviosas corneales

A partir de experiencias de denervación, se ha demostrado que la mayor parte de los axones que penetran en la córnea son de tipo sensitivo, procedentes del ganglio trigémino (Beurman RW 1980). Sin embargo, algunas fibras son de origen simpático.

Fibras simpáticas

Las fibras simpáticas corneales tienen su origen en el ganglio cervical superior. La mayor parte de estas fibras se disponen en el limbo esclero-corneal y se encuentran estrechamente asociadas a vasos. Algunas fibras simpáticas penetran en el estroma y terminan bajo la forma de expansiones axonales preterminales a nivel subepitelial y epitelial (Assouline M 1993).

Fibras sensitivas

Los axones nociceptivos son de velocidad de conducción lenta (fibras A-delta o fibras C-Assouline). La córnea es un sistema puramente nociceptivo (Beuerman RW 1980) presentando dicha clase de fibras como lo demuestran los trabajos de Lelé (Lelé PP 1959) y Tanelian (Tanelian DL 1983). A nivel del nervio ciliar, el 80% de las fibras no presentan mielinización, siendo de tipo C. Este porcentaje es mucho mayor que en la mayor parte de los nervios periféricos y corrobora la hipótesis de un sistema corneal nociceptivo puro o casi puro (Assouline M 1993).

Receptores sensitivos

Los receptores sensitivos corneales están representados por terminaciones libres intraepiteliales. Pero existe especialización funcional de dichas terminaciones libres diferenciándose en mecanorreceptores y termorreceptores (Assouline M 1993).

I.4. RESPUESTA CORNEAL ANTE UNA AGRESIÓN

En comparación con la cicatrización de la piel, la cornea es más compleja como resultado de la mayor diferenciación y de la estricta organización de su estructura. Debido a que la córnea está sujeta a agresiones de forma tanto natural (traumatismos, infecciones,..), como iatrogénica (cirugía, láseres, lentes de contacto,...), los mecanismos

de cicatrización han sido objeto de diversos **estudios**.

La renovación epitelial se produce cada 7 días, pero ante una lesión o defecto se inicia una reacción que consiste en tres fases diferentes. La fase latente, consiste en un periodo de 4 a 6 horas durante el cual se eliminan los restos celulares, las células se redondean y se reducen los hemidesmosomas del área de la lesión. En la fase de migración celular, que dura entre 24 y 36 horas, la movilidad celular se acelera y llega a cubrir en poco tiempo la pérdida de sustancia, con la recuperación del efecto barrera, gracias a un incremento de la superficie celular y la formación de fibrillas y filamentos. Se le ha atribuido a la fibronectina un papel fundamental en la fase de cicatrización, permitiendo una fuente de unión celular con la membrana basal. En la fase de proliferación celular se activan las células primordiales del limbo, se desarrollan los complejos de unión con la membrana basal y se reestablecen las terminaciones nerviosas. Es clave entonces para la recuperación epitelial, tanto una membrana basal en condiciones como una adecuada capacidad regenerativa de las células primordiales del limbo.

Las agresiones del estroma provocan una liberación de citoquinas que estimulan el movimiento de los queratocitos hacia los márgenes de la herida, iniciando la formación de nuevo tejido colágeno y mucopolisacáridos, pero las células pierden su especialización liberando sustancias comunes a cualquier herida, con un tamaño y disposición irregular de las fibras. Se ha insistido mucho en la importancia del epitelio en este proceso de cicatrización, pues no se inicia hasta que cubre el área afectada una capa de epitelio. La recuperación de las características normales no se llega a cumplir, al perderse la disposición de las fibras, incrementarse el diámetro de las mismas y

disminuir la resistencia del tejido. La tensión y la forma global de la córnea se puede ver profundamente afectada en heridas amplias, lo que se traduce en menor resistencia y astigmatismo, respectivamente.

En humanos adultos no existen fenómenos de mitosis en las células endoteliales, por lo que la pérdida celular se debe cubrir con la expansión de las células vecinas. La pérdida celular causada tanto por el envejecimiento como por agresiones externas o enfermedades, provoca disminución de la actividad endotelial y pone en peligro sus efectos bomba y barrera.

I.4.1. RENOVACIÓN DEL EPITELIO CORNEAL

El epitelio corneal es un tejido que se autorrenueva de forma permanente. Se trata de un epitelio de descamación cuyas células se recambian permanentemente. Para explicar este fenómeno, se requiere la presencia de células madre, stem o pluripotenciales. Estas células primordiales son la fuente de nuevas células epiteliales y aseguran su renovación constante. Estas células, teóricamente, están localizadas en el epitelio basal del limbo corneal y juegan un papel fundamental en la cicatrización corneal (Tseng SCG 1989).

Varias observaciones clínicas y experimentales vienen sugiriendo la posibilidad de que la superficie corneal se regenera de modo continuado a partir del limbo esclerocorneal. La forma en que se regenera el epitelio corneal se ha postulado por diversas teorías en los últimos años.

I.4.1.1. Hipótesis X, Y, Z

Es una teoría propuesta por Thoft y Friend (1983) para explicar la forma en la

que la masa epitelial corneal se mantiene y renueva constantemente (Figura I.8). Según esta teoría, las células descamadas (células Z) se reemplazan continuamente no sólo por las células basales (células X) que están dividiéndose, sino también por las células que migran desde la periferia (células Y).

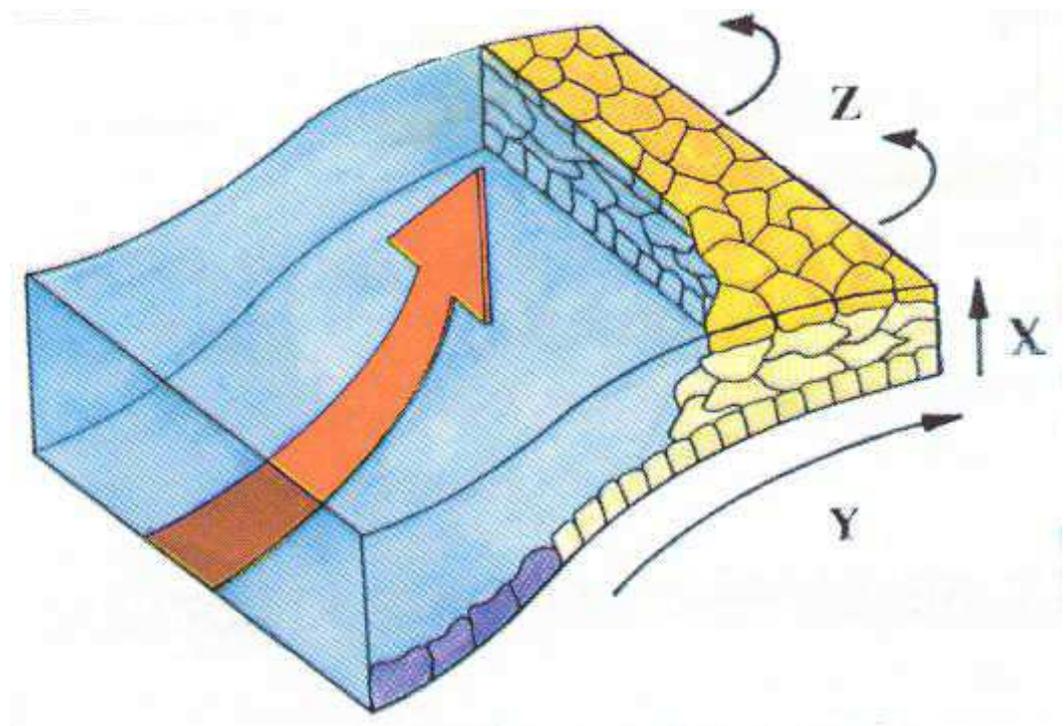


Figura I.8.: Hipótesis X, Y, Z del movimiento celular.

I.4.1.2. Papel del limbo en la regeneración del epitelio corneal

La importancia del limbo ha sido considerada a partir de la observación de evidencias que confirman un **movimiento centripeto** de células desde la periferia corneal hacia su centro y una **descamación preferencial** del epitelio central frente al periférico.

a) Movimiento celular centrípeto.

Diversos estudios han demostrado que existe un movimiento centrípeto de células desde la periferia corneal hacia el centro. Es precisamente este movimiento centrípeto el responsable de renovar la masa celular corneal (Thoft RA 1989). Este movimiento migratorio centrípeto tiene lugar tanto en condiciones de cicatrización normal como traumática (Tseng SCG 1989).

En la cicatrización de un defecto epitelial corneal, la curación se lleva a cabo por proliferación celular y migración de las células adyacentes (Kuwabara T 1976, Buck RC 1979).

Las investigaciones de varios autores prueban la hipótesis del movimiento migratorio centrípeto de las células epiteliales en la regeneración de la superficie corneal:

-Davenger y Evensen (1971) demostraron que en ciertos pacientes pigmentados, las células limbares altamente pigmentadas, forman estrías radiales hacia la córnea.

-Bron (Bron AJ 1973) amplió la mencionada observación constatando que en numerosas enfermedades epiteliales corneales pueden formarse patrones estriados similares.

-Aldrege y Krachmer (1981) descubrieron que el epitelio de la córnea humana del donante era gradualmente reemplazada por las células periféricas del receptor en las queratoplastias.

-Kinoshita, Friend y Thoft (1981) documentaron la dilución gradual de la cromatina sexual del injerto donante femenino por la del receptor masculino en un periodo de 12 semanas en conejos.

-Buck (1982) observó que las células epiteliales periféricas corneales del ratón, tatuadas con partículas de carbón, migran centrípetamente incluso en córneas normales, mínimamente traumatizadas.

-Dua y Forrester (1990) estudiaron el proceso de reepitelización de la superficie ocular de 14 pacientes con grandes abrasiones corneo-conjuntivales. Se encontró que durante este proceso el movimiento celular era circunferencial a lo largo del limbo corneo-escleral y de forma centripeta desde el limbo corneo-escleral. En ninguno de los pacientes el defecto corneal central se cerró antes que el limbo se hubiera reepitelizado completamente.

Suponiendo que la proliferación celular se originara en el limbo, el epitelio corneal periférico debería tener una mayor capacidad proliferativa. Esta teoría viene avalada por los siguientes trabajos experimentales:

-Matsuda, Ubels y Edelhauser (1985) en sus investigaciones concluyeron que en conejos, los defectos epiteliales corneales de más de 8 mm curan más rápidamente ($0,91 \text{ mm}^2/\text{hora}$) que los de menos de 4mm de diámetro. ($0,37 \text{ mm}^2/\text{hora}$). Estos resultados sugerían que el epitelio corneal periférico tiene una tasa de proliferación mayor.

-Ebato, Friend y Thoft (1987) observaron en cultivos tisulares que los fragmentos de córnea periférica crecían más rápidamente que los centrales ($52,8 \pm 5,2 \text{ mm}^2$ versus $7,8 \pm 1,1 \text{ mm}^2$; $p \leq 0,001$) y que la actividad mitótica también es mayor en centro que en periferia ($18,8 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ versus $1,1 \pm 0,5 \%$; $p \leq 0,001$).

-Ebato, Friend y Thoft (1988) observaron en cultivos tisulares que el epitelio limbar crece incluso mejor que el epitelio periférico corneal ($47,8 \pm 5,2 \text{ mm}^2$ versus $41 \pm 10\%$ en 24 horas; $p \leq 0,01$) y que la actividad mitótica también es mayor en el centro

que en periferia ($2,9 \pm 1,2$ versus $0,8 \pm 0,6$; $p \leq 0,01$).

-Sririvasan, Eakins y Huang (1979) han llegado a la conclusión que cuando el epitelio corneal central es denudado repetidamente, la curación es más rápida en la segunda que en la primera denudación. Esto sugiere que las células epiteliales periféricas más jóvenes han emigrado centripétamente a los bordes de la herida tras la primera denudación y responden de una forma más rápida al segundo trauma.

b) Descamación preferencial

Las células de las capas más superficiales del epitelio corneal se pierden por apoptosis y se descaman periódicamente (Haskjold E 1992). Este hecho ha sido avalado por numerosos autores.

Los primeros en estimar la vida media de una célula epitelial corneal en ojo de conejo (entre 3 y 7 días) fueron Hanna y O'Brien (1961) aplicando métodos de marcaje radiactivo en el conejo.

Haskjold y Bjerknes (1989) utilizando el mismo marcador radiactivo para las células epiteliales de rata, comprobaron la localización de las mitosis en la capa basal, confirmando que las células que abandonaban dicha capa seguían un trayecto vertical; las primeras células marcadas alcanzaban la superficie corneal a los tres días de la introducción de la timidina tritiada.

Cenedella y Flescher (1990) constataron que la pérdida de marcaje por descamación de las células epiteliales superficiales de la rata comenzaba a los tres días de la inyección y que el reemplazamiento completo del epitelio corneal requería unas 2 semanas.

Lavker, Dong y Kudoh (1991) comprueban que el índice de división es más bajo

en el epitelio limbar que en el epitelio corneal central, discrepando con la hipótesis de la presión tisular del epitelio periférico sobre el central. Estos autores miden las velocidades relativas de la proliferación del epitelio limbar y del central utilizando técnicas autorradiográficas con timidina tritiada en conejos albinos de la raza New Zealand, objetivando que el índice de división en el epitelio limbar es menor que en el epitelio central y que estas diferencias se mantienen durante el ciclo circadiano. Este hecho vendría explicado por las propiedades de ciclo lento que poseen las células primordiales, con una fase G_0 más larga (Tseng 1989). Estos resultados sugieren que la presión de la población "*per se*" no puede ser responsable de la migración centrípeta del epitelio corneal y promueven la posibilidad de que la descamación preferencial del epitelio corneal central pudiera atraer células periféricas hacia el centro de la córnea.

I.4.2. LA CONJUNTIVA EN LA CICATRIZACIÓN CORNEAL

a) Transdiferenciación conjuntival

Durante el proceso de cicatrización del epitelio corneal con implicación limbar, el epitelio conjuntival, a menudo, migra a través del limbo desnudo para intentar cubrir la superficie corneal. Se cree que durante este periodo de cicatrización, el epitelio conjuntival que cubre la córnea "asume" las características del epitelio corneal en un proceso denominado transdiferenciación conjuntival (figura I.9.). El fenómeno de la transdiferenciación conjuntival, supone el paso de epitelio conjuntival a corneal pero no ha sido demostrado de manera concluyente ni *in vivo* (Wei ZG 1993, Chen WYW 1994, Dua HS 1998) ni *in vitro* (Kruse FE 1990, Moyer PD 1996). Hasta nuestros días podemos decir que las células epiteliales conjuntivales pueden reestablecer la córnea

denudada, pero no inducir transdiferenciación haciendo que las células conjuntivales expresen marcadores fenotípicos específicos de córnea como la queratina K₁₂ y K₃. Los últimos intentos de demostrar este fenómeno mediante el cultivo de células del epitelio conjuntival sobre membrana amniótica también han fracasado (Prabhasawat P 1997, Cho BJ, 1999). La membrana amniótica humana no parece inducir transdiferenciación de las células epiteliales conjuntivales en células epiteliales de tipo corneal en condiciones de cultivo in vitro.

La cicatrización de una herida epitelial corneal sin transdiferenciación, está inevitablemente asociada con vascularización corneal. Esta observación llevó al descubrimiento de la vitamina A como uno de los factores sanguíneos responsables del mantenimiento del fenotipo conjuntival. De hecho la interrupción del aporte de vitamina A por la técnica denominada fototrombosis, puede llevar a la transformación del fenotipo epitelial conjuntival en otro parecido al corneal (Tseng SCG 1987, Huang AJW 1988). Este estudio y otros muchos previos establecen que la transdiferenciación conjuntival se inhibe por la neovascularización corneal. Por el contrario, la oclusión de los vasos corneales puede inducir transdiferenciación conjuntival en córneas vascularizadas. Estos resultados podrían tener aplicaciones clínicas en patologías con neovascularización corneal elevada. También es sabido que la neovascularización corneal reduce significativamente la supervivencia del injerto corneal tras queratoplastia penetrante. La fototrombosis usando Rosa de Bengala intravenoso y posteriormente irradiando la zona neovascularizada mediante láser Argón puede ser prometedor para la oclusión de vasos corneales e inducir transdiferenciación conjuntival (Corrent G 1989).

La asociación entre fenotipo conjuntival y vascularización estromal corneal

(*conjuntivalización*) sugiere la presencia de factores angiogénicos derivados de la conjuntiva o antiangiogénicos derivados córnea, es decir, modulación intrínseca de la expresión fenotípica.

Además de la vascularización, la membrana basal parece ser otro factor modulador extrínseco, como lo sugiere la expresión de queratina K₁₂ (específica de córnea) por parte de células epiteliales conjuntivales cuando se cultivan en membranas basales corneales. El hecho de que la membrana basal sea destruída en muchas patologías que ocasionan el cambio de epitelio corneal por conjuntival sugiere que alteraciones de ésta puedan ser una de las causas principales de la conjuntivalización, de ahí el “*resurgir*” del uso de trasplante de membrana amniótica (con gruesa membrana basal) para **intentar** reemplazar la membrana basal destruída.

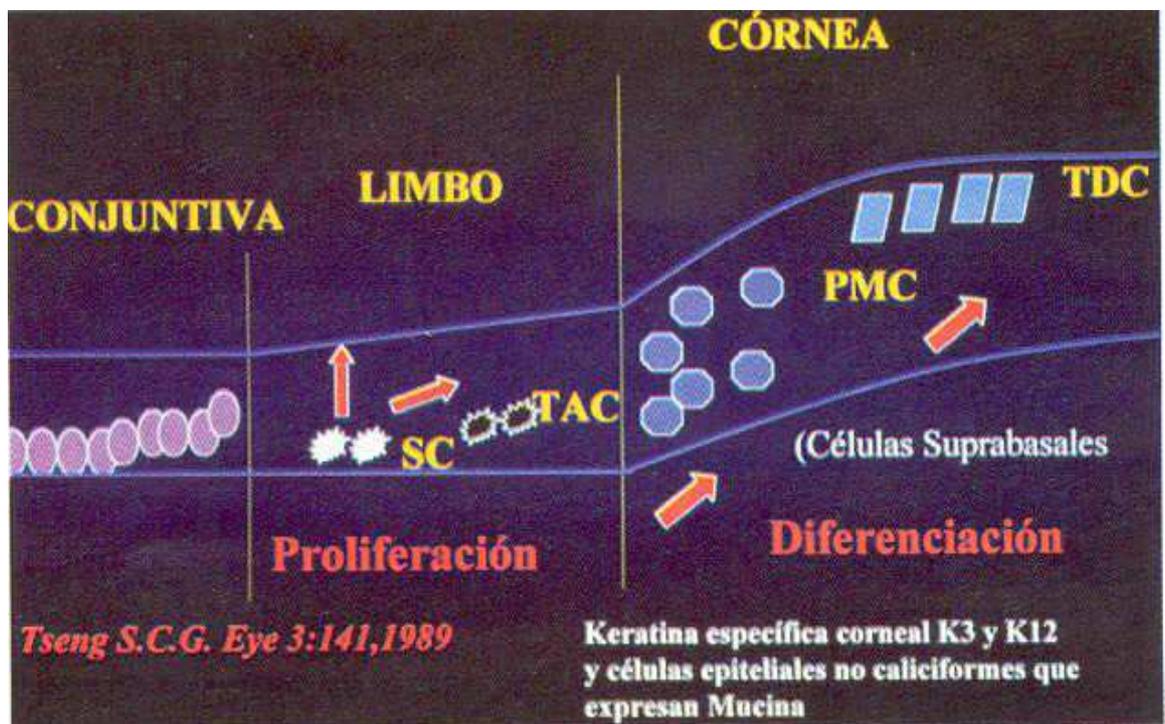


Figura I.9.: Esquema de las células epiteliales de la superficie ocular.

I.5. CARACTERÍSTICAS ESPECIALES DEL OJO DEL CONEJO (PRINCE, 1964).

El ojo del conejo presenta diferencias respecto al ojo humano. Tiene varias estructuras anatómicas que no existen en el humano: músculo retractor del globo, la glándula de Harder, la membrana y glándula nictitantes.

Además el sistema lagrimal del conejo presenta una glándula lagrimal mucho mayor y el aparato de drenaje es diferente. También el sistema de drenaje del acuoso, aunque probablemente con resultados similares, es diferente.

El tamaño del ojo varía con la edad y en el adulto es relativamente grande y prominente. Al nacimiento es de sólo 6 mm de diámetro pero crece rápidamente y a los 6-7 días de abrir los párpados ya se ha alcanzado el 90% del tamaño final que alcanza de la semana 14 a la 20 aproximadamente. Las dimensiones medias normales de conejos adultos son:

.Diámetro antero-posterior: 16-19 mm.

.Diámetro vertical: 17-18 mm.

.Diámetro horizontal: 18-20 mm.

Las características de las diferentes estructuras oculares del conejo son:

La córnea del conejo es prominente y relativamente grande, mucho más curva que la humana (Salinas-Martínez E 1997). De diámetro horizontal medio 15 mm y vertical de 13,5-14mm. Su curvatura no difiere mucho de la de la esclera por lo que el sulcus ciliar es muy poco pronunciado. El radio de curvatura es de 7-7,5 mm y el espesor corneal de 0,3-0,4 mm de media. La curvatura corneal, no obstante, va cambiando durante los primeros 15 meses de vida. Al nacimiento el poder dióptrico es

de 60 que se reduce a menos de 50 a las 30 semanas y se establece en 40-43 dioptrías a las 60-80 semanas.

Los bordes corneales se identifican en una sección histológica por una zona pigmentada en la parte anterior de la córnea y en la parte posterior por la unión de los pilares del iris con la superficie de transición corneo escleral. El epitelio corneal es más delgado que en el hombre (30-40 micras en el conejo). Está constituido por una fila de células basales columnares sobre dos filas de células poligonales y seis de células aladas y escamosas. Las células columnares tienen proyecciones hacia la membrana basal. Los desmosomas de unión son menos visibles en las células basales que en el hombre, siendo más marcados en capas intermedias y superficiales.

Cerca del limbo, las células basales presentan pigmentación que permite identificar el borde anatómico corneal en conejos pigmentados. De hecho, una pequeña cantidad de pigmento esta presente en todas las capas del epitelio en el área del limbo.

La córnea del conejo carece de membrana de Bowman, esta es una de las principales diferencias con la humana, aunque algunos investigadores han descrito como la membrana basal epitelial se divide en dos zonas, asumiendo que una de ellas corresponda a una membrana de Bowman muy delgada.

El endotelio presenta capacidad regenerativa (mitosis) tras un trauma y se ha observado la transformación de células epiteliales en endoteliales si las primeras están en contacto con el humor acuoso; y de células endoteliales en epiteliales cuando están en contacto con la conjuntiva.

La región trabecular es bastante diferente a la del ojo humano. El ángulo de la cámara anterior es muy difícil de observar ya que el iris se abomba hacia la córnea y lo

oculta al examen clínico.

En las secciones histológicas, en las que sí se puede estudiar con claridad, se observan unas estructuras que teniendo una amplia base en el iris van a anclarse en la córnea mediante finas inserciones en la Descemet e incluso estroma corneal. Se denominan pilares del iris o también ligamento pectinato. Entre ellos originan senos que se encuentran adyacentes al trabéculum (seno cilioescleral).

Estos pilares dan soporte a un iris que es muy delgado y a los grandes y desarrollados procesos ciliares de la cara posterior de éste, que a su vez, soportan un cristalino más pesado que el humano.

En secciones histológicas, el seno cilioescleral parece estar separado de la cámara anterior, pero entre los pilares del iris hay libre acceso del acuoso entre él y la cámara anterior.

Los procesos ciliares están muy desarrollados, formando la porción secretora del cuerpo ciliar. Nacen de la porción anterior del cuerpo ciliar, se unen a la superficie posterior del iris en su base y se extienden hasta 1 mm del borde pupilar del iris, unidos unos a otros en gran parte de su extensión. De esta forma, como el iris del conejo es muy delgado, los procesos ciliares que se unen a él en su parte posterior le dan soporte.

El cristalino es más grande y esférico que el humano, aunque su composición, anatomía y función son similares. El diámetro anteroposterior es de 1 mm y el ecuatorial de 9 a 11 mm. El radio de la superficie posterior es de 5 mm y de la anterior de 5,3 mm.

La retina se diferencia fundamentalmente de la humana en que el conejo no posee fovea central, es rica sobre todo en bastones y tiene un reducido número de células bipolares y ganglionares.

I.6. QUEMADURAS QUÍMICAS DE LA SUPERFICIE OCULAR

Son muchos los productos químicos que pueden lesionar la superficie ocular. La severidad y el pronóstico de las quemaduras químicas varía ampliamente. Las quemaduras medias suelen ser dolorosas pero no reducen la visión significativamente ni incapacitan laboralmente al sujeto durante largos periodos de tiempo. En la práctica diaria, la lesión es casi siempre relativamente leve y se recupera con rapidez; sin embargo, algunos productos químicos producen una lesión ocular grave, dando incluso lugar a una ceguera permanente.

Los traumas oculares químicos externos es un problema común que puede variar en severidad desde una irritación media a una completa destrucción de la superficie ocular, opacificación corneal, pérdida de visión y más raramente pérdida del ojo. El producto químico puede estar en estado sólido, líquido, vapor, polvo, etc...Las quemaduras químicas pueden ocurrir en casa, más frecuentemente por detergentes, desinfectantes, disolventes o cosméticos. Los pesticidas y fertilizantes son frecuentes entre agricultores. En un entorno industrial las quemaduras químicas son debidas a cáusticos químicos y disolventes.

Las quemaduras oculares constituyen verdaderas urgencias oftalmológicas ya que potencialmente pueden provocar ceguera irreversible. Se trata de la única situación, fuera del quirófano, donde los segundos pueden modificar los resultados. Con independencia del producto químico específico, la rápida irrigación con agua, puede disminuir o impedir las secuelas de ceguera. La irrigación debe hacerse ya en el mismo lugar donde se produce la lesión, ya que el tiempo necesario para llegar a la sala de urgencia o a la consulta del oftalmólogo puede hacer la lesión ya irreversible. La

severidad de la injuria química depende de la concentración del producto, de la duración del contacto o exposición, del PH de la solución, del volumen y de la capacidad tóxica inherente del producto químico (Hughes WF 1946).

Las quemaduras químicas más severas son causadas por fuertes ácidos y álcalis. Los ácidos débiles no penetran muy bien en los tejidos biológicos. Los efectos dañinos de estas soluciones resultan de su capacidad para cambiar drásticamente de concentración de iones hidrógenos e hidroxilos altamente reactivos en los tejidos afectados. El daño tisular de las soluciones ácidas tiende a ser menos severo que el de las soluciones alcalinas, debido a la capacidad de tampón de los tejidos así como a la barrera de penetración formada por las proteínas precipitadas. El ión hidrógeno precipita con las proteínas en contacto proporcionando protección al estroma corneal y al contenido intraocular. La precipitación de proteínas epiteliales le da a la córnea un aspecto de cristal esmerilado. La desepitelización tras quemaduras severas puede revelar un estroma subyacente trasparente. Los ácidos no causan pérdida de sustancia glicoproteica de la córnea. Los álcalis (y ácidos fuertes) aumentan el PH de los tejidos y causan saponificación de los ácidos grasos en las membranas celulares, trombosis vascular y finalmente destrucción celular. Una vez la superficie epitelial está dañada, las soluciones alcalinas penetran rápidamente en el estroma corneal, y rápidamente destruyen la sustancia de proteinglicanos y las fibras de colágeno. Las sustancias alcalinas fuertes pueden también penetrar dentro de la cámara anterior y producir daño tisular e intensa inflamación. La gravedad de la lesión es mayor si se asocia con extenso daño del epitelio limbar y penetración intraocular. El limbo contiene las células stem y cuando estas se dañan, la superficie corneal denudada es a menudo restaurada por el

epitelio conjuntival vecino. Si no se trata, el proceso de conjuntivalización de la córnea se acompaña de neovascularización, inflamación crónica y defecto epitelial persistente.

Los agentes causantes de quemaduras químicas oculares más importantes se encuentran en las tablas I.6.1. y I.6.2.

AGENTE	COMPUESTO	USOS	COMENTARIOS
ÁLCALIS	Amoniaco NH_3	Fertilizantes Refrigerantes Limpieza	-Combina con agua y forma amonio. -Rápida penetración.
	Sosa cáustica Lejía NaOH	Limpieza	-Penetra tan rápido como amoniaco.
	Hidróxido potásico KOH	Potasa cáustica	-Severidad similar sosa.
	Hidróxido de Magnesio $\text{Mg}(\text{OH})_2$	Abrillantadores	-Combina efecto térmico.
	Cal $\text{Ca}(\text{OH})_2$	Yeso Mortero Cemento Cal	-Agente común en medio laboral. -Poca penetración. -Toxicidad aumentada por retención de partículas.

Tabla I.6.1.: CAUSAS de CAUSTICACIONES OCULARES por ÁLCALIS.

AGENTE	COMPUESTOS	USOS	COMENTARIOS
ÁCIDOS	Ácido sulfúrico H ₂ SO ₄	-Limpieza industrial. -Ácido de baterías.	-Efecto térmico al combinar con agua. -Puede asociarse a cuerpos extraños por explosión de baterías.
	Ácido sulfuroso H ₂ SO ₃	-Se forma por la combinación de SO ₂ con agua corneal. -Conservante de frutas y vegetales. -Lejías. -Refrigerantes.	-Penetra más fácilmente que otros ácidos.
	Ácido fluorhídrico HF	-Limpieza de cristales. -Esmerilado de cristales. -Refinado de minerales. -Producción de gasolinas. -Producción de siliconas.	-Penetra fácilmente -Produce alteraciones severas.
	Ácido acético CH ₃ COOH	-Vinagre (4-10%). -Esencia de vinagre(80%). -Ácido acético glacial (90%).	-Lesiones leves a concentraciones menores del 10%. -Lesiones graves a mayores concentraciones.
	Ácido crómico Cr ₂ O ₃	-Industria del cromado.	-Conjuntivitis crónicas.
	Ácido clorhídrico HCl	-Usado en solución del 32 al 38%.	-Lesiones graves sólo a elevadas concentraciones.

Tabla I.6.2.: CAUSAS de CAUSTICACIONES OCULARES por ÁCIDOS.

I.7. QUEMADURAS POR ÁLCALIS.

Compuestos químicos alcalinos. Mecanismo de acción.

Las sustancias alcalinas más agresivas son el hidróxido de amonio, el hidróxido sódico, el hidróxido cálcico, el hidróxido potásico y el hidróxido de magnesio (tabla I.6.1.). Como se deduce de sus nombres, cada uno es una combinación de un catión y de ión hidróxido (OH^-) y se disocia rápidamente en solución, liberando grandes cantidades de hidróxido tóxico. Si la ionización en solución es débil, la sustancia será relativamente inocua.

El ión OH^- provoca una saponificación de los ácidos grasos de las membranas celulares. La penetrabilidad de un álcali depende de su catión, determinando por tanto su severidad. A mayor PH, los cationes se unen al colágeno y a los glicosaminglicanos por reacción con los grupos carboxilo (Grant WM 1950, 1955). Dado que el estroma corneal está constituido de colágeno extracelular principalmente, este cambio en el PH causa hidratación y engrosamiento de las fibrillas de colágeno (McCulley JP 1987). Los álcalis también hacen que el colágeno sea más susceptible a la degradación enzimática debido a que el ión hidroxilo hidroliza los glicosamin glicanos interfibrilares dejando desnudo el colágeno y con ello más susceptible a la degradación enzimática (Cejkova J 1975).

Los álcalis más frecuentes en la práctica médica son:

1. Amoniaco: El hidróxido de amonio o amoniaco (NH_3), es una sustancia frecuente en productos de limpieza, fertilizantes y refrigerantes; y se utiliza para la fabricación de otros productos químicos. Puede disolverse en agua, incluyendo las lágrimas y puede formar hidróxido de amonio (NH_4OH), que es muy cáustico. El

amoníaco penetra rápidamente en los tejidos oculares, ya que es liposoluble e hidrosoluble; puede alcanzar la cámara anterior en menos de 1 minuto (Pfister RR 1971, 1981). Por tanto puede producir una extensa lesión ocular interna y hay que tener en cuenta que no se elimina fácilmente con una irrigación tópica.

2. Hidróxido sódico: El hidróxido sódico se denomina habitualmente (Na OH) sosa cáustica y se utiliza como sustancia de limpieza y en la industria. Las lesiones se producen casi siempre durante su utilización en el desatascado de desagües domésticos. En estos casos, una combinación de cristales y solución salta del desagüe a los ojos. La lejía (hipoclorito sódico) es también un producto alcalino frecuente de uso doméstico que puede producir ceguera de forma inintencionada. El hidróxido de sodio penetra rápidamente en el ojo pero no tanto como el amoníaco. El pico máximo de alcalinidad en la cámara anterior se produce a los 3-5 minutos (Pfister RR, Friend J 1971) después de la exposición.

3. Hidróxido de calcio: La cal, el yeso, el cemento, la argamasa y la lechada contienen hidróxido cálcico ($\text{Ca(OH}_2\text{)}$) y son causa frecuente de lesión ocular. Los sólidos suelen caer o salpicar en el interior del ojo y pueden quedar atrapados en el fórnix, produciendo una exposición ocular prolongada. El hidróxido cálcico penetra relativamente poco, reacciona con la membrana celular epitelial para formar jabones de calcio, que precipitan y obstaculizan la penetración ulterior. Por tanto, tiende a producir una mayor lesión superficial, pero una opacificación precoz. Esto suele indicar un peor pronóstico del que se observa en ese momento.

4. Otros productos alcalinos:

El **hidróxido potásico** (KOH), también conocido como potasa cáustica, se utiliza con frecuencia como producto de limpieza y en la industria. Su penetración y gravedad son similares a las del hidróxido sódico.

El **hidróxido de magnesio**, es un componente de los fuegos artificiales y por lo tanto se contempla en el contexto de lesiones térmicas. Por si mismo, el hidróxido de magnesio produce una lesión epitelial menor. Véase tabla I.6.1 y I.6.2 de causas de quemadura químicas.

I.7.1. CLASIFICACIÓN CAUSTICACIONES de la SUPERFICIE OCULAR.

Históricamente se ha reconocido que la extensión del tejido dañado es un factor pronóstico tras las quemaduras químicas. Debido a la gran variedad de cáusticos y a la complejidad de los factores asociados a las causticaciones no existe una clasificación ideal. Existen diferentes clasificaciones que intentan correlacionar el aspecto clínico de la lesión con su pronóstico.

Las más utilizadas en la práctica médica han sido la clasificación de Hughes (tabla 1.7.1.1), la clasificación de Ballen (tabla 1.7.1.2) que posteriormente fue modificada por Roper Hall (tabla 1.7.1.3).

La clasificación de Hughes (Hughes 1946) relacionaba el pronóstico de la lesión con la necrosis isquémica de la conjuntiva sin diferenciar zonas de la misma. En 1946 se desconocía la importancia específica que pudiera tener la afectación límbica en la regeneración de la superficie corneal tras causticación.

La clasificación de Ballen (Ballen PH 1964) recogía por primera vez la importancia del daño limbar (tabla 1.7.1.2). Pero Roper-Hall aportaba además, que el daño corneal y limbar era la causa del daño visual y el daño conjuntival era el responsable de la cicatrización y del simbléfaron, y que sería más apropiado considerarlos separadamente y haciendo hincapié en el grado de isquemia y necrosis limbar (tabla 1.7.1.3). En aquella época ya se relacionaba el daño límbico con el pronóstico evolutivo de la causticación y por primera vez se reconocía el limbo esclero-corneal como una estructura diferenciada de la conjuntiva adyacente en el pronóstico de las causticaciones oculares.

En la década siguiente Thof y Friend relacionaría el daño límbico con la pérdida de las llamadas células stem limbares y se reconocería la importancia de la epitelización corneal (Thoft RA 1979, Friend 1978). La clasificación que sugería Thoft aparece en la siguiente tabla, en la que se relaciona el estado corneal y límbico con el pronóstico visual (tabla 1.7.1.4).

Sin embargo, durante los años posteriores nuestro conocimientos sobre el proceso de cicatrización corneal y las diferentes formas quirúrgicas de abordar las quemaduras oculares han cambiado dramáticamente. Tanto el conocimiento como las aplicaciones clínicas del concepto de células madre del epitelio corneal y del epitelio conjuntival localizadas en los fornices han hecho que los resultados en el tratamiento de las causticaciones de la superficie ocular hayan mejorado notablemente.

El epitelio corneal deriva de las células madre localizadas en las células basales del epitelio limbar. Este ciclo celular lento se cree que se localiza en la capa basal de las empalizadas de Vogt en el limbo (Davanger M 1971, Townsend WM 1991). Estas

células están pobremente diferenciadas y se cree que mantienen su pluripotencialidad debido tanto a sus características inherentes como a la presencia de un microambiente favorable en el limbo (Dua HS 2000). Algunas de estas células madre pasan a células amplificadoras transitorias (TAC) las cuales mantienen constante la masa de células epiteliales durante el recambio celular y durante el proceso de cicatrización epitelial (figura I.9). Estos dos tipos de células: madre y amplificadoras transitorias (TAC) constituyen el compartimento proliferativo, poseen características diferentes y están separadas anatómicamente, lo cual hace del ojo un modelo ideal para estudiar la regulación de las células pluripotenciales (SC). La regeneración del epitelio corneal tiene lugar de dos maneras centrípeta y circunferencialmente mediante células creciendo desde el limbo hacia el centro de la córnea y también migrando a lo largo del limbo. Las células stem de la conjuntiva están localizadas en la región de los fornices (Dua HS 1990, 1987) y migran de modo centrípeta desde los fornices para cubrir la conjuntiva bulbar y tarsal (Dua HS 1990, Wei ZG 1993).

Las nuevas técnicas quirúrgicas desarrolladas en el tratamiento de las quemaduras de la superficie ocular como el trasplante de limbo con o sin membrana amniótica, así como los nuevos fármacos sistémicos inmunosupresores, pasando por los colirios de suero autólogo han hecho comprender mejor los mecanismos de regeneración de la superficie ocular. Los procedimientos de regeneración de la superficie ocular se están difundiendo por todo el mundo. Sin embargo, los éxitos y fracasos (Meller D 2000, Dua HS 2000, Joseph A 2001), de los trabajos publicados en la literatura internacional varían mucho de unos centros a otros, incluso para quemaduras del mismo

grado. Estas grandes diferencias no sólo pueden ser debidas a una técnica quirúrgica inadecuada o poco experimentada de los cirujanos con el trasplante de limbo o de membrana amniótica (Rigal-Sousturne 2002), teniendo en cuenta la probada solidez quirúrgica de muchos de ellos, sino probablemente al reflejo de un sistema de clasificación de las quemaduras inadecuado o poco estandarizado. Esto es particularmente visible para las quemaduras de superficie ocular más severas o de grado IV según la clasificación de Roper-Hall la cual implica isquemia limbar 50%-100% y es igualada con pronóstico malo. Sin embargo, con las nuevas técnicas de trasplante de limbo o de membrana amniótica, tema de esta tesis, o de ambas, sabemos que pacientes con una isquemia limbar del 50% o incluso del 75% pueden esperar buenos resultados. Mientras que pacientes con un 100% de isquemia limbar es muy difícil que obtengan buenos resultados. La extensión del daño epitelial conjuntival asociado es otra variable de considerable significación pronóstica. En ojos con pérdida total del epitelio limbar (y corneal), la presencia de alguna área de epitelio conjuntival superviviente es un indicador favorable de buen pronóstico (Dua HS 1998, 1994) si lo comparamos con ojos con pérdida total del epitelio corneal, limbar y conjuntival. Si el epitelio conjuntival cubre la córnea (y la superficie ocular) es mejor que si no la recubre. La conjuntivalización de la córnea protege frente una lisis corneal progresiva y posterior perforación. La neovascularización promueve la cicatrización y facilita la reparación. En ojos con 100% de implicación limbar y conjuntival podemos esperar pobres resultados a pesar de realizar todo tipo de intervenciones.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, Dua y colaboradores (Dua HS 2001) proponen una significativa modificación de la clasificación de Roper-Hall para las

quemaduras de la superficie ocular. Esta clasificación tiene en cuenta no sólo el daño limbar sino en qué cantidad, contando horas de reloj y también el porcentaje de daño conjuntival (tabla 1.7.1.5). Las horas de reloj limbares se determinan dividiendo el limbo en 12 horas. El término “afectación limbar” se prefiere a “isquemia limbar” por ser un concepto de connotación más amplia y que no excluye áreas de limbo donde hay una completa o parcialmente pérdida del epitelio limbar sin isquemia significativa. La pérdida total del epitelio limbar (incluyendo las células madre) puede tener lugar a pesar de haber poca isquemia pero potencialmente puede tener las mismas consecuencias.

La clasificación de Dua se ha basado en la recopilación de datos sobre 67 casos de quemadura de la superficie ocular (de todos los grados) tratados y seguidos durante años (Dua HS 2001). Según esta clasificación los mejores resultados se esperan cuando se produce defecto epitelial corneal sin afectación limbar ni conjuntival. Esta es la quemadura de la superficie ocular más frecuente tras accidentes domésticos menores, bien con utilización de jabones y detergentes o soluciones de alcohol en productos de limpieza. Son las lesiones de grado I. Cuando se afectan menos de tres horas limbares y menos de un 30 % de la conjuntiva suelen tener buen pronóstico con el tratamiento convencional y la clasificamos de grado II. Tanto el grado I como el II de Dua se corresponden de manera paralela con los grados I y II de Roper-Hall pero teniendo en cuenta además la afectación conjuntival, según Dua. También podemos esperar buenos resultados cuando la afectación limbar incluye de 3 a 6 horas y se asocia con afectación conjuntival entre un 30% y 50%. Esto equivaldría a un grado III. Cuando el limbo se afecta entre 6 y 9 horas y la afectación conjuntival entre el 50 y 75% el pronóstico es reservado y la reconstrucción de la superficie ocular con buenos resultados es posible.

Esto se clasifica como grado IV. La afectación limbar de más de 9 horas pero menor de 12 indica una causticación bastante severa pero no tan mala como una causticación donde todo el limbo (100%) y toda la conjuntiva (100%) están implicados. Mientras haya al menos 1 hora de epitelio de limbo “viva”, hay una oportunidad de reestablecer el epitelio corneal. Bajo la clasificación de Roper-Hall, los grados 4, 5 y 6 de Dua, se incluirían en el grado 4 de mal pronóstico. Este grado IV de Roper-Hall incluye un amplio abanico de posibilidades donde, con las técnicas actuales de trasplante de membrana amniótica y trasplante de limbo, los resultados son esperanzadores e incluso buenos. Pos supuesto, a pesar de estas técnicas, el pronóstico para las causticaciones grado VI de Dua sigue siendo todavía pobre.

Por tanto es muy importante remarcar la importancia que tiene la extensión de la afectación límbica y la extensión de la afectación del epitelio conjuntival en esta nueva clasificación de las causticaciones de la superficie ocular. Otro concepto nuevo que incluye esta clasificación es el de dinamismo. El estatus clínico y grado de quemadura de la superficie ocular en un paciente dado, puede reclasificarse a lo largo de su proceso si su condición mejora o se deteriora y moverse 1 grado por arriba o por debajo de la escala.

Otros factores que también influyen en el resultado:

- 1-Haze corneal.
- 2-Afectación de los párpados asociada.
- 3-Presión intraocular elevada.
- 3-Hipotonía ocular persistente.
- 4-Unilateralidad/bilateralidad.

Tabla 1.7.1.1.: Clasificación de HUGHES.

GRADO	CLÍNICA
Leve	Erosión del epitelio corneal Ligera opacidad corneal Ausencia de necrosis isquémica
Moderada	Opacidad corneal que enturbia detalles iridianos Mínima necrosis isquémica de conjuntiva o esclera
Severa	Enturbiamiento de los límites pupilares Importante necrosis isquémica de conjuntiva y esclera

Tabla 1.7.1.2.: Clasificación de Ballen.

GRADO	CÓRNEA	CONJUNTIVA	PRONÓSTICO
I	Alteración epitelial	Congestión y quemosis	Excelente
II	Córnea deslustrada Iris visible	Congestión y quemosis Isquemia de menos de 180 ° de Limbo	Bueno Ocasionalmente leve simbléfaron
III	Desepitelización total Borrosidad corneal Borrosidad iris	Quemosis y/o necrosis de más de 180 ° del limbo	Reservado Escaso riesgo de perforación Pérdida visual
IV	Córnea opaca. Imposible ver Iris.	Necrosis e isquemia de más del 50% de conjuntiva.	Larga convalecencia Mal pronóstico. Mala visión. Simbléfaron.

Tabla 1.7.1.3.: Clasificación de Roper-Hall.

GRADO	CÓRNEA	CONJUNTIVA	PRONÓSTICO
I	Alteración epitelial	Sin isquemia	Bueno
II	Córnea deslustrada Iris visible	Congestión y quemosis Isquemia de menos de 1/3 del limbo	Bueno Ocasionalmente leve simbléfaron
III	Desepitelización total Borrosidad corneal limbo	Quemosisy/o necrosis Isquemia de 1/3 a 1/2	Reservado Escaso riesgo de perforación Pérdida visual
IV	Córnea opaca. Imposible ver iris	Necrosis e isquemia de más del 1/2 de conjuntiva.	Larga convalecencia Mal pronóstico Mala visión. Simbléfaron

Tabla 1.7.1.4.: Clasificación de Thoft.

GRADO	ESTADO OCULAR	PRONÓSTICO
Grado I	Daño epitelial corneal; Sin isquemia límbica	Bueno
Grado II	Córnea deslustrada, Visualización iris al detalle, Isquemia menor de un tercio del limbo.	Bueno
Grado III	Pérdida total del epitelio corneal, veladura del Estroma que hace borrosos los detalles del iris Isquemia de 1/3 a 1/2 del limbo	Reservado
Grado IV	Córnea opaca, que imposibilita la visión del iris	Malo

Tabla 1.7.1.5.: Nueva clasificación para las quemaduras de la superficie ocular de DUA.

Grado	Pronóstico	Clínica	Afectación conjuntival	Escala análoga
I	Muy bueno	0 horas de reloj de afectación limbar	0%	0/0%
II	Bueno	≤ 3 horas de reloj de afectación limbar	≤ 30%	0.1-3/1-29.9%
III	Bueno	>3-6 horas de reloj de afectación limbar	>30-50%	3.1-6/31-50%
IV	Bueno moderado	>6-9 horas de reloj de afectación limbar	>50-75%	6.1-9/51-75%
V	Moderado malo	>9-<12 horas de reloj de afectación limbar	>75-<100%	9.1-11.9/75.1-99.9%
VI	Muy malo	Limbo completo (12 horas de reloj)	Afectación conjuntival completa (100%)	12/100%

* La escala análoga recuerda precisamente la implicación limbar en horas de reloj, expresada en porcentaje de limbo y conjuntiva afectados.

I.7.2. PATOGENIA de las QUEMADURAS por ÁLCALIS.

Los productos químicos muy alcalinos, producen la rotura de las células, ya que su PH elevado da lugar a saponificación y disociación de los ácidos grasos en las membranas celulares. Un PH local de 11.5 o mayor parece asociarse con lesión permanente de los tejidos. En el estroma, los iones hidroxilos (OH⁻) provocan hinchazón de las fibras de colágeno, que produce su engrosamiento y acortamiento. También dan lugar a la hidroxilación de los glucosaminglicanos interfibrilares (Cejkova J 1975). La gravedad de la lesión del estroma también se relaciona con la naturaleza del catión, que influye sobre la penetración, y el mismo puede unir colágeno y glucosaminglicanos

(Grant WM 1955).

También puede producirse, por los mismos mecanismos, la lesión de la conjuntiva, los nervios corneales, los queratocitos, el endotelio y los vasos sanguíneos límbicos. La estimulación de los extremos libres de los nervios en el epitelio corneal y conjuntival es la responsable del intenso dolor que se asocia a la lesión por álcalis (Pfister RR 1983). Los efectos de la lesión por álcalis sobre las células caliciformes no están claras; se ha observado una disminución de la densidad de células caliciformes, como en el penfigoide cicatricial y otros procesos cicatrizantes. Por el contrario, otros investigadores han comunicado un sorprendente y significativo aumento de la densidad de las mismas (Ohji M 1987).

Las estructuras intraoculares, entre ellas el iris, cristalino, el trabeculum y el cuerpo ciliar, también pueden verse afectadas dependiendo del PH del humor acuoso. El PH del humor acuoso puede mantenerse alcalino durante 3 horas después de la lesión, con independencia de la irrigación externa. Los niveles de glucosa y de ascorbato del humor acuoso están disminuidos, pudiendo permanecer así durante largos periodos (Pfister RR 1983, Petroustos G 1984, Reim M 1988, 89).

Es frecuente observar ulceración del estroma en las córneas quemadas por álcalis. Son varios los factores que contribuyen a la ulceración del estroma, entre ellos los defectos epiteliales persistentes, el déficit de lágrimas, la inflamación, la liberación de enzimas proteolíticas, la deficiencia antioxidante (Nirankari VS 1981), la anestesia y el deterioro de la síntesis de colágeno. Un tipo de enzima proteolítica , la colagenasa, parece desempeñar un papel significativo y ha sido sometida a una gran investigación (Berman M 1971, 1976, 1979). El epitelio, los fibroblastos y los leucocitos

polimorfonucleares pueden liberar colagenasas y se ha detectado actividad colagenasa en las córneas que se ulceran tras quemaduras por álcalis. La colagenasa aparece en las 9 horas siguientes a la quemadura y alcanza su mayor pico a los 14-21 días.

La producción de plasmina en las células epiteliales, polimorfonucleares y queratocitos pueden también desempeñar algún tipo de función en la ulceración del estroma (Berman M 1980). Asimismo, se ha sugerido que la respuesta inmunitaria del huésped puede contribuir al desarrollo de ulceración, tal como indican los hallazgos que a continuación se exponen (Ben-Hanan I 1983, 1986). En conejos, si el segundo ojo es quemado de 2 a 4 semanas después del primero, la tasa de ulceración en este segundo caso es mucho mayor que la del primero. Por otra parte, la administración de suero tomado en la convalecencia de estos conejos incrementa también la tasa de ulceración.

Tras las quemaduras por álcalis, se ha observado una deficiencia de ácido ascórbico corneal localizada (Brodovsky SC 2000, Risa O 2002, Saika S 1993), que puede desempeñar un papel en la ulceración corneal. Los niveles de ascorbato en el humor acuoso son por lo general 20 veces los del plasma, debido probablemente al transporte activo por el cuerpo ciliar. La lesión del cuerpo ciliar puede deteriorar o suprimir esta función y dan lugar a una deficiencia relativa de ascorbato. El ascorbato es necesario para la síntesis de colágeno, la conversión de los monocitos en fibroblastos y para la formación de retículo endoplásmico rugoso, y también tiene un papel en la síntesis de glicosaminglicanos.

I.7.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS CAUSTICACIONES POR ÁLCALIS

McCulley (McCulley JP 1987) ha sistematizado la evolución clínica de las quemaduras químicas en cuatro fases:

- 1) Inmediata.
- 2) Aguda (0-7 días).
- 3) Fase reparadora temprana (7-21 días).
- 4) Fase reparadora precoz (>21 días-varios meses).

El dolor intenso, lagrimeo y blefarospasmo que acompañan a una quemadura ocular química se debe a la estimulación directa de las terminaciones nerviosas libres localizadas en el epitelio corneal y conjuntival.

1. Agudas. Unos minutos después de una lesión grave por álcalis, puede aparecer una extensa lesión en todas las células de la córnea, entre ellas el epitelio, los queratocitos, los nervios, los vasos y el endotelio. La lesión de los componentes celulares y vasculares de la conjuntiva, el iris y el cuerpo ciliar, así como los del epitelio del cristalino, también puede producirse en las primeras horas. La conjuntiva se inyecta y puede mostrar áreas de necrosis, que aparecen blancas y desprovistas de vasos sanguíneos. Pueden existir grandes defectos epiteliales, que afectan toda la córnea y se extienden a los fórnices. El estroma corneal aparece a menudo, borroso y edematoso, pudiendo ser opaco en las lesiones graves. La cámara anterior puede ser superficial y mostrar formación de fibrina.

Todos los hallazgos clínicos presentes inmediatamente tras la quemadura química se refieren a la extensión de la implicación de la superficie ocular, la

profundidad de la penetración, y la relativa toxicidad y concentración de la sustancia química. La extensión de la implicación de la superficie ocular puede determinarse generalmente por el tamaño del defecto epitelial. La profundidad de la penetración puede estimarse evaluando la claridad corneal, la inflamación intraocular, presión intraocular y la transparencia del cristalino. Aunque la inflamación de la cámara anterior pueda ser secundaria a la lesión de la superficie ocular, un aumento en la presión intraocular o una pérdida de la transparencia del cristalino de manera cercana tras la lesión sugiere una penetración ocular importante.

La presión intraocular aumenta, a veces, rápidamente. Este aumento precoz parece deberse al encogimiento del colágeno en la córnea y en el retículo trabecular, con compresión de la cámara anterior y de los canales trabeculares de salida (Stein MR 1973, Paterson CA 1974, Chiang TS 1971). En unas pocas horas pueden entrar en juego otros mecanismos: el aumento de la presión venosa episcleral, el bloqueo del retículo trabecular por residuos inflamatorios y, posiblemente, la liberación de prostaglandinas a partir de las estructuras intraoculares lesionadas. Aunque estos mecanismos pueden contribuir a que aumente la presión, también puede producirse la lesión del cuerpo ciliar, que da lugar a una disminución del flujo de humor acuoso. Durante los primeros días, el equilibrio entre estos factores es precario y el ojo puede fluctuar entre la hipotonía y una intensa elevación de la presión.

La penetración de las soluciones alcalinas fuertes dentro del ojo (\geq PH 12) no remite hasta que la solución se lava o diluye de la superficie externa del ojo.

La gravedad de la lesión y el pronóstico sobre la curación del ojo, se pueden calcular en base a la exploración inicial. Es útil la clasificación desarrollada por Hughes

(1964)(tabla I.7.1.1) y modificado por Roper Hall (Roper-Hall 1965) que divide las lesiones en cuatro grupos (véanse tablas I.7.1.1-5). Estos esquemas son útiles, sobre todo para quienes no están acostumbrados a tratar pacientes con lesiones por productos químicos. Pueden utilizarse como una indicación de la posibilidad de complicaciones y del pronóstico a largo plazo. Los signos pronósticos más importantes son el grado de necrosis límbica (isquemia) y el velado del estroma corneal. Los signos de lesión de la cámara anterior, como una pupila dilatada y fija, iridociclitis y un aumento mantenido de la presión intraocular, también indican la existencia de una lesión más grave.

2. Fase reparadora precoz. Es característico que el epitelio empiece a crecer desde la periferia del defecto en unos pocos días. Dependiendo de la extensión de la lesión, sin embargo, puede tardar 1-2 semanas en alcanzar la córnea. En el intermedio, puede aparecer simbléfaron como consecuencia de la fusión de las superficies desnudas del párpado y de la conjuntiva bulbar. Su progresión a través de la córnea puede ser desesperadamente lenta, tardando muchas semanas, sobre todo en casos con intensa lesión del estroma. El índice de curación epitelial depende de la extensión de la afectación límbica, la intensidad de la necrosis hística, la suficiencia de la función palpebral, la producción lagrimal y la edad del paciente. El epitelio suele mostrar vascularización periférica e infiltrado celular inflamatorio. Con el tiempo, el estroma se aclara gradualmente y la inflamación de la cámara anterior desaparece. Sin embargo, pueden formarse membranas fibróticas sobre el iris, el endotelio o el cristalino, y este último puede hincharse más y aparecer más borroso. La presión intraocular puede ir desde la hipotonía al glaucoma de difícil control, pero por lo general no es tan lábil como en la fase aguda. Se puede producir la ulceración del estroma en cualquier

momento después de los primeros 7 a 10 días, pero suele hacerlo a las 2-3 semanas de la lesión. Sólo aparece en áreas en las que no existe epitelio ni vasos superficiales. En la mayoría de los casos, el epitelio cubre la córnea antes de que tenga lugar un adelgazamiento significativo, y los vasos se observan periféricamente o no se observan en absoluto; sin embargo, a mayor extensión de epitelio no intacto, mayor posibilidad de ulceración. En los casos graves, la curación epitelial puede tardar meses y a veces se produce una progresiva ulceración del estroma antes de que el epitelio alcance la córnea central. Si puede evitarse la perforación, se conseguirá finalmente la curación, aunque a menudo con una intensa vascularización y cicatrización.

3. Fase reparadora tardía. Si se consigue la curación inicial del epitelio sin una intensa vascularización y cicatrización, el ojo puede aparecer bastante bien en esta etapa, incluso si las quemaduras han sido graves. Una minuciosa inspección, sin embargo, indica a menudo la presencia de obstáculos aún por tratar. La cicatrización conjuntival puede progresar durante semanas tras la lesión y da lugar en ocasiones al cierre de los conductos de las glándulas lagrimales, entropion, triquiasis y fallo en el cierre palpebral. Además de la deficiencia acuosa lagrimal, el componente lipídico de las lágrimas puede estar reducido por la cicatrización de los orificios de las glándulas de Meibomio, y a veces está deteriorada también la superficie lagrimal. La secreción corneal suele estar disminuída a causa de la lesión del nervio. Aunque no es fácilmente evidente, también puede existir una extensa lesión endotelial y de los queratocitos.

Todos estos problemas pueden llegar a ser perjudiciales. En los casos más graves, la cicatrización y la vascularización corneal progresan durante 6-12 meses después de la lesión. La lesión del endotelio puede dar lugar a la formación de una

membrana fibrosa retrocorneal. Son frecuentes membranas papilares y cataratas, que deben extraerse antes de la rehabilitación visual. La presión intraocular puede permanecer elevada o el ojo puede estar hipotónico y consiguientemente atrófico.

I.7.4. TRATAMIENTO CAUSTICACIONES POR ÁLCALIS

Cualquier lesión química en la superficie ocular, y más aún alcalina, supone una urgencia oftalmológica. Los objetivos de cada estadio son maximizar los beneficios del tratamiento médico y quirúrgico actuando sobre el principal mecanismo fisiopatológico de acción. Tras iniciar el tratamiento primario los objetivos se encaminan en cada estadio:

- Promover la cicatrización epitelial de la herida
- Limitar la ulceración

1. Tratamiento inmediato.

El ojo lesionado por productos químicos se debe irrigar de forma copiosa lo antes posible (Brown SI 1970). El destino del ojo casi siempre queda marcado en los primeros minutos después de la lesión; por tanto, es preferible realizar la irrigación en el lugar donde se ha producido la lesión con cualquier líquido no tóxico, repitiéndola después que el paciente llega a la sala de urgencias o a la consulta del médico. Es útil determinar el PH del fondo de saco inferior antes de irrigar utilizando papel tornasol, pero no si supone retrasar la irrigación. Teóricamente, una solución tamponada, isotónica, de PH neutro, sería el líquido ideal para irrigar, pero no parece ser superior al agua, al Ringer lactato, al suero salino normal o a soluciones similares.

La irrigación suele realizarse introduciendo el líquido a través de un tubo

intravenoso, retrayendo los párpados y sosteniendo manualmente el tubo de forma que el líquido se vierta en el interior del ojo lavando a fondo los sacos conjuntivales . Los tubos de irrigación fijados a lentes de contacto escleral de polimetilmetacrilato (lentes terapéuticas Medi-Flow, Mor-Tan, Inc., Torrington, WY 82240) y un tubo de silicona perforado para colocar en el fórnix conjuntival (tubo de irrigación ocular de Oklahoma, Edward Weck y Co., Inc., Long Island City, NY 1110 1) son productos comercializados para facilitar este proceso. La irrigación se continúa durante un mínimo de 30 minutos o hasta que el PH sea neutro. Puede ser necesario bloquear el párpado o utilizar anestésicos tópicos para este tratamiento inicial.

La extracción del material sólido es esencial y puede requerir la doble eversión palpebral para asegurar que esta zona está libre de producto químico. La pasta pegajosa o el polvo de hidróxido de calcio puede resultar particularmente difícil de extraer. La irrigación con una solución al 0,01-0,05 M de ácido etilendiarninotetraacético (EDTA) y torundas de algodón empapadas en la misma solución puede ayudar a extraerlo (Itoi M 1969, Grant WM 1950, Pfister RR 1983).

En causticaciones muy severas, se ha recomendado la paracentesis de cámara anterior con extracción de humor acuoso e irrigación, pero sus ventajas aún no se han determinado y los riesgos pueden ser significativos. Esta recomendación se basa en que se ha encontrado que el PH del humor acuoso a los 100 minutos después de la causticación es todavía mayor de 10, incluso cuando se ha realizado un lavado copioso inmediatamente después del daño (Paterson CA 1975). Otros autores, en animales de experimentación han demostrado también este hecho (Bennett TO 1978). El lavado de la cámara anterior con tampón fosfato antes de 30 minutos tras el suceso puede prevenir la

formación de catarata y reducir la opacidad corneal. Sin embargo otros autores no consideran el lavado de cámara anterior tan beneficioso (Grayson M 1992). Estudios de causticación corneal en conejos por Grant, nos muestran que el lavado no es efectivo reduciendo el PH del humor acuoso en cámara anterior, probablemente porque la irrigación externa se aplicó a los 10-20 segundos tras producir la quemadura con el producto alcalino. Por ello hay que mostrarse cauto con esta técnica y sólo realizarla en casos muy severos.

Si se decide hacer la paracentesis de cámara anterior, esta debe realizarse bajo anestesia tópica en la sala de urgencia usando una jeringa de tuberculina con aguja de # 27 ó # 30 gauges y un cuchillete fino de 15° para facilitar la penetración en el limbo. Tras realizar la paracentesis se coloca un tubo de drenaje a través de la incisión proporcionando un sistema de irrigación eficiente que se mantendrá durante 2 horas. Posteriormente se induce midriasis mediante el empleo de colirio de atropina 1% 2 veces al día para conseguir bienestar. También añadiremos colirios de antibiótico de manera profiláctica (gentamicina, ciprofloxacino, tobramicina, ...) mientras persista el defecto epitelial.

Si la lesión es relativamente leve (por ejemplo, de grado I), se puede colocar un parche en el ojo y volver a examinar al paciente al día siguiente. Si las quemaduras son más graves, fundamentalmente con lesiones bilaterales, el paciente ha de ser hospitalizado y monitorizado.

2.Tratamiento precoz (1-2 semanas)

El papel del oftalmólogo en el periodo precoz del tratamiento consiste en aliviar el malestar, controlar la presión intraocular y promover la curación epitelial. Se utiliza

un cicloplégico, como la escopolamina o la atropina, para aumentar el bienestar y se aplica un antibiótico relativamente no tóxico de 2 a 4 veces al día para reducir el riesgo de infección. La elevación de la presión intraocular se trata fundamentalmente con medicamentos que disminuyen el flujo, como el timolol y los inhibidores de la anhidrasa carbónica.

Si la lesión del epitelio conjuntival es extensa, afectando la conjuntiva palpebral y también la bulbar, o si empiezan a formarse sinequias, hay que tomar medidas para separar físicamente ambas superficies conjuntivales. No está claro si ello afecta al resultado final. Ciertamente, no impiden la cicatrización subconjuntival, pero pueden reducir el acortamiento del fórnix. En nuestro caso, utilizamos casi siempre un conformador, combinado con una lente de contacto terapéutica. Por otro lado, la superficie palpebral se puede revestir con un material plástico delgado o pueden limpiarse a diario las adherencias con un bastoncillo.

La curación epitelial puede estimularse por lubricación, colocación de un parche, lentes de contacto terapéuticas o tarsorrafia. Las lentes de contacto terapéuticas son útiles cuando se prolonga la curación epitelial o se observa una pérdida epitelial recidivante. La lente se coloca en su sitio cuando se alcanza una adhesión adecuada, lo que puede requerir hasta 3 meses. Puede aparecer un cierre palpebral incompleto, entropión, ectropión o triquiasis, que debe corregirse en lo posible. Las lentes de contacto de vendaje también son útiles para mejorar los efectos de estas afecciones.

La **fibronectina** (Caron LA 1985, Tenn PF 1985, Spigelman AV 1985, Ren G 1994) y el **factor de crecimiento epidérmico** (Watanabe K 1987, Reim M 1988, 89,90) promueven la curación epitelial tras la lesión por álcalis en conejos. En estos modelos,

sin embargo, los defectos epiteliales recidivan, incluso con un tratamiento continuado con fibronectina o FCE. La incidencia de rotura epitelial secundaria disminuyó con la utilización combinada de FCE y fibronectina, o con la adición de tratamiento esteroide tópico al tratamiento con fibronectina o con FCE.

La fibronectina favorece las adhesiones entre célula y célula y entre célula y matriz celular, aunque no tenga efecto sobre la mitosis celular ni sobre la migración (Berman MB 1983). Teóricamente la fibronectina puede facilitar la reepitelización tras la quemadura química (Tenn PF 1985, Spigelman AV 1985) e incluso reducir la ulceración (Phan TM 1991). Aunque varios autores opinan de manera contradictoria.

El factor de crecimiento epidérmico puede inducir hiperplasia epitelial (Ho PC 1975, Singh G 1987) y favorece la migración celular en el proceso de cicatrización tras las lesiones químicas (Brazzell RK 1991, Schultz GS 1992, Fujisawa K 1991). Según últimos estudios (Kim MJ 2001), dosis bajas de factor de crecimiento epidérmico favorecen el crecimiento epitelial de una manera más selectiva que dosis altas. Otros autores afirman, que el proceso de cicatrización en modelos experimentales de causticación en conejos, la reepitelización y migración celular se ve más favorecida mediante un tratamiento combinado de fibronectina y factores de crecimiento, (Schultz G 1992, Singh G 1987). No sólo influye la concentración del factor de crecimiento epidérmico, sino también la forma de administrarlo (Gonul B 1995).

El **ácido amino caproico** tópico también ha sido empleado con éxito por algunos autores en el tratamiento de defectos epiteliales persistentes secundarios a lesiones químicas (Williams PB 1999).

Actualmente se está investigando el uso de sustancias como el colirio de

alopurinol (Sekundo W 2002) y el lavado con nuevas drogas como la difoterina (Schrage NF 2002, Gerard M 2002) con resultados esperanzadores.

En la literatura se han encontrado resultados satisfactorios con el uso de otras sustancias como: Healon[®], inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, inhibidores de proteasas como el Trasyolol (Reim MA 1990), propolis (resina natural producida por las abejas)(Ozturk F 2000) en modelos experimentales de causticación corneal en conejos.

El **uso de corticoides tópicos** tras las quemaduras químicas es muy controvertido. Los esteroides reducen la inflamación y proporcionan algún bienestar, pero pueden promover la ulceración del estroma (Brown SI 1970, Donshik PC 1978, Wagoner MD 1984). Dado que el riesgo de ulceración del estroma es escaso en los 10 días siguientes a la lesión (Donshik PC 1978), utilizamos acetato de prednisolona al 1% cuatro veces al día durante los primeros 7-10 días. De todas formas, el uso de corticoides para promover la reepitelización no está exento de riesgos, pues la potencial sobreinfección microbiana debe anticiparse con profilaxis antibiótica. Este potencial efecto adverso sobre la reparación estromal debe ser regulado con la apropiada reducción de la dosis de corticoesteroides o su sustitución con esteroides progestágenos (Philips K 1983, Francois J 1973). Por tanto, si se utilizan durante los primeros siete días tras la quemadura pueden disminuir la reacción inflamatoria del segmento anterior, reduciendo posiblemente algunos de los efectos secundarios como el glaucoma. Después de los siete primeros días, se aplican esteroides tópicos, pero sólo si el epitelio está intacto. Porque sino, podrían retardar la cicatrización corneal y resultar en ulceración y perforación. En caso de intensa inflamación, cicatrización y vascularización progresivas, disminuimos gradualmente la dosis de esteroides hasta que el ojo está estable, pero es

discutible que esta pauta afecte el resultado final.

Ácido ascórbico.

La vitamina C o ácido ascórbico es esencial tomarla a diario para mantener el almacén del organismo. El déficit de la enzima L-glucolactone impide que el ser humano sintetice su propio ácido ascórbico. El ácido ascórbico es un cofactor esencial en la síntesis de colágeno. Su mecanismo de acción en la síntesis de colágeno es la hidroxilación de la prolina (Barnes MJ 1974). La depleción de queratocitos de ácido ascórbico secundaria a la disminución de los niveles en acuoso tras las quemaduras químicas, puede implicar a la síntesis de colágeno durante la siguiente fase de reparación (Pfister y Paterson 1980). Tanto el ascorbato tópico como el sistémico se ha mostrado que disminuye la incidencia, pero no la progresión, de la ulceración estromal, estéril en las quemaduras químicas (Pfister y Paterson 1978, 80; Saika S 1993).

Los niveles de ácido ascórbico en el humor acuoso son al menos 15-20 veces mayores que en el plasma por medio de un transporte localizado en el epitelio de los procesos ciliares. La razón de este alto nivel de ácido ascórbico en el ojo es desconocida. Como indicamos anteriormente, los niveles de ascorbato en el humor acuoso y en el estroma corneal disminuyen tras las quemaduras por álcalis. El hecho de que el ácido ascórbico estaba muy disminuído en el humor acuoso de los ojos de conejo causticados (a los 20 segundos tras la causticación, 1 N Na OH, 12mm) hizo que se realizaran estudios de investigación donde se concluía que el ascorbato tópico y subconjuntival podía significativamente reducir la incidencia de perforaciones corneales (Pfister RR 1978, 1977, 1980, 1981). En animales de experimentación, la administración de ascorbato impedía la ulceración corneal relacionada con álcalis, siempre que el

tratamiento se iniciara antes del inicio de la ulceración (Pfister RR 1980, 1982). Aunque no es eficaz en causticaciones muy severas, cuando se produce una disminución importante en el número de fibroblastos.

Ácido cítrico

El ácido cítrico es un quelante del calcio que disminuye los niveles de calcio en las membranas celulares y a nivel intracelular, limitando la quimiotaxis, la fagocitosis y la liberación de enzimas lisosomiales de los polimorfonucleares (PMN) (Pfister RR 1980), hechos que explicarían los mecanismos por los que la infiltración corneal por PMN es reducida tras la administración tópica de citrato en córneas causticadas por álcalis, reduciendo la ulceración corneal y el riesgo de perforación. Sin embargo, en un estudio, se comparaban a los pacientes que recibían ascorbato con un grupo control tratado con citrato, la incidencia de ulceración y perforación era mucho menor en este último grupo (Pfister RR 1981). A diferencia del ascorbato, la administración de citrato también era eficaz si se iniciaba tras el inicio de la ulceración del estroma (Pfister RR 1988). Se ha observado, que el citrato disminuye la actividad de los PMN, entre ella la liberación de mediadores, y la fagocitosis (Paterson CA 1984). Otros ensayos clínicos sugieren el tratamiento mixto con citrato y ascorbato, en el que los pacientes reciben ascorbato o citrato tópico (al 10%) y sistémico (Pfister RR 1988, 1991).

La Galectina-7 es un potencial mediador de la migración del epitelio corneal celular (Cao Z 2003), en un futuro podría emplearse en diversos preparados como estrategia terapéutica.

3.Tratamiento intermedio (2 semanas a 6 meses): La principal complicación en el periodo intermedio es la ulceración del estroma. Como indicamos anteriormente, el

principal objetivo consiste en promover la curación epitelial, ya que ello impedirá la ulceración posterior. Se deben obtener cultivos regularmente, debido al posible papel de la infección microbiana. Se han sugerido diversas sustancias para reducir la progresión de la ulceración, entre ellas los inhibidores de la colagenasa, la heparina (Aronson SB 1970), el citrato y la medroxiprogesterona (Newsome DA, Gross J 1977), si bien no se han demostrado los beneficios clínicos de ningún agente.

Si el tratamiento médico no tiene éxito, es frecuente que un colgajo conjuntival pueda detener la ulceración. Se prefiere la conjuntiva ipsolateral, pero si está necrótica o cicatrizada se puede utilizar la contralateral o la mucosa oral (Ballen PH 1964). También puede utilizarse **pegamento tisular** para impedir la ulceración o para sellar una pequeña perforación. Aunque los adhesivos tisulares son efectivos parando el avance de la ulceración y manteniendo la integridad del globo ocular, su empleo se reserva cuando las terapias médicas y quirúrgicas han fracasado, para restaurar las normales relaciones entre el epitelio y el estroma. Cuando la perforación es inminente, el uso de adhesivos tisulares, especialmente isobutil-cianocrilato (Hystacryl[®]) es preferible (Kenyon KR 1982, Fogle JA 1980). Los adhesivos tisulares previenen una mayor perforación celular, y soportan una reparación estromal y neovascularización con un resultado tectónico estable aunque comprometido visualmente. Además la neovascularización inducida por el tejido adhesivo puede suponer un problema durante la cirugía para visualizar la rehabilitación del ojo.

Algunos autores han empleado con éxito (Su CY, Lin CP 2000) la combinación de pegamento tisular y membrana amniótica para el tratamiento de algún caso de quemadura corneal por álcalis.

Las perforaciones de mayor tamaño se pueden reparar mediante **queratoplastia penetrante o lamelar**, pero los injertos también suelen sucumbir a la ulceración. La cobertura de los injertos con conjuntiva o mucosa puede aumentar su resistencia.

4. Tratamiento a largo plazo (más de 6 meses). Si existe cicatrización intensa de la córnea o del saco conjuntival, se puede recurrir a la queratoplastia o a la cirugía plástica reconstructora. Aunque los resultados de la queratoplastia penetrante han sido a veces alentadores, el pronóstico general de las córneas dañadas por quemaduras por álcalis todavía es incierto. Los resultados obtenidos vienen dados fundamentalmente por la importancia de la lesión, aunque pueden mejorar si se presta especial atención al entorno ocular en el que se coloca el injerto. La cicatrización y la distorsión palpebral, la triquiasis, el simbléfaron, la inflamación y la deficiencia de moco y lágrimas puede amenazar la supervivencia del injerto.

La *queratoplastia penetrante* se debe retrasar hasta que el ojo sane por completo y se resuelva la inflamación, un proceso que requiere por lo general al menos un año, y con frecuencia un año y medio y dos años (Kramer SG 1983, Abel R 1975). Las alteraciones de la posición palpebral y la triquiasis deben corregirse primero, y se debe controlar el glaucoma. Es importante el tejido donante reciente con epitelio sano para disminuir el riesgo de que aparezcan defectos epiteliales precoces. El epitelio del injerto debe ser protegido durante y después de la intervención; para ello se utilizan las lentes de contacto terapéuticas, se coloca un parche continuo o se realiza la tarsorrafia de sutura durante al menos 4 a 6 semanas después de la intervención. Mientras el ojo está abierto, hay que mantenerlo bien lubricado con pomadas y lágrimas artificiales. Se debe

reducir al mínimo la inflamación ocular con corticoides sistémicos o tópicos.

El riesgo de rechazo es relativamente elevado, debido a la presencia de neovasos corneales (Abel R 1975). La capacidad del sistema HLA y de los inmunosupresores, como la Ciclosporina A, el FK 506, el micofenolato de mofetilo, daclizumab y otros, para aumentar el índice de supervivencia del injerto, están siendo investigados actualmente.

Además, los injertos se opacifican con frecuencia, debido a la escasa curación epitelial. Si existen defectos epiteliales, éstos curan lentamente, pudiendo producirse una ulceración del estroma o la separación de la herida. Si se ha producido una extensa lesión límbica, el epitelio del huésped es anormal, con menos capacidad para curar y mantener la transparencia corneal. Finalmente, el epitelio anormal crece sobre el injerto y puede afectarse por defectos recidivantes, opacificación superficial y vascularización.

El *trasplante conjuntival* se diseñó para proporcionar un epitelio sano que recubriera las córneas lesionadas por quemaduras térmicas y químicas (Thoft RA 1979, 1982), impidiera la rotura epitelial y redujera la cicatrización y la vascularización corneal central. Se realiza en primer lugar una queratectomía lamelar superficial. En la forma tradicional, se toman cuatro áreas circulares de conjuntiva perilímbica del otro ojo y se suturan en el limbo. Por otro lado, se puede trasplantar un injerto lamelar en forma de media luna que contiene varias horas del limbo (Kenyon KR, Tseng SCG 1989), pero no es posible eliminar claramente la cicatrización corneal profunda o sustituir al endotelio lesionado. Si la lesión es unilateral, puede obtenerse la conjuntiva del otro ojo. Si ello no es posible, puede utilizarse epitelio límbico de un donante, procedimiento que

recibe el nombre de queratoepitelioplastia (Thoft RA 1984).

El trasplante conjuntival está indicado en caso de roturas epiteliales recidivantes o defectos epiteliales persistentes. Este procedimiento sólo parece ser útil tardíamente en el periodo de reparación que sigue a la quemadura, tras la curación primaria del epitelio y la desaparición de la inflamación, o después de una queratoplastia penetrante. También puede ser una alternativa a la queratoplastia penetrante cuando la cicatrización y la vascularización corneal son relativamente superficiales. En estos casos, el pannus y el estroma inferior opacificado se extirpan antes de colocar los injertos de conjuntiva. Debe optimizarse el entorno superficial, como sucede en la queratoplastia.

Otras alternativas son el trasplante de mucosa nasal autóloga (Kuckelkorn R 1994), mucosa oral (Shore JW 1992), cápsula de Tenon orbitaria (Teping C 1989), epitelio artificial (Reim M 1990).

Queratoprótesis. En casos con lesión bilateral grave y múltiples queratoplastias fallidas, pueden utilizarse las queratoprótesis como último recurso para obtener una visión útil (Choyce DP 1980, Castroviejo R 1969, Laibson PR 2002). Se realizan estos implantes en aquellos casos en que, para devolver la transparencia a la córnea, no es factible realizar una queratoplastia laminar o penetrante, debido al estado del terreno receptor, o a que realizadas estas varias veces hayan fracasado. Estos dispositivos tienen muchas complicaciones (Khan B 2001, Ray S 2002) y sólo tienen éxito durante unos pocos años, en el mejor de los casos, si bien pueden proporcionar una buena agudeza visual, aunque un campo visual muy estrecho. La mayoría de las queratoprotesis actuales son derivadas del PMMA, material inerte, pero será superado en un futuro por

nuevos materiales (Yaghouti F 1999).

Trasplante de limbo

Con el relativamente nuevo concepto de que el epitelio límbico contiene la población de células madre, primordiales o stem, y de allí proliferan y se diferencian a células del epitelio corneal se ha desarrollado este procedimiento quirúrgico de trasplante límbico (Kenyon KR, Tseng SCG 1989) para contribuir a la restauración de la superficie ocular en diferentes situaciones clínicas. En 1965 José I Barraquer ya propuso esta técnica de trasplante de limbo conjuntivo-corneal, tomado del ojo contralateral con el objeto de mejorar el epitelio de la córnea dañada por una causticación, como técnica preparatoria para la queratoplastia.

Trasplante de membrana amniótica

Tras causticaciones severas de la superficie ocular, la córnea se reepiteliza por un tejido nuevo de características patológicas desde su origen, frecuentemente conjuntival. Esto supone que estos ojos permanezcan crónicamente irritados, inflamados y con defectos epiteliales persistentes, cicatrización estromal y tendencia a la neovascularización, presentando mal pronóstico para la queratoplastia. Es necesario, por tanto, el reemplazamiento quirúrgico de la superficie ocular en todos los casos en los que no se haya alcanzado una correcta reepitelización, bien para mejorar el pronóstico de una futura queratoplastia o para evitarla.

En 1995 hubo un nuevo resurgir del empleo de la MA para multitud de usos en oftalmología, entre ellos la reconstrucción de la superficie ocular tras causticaciones.



Figura I.10.: Feto humano de 16 semanas de gestación intraútero.

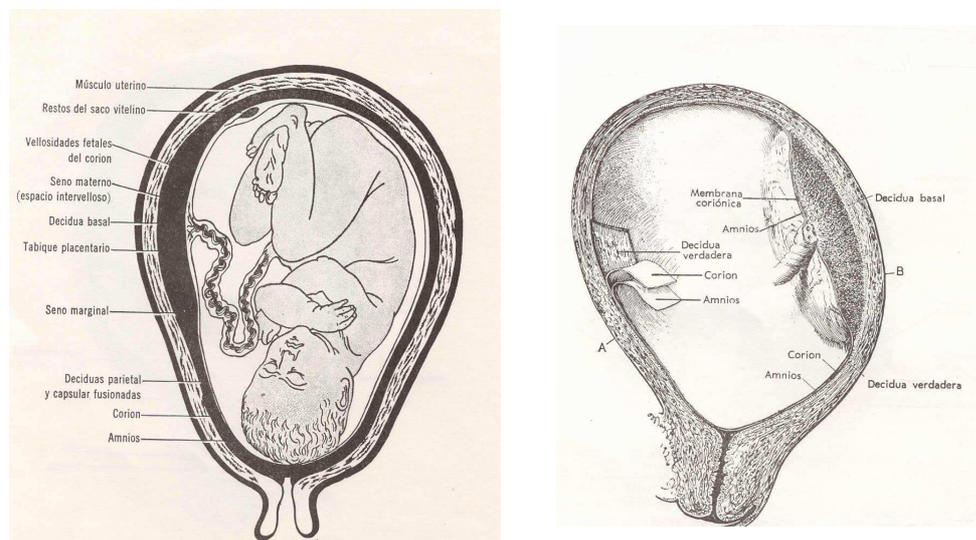


Figura I.11.: Esquema membranas fetales.

I.8. ANATOMÍA DE LA PLACENTA HUMANA

La placenta es un órgano muy especializado, característico de los mamíferos superiores, que interviene de forma decisiva en la nutrición del feto (figura I.10 y I.11.), así como en la regulación de su crecimiento y de su metabolismo durante los 9 meses de una gestación normal.

I.8.1 Estructura macroscópica

La placenta madura es un órgano de forma discoide, que tiene un diámetro aproximado de 15 a 20 cm y un espesor de 1,5 a 2,5 cm, con un peso promedio de 500-600 gramos. Se extiende sobre la cuarta o quinta parte de la cavidad uterina (Dexeus S 1982). En ella se distinguen dos caras (figura I.12.): una materna y otra fetal en la que se inserta el cordón umbilical. La longitud de éste suele ser de 50 cm como

término medio, si bien puede oscilar entre 25 y 150 cm. La cara fetal, orientada hacia la cavidad amniótica, está tapizada por el amnios, una membrana delgada, lisa y brillante que permite reconocer los vasos sanguíneos que recorren la lámina coriónica, y que son continuación de los vasos del cordón umbilical, que se inserta en el centro de dicha cara (figura I.13a y I.13b.). Al final del embarazo dicho cordón tiene una longitud media de 50 cm y un diámetro entre 1 y 1.5 cm. En él hay dos arterias y una vena que poseen una musculatura propia y están rodeadas de un tejido mesenquimatoso, denominado gelatina de Wharton. La cubierta del cordón está formada por el amnios, y junto con la gelatina de Wharton, favorece la circulación sanguínea por los vasos del cordón.

Por la cara materna, la placenta se une al útero. Si se examina después del parto, esta cara tiene un color rojizo y un aspecto sangrante, y en ella se comprueba la existencia de surcos intercotiledóneos que son el resultado de la rotura de los tabiques placentarios durante el desprendimiento placentario. Dichos surcos dividen la superficie de la placenta en 15 a 20 lóbulos placentarios.

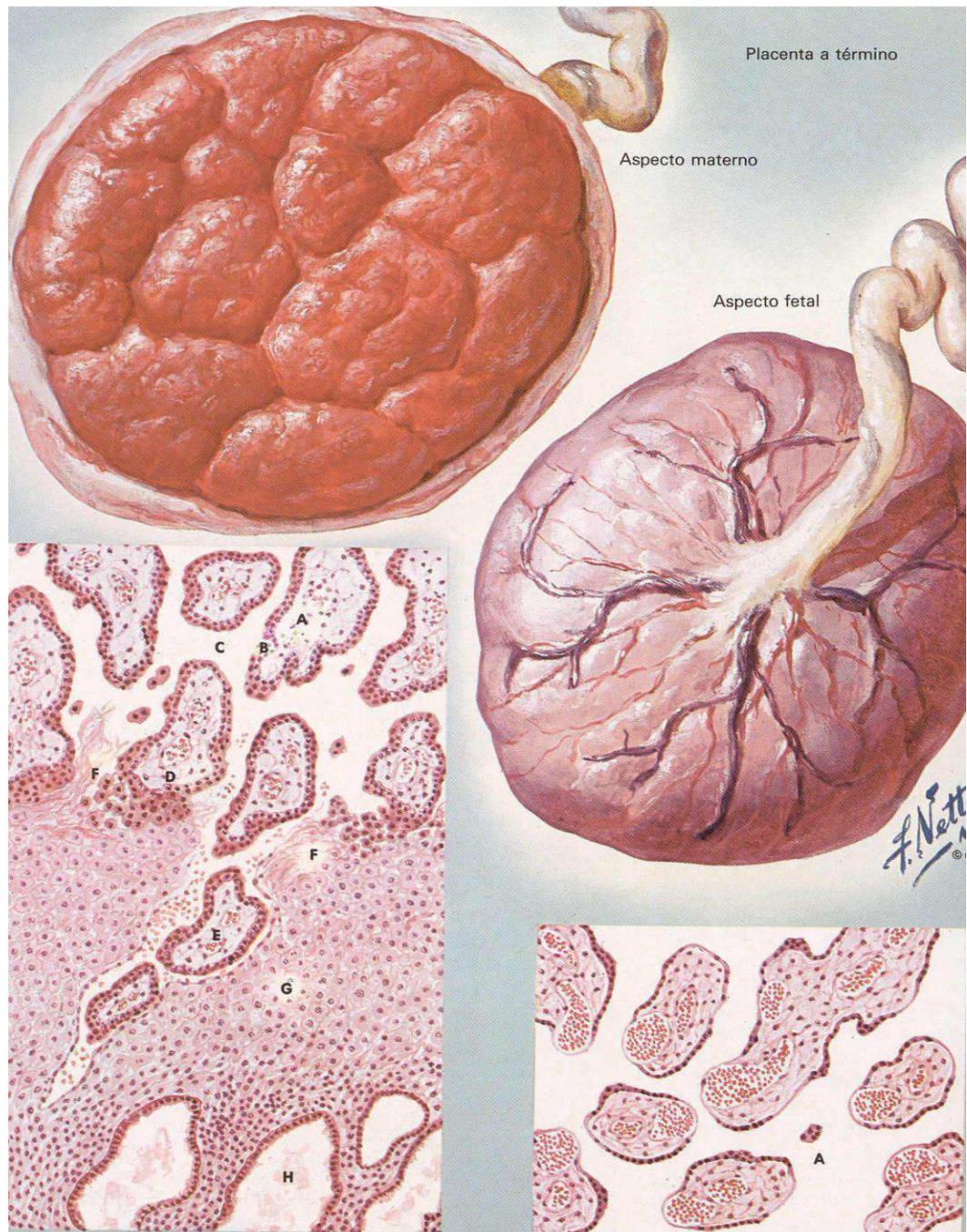


Figura I.12.: Esquema de la cara materna y fetal de la placenta. Tomado del Netter.

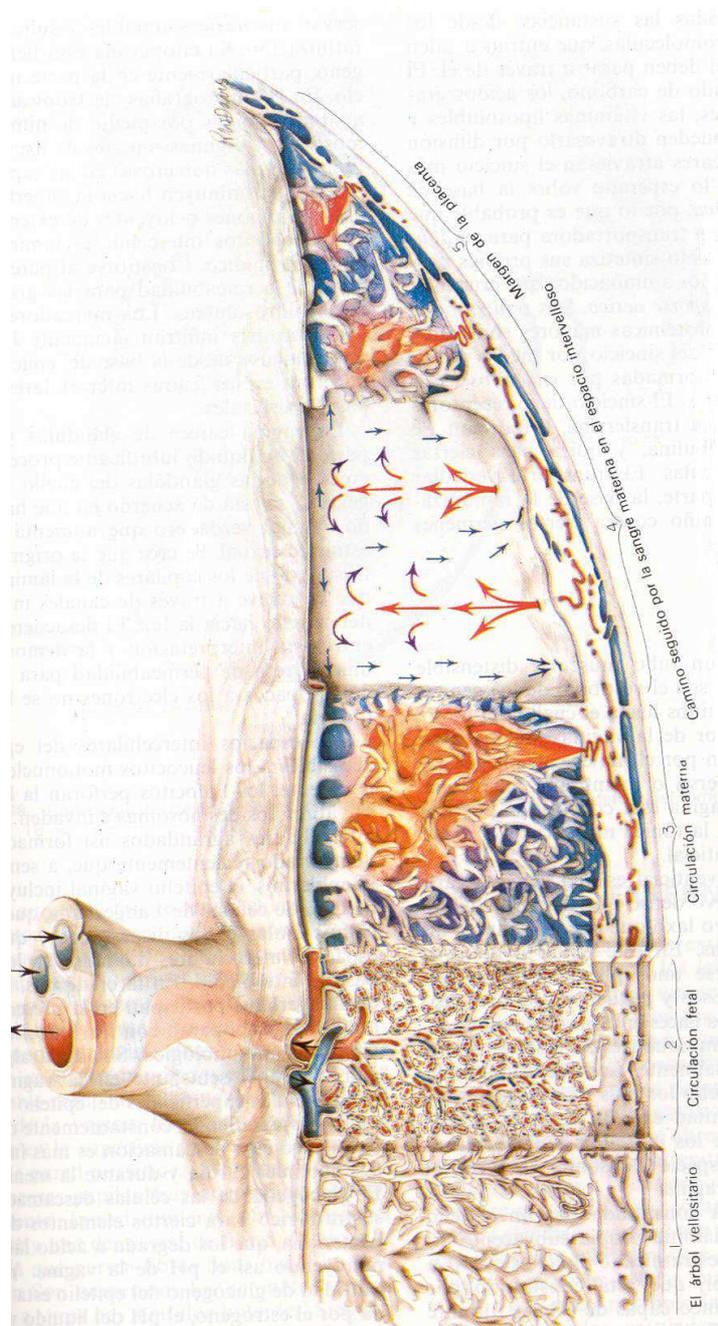


Figura I.13a.: Circulación placentaria.

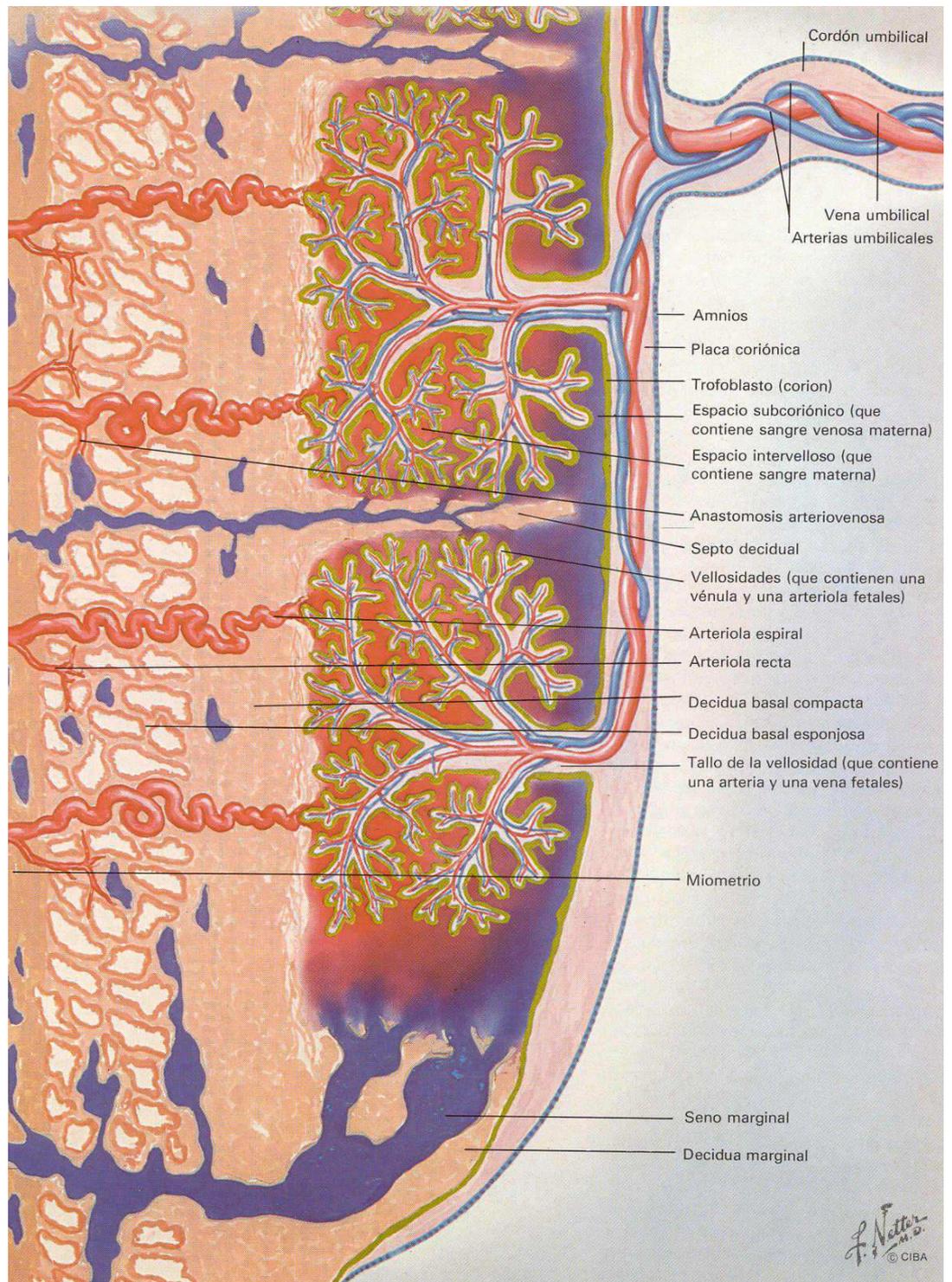


Figura I.13b.: Esquema circulación placentaria.

I.8.2..Estructura microscópica

El cotiledón descrito anteriormente, constituye la unidad funcional de la placenta.

Las vellosidades coriónicas, que se encuentran bañadas por la sangre materna, evolucionan histológicamente a lo largo de la gestación y están formadas por una capa epitelial, estroma y capilares sanguíneos, que con frecuencia se encuentran en íntimo contacto con el epitelio. Por tanto, la placenta humana es hemocorial.

Como hemos comentado, las vellosidades experimentan cambios progresivos durante el embarazo. Así en el primer trimestre hay un número escaso de vellosidades, que presentan un diámetro relativamente grande (170 μ). Su epitelio está formado por dos capas claramente diferenciables: sincitotrofoblasto y citotrofoblasto. El sincitio aparece como una masa citoplasmática con los núcleos repartidos de manera uniforme. Con el microscopio electrónico se observan microvellosidades de 3 μ de longitud en la superficie de dichas células. En su citoplasma se pueden ver vacuolas de contenido líquido que se forma por pinocitosis, y todo el sincitotrofoblasto está delimitado por una membrana basal.

El citotrofoblasto que se encuentra por dentro del sincitio está formado por células cúbicas bien definidas con un núcleo central redondo u ovoideo.

El estroma que está en el centro de la vellosidad es laxo, con escasas fibras conjuntivas y abundante sustancia fundamental de aspecto mucoide. En él se encuentran numerosas células redondeadas u ovoides, las células de Hofbauer, que desde el año

1971 se identifican con los macrófagos. Los vasos, desde su aparición, se sitúan en el centro del estroma.

Los cambios citados afectan al número y al diámetro de las vellosidades, ya que aquel aumenta y este disminuye. Por otra parte, el citotrofoblasto va desapareciendo y los núcleos del sincitio se van agrupando hasta formar los denominados nudos sincitiales. De igual forma, el estroma se hace cada vez más denso y los vasos se desplazan hacia la periferia.

Al final de la gestación, por tanto, las vellosidades (figura I.14.) son abundantes y más delgadas, ya que su diámetro ha disminuído a 40 μ . Sólo se observan algunas células aisladas de citotrofoblasto, y el sincitio ha quedado reducido a los nudos sinciliales, cuyo significado se desconoce en el momento actual. Los vasos vellositarios están en la periferia de la vellosidad, donde contactan con el sincitio y forman, en las zonas anucleadas, las membranas vasculosincitiales, donde las sangres materna y fetal están separadas por una fina capa de sincitio, y el endotelio del capilar fetal con su membrana basal, que se hace más visible en el último trimestre del embarazo. Los capilares fetales están dilatados y ocupan prácticamente todo el estroma, máxime si se tiene en cuenta que el diámetro de la vellosidad ha disminuído.

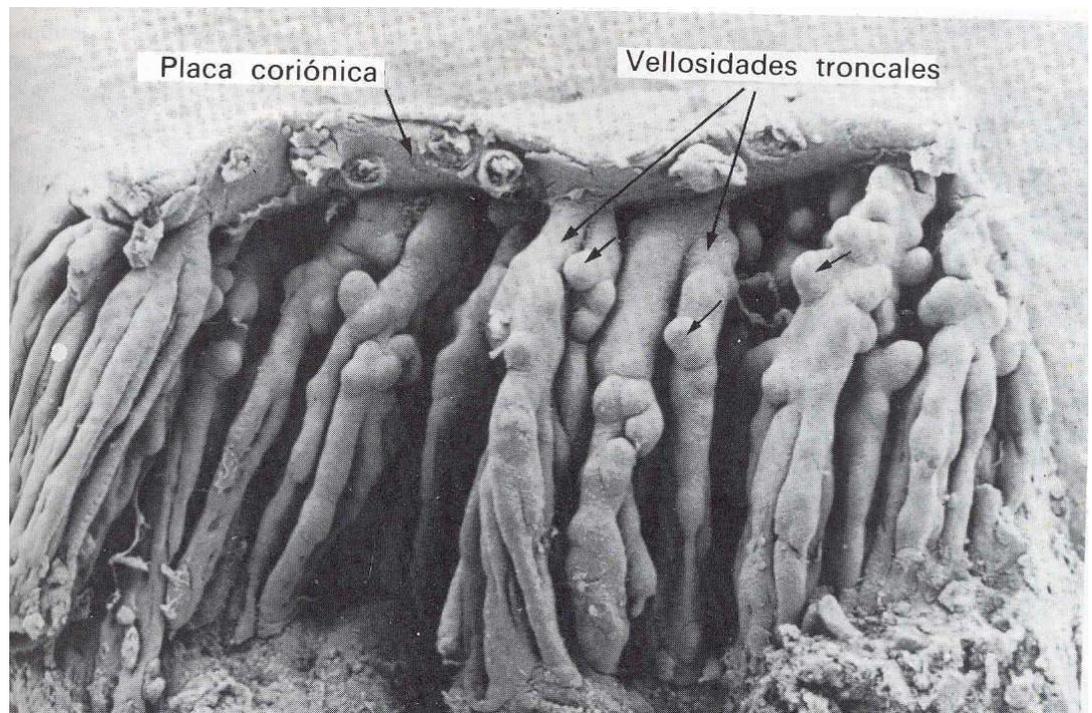


Figura I.14.: Anatomía patológica (microscopía electrónica) de la placenta humana.

I.8.3. Membrana amniótica o amnios

Es una membrana delgada, transparente, plateada, que tapiza la cara interna del corion y de la placa coroidal de la placenta, y forma una vaina al cordón umbilical (figura I.11-I.12). Se debe al crecimiento de la vesícula amniótica, la cual se pone en contacto con el corion y solo está separado de él por una fina capa del mesodermo extraembrionario, que empujó en su crecimiento y se transforma en un tejido mucoide sin vasos.

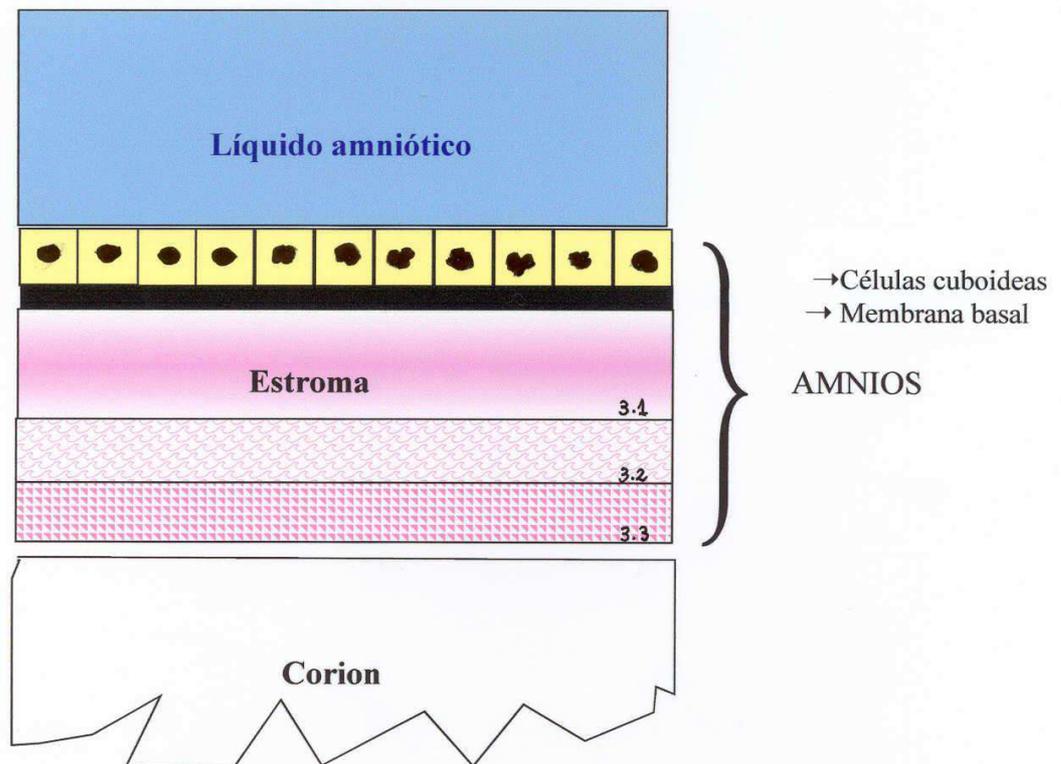
El amnios, derivada del ectodermo, se compone de cinco capas: epitelio,

membrana basal y tres capas mesenquimatosas (esponjosa, capa de fibroblastos y compacta-figura I.15. y I.16.). El epitelio está firmemente adherido a la gruesa membrana basal subyacente. Su uso terapéutico se debe sobre todo a sus propiedades, ya que es una membrana fuerte y resistente pero muy flexible. El amnios carece de vasos sanguíneos y; la nutrición parece realizarse por difusión, si bien se ha descrito una red vascular, linfática y nerviosa. Estas circunstancias pueden ser las que justifiquen su baja antigenicidad y la inexistencia de rechazo tras su implantación. La membrana amniótica está bañada por el líquido amniótico.

El epitelio del amnios es cuboide y al microscopio presenta numerosas vacuolas. Este epitelio posee capacidad de secreción y resorción activas, en relación con la formación de líquido amniótico. Según Shimazaki, el epitelio de la membrana amniótica sobrevive más de 70 días tras la preservación. Tras congelar la MA a -70°C de 6 meses a 1 año, las células epiteliales aparecen muy vacuoladas pero permanecen adheridas a la capa basal subyacente y al mesénquima. La superficie apical de las células amnióticas tienen muchos microvilli. En la base, los procesos ciliares o pedículos se extienden dentro de la membrana basal a modo de podocitos. Los procesos de las células basales tienen una unión con la membrana basal tipo hemidesmosoma con tonofilamentos, y la sustancia de la membrana basal subyacente es parcialmente amorfa y parcialmente microfibrilar (Pollard SM 1976). El citoplasma contiene muchas vesículas pinocíticas, abundantes organelas incluyendo cisternas de retículo endoplásmico y aparato de Golgi. El núcleo tiene una configuración muy irregular con gran número de indentaciones de la membrana nuclear. El nucleolo es a menudo grande y homogéneo sugiriendo actividad

nucleolar. Por otra parte, la ultraestructura del epitelio sugiere que el amnios tiene múltiples funciones especializadas. Está especialmente adaptado a sus tres funciones principales- epitelio de recubrimiento, actividad secretora, transporte intercelular y transcelular intenso-. El amnios es más resistente que el corion; en el momento de la rotura de la bolsa de las aguas durante el parto. El corion suele desgarrarse en primer término, de ahí que en Medicina se emplee el amnios. La permeabilidad del amnios es adecuada, lo cual explica el derrame de líquido amniótico sin rotura de membranas (hidrorrea amniótica) y la acumulación del líquido entre el amnios y el corion (bolsa amniocorial).

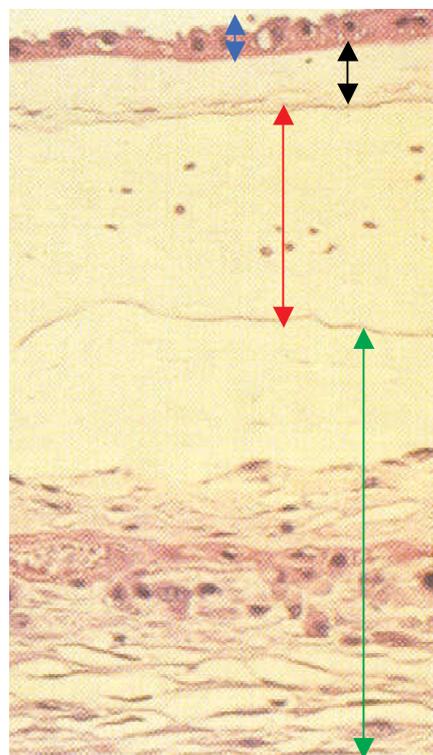
ESQUEMA MEMBRANA AMNIÓTICA



El **amnios**, derivada del ectodermo, se compone de **cinco capas**:

1. EPITELIO (monocapa de células cuboideas)
2. Membrana basal
3. ESTROMA
 - tres capas mesenquimatosas - 3.1 esponjosa
 - 3.2 capa de fibroblastos
 - 3.3 compacta

Figura I.15.: Dibujo esquemático de la estructura microscópica de la membrana amniótica humana.



Epitelio

Membrana basal

Matriz estromal avascular

Corion

Figura I.16.: Histología de la membrana amniótica humana (3 capas) y corion. Tinción con hematoxilina-eosina (HE) $\times 50$.

I.9. ANTECEDENTES DE LA UTILIZACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA. RECUERDO HISTÓRICO.

El uso terapéutico de estructuras relacionadas con la placenta humana es muy antiguo. Debido a sus características como la baja antigenicidad, el potencial antimicrobiano, su capacidad para favorecer la epitelización e inhibir la fibrosis, su fácil obtención y conservación así como el escaso coste, ha hecho que numerosas especialidades médicas empleen este injerto como terapia coadyuvante. En los últimos años se ha despertado un gran interés dentro del campo de la Oftalmología, ya que dadas sus características, la hacen un tejido idóneo para suplir defectos epiteliales en la superficie ocular.

Los precursores del empleo de injertos de membrana amniótica con el fin de sustituir a otro tejido o cubrir defecto epitelial practicaban lo que se conoce como "histioterapia" colocando tejidos placentarios a nivel periocular (Barraquer JI 1951) en el tratamiento de diversas enfermedades. La placenta empleada en lo que se denominaba terapia tisular, era conservada durante 15 días en frío, posteriormente se esterilizaba y se troceaba en pequeños fragmentos que se introducían debajo de la conjuntiva. Durante los años 30-50 la placenta se consideraba una especie de "panacea", de bálsamo de Fierabrás (Sánchez-Salorio 1999) que realizaba verdaderos milagros consiguiendo la curación de patologías oftálmicas como: tracoma, queratitis tuberculosa, coriorretinosis miópica, atrofia del nervio óptico, retinosis pigmentaria,... En la literatura encontramos artículos de autores rusos sobre el empleo de membrana amniótica en la "escleroplastia" para el tratamiento de la miopía progresiva (Zaikova MV 1983, Iumasheva AA 1989, Zaikova MV 1991). Con el empleo de estos fragmentos se pretendía parchear las zonas

de la esclera adelgazadas por la miopía progresiva.

A nivel sistémico, los “efectos” también eran excelentes pues se podían tratar desde dolores de cabeza, falta de apetito, solucionaba problemas de esterilidad masculina,... (Barraquer JI 1951). La utilización de componentes placentarios en cosmética sigue en pleno auge, y el extracto de placenta liofilizada para la utilización tópica en Oftalmología aún estaba disponible en las farmacias hasta no hace mucho tiempo.

Los oftalmólogos antiguamente, para sustituir la conjuntiva dañada, empleaban la placenta al completo (corion y amnios). Pero esta era demasiado gruesa como para sustituir una capa tan fina como la conjuntiva, por lo que se optó por prescindir del corion implantándose únicamente el amnios. Esta técnica se empleaba en el tratamiento de la queratitis tuberculosa, pterigion y en algunos casos de simbléfaron. Su utilización se basaba en la facilidad de obtención comparada con la mucosa labial que hasta ese momento se había utilizado.

Davis JW, en 1910, fue el primero que describió y comunicó el uso de la membrana amniótica fetal como material quirúrgico en el trasplante de piel. Injertó fragmentos de la capa más interna del saco amniótico con el fin de favorecer la granulación de una herida abierta en un quemado. Tres años después se trató con membrana amniótica úlceras cutáneas por quemaduras (Stern W 1913, Sabella N 1913). Estos fragmentos de membrana eran sólo provisionales, pues necesitaban cambiarse a los pocos días porque se creía que podían inducir rechazo (en esta época no sólo se trasplantaba la membrana amniótica sino la placenta entera). Estos cirujanos se dieron cuenta de que empleando injertos de placenta como sustitutos temporales de la piel

observaron una disminución de infecciones en las heridas, una importante reducción del dolor y un aumento de la velocidad de reepitelización de la superficie de piel dañada. Posteriormente algunos autores emplearon la membrana amniótica con éxito en la reconstrucción de heridas cutáneas por traumatismo o quemaduras. Sin embargo, en este periodo también se empleó por otras especialidades como los ginecólogos y traumatólogos (Burger K ya en 1937, utiliza la membrana para reconstruir una vagina).

En Oftalmología, fue De Röth en 1940 quién la utilizó y publicó por primera vez el uso de la membrana (empleó tanto amnios como corion frescos) como un envoltorio conjuntival en la reparación con cierto éxito de defectos conjuntivales en 1940. Probablemente su bajo nivel de éxito (1 de 6 casos) estuvo relacionado con el rechazo al aloinjerto debido a la inclusión de la membrana coriónica viva, que es altamente inmunógena. En 1941 Brown propuso el uso de peritoneo de conejo como parche temporal para cubrir la superficie ocular quemada, promover la curación y prevenir la extensión de la necrosis. Tomando esta idea, posteriormente otro Oftalmólogo (Sorsby A 1946-47) empleó MA “seca” químicamente tratada denominada “amnioplastina”, como parche temporal en el tratamiento de quemaduras oculares agudas. Sin embargo, su uso fue abandonado durante décadas hasta el nuevo resurgir de los años 90 con Kim y Tseng en el Bascom Plamer de Miami (figura I.17). A estos autores debemos la reintroducción del uso de MA en Oftalmología. En 1995 comenzaron sus experimentos con membrana amniótica para la reconstrucción de la superficie ocular de ojos de conejo severamente dañados con n-heptanol y queractetomía lamelar limbar. Demostraron en sus trabajos que el 40% de las córneas de conejo con deficiencia total de las células madre limbares podía reconstruirse reemplazando la superficie ocular

“conjuntivalizada” con una membrana amniótica humana crioconservada. Desde entonces se han publicado un gran número de artículos con un gran espectro de indicaciones oftalmológicas.

El trasplante de membrana amniótica ha mostrado un aumento exponencial de publicaciones oftalmológicas en la literatura científica angloamericana desde mediados de los años 90 como se muestra en la figura I.17. Esto parece ser debido a una mayor disponibilidad de la membrana amniótica, una creciente percepción de su papel en patología oftálmica y a una larga lista de indicaciones.

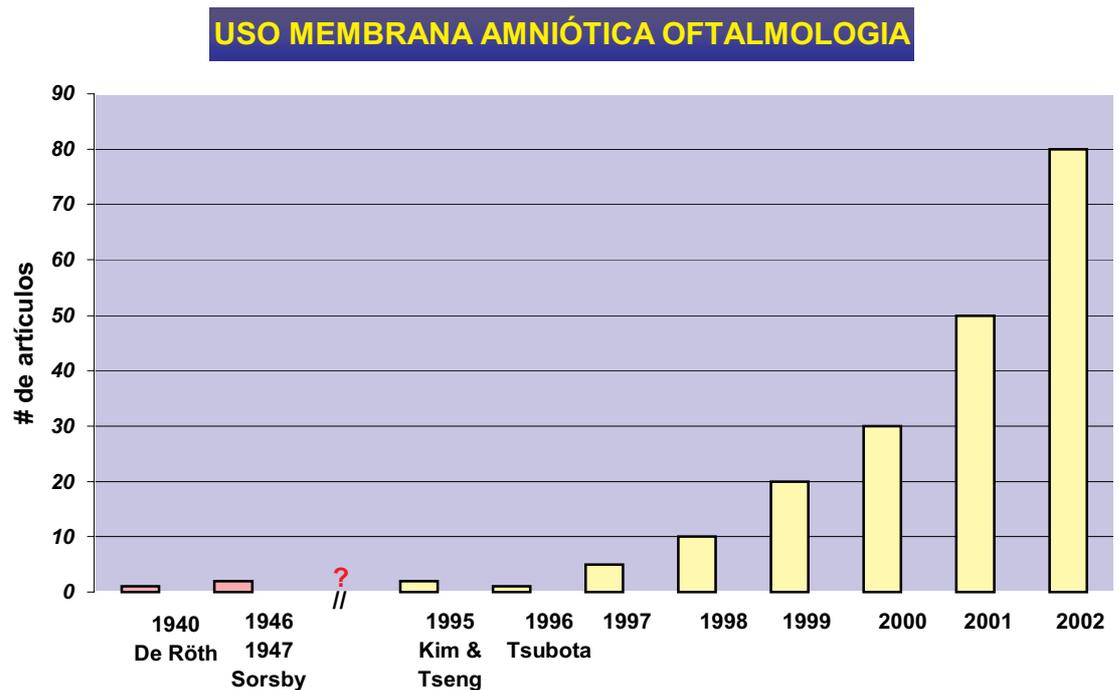


Figura I.17.: Gráfico de uso de la MA en Oftalmología.

Ciertas características hacen de la membrana amniótica un tejido ideal para su aplicación en la reconstrucción ocular. La membrana amniótica no expresa antígenos

HLA-A, B y DR y por ello el rechazo inmunológico tras su trasplante no ocurre. Asimismo, la membrana amniótica tiene propiedades antimicrobianas, reduce el riesgo de infección postoperatoria, promueve la epitelización corneal y conjuntival, así como inhibe la fibrosis, e inhibe la neovascularización, etc....que expondremos a continuación.

I.10. PROPIEDADES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA-MECANISMOS DE ACCIÓN.

Podemos decir que la membrana amniótica presenta las características que debe reunir un buen injerto cuyo fin sea el de cubrir una solución de continuidad. Entre otras, estas son algunas de las muchas propiedades que se le atribuyen:

I.10.1. Regula el transporte hidroelectrolítico

Esta es una propiedad que hace a la membrana amniótica altamente interesante en el tratamiento de los grandes quemados pero que en Oftalmología pierde gran parte de su importancia dado el mínimo tamaño del injerto con respecto a la superficie ocular total. A grandes rasgos, diremos que se trata de un tejido metabólicamente activo que regula la composición del líquido amniótico y produce gran variedad de compuestos activos (hormonas, factores de crecimiento y citoquinas).

I.10.2. Propiedad de disminuir el crecimiento bacteriano

La capacidad antimicrobiana de la placenta ha sido estudiada por autores como Talmi YP (1991). Una de las utilidades más frecuentes de la membrana amniótica en Oftalmología es el recubrimiento de defectos epiteliales corneales persistentes donde el evitar una infección sobreañadida es fundamental. En un estudio experimental Rao y Chandrasekhara (1968) provocaron quemaduras profundas en animales de

experimentación y cinco días más tarde se realizó escarectomía y aposición de membrana amniótica sobre la mitad de la herida. Cultivos posteriores de la zona situada bajo la membrana fueron infructuosos mientras los realizados en la zona descubierta mostraron amplia variedad de gérmenes. Robson y Krizek (1974) demostraron recuentos bacterianos menores en aquellas heridas que habían sido inoculadas con *Pseudomona Aeruginosa* y recubiertas con membrana amniótica que en aquellas recubiertas con injertos de piel o descubiertas. Dado que estos autores no pudieron demostrar en el tejido amniótico la presencia de un factor con actividad bacteriostática o bactericida conocido, postularon que el cierre biológico de la herida con una más rápida instauración de un tejido de granulación bien vascularizado favorece la llegada de leucocitos y la eliminación de restos necróticos. Aunque este mismo experimento no ha sido (hasta donde nosotros tenemos conocimiento) realizado en córneas de animales de experimentación se puede avanzar que el resultado podría diferir dado que la respuesta reparadora que sucede tras un daño corneal es sustancialmente diferente del que sucede en la piel y tejidos blandos. Otra duda es saber si los factores antibacterianos presentes en el líquido amniótico (lisozima fundamentalmente, Schuel H 2002) son formados por el amnios o provienen de la madre. Recientemente se ha publicado un estudio donde se muestra la existencia de ciertos péptidos (“defensinas”) en el fluido amniótico con propiedades antimicrobianas (Espinoza J 2003).

I.10.3. Escasa inmunogenicidad

De las dos partes en que se dividen las membranas fetales (amnios y corion) se conoce que la membrana amniótica se forma a partir del ectodermo fetal por lo que un embarazo es en realidad un injerto. El cómo es posible que un feto llegue a término sin

ser rechazado, es realmente difícil de comprender y puede obedecer a dos factores. 1) Por una parte, se ha podido constatar un cierto grado de inmunodepresión de la madre durante el embarazo, pero, por otra 2) en los tejidos fetales en contacto directo con los maternos se echan en falta la presencia de vasos sanguíneos y linfáticos y de determinados antígenos. Estas características, que le permiten al feto llegar felizmente a término, pueden ser las mismas que nos permitan utilizar la membrana amniótica en Oftalmología sin la necesidad perentoria, como en otro tipo de trasplantes como es el limbar o la queratoplastia penetrante, de inmunosupresión del paciente. Adinolfi y colaboradores (1982, 1986) demostraron con cultivos celulares de epitelio de la membrana amniótica que los antígenos de histocompatibilidad HLA 1, B, C y DR no pueden ser detectados en estas células con las técnicas de inmunofluorescencia habitualmente utilizadas. Sin embargo, sí se puede detectar una proteína relacionada con la 132-microglobulina cuya secuencia es casi idéntica al HLA-G, gen del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I aislado a partir de una línea de células B malignas y que se creía que no se expresaba en ningún tejido humano sano (Adinolfi 1982). El hecho de que la expresión de esta proteína sea máxima al principio del embarazo y baje posteriormente, añadido al hecho de que no se haya podido encontrar en ningún tejido humano, apoya la hipótesis de que el trofoblasto es un tejido antigénicamente inmaduro y, tal vez, incapaz de provocar una reacción de rechazo. De forma experimental se implantaron injertos de membrana amniótica a seis voluntarios, dos de los cuales habían rechazado previamente injertos de piel. La región del implante fue extraída y examinada sin que se encontraran datos de reacción inmunológica. Las muestras de suero extraídas un mes más tarde no mostraron reactividad contra células

del epitelio amniótico cultivadas in vitro. Una comunicación reciente, sin embargo, nos alerta sobre una posible reacción de hipersensibilidad con formación de hipopion (Messmer EM 2001); tras trasplantes repetidos de membrana amniótica procedentes de la misma donante, que se resolvieron con la utilización de esteroides tópicos. Esto sugiere utilizar membrana amniótica procedente de distintas donantes, si es necesario el retrasplante, con fin de minimizar el riesgo de inflamación postoperatoria inmediata (Messmer EM 2001).

I.10.4. Permitir una adecuada reepitelización

La presencia de un sustrato sano en la córnea es esencial para la normal proliferación y diferenciación de las células epiteliales. La membrana basal facilita la migración de las células epiteliales (Tseng SCG 1997), incluso refuerza la adhesión de las células basales epiteliales (Khodadoust 1968), promueve la diferenciación epitelial (Kurpakus MA 1992, Guo M 1989), y previene la apoptosis epitelial (Boudreau N 1995). La membrana amniótica, sirviendo de “membrana basal trasplantada”, actúa como un nuevo sustrato saludable para una adecuada epitelización.

Numerosos autores utilizando muy diferentes membranas basales han llegado a la conclusión de que favorecen una más rápida epitelización. La membrana no es otra cosa que una capa de células epiteliales asentadas sobre un tejido constituido por sustancia fundamental (matriz extracelular, membrana basal). Se ha visto (Koizumi N , 2000, Uchida S 2000 y 2001, Steuhl KP 2001, Touhami A 2002, Choi TH 2001) que la membrana amniótica expresa mRNA de gran número de factores de crecimiento (EGF, GF, HGF y b FGF) que pueden favorecer reepitelización tras su trasplante, tanto si lleva células como si no, aunque las cantidades de factores de crecimiento son

significativamente mayores cuando el epitelio está adherido a la membrana lo cual sugiere un origen epitelial para estos factores de crecimiento. Se ha demostrado que el cultivo de fibroblastos en presencia de una matriz de membrana amniótica reduce la expresión de TGF-beta (Sato H 1998), así como las señales intercelulares vía CD44, integrina b1 y GFR1. El resultado final conforma un fenotipo menos mitogénico, contráctil e iatrogénico que podría explicar en parte el efecto inhibitor de la cicatrización que la membrana amniótica presenta cuando es utilizada en la reconstrucción de la superficie ocular. Este mismo resultado ha sido conseguido por otros autores, que también comunican una supresión del receptor de TGF-beta tipo II y de la diferenciación a miofibroblastos de un cultivo de fibroblastos corneales y limbares en presencia de una matriz de membrana amniótica. Algunos autores otorgan a la membrana amniótica una actividad inhibidora de la proteínasa que podría ser útil en el desarrollo de agentes para el tratamiento de queratitis recidivantes. Asimismo, se ha detectado en el estroma de membrana amniótica criopreservada tinción positiva para los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, agentes con conocido efecto antiangiogénico y antiinflamatorio (Espana EM 2003).

I.10.5 Facilita la migración de células epiteliales

La composición de la membrana basal de la membrana amniótica es similar a la membrana basal conjuntival (Fukuda K 1999). Incluso se parece más a la membrana basal de la conjuntiva que a la de la córnea. Por tanto, representa un sustrato ideal para el crecimiento de las células progenitoras epiteliales (stem cells-células madre). Esta propiedad es de suma importancia, pues hace que el trasplante de MA se pueda utilizar para hacer crecer y expandir las stem cells del limbo que queden y amplificar las células

transitorias corneales durante el tratamiento de las deficiencia limbar parcial, y para facilitar la epitelización de defectos epiteliales corneales persistentes con ulceración estromal. En cultivos de tejido, la membrana amniótica soporta las células epiteliales que crecen en cultivos explantados u otros cultivos, y mantiene su morfología y diferenciación epitelial normal. Las células epiteliales resultantes que crecen en el sustrato duro de la membrana amniótica pueden volver a trasplantarse de nuevo para reconstruir un daño producido en la superficie corneal tanto en humanos como en conejos de experimentación.

Kim y Tseng en sus primeros trabajos experimentales en conejos observaron que tras el trasplante de MA algunos ojos experimentaron una progresiva epitelización con una superficie transparente y escasa vascularización. Dado que las células limbares y corneales habían sido previamente eliminadas, se puede afirmar que las células que cubren la MA derivaban del tejido conjuntival y que la membrana basal de la MA había servido de soporte para la migración de células epiteliales conjuntivales próximas a la lesión.

I.10.6. Inhibidor de la fibrosis

Varios son los factores implicados en el efecto antifibrótico de la membrana amniótica. La membrana amniótica puede también funcionar como una barrera anatómica, manteniendo aparte las superficies potencialmente adhesivas. El estroma de la MA es normalmente avascular y se cree que inhibe la formación de nuevos vasos.

I.10.7. Evita la vascularización de la superficie corneal

Una de las características más importantes de la gran mayoría de los trabajos con trasplante de MA es la coincidencia en destacar la menor vascularización, e incluso

ausencia, en la córnea en comparación con los ojos no sometidos a trasplante de MA. La propia avascularidad de la membrana amniótica podría ser determinante, dado que podría reducir los tejidos de granulación vascularizados y las cicatrices en el postoperatorio.

I.10.8. Efecto antiinflamatorio

El mecanismo por el cual tiene un efecto antiinflamatorio la membrana amniótica no es conocido. Shimura y colaboradores (Shimura S, 2001) explican las propiedades antiinflamatorias de la membrana amniótica mediante la capacidad de atracción y secuestro de las células inflamatorias de la superficie ocular que posee esta membrana. Como consecuencia de esta reducción los signos inflamatorios, clínicamente se traduce en una disminución de dolor para el paciente.

I.10.9. Favorece la diferenciación de un epitelio conjuntival a otro más parecido al corneal.

El epitelio conjuntival humano, es típicamente negativo para los marcadores AE5 y AK2 (dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra componentes específicos de la queratina) y positivo para AM3 (que identifica las proteínas glicosiladas de las células caliciformes, habitualmente presentes en la conjuntiva pero ausentes del epitelio corneal). Mientras que el epitelio corneal presenta unas características tintoriales totalmente diferentes (positividad para AE5 y AK2 y negatividad para AM3). En los trabajos experimentales de Kim y Tseng, las córneas no sometidas a TMA mostraban un fenotipo típicamente conjuntival mientras que aquellas córneas en las que el resultado fue mejor, captaban los anticuerpos AE5 y AK2 sugiriendo la presencia de subunidades de queratina, y por tanto, instauración de un fenotipo corneal. La conclusión que resulta

fácil extraer de lo expuesto anteriormente, es que en determinadas condiciones ambientales el epitelio conjuntival es capaz de modificarse produciendo queratina a semejanza del epitelio corneal (transdiferenciación de epitelio conjuntival a corneal). El concepto de “transdiferenciación conjuntival” es todavía muy controvertido y no ha podido demostrarse que ocurra “in vivo” (Cho BJ 1999, Dua HS 1998) aunque otros autores opinen lo contrario (Goto S 2002). Estudios posteriores realizados en humanos mediante citología de impresión demostraron que el epitelio presente sobre la MA no es un epitelio corneal fenotípicamente, sino que continúa teniendo células caliciformes propias de un epitelio conjuntival (Prabhasawat P 1997, Moyer PD 1996), no demostrándose, por tanto una transdiferenciación de epitelio conjuntival a otro corneal. Debido a esto, otros autores sugieren la necesidad de realizar de manera conjunta trasplante de limbo (que aporta las células madres epiteliales corneales) y de membrana amniótica (que aporta el soporte para proliferar) (Tseng SCG, Prabhasawat P 1998).

I.10.10. Impide la apoptosis de células epiteliales

Estudios en diferentes órganos han demostrado que la presencia de una membrana basal o una matriz extracelular es capaz de evitar la apoptosis de células epiteliales rescatándolas de nuevo al ciclo celular.

I.10.11. Escaso coste y facilidad para su obtención

I.10. INDICACIONES DE TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA EN OFTALMOLOGÍA

En los últimos años, la membrana amniótica humana ha sido empleada en Oftalmología para el tratamiento de multitud de patologías, la mayoría de las veces con éxito. Histológicamente, la membrana, hemos comentado que posee una gruesa membrana basal que le ofrece gran resistencia. La membrana basal parece ser otro modulador extrínseco, como lo sugiere la presencia de keratina K₁₂ (específica de córnea) (Moyer PD, 1996) por parte de las células epiteliales conjuntivales cuando se cultivan membranas basales corneales. El hecho de que la membrana basal sea destruída en muchas patologías que ocasionan cambio del epitelio corneal por conjuntival sugiere que alteraciones de esta, pueda ser una de las causas principales de la “conjuntivalización”, de ahí el uso actual de membrana amniótica para reemplazar la membrana basal destruída.

Podemos sistematizar las lesiones en las que se ha empleado MA según el componente corneal, conjuntival o limbar que predomine:

I.10.1.) Corneales.

I.10.2.) Conjuntivales.

I.10.3.) Deficiencia limbar.

1.10.1. ALTERACIONES PRINCIPALMENTE CORNEALES:

1.10.1.1. Tratamiento de defectos epiteliales persistentes que no respondían al tratamiento médico (Lee SH y Tseng SCG 1997). En este campo es donde se ha tenido una mayor experiencia y con mejores resultados. Entre estos defectos epiteliales

persistentes se encuentran los defectos epiteliales secundarios a queratitis neuroparalíticas, después de queratoplastia penetrante, por exposición, secundarios a infecciones, cicatriciales, postquirúrgicos (queratopatías bullosas sintomáticas), erosiones corneales recidivantes,...

Para algunos autores con el trasplante de membrana amniótica se consigue la restauración del epitelio en escasas semanas con importante mejoría subjetiva de las molestias, ganando en algunos casos transparencia corneal. Otros trabajos consideran que si el defecto epitelial persistente es secundario a una insuficiencia limbar parcial es más adecuado realizar un trasplante de membrana amniótica que un trasplante de limbo (Tseng SCG y cols 1998). Otros consideran que la técnica de trasplante de MA es más útil si se hace en combinación con el trasplante de limbo (Zito E 2002). Para Gris el trasplante de membrana amniótica en los defectos epiteliales persistentes es más efectivo y seguro en combinación con una lente de contacto terapéutica (Gris O 2002, Rosenthal P 2000). Sin embargo, el pronóstico a largo plazo de esta técnica quirúrgica así como su mecanismo de acción está pobremente definido. En la mayor parte de la literatura revisada se apunta que el éxito del trasplante de membrana amniótica depende de la gravedad de la patología subyacente que se esté tratando y del grado de inflamación previa, siendo mejor en líneas generales cuanto menos severa sea la patología y menor el grado de inflamación.

I.10.1.2. Tratamiento perforaciones y microperforaciones oculares.

Se ha descrito con buenos resultados la utilización conjunta de membrana amniótica y adhesivo hístico para sellar perforaciones oculares. Otros autores como

Solomon, considera el trasplante de membrana amniótica como un método efectivo en el manejo de perforaciones corneales no traumáticas, descemetocel y úlceras profundas, utilizando múltiples capas de membrana amniótica (Solomon A 2002). Al menos, sirve de manera temporal hasta reducir la inflamación y hasta la espera del procedimiento restructor definitivo. Es especialmente útil en aquellos países donde la disponibilidad de córneas es escasa.

Otros autores abogan por la utilización de varias capas de membrana amniótica en lugar de una sola, para el tratamiento de diversas patologías, como úlceras corneales infecciosas (Dekaris 2001, Ferreira de Souza 2001), queratitis neurotróficas (Dekaris 2001, Prabhasawat 2001). Degeneraciones corneales calcáreas con microperforaciones (Peris-Martínez 2001),...

I.10.1.3. Queratopatía en banda

Anderson empleó con éxito varios injertos de MA en el tratamiento (Anderson DF 2001) de queratopatías en banda, tras remover los depósitos de calcio.

I.10.1.4. Tratamiento de haze en pacientes con PRK (queratectomía fotorrefractiva)

Se cree que la utilización de la membrana amniótica reduciría la muerte de los queratocitos del estroma anterior tras la realización de la PRK evitando de esta forma la aparición de haze corneal (Hong JW 1998). Otros autores han demostrado que el trasplante de membrana amniótica tras PRK reduce la proliferación de queratocitos y el haze corneal durante el proceso de cicatrización de la herida en ojos de conejo (Choi YS

1998, Wang MX 2001). El mecanismo por el cual se reduce el haz en el ojo de conejo es por la menor respuesta inflamatoria que induce la membrana amniótica (Shimura S 2001) y por la capacidad de inhibir la síntesis irregular de colágeno estromal que se asocia al haz corneal (Woo HM 2001).

I.10.2. ALTERACIONES PRINCIPALMENTE CONJUNTIVALES.

I.10.2.1. Reconstrucción de superficie ocular severamente dañada. La membrana amniótica se ha empleado con éxito para la reconstrucción de los fornices conjuntivales y superficie ocular en general en pacientes con Síndrome de Stevens Johnson (Tsubota K 1997, Solomon A 2002, 2003), penfigoide ocular cicatricial (Solomon A 2002), tras cirugía de estrabismo, tras necrolisis epidérmica tóxica, causticaciones oculares graves (Shimazaki N 1997), degeneraciones calcáreas (Peris-Martínez 2001). Otros autores, primero con conejos de experimentación (Koizumi N 2000, 2001) y luego in vivo (Tsubota K 1999, Shimazaki J 2002, Koizumi N 2001, Avila M 2001) han empleado trasplante de células limbares cultivadas sobre un soporte de membrana amniótica para la reconstrucción de superficie ocular en casos muy severos y no han obtenido resultados superiores al uso de trasplante de MA y trasplante de limbo convencional.

Un niño de 6 años con síndrome de Stevens-Johnson fue tratado con éxito cubriendo el 95% de superficie corporal mediante pequeños fragmentos de amnios (Prasad JK 1986).

I.10.2.2. Cirugía de filtración. Algunos autores han empleado la membrana amniótica localizándola debajo del colgajo escleral en trabeculectomías para inhibir la

fibrosis y promover la filtración. Fujishima y colaboradores la han utilizado en procedimientos de cirugía filtrante en combinación con Mitomicina C (Fujishima H 1998). Otros autores (Kee C 2002, Bundenz DL 2000) también han empleado injertos de membrana amniótica para el tratamiento de fugas de las ampollas de filtración en las trabeculectomías. Pires RT (2000), ha utilizado con éxito el trasplante de membrana amniótica para restaurar la superficie ocular de pacientes con deficiencia limbar parcial secundaria al tratamiento con 5-fluorouracilo en la cirugía del glaucoma.

Se ha empleado también membrana amniótica para recubrir ampollas de filtración tras cirugía filtrante asociadas con hipotonía, cámara anterior poco profunda y desprendimiento coroideo con grave riesgo de endoftalmitis (Bundenz DL 1998).

I.10.2.3. Tratamiento del pterigium primario y recidivante

La membrana amniótica ha sido empleada como una alternativa al injerto conjuntival durante el tratamiento del pterigion. El porcentaje de recurrencias de pterigion después del trasplante de membrana amniótica (10.9% para pterigion primario) resultó ser más bajo que la técnica de la esclera desnuda (45%) (Prabhasawat 1997), pero más alto que el injerto conjuntival autólogo (2.6%, Shimazaki 1998). Diferentes procedimientos han sido utilizados para el tratamiento del pterigion. Aunque el autoinjerto conjuntival, es el método considerado más eficiente, el trasplante de membrana amniótica parece ser una opción razonable en casos con afectación conjuntival difusa y en pacientes en los cuales toda la conjuntiva bulbar debe ser preservada para una posterior cirugía filtrante de glaucoma. En nuestra experiencia en el tratamiento del pterigion primario, creemos que el trasplante de conjuntiva libre es

superior al injerto de MA. Shimazaki 2003 sugiere que la combinación de trasplante de MA y conjuntival disminuyen las recidivas en el prerigion.

I.10.2.4 Simblefaron y cicatrices conjuntivales

Se ha descrito también la utilidad del implante de MA tras la resección del simblefaron (Shimazaki J 1998) y cicatrices conjuntivales tanto en pacientes con penfigoide ocular cicatricial o Síndrome de Stevens Jonhson (Tsubota K 1996) como causticaciones (Shimazaki J 1997)(véase epígrafe I.10.2.2.). Conjuntamente con injertos-recubrimientos esclerales, la membrana amniótica se ha utilizado en casos de perforación escleral en el Síndrome de Marfan (Rodríguez-Ares MT 1999).

I.10.3. DEFICIENCIA LÍMBICA

La insuficiencia límbica es una entidad clínica como consecuencia de la destrucción de las células madres limbares en mayor o menor cantidad y por diferentes causas. Clínicamente la destrucción de las stem se traduce en conjuntivalización, neovascularización, inflamación crónica, y defectos epiteliales persistentes o recurrentes (Tseng SCG 1996). Este conjunto de enfermedades pueden subdividirse en dos categorías principales (deficiencia limbar total y parcial). La insuficiencia limbar total se caracteriza por la destrucción total de la población de células limbares, producida por ejemplo por una quemadura química o térmica, Síndrome de Stevens Jhonson, procedimientos quirúrgicos múltiples o crioterapia en la región limbar, portador de lentes de contacto, o infección severa. La deficiencia limbar parcial incluye varias entidades, donde las células stem, sólo están destruídas en parte, como la aniridia, deficiencia endocrina múltiple, limbitis, queratitis inflamatoria, queratitis neurotrófica e

isquémica, y pterigion y pseudopterigion. Ante la sospecha clínica de insuficiencia límbica podemos llegar a un diagnóstico de certeza mediante la citología de impresión (Puangsricharern V 1995, Dart J 1997) para confirmar si existe y en qué grado de severidad. En los casos de insuficiencia parcial o hipofunción de las células madre, el implante de MA puede conseguir estimular la actividad de las células stem sobre la membrana basal amniótica y ser suficiente como para conseguir una mejoría clínica (técnica de injerto). Esto constituye uno de las mayores aplicaciones de la MA en la actualidad, al ofrecer una alternativa al trasplante de limbo sin la necesidad de la inmunosupresión sistémica asociada que requiere este último, durante 2-5 años. Por el contrario, si el déficit de las células stem es total será necesario el auto o alotrasplante de limbo para conseguir un resultado satisfactorio. También en estos casos el trasplante mixto de limbo y MA (Tseng SCG, Prabhasawat P 1998) puede ayudar a mejorar el resultado final y disminuir la incidencia de rechazo, ya que reduce la inflamación. La neovascularización y mejora el microambiente perilímbico y por tanto la actividad de las células stem.

I.12. INDICACIONES NO OFTALMOLÓGICAS

Los tejidos placentarios humanos (y bovinos en casos aislados), han sido utilizados de muy diversas formas por varias subespecialidades quirúrgicas y médicas.

Trelford en sus publicaciones nos muestra una revisión bastante completa con respecto a este tema (Trelford 1979).

I.12.1. Cirugía plástica

Tal vez la primera aplicación utilizada sea como recubrimiento temporal en

pacientes con quemaduras importantes. Algunos autores comunicaron que en este tipo de pacientes, el trasplante de membrana amniótica repercutía en una menor pérdida de líquido, electrolitos y proteínas y en una más rápida epitelización de la herida (Colocho G 1974). De la misma forma también se ha mostrado útil en el tratamiento de úlceras en las extremidades inferiores (Ward DJ 1984) úlceras de decúbito y otros tipos de úlceras de difícil cicatrización (Troensgaard-Hansen E 1950). En pacientes traumatizados con amplias pérdidas de tejidos blandos con exposición de huesos, nervios, tendones y vasos que no permiten un cierre inmediato por posible contaminación, la implantación provisional de membrana amniótica sobre el área afectada permite mantener la viabilidad de los tejidos hasta que sea posible el cierre definitivo de la herida (Subrahmanyam M.1995).

I.12.2. Ginecología

El recubrimiento con membrana amniótica ha sido utilizado con relativo éxito como agente favorecedor de la epitelización, en la prevención de sinequias y en la cirugía vaginal (Trelford JD 1979) atresias o reconstrucción tras cirugía, generalmente traumática u oncológica. Diversas técnicas de vaginoplastia con membrana amniótica han sido descritas para el tratamiento de atresias vaginales (Nguyen-Dinh-Mac 1988, Tolhurst DE 1991, Dhall K. 1984, Georgy MS 1996) y malformaciones vaginales (Morton KE 1986, Ashworth MF 1986) obteniendo excelentes resultados.

I.12.3. Cirugía general

Experimentos con animales han demostrado que el implante de membrana

amniótica humana tras una resección intestinal amplia favorece el desarrollo de una neomucosa que podría ser útil desde el punto de vista funcional. Otros autores han documentado que la membrana amniótica da lugar a la producción de una menor cantidad de adherencias peritoneales (Gharib M 1996) cuando es utilizada para reemplazar el peritoneo parietal tras la provocación experimental de un proceso inflamatorio o infeccioso. En algunos casos su utilización tras técnicas quirúrgicas de las que resultan heridas electivamente abiertas (mastectomías radicales, amputaciones abiertas, escisiones de quistes pilonidales,...) resultó en un postoperatorio más confortable y una más rápida cicatrización. Situación similar se dio en un paciente con gastrosquisis (Kennekampt H-U 1994) y en otro sometido a una glosectomía.

I.12.4. Endocrinología

El trasplante de islotes de Langerhans para el tratamiento de la diabetes mellitus se ha demostrado como una técnica prometedora. Uno de los principales problemas que comporta, como todo trasplante de órgano sólido, es el rechazo del órgano trasplantado. Además de los fármacos inmunosupresores una posible opción terapéutica sería el aislamiento de estas células del sistema inmunológico del receptor. Trabajos recientes experimentales con animales, han demostrado que la membrana amniótica puede actuar como agente inmunoaislante impidiendo a las células situadas en su interior entrar en contacto con el sistema inmune del receptor y de esta manera evitando o reduciendo las posibilidades de rechazo.

En el tratamiento de errores congénitos del metabolismo, se ha visto que la membrana amniótica posee una elevada actividad esfingomielinasa, enzima que es

deficiente en la enfermedad de Niemann-Pick. Se ha descrito un caso de mejoría clínica evidente en un niño de 14 años con un cuadro florido de este síndrome tras el implante de un extracto de membrana amniótica aunque fue necesario repetir estos implantes con el fin de conservar una; actividad esfingomielinasa aceptable. A un nivel más experimental se ha demostrado que en el líquido sobrenadante obtenido tras cultivar células epiteliales del amnios, existen cantidades de enzimas suficientes para, normalizar los niveles de glicosaminoglicanos, en cultivos de fibroblastos procedentes de pacientes afectados de enfermedad de Hurler I y Hunter (Akle C 1985, Adinolfi M 1986). En ese mismo trabajo se encuentran niveles elevados de arilsulfatasa A o glucosidasa (entre otros), enzimas que son deficientes respectivamente, en la leucodistrofia metacromática y en la enfermedad de Pompe. El implante de células epiteliales de la membrana amniótica tendría la ventaja frente a otros ya utilizados como el de médula ósea, en la no posibilidad de reacción del injerto frente al huésped y la no necesidad de inmunosupresión, siempre según los mismos autores.

I.12.5. Cirugía ortopédica

La práctica de una artroplastia de cadera utilizando una multicapa de membrana amniótica ha sido ampliamente utilizada en algunos ámbitos en el tratamiento de la artritis tuberculosa, con buenos resultados en cuanto a ausencia de síntomas y movilidad de la articulación en un muy elevado porcentaje de pacientes (Prasad JK 1986).

I.12.6. Otorrinolaringología

Reemplazando a la mucosa nasal por membrana amniótica en casos de

telangiectasia hereditaria familiar hemorrágica (enfermedad de Rendu-Osler-Weber) se ha conseguido en muchos pacientes una rápida y persistente mejoría de los episodios hemorrágicos. Se ha intentado su utilización en timpanoplastias, obteniendo resultados poco satisfactorios. Su utilización tras amplias resecciones en cirugía al nivel auricular, ha resultado en una más rápida epitelización de la herida. También se ha utilizado membrana amniótica liofilizada en vestibuloplastias y en la reconstrucción de la cavidad oral y laríngea (Zohar Y 1987).

I.12.7. Urología

En animales se ha experimentado, con buenos resultados, la reconstrucción de la vejiga urinaria con membrana amniótica humana estabilizada con glutaraldehído (Norris MA 1982). También, en humanos se ha reconstruido con éxito una vejiga urinaria utilizando membrana amniótica fresca (Fishman IJ 1987).

I.12.8. Neurología

En animales de experimentación, se ha demostrado, que tras la cirugía radical pélvica con ablación de los nervios cavernosos, la combinación de factores de crecimiento neuronales, injertos nerviosos e injertos de membrana amniótica como matriz que favorece la regeneración neuronal permite recuperar la actividad autonómica regional comprobada eléctrica y clínicamente con una restauración de la función eréctil (Burgers JK 1991). De una forma análoga, tras realizar la separación entre el septo y el hipocampo en ratas, se colocó una tira fina de membrana amniótica con un extremo situado en el septo axotomizado y el otro en el hipocampo denervado. Tres meses

después de la cirugía se pudo apreciar claramente el crecimiento de fibras nerviosas sobre el lado laminina-positivo de la membrana amniótica pero no en el lado laminina-negativo, concluyéndose que la membrana amniótica puede ser un agente adyuvante importante en los estudios sobre la reparación del sistema nervioso central (Danielsen N 1988).

I.13. RESUMEN PROTOCOLO ESTÁNDAR DE OBTENCIÓN, PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN de la MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA.

El método de preparación de la membrana amniótica ha sido descrito por diversos autores. Tseng elaboró un método propio de preparación de este tejido con la finalidad de que no haya células viables y que sus propiedades físico-químicas sean manipuladas mínimamente, haciendo que la MA fuese un injerto ideal para la colocación sobre un sustrato (matriz) sin obtener respuesta inmune. Esta modalidad en el procesamiento y distribución de la MA fue revisada por Dua en su artículo en 1999. Todos los criterios han sido unificados en el artículo publicado por la Food and Drug Administration, USA (Normativa final: filtrar y examinar los tejidos humanos donados para trasplante-29 de Julio de 1997, y Guía para la Industria: validación de los procedimientos para el proceso de donación de tejidos humanos para trasplante, Marzo de 2002). Este producto también está comercializado bajo el nombre AmniograftTM (Bio-Tissue, Inc Miami, FL) del cual tiene la patente Scheffer C Tseng (Bascom Palmer Eye Institute, Miami, Florida) de preparación y usos clínicos de la MA. Recientemente en Mayo de 2003 también se ha comercializado membrana amniótica deshidratada y

esterilizada que no precisa refrigeración para su conservación AmbioDry™ (OKTO-OPHTHO). Tampoco lleva papel de filtro adherido para su conservación, es acelular y en condiciones de máxima esterilidad. En estado seco, podemos recortar el tamaño del fragmento de MA que consideremos más apropiado con mayor facilidad. Durante la cirugía podemos hidratar el fragmento empleado, en minutos.

En nuestro caso, basándonos en el modelo de procesamiento de MA de Tseng y colaboradores, obtenemos la placenta inmediatamente después de una cesárea electiva de un feto sano. Previamente se han descartado, mediante pruebas serológicas, los virus de inmunodeficiencia humana (VIH), de la hepatitis tipo B y C y la sífilis. Bajo condiciones de esterilidad, la membrana se limpia de coágulos de sangre bajo una campana de flujo laminar con suero fisiológico que contiene: Penicilina, 50 mg/ml; Estreptomina, 50 mg/ml; Neomicina, 100 mg/ml; y Anfotericina B, mg /ml. La membrana amniótica se separa del resto del corion mediante disección roma a través de los espacios virtuales situados entre estos dos tejidos, y se extiende sobre un papel de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 μ m. La superficie epitelial de la membrana amniótica debe colocarse hacia arriba sobre el papel de filtro, mientras que la superficie estromal debe ponerse en contacto con el papel referenciador. El papel con la membrana amniótica adherente se corta en círculos de 2 cm de radio almacenándose antes del trasplante a -80 °C en placas de Petri estériles durante un mes. Pasado este mes, se volverá a corroborar la seronegatividad de la madre para VIH, hepatitis B y C, así como sífilis. Esta conservación a - 80 °C y su posterior descongelación desvitaliza todas las células de la MA, dando como resultado una MA no viable pero biológicamente activa. El medio de conservación que se utiliza será 50% DMEM y 50% glicerol de la casa

Dulbecco. Otros autores utilizan otros medios de conservación como el Optisol® (mucho más costoso) o el suero fisiológico.

I.14. SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA MEMBRANA AMNIÓTICA

La transmisión de agentes infecciosos es uno de los riesgos asociados con el trasplante de órganos y tejidos. Los mismos criterios de seguridad aplicados al trasplante de órganos deberían aplicarse, incluso más estrictamente para un tejido como la MA. Todos los receptores de órganos y tejidos deben ser advertidos de que los donantes han sido testados para algunas infecciones (Sífilis, virus de la inmunodeficiencia humana-VIH, Virus Hepatitis B y C), pero que existe una ligera posibilidad de que el donante este infectado por ejemplo, durante el periodo ventana, es decir cuando el donante está infectado, pero los test de detección no son todavía positivos. Este tejido debería usarse para trasplante sólo cuando todos los test sean negativos. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de infección mediante patógenos para los cuales el test no está disponible como el de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob producida por un prion. La infección también puede ocurrir durante el proceso de preparación del tejido. Las pacientes sometidas a cesáreas electivas o programadas son las de elección, porque llevan un estudio más riguroso de estas pruebas serológicas. Así, se reduce el riesgo de contaminación bacteriana tras el parto o la ruptura prematura de membranas fetales. Tras la identificación de un potencial donante, obtendremos una detallada historia clínica. El responsable de la recogida del tejido debe asegurarse de que la donante no entra dentro de ningún grupo de riesgo. Las donantes con riesgo, de ser positivas para el virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, sífilis e

incluso toxoplasma, deben excluirse.

I.15. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS CON EL EMPLEO DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA.

Son muchas las preguntas que nos planteamos al emplear la membrana amniótica para la reconstrucción de la superficie ocular puesto que la literatura muestra varias opciones para una misma patología, por lo que vamos a tratar de unificar criterios:

- . ¿Cuántas capas empleamos una o varias?
- . ¿Qué orientación?
- . ¿Cuál la amplitud óptima del fragmento a emplear?
- . ¿Qué sutura utilizo?
- . ¿Fresca o criopreservada?
- . ¿Es el primer trasplante de MA o ya se han realizado varios en ese paciente?

Existen diversas técnicas básicas descritas para trasplantes de MA (Tabla I.15.). La técnica más apropiada será en función de la indicación clínica. La membrana amniótica criopreservada se almacena en condiciones habituales adherida por su lado estromal a un papel de nitrocelulosa referenciador. Una vez separada de este papel puede ser difícil identificar el lado epitelial del lado estromal de este tejido semitransparente. El lecho estromal es más “rugoso” ópticamente bajo el microscopio quirúrgico que el lado epitelial. Por otro lado, el lado estromal también es más “pegajoso” que el epitelial (Dua HS 1999, Azuara-Blanco A 1999), de tal manera que adhiriendo una “hemosteta” o flecha esponjosa de microcrugía a la parte estromal aparecerá una brida “a modo de vítreo” entre la hemosteta y la membrana.

TECNICAS QUIRÚRGICAS MA
1. Técnica monocapa
-Injerto
-Parche
2. Técnica multicapa
3. Expansión ex vivo de células madre

Tabla I.15.

I.15.1. Técnicas de membrana amniótica MONOCAPA

I.15.1.A. Técnica de membrana amniótica como INJERTO

La técnica de injerto consiste en colocar la MA dentro del lecho ulceroso o defecto estromal, para que de esta manera, la MA proporcione un sustrato favorable para la epitelización rápida (figura I.18.). Estudios histológicos han demostrado la remodelación de la matriz estromal de la MA con las células del lecho receptor del huésped.

-El tamaño del fragmento de MA que debemos emplear para rellenar el defecto, debe ser similar al tamaño del lecho ulceroso, de tal modo que no sobrepase los bordes.

-La MA se debe colocar con la superficie epitelial mirando hacia arriba y la estromal hacia abajo. De esta manera se presenta una membrana basal “sana” para que las células epiteliales circundantes del tejido receptor puedan migrar hacia el otro lado.

-Es aconsejable mantener la MA estirada y sin arrugas ni pliegues para que no se acumule sangre ni otros fluidos por debajo de ella.

-Si suturamos la MA al tejido corneal circundante es preferible hacerlo mediante nylon monofilamento de 10-0. Otros autores prefieren emplear poliglactina (vicryl) 9-0 y/o 10-0 porque no hay que retirar la sutura, al ser reabsorbible.

-Si anclamos la MA al tejido conjuntival circundante y/o epiescleral se recomienda emplear poliglactina (vicryl) 9-0.

-Las lentes de contacto terapéuticas pueden ser útiles así como la tarsorrafia mediante sutura, mediante toxina botulínica o mediante otro injerto de MA empleando la técnica del parche (véase apartado I.15.1.B).

Es importante antes de suturar la MA a modo de injerto, desvitalizar los bordes de la lesión o lecho ulceroso de tejido muerto necrótico para anclar la MA a tejido sano.

Injerto o técnica "intracapa"

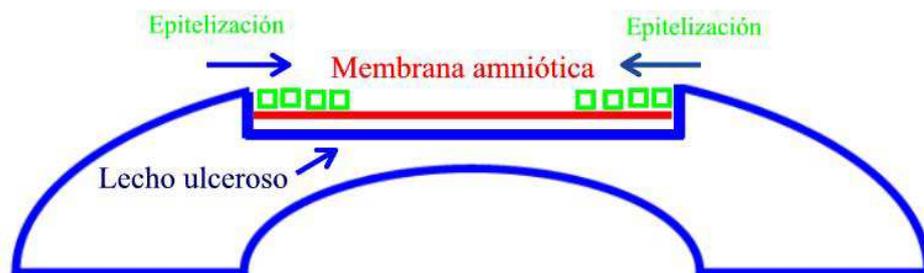


Figura I.18.: Esquema técnica de MA como injerto.

I.15.1.B. Técnica de membrana amniótica como PARCHÉ

Mediante el empleo de MA a modo de parche, se deposita el fragmento de MA sobre la zona a tratar (como defectos epiteliales persistentes..., generalmente bastante amplios) y se sutura a la córnea sana circundante o al epitelio conjuntival. Cuando se emplea de este modo, la MA funciona esencialmente como una lente de contacto terapéutica biológica temporal (figura I.19.). La membrana amniótica tarda en reabsorberse entre 3 y 4 semanas aproximadamente. Por lo tanto, no sólo actúa proporcionando una barrera mecánica protegiendo el epitelio en curación, del movimiento del párpado, sino también actúa como una barrera fisiológica para proteger la córnea subyacente o el estroma limbar de los mediadores de la inflamación segregados en la película lagrimal y de la infiltración de las células inflamatorias.

Además de estas barreras, la proximidad de la MA (con sus componentes de matriz fetal) sirve para modificar la respuesta subyacente del receptor proporcionando un microambiente no inflamatorio y no cicatrizante. Esta respuesta modificada de cicatrización de la herida asemeja a la descrita en un trabajo de curación de las heridas sin cicatriz (Longaker MT 2001). La orientación del fragmento de membrana amniótica no parece ser tan importante con la técnica del injerto como en la técnica del parche, aunque también se recomienda que el estroma de la MA se oriente hacia abajo. El parche se ajusta holgadamente anclado a la conjuntiva y/o epiesclera circundante preferiblemente mediante sutura continua que cierre a modo de cremallera. Se suele emplear poliglatina (vicryl) de 9-0 alrededor del limbo esclerocorneal.

Parche o técnica "sobrecapa"

Membrana amniótica

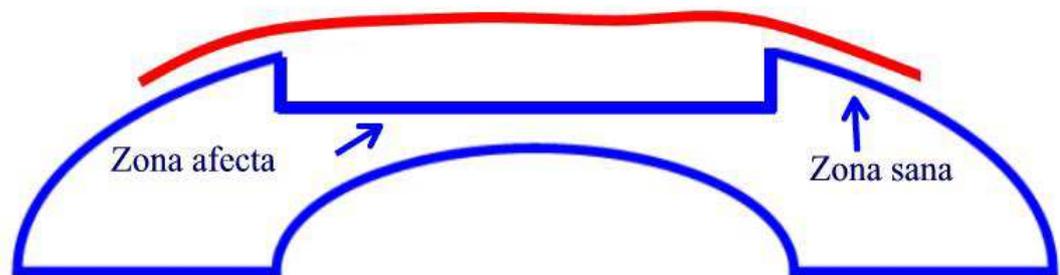


Figura I.19.: Esquema técnica de MA como parche.

I.15.2. Técnica de membrana amniótica MULTICAPA.

En esta técnica, también denominada de llenado, se emplean varias capas de MA para tratar úlceras profundas e incluso microperforaciones (figura I.20.). Aunque la orientación de las capas más profundas parece no tener importancia, se recomienda de nuevo que la capa más superficial tenga el epitelio (membrana basal orientada hacia arriba) hacia arriba, impulsando de esta forma la epitelización sobre la superficie de la membrana amniótica del tejido receptor circundante sano. Sólo se necesita suturar la capa más superficial de la MA, utilizando técnicas de sutura similares a las descritas con la técnica del injerto.

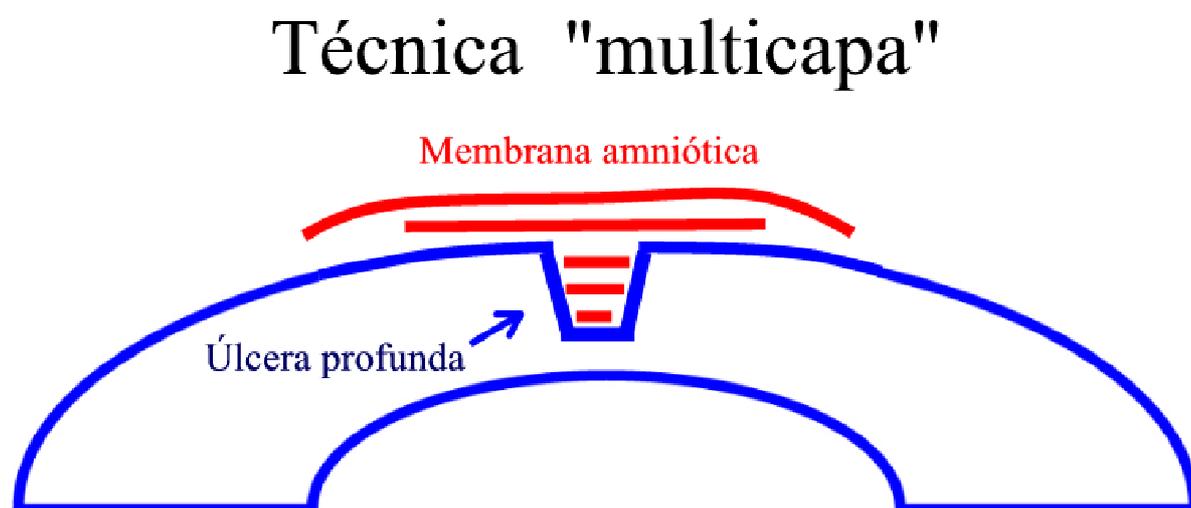


Figura I.20.: Esquema de técnica de empleo de MA en múltiples capas.

I.15.3. Expansión ex-vivo de las células madre epiteliales

En 1997 Pellegrini y colaboradores emplearon las técnicas de cultivos tisulares para cultivar líneas de células epiteliales a partir de una pequeña biopsia de limbo. Presuntamente, esta biopsia, contenía células madre limbares obtenidas a partir de ojos sanos de dos pacientes con causticaciones oculares por álcalis unilaterales (Pellegrini G 1997). Las células limbares cultivadas, fueron posteriormente trasplantadas a los ojos contralaterales dañados y el autoinjerto epitelial corneal regenerado se mantuvo estable durante un periodo de dos años. Esta técnica de expansión ex-vivo del tejido limbar tiene ventajas obvias donde hay una disponibilidad limitada de tejido limbar del ojo donante enfermo y presenta menos riesgo potencial que un ojo sano donante. No hay tampoco ningún riesgo de rechazo del aloinjerto, ni necesidad de inmunosupresión sistémica.

El sustrato de MA ofrece varias ventajas sobre el método original de Pellegrini, ya que la MA ayuda a la expansión ex vivo de las células epiteliales limbares proporcionando (figura I.21.):

- Un sustrato natural de soporte grueso.
- Un trasplante más fácil del tejido del injerto desde el laboratorio hasta el quirófano y al ojo del paciente.
- Acciones biológicas únicas de la MA en el tejido circundante.

La validez de este método ha sido ahora probada en sistemas de cultivo . (Cho BJ 1999; Meller D 1999, Koizumi N 2000), animales de laboratorio (Sorsby A 1946, Schwab IR 1999) y pacientes humanos (Koizumi N 2000, Cho BJ 1999, Meller D 2000, Tsai RJF 2000, Meller D 1999).

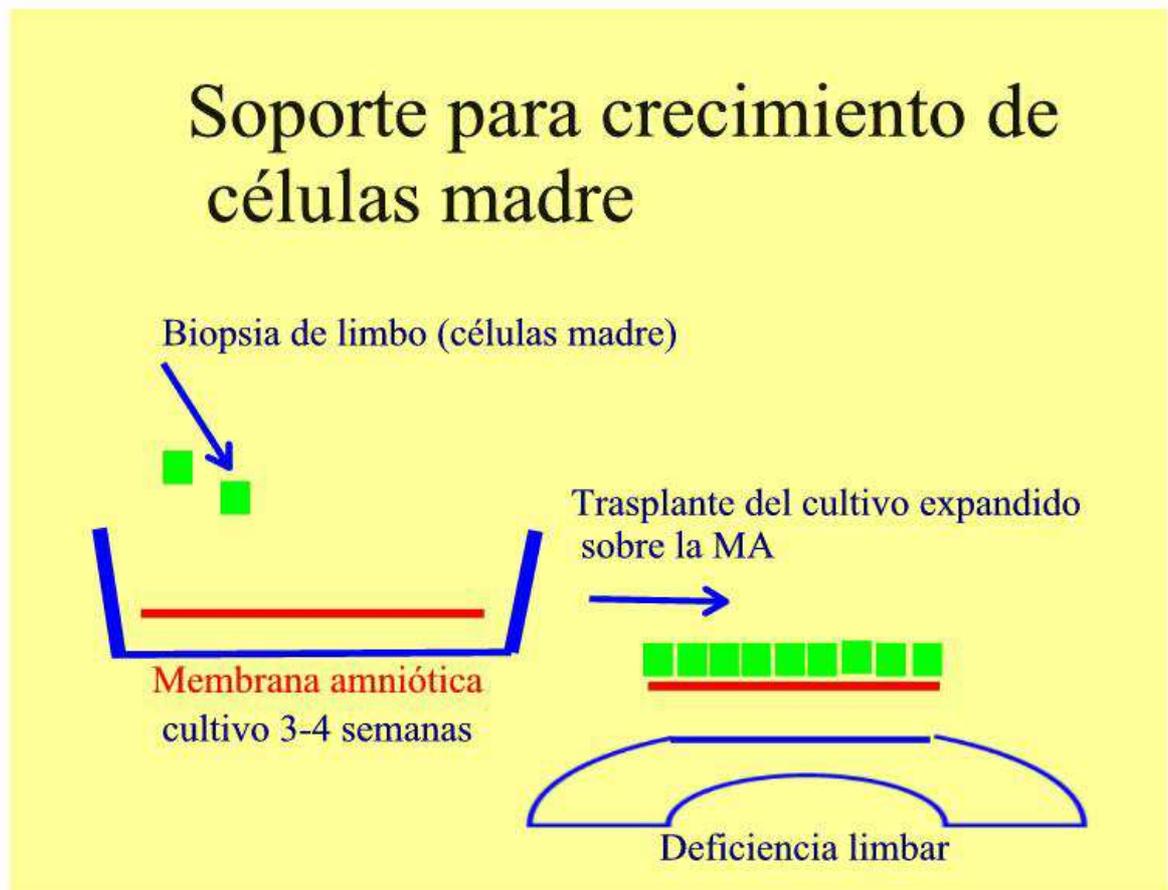


Figura I.21.: Esquema de técnica de empleo de MA como soporte para la proliferación de células madre.

II. JUSTIFICACIÓN

II. JUSTIFICACIÓN

II.1. JUSTIFICACIÓN

Las causticaciones oculares severas constituyen una entidad clínica de mal pronóstico, reconocido por numerosos autores en la bibliografía (Wagoner MD 1984, 1997). Estas, pueden alterar la superficie ocular y evolucionar a pérdidas unilaterales o bilaterales de visión. Especialmente, las causticaciones corneales por álcalis, siguen planteando todavía dificultades terapéuticas.

Tanto en un entorno industrial como doméstico no es despreciable la prevalencia de causticaciones oculares generando urgencias médicas, considerables bajas e incluso incapacidad laboral.

Aunque existen estrictas medidas de seguridad, todavía algunas grandes compañías usan potentes sustancias químicas, a menudo a altas temperaturas, que suponen serios riesgos para los trabajadores.

Por otro lado, existen conclusiones contradictorias en cuanto al resultado del tratamiento de las causticaciones con trasplante de membrana amniótica, lo que nos hace pensar en criterios de clasificación clínicos de las causticaciones más unificadores, que los que tenemos actualmente.

Con las premisas expuestas consideramos que pudiera ser útil proponer un estudio experimental de causticación corneal con compromiso límbico para intentar establecer y reevaluar la utilidad del trasplante de membrana amniótica en estas situaciones.

Del mismo modo, también nos planteamos mostrar nuestra experiencia de 5 años en el empleo de MA para el tratamiento de diversas entidades clínicas (descompensación

corneal, pterigion, simbléfaron, defectos limbares, queratitis neurotróficas, úlceras estromales profundas, microperforaciones corneales,...)

II.2. HIPÓTESIS

La hipótesis fundamental sobre la que se apoya esta investigación: **“El trasplante de membrana amniótica mejora la evolución clínica de las causticaciones corneales”**.

El objetivo principal de esta tesis es establecer si el trasplante de membrana amniótica puede modificar la evolución natural de las causticaciones corneales en un modelo experimental propuesto y desde un punto de vista clínico, y si esta evolución se relaciona con la regeneración de la superficie epitelial favorecida por la práctica del trasplante de membrana amniótica. También nos planteamos, como objetivo secundario, si existe un momento óptimo para practicar el trasplante de membrana amniótica en el cual obtengamos mejor evolución clínica de las lesiones.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

III.1. INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

La **investigación experimental** de esta Tesis tiene como **objetivo principal**:

1. Estudiar la utilidad que pudiera tener la práctica del trasplante de membrana amniótica en un modelo experimental de causticación corneal con compromiso límbico.
2. Si se demuestra la utilidad del trasplante de membrana amniótica en dicho modelo experimental, valorar si hay un momento óptimo para su práctica.

Otros **objetivos secundarios** son establecer:

1. Si el **trasplante de membrana amniótica** puede contribuir a la regeneración de la superficie ocular tras causticación experimental.
2. Si el **trasplante de membrana amniótica** contribuyera a la regeneración de la superficie ocular, estudiar la influencia que dicha regeneración puede tener en los procesos de reparación estromal tras causticación experimental.
3. Si el momento en el que se practica el **trasplante de membrana amniótica (precoz, intermedio o tardío)** puede ser determinante en la evolución de las causticaciones corneales.

III.2. INVESTIGACIÓN CLÍNICA

El **objetivo principal** de esta Tesis en su vertiente de investigación clínica, es el de reevaluar y comparar los diferentes usos de la membrana amniótica en Oftalmología. El empleo de este tejido en nuestra especialidad se ha repopularizado en la última

década, apareciendo como tema de actualidad en las revistas de mayor impacto científico, pero con resultados muy contradictorios entre diferentes autores.

Los **objetivos más concretos** se resumen en:

1. Evaluar los resultados obtenidos con membrana amniótica en el tratamiento de diversas patologías oftálmicas con los conseguidos con otros métodos alternativos.
2. Comparar los resultados obtenidos en el tratamiento diversas patologías oftálmicas con membrana amniótica por otros autores, con los nuestros.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación de esta Tesis se ha desarrollado en dos vertientes principales, una clínica y otra experimental.

A) Investigación clínica. Empleamos MA en el tratamiento de diversas patologías oftálmicas más o menos frecuentes en la práctica médica diaria. No pretendemos exponer resultados para sacar conclusiones estadísticas de rigor, sólo mostrar nuestra experiencia con pacientes y MA a lo largo de 5 años.

Desde Octubre de 1998 hasta Enero de 2003, 64 ojos de 63 pacientes han sido tratados mediante trasplante de membrana amniótica. Las patologías oftálmicas han sido las siguientes:

- 9 casos de defectos epiteliales corneales persistentes.
- 3 simbléfaron.
- 19 pterigiones contando primarios y recidivantes.
- 27 casos de descompensación corneal secundaria a cirugía catarata (8 mediante extracción extracapsular y el resto facoemulsificación).
- 6 casos de microperforaciones corneales de diversas etiologías:
 - 2 degeneraciones corneales calcáreas.
 - 1 secundaria a lisis corneal o “melting” con dehiscencia de sutura en una queratoplastia penetrante.
 - 1 en paciente intervenido de miopía mediante la técnica láser in situ keratomileusis (LASIK).
 - 1 secundaria a úlcera por queratitis metaherpética.
 - 1 causticación con ácido sulfúrico.

B) Investigación experimental. El estudio experimental se realizó en 40 ojos de conejos de laboratorio (todos ellos albinos de la raza New Zealand) a los que se le aplicó el mismo modelo de causticación experimental, que a continuación expondremos y del que es objeto esta tesis.

La presente investigación tuvo una finalidad exclusivamente científica y se realizó bajo el estricto cumplimiento de la normativa vigente nacional y europea en lo que respecta a la protección y manejo de los animales de experimentación: legislación nacional (Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo -Boletín Oficial del Estado- de 1988, y la Orden del 13 de Octubre de 1989 -Boletín Oficial del Estado- de 1989), y legislación europea (86/609/CEE).

IV.1. MATERIALES DE EXPERIMENTACIÓN

IV.1.1. ANIMALES

Todos los experimentos incluidos en el presente proyecto se han realizado siguiendo las resoluciones de la ARVO ("Association for Research in Vision and Ophthalmology") y las normativas internacionales de la Comunidad Económica Europea ("Orden 86/609/CEE") referentes al uso de animales en experimentación. La manipulación de los animales se realizó en todo momento con el máximo cuidado y la precaución de evitar cualquier estrés innecesario o infligir dolor a los mismos. El número de animales se redujo al mínimo necesario para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Los experimentos que se describen en este estudio han sido realizados sobre 40 conejos albinos, machos, de raza NEW-ZEALAND. Se ha elegido este modelo por la facilidad de manejo, accesibilidad y disponibilidad. Otro motivo de elección del conejo de laboratorio como animal de experimentación para esta Tesis Doctoral se basó en la experiencia que otros autores habían descrito en publicaciones internacionales de alto impacto sobre las causticaciones de la superficie ocular, lo que permitiría establecer comparaciones con estos trabajos previos.

Los animales llegan a nuestro laboratorio a los dos meses de edad y sus pesos estaban comprendidos entre 1.6 y 2.7 Kg. Los animales han sido mantenidos en unas condiciones estandarizadas, albergados de manera separada, y se les ha administrado agua y alimento ad libitum. El lugar de mantenimiento fue el Estabulario del Departamento de Veterinaria del Centro de Investigación del Hospital Universitario "La Fe" en Valencia. En las mencionadas instalaciones, los animales se mantuvieron en condiciones controladas de

temperatura (20°C) y humedad (60%), bajo ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas, de 08:00 a 20:00 h y de 20:00 a 08:00 h.

Ninguno de los animales había sido sometido a manipulación previa.

IV.1.2. APARATAJE e INSTRUMENTAL

IV.1.2.1. Microscopio quirúrgico

Los procedimientos descritos en este modelo experimental se han practicado bajo control microscópico con el microscópico quirúrgico Zeiss modelo OPNI 99, West Germany.

IV.1.2.2. Instrumental quirúrgico

Para la práctica de las causticaciones de la superficie ocular, los trasplantes de membrana amniótica y las exploraciones se ha utilizado el instrumental que se detalla:

- 1) Blefarostato de Lancaster (Moria ref: 6360)
- 2) Blefarostato de Barraquer-niño (Moria ref: 6346-B)
- 3) Porta-agujas de Castroviejo (Moria ref: 8149)
- 4) Tijeras de Westcott (ASICO ref: AE-5500 derecha)
- 5) Pinza de fijación de Castroviejo-colibrí (ASICO ref: AE-4049)

IV.1.2.3. Balanzas

Balanzas de precisión

- Balanza (FY-300, AND, Japón)
- Balanza de precisión modelo Recator 6110.

Para pesar los filtros de papel secos y los filtros húmedos se empleó la balanza electrónica de precisión, con precisión de 0.001gramos.

-Balanza LETICA. Modelo Digital Scale L-2000.

Balanza para pesar los animales experimentación.

IV.1.2.4. Equipo fotográfico

-Cámara fotográfica Nikkormat FTN (Medical-NIKKOR/ Nikon-NIPPON-KOGAKU K.K.-Tokio, Japan) (figura IV.1.). Con objetivo macro (figura IV.2.) al que hemos adaptado lentes de diversos aumentos ($\times\frac{1}{2}$, $\times\frac{1}{4}$, $\times 1$, $\times 2$). Para realizar las fotografías de la superficie ocular de los animales de experimentación hemos empleado el aumento $\times 2$ en todos los casos.

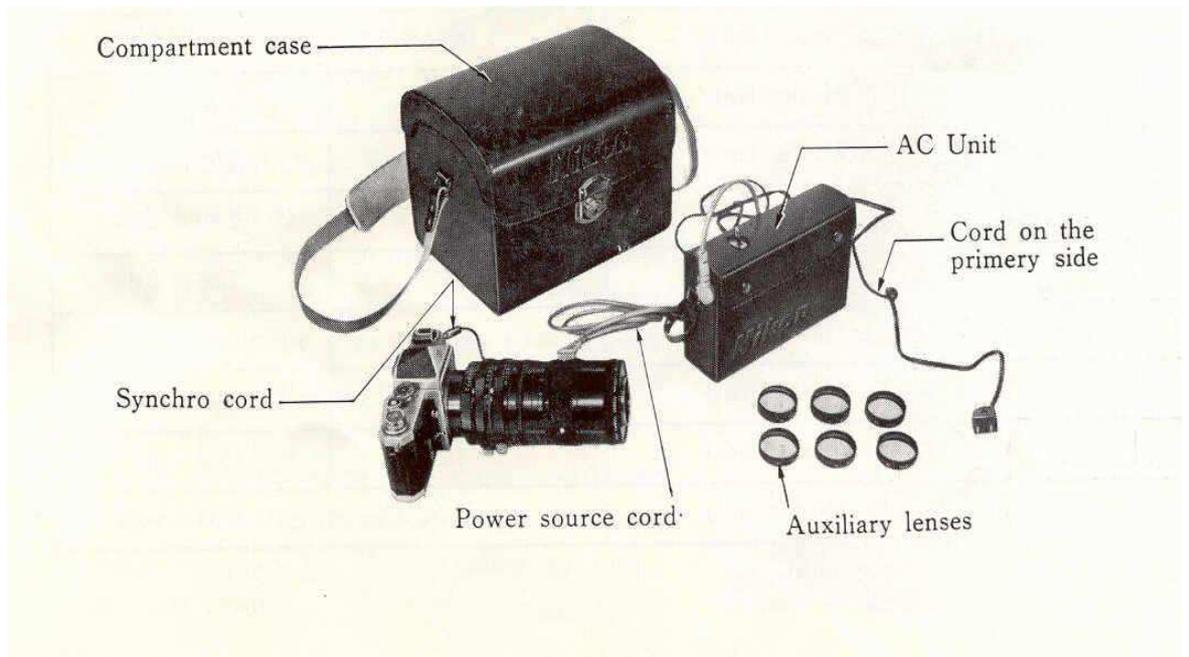


Figura IV.1.: Arriba. Equipo fotográfico empleado.

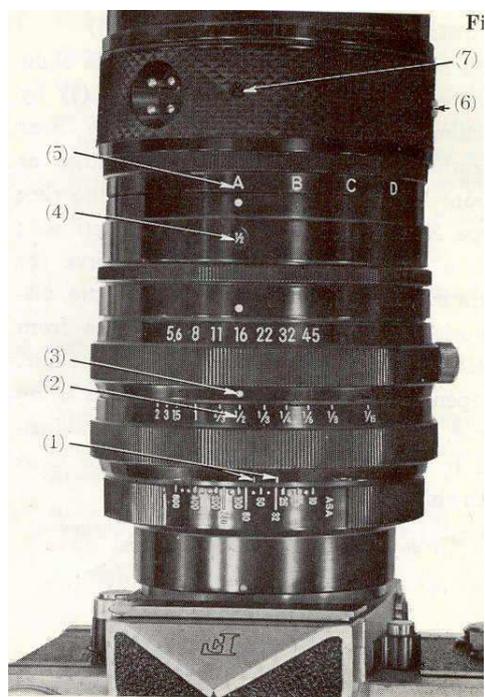


Figura IV.2.: Abajo. Detalle del objetivo macro de la cámara fotográfica.

IV.1.2.5. Paquímetro

Las paquimetrías se han realizado con el paquímetro ultrasónico de la casa TOPCON® modelo DGH-500.

La constante de velocidad empleada ha sido de 1630 m/segundo.

IV.1.2.6. Refrigeradores

- Congelador de -20 °C marca Liebherr, modelo GT 1401-1.
- Congelador de -80 °C, marca Sanyo, modelo Ultra Low.

IV.1.2.7. Equipo Informático

Ordenador

- Ordenador personal marca Apple, modelo Power Macintosh 6100.
- Ordenador personal marca AOC, modelo 486-50 mHz.
- Ordenador portátil marca Hewlett & Packard, modelo Omnibook XE 3-interceleron.

Escáner

Hewlett & Packard, modelo Scan Jet 5370C.

Impresoras

- Impresora de color de inyección de tinta modelo Deskjet 850 C manufacturada por Hewlett & Packard.
- Impresora láser marca Hewlett & Packard, modelo Laserjet 4L.

Programas informáticos

- Windows® 98, 2000.

-Paquete SPSS[®] para estadística.

-Programas de medición de áreas Image Tool.

IV.1.3. MATERIAL FUNGIBLE

IV.1.3.1. Cáustico

Se ha empleado Hidróxido de sodio (NaOH) 1N, en disolución 1 mol/l, con un peso de 0.0400 gramos de NaOH/ml ajustado al factor 1,000 y utilizando fenoftaleína como indicador (Probus S. A., Badalona, España).

IV.1.3.2. Papel de filtro Whatman #3

Papel de filtro WHATMAN #3 (Whatman Paper Ltd.,Maidstone, Reino Unido)
(figura IV.3.).WHATMAN[®] #3 (Whatman Paper Ltd., Maidstone Reino Unido).



Figura.IV.3.: Detalle de la carátula del papel de filtro empleado en las causticaciones.

IV.1.3.3. Placas de PETRI

Discos para cultivos celulares de 6 cm de diámetro × 15mm de altura. Becton Dickinson and company. EASY GRIP™. USA nº Patente 295319. Belliver Industrial Estate. Made in England. Empleados para la conservación de la membrana amniótica.

I.V.1.3.4. Filtro

Filtro de nitrocelulosa. Ref: Millipore® 0,45 μm

IV.1.3.5. Medio de cultivo DMEM

Dulbecco-Modified Eagle Medium (Life Technologies Inc).

IV.1.3.6. Glicerol

Baxter Healthcare Corp, Sotone Mountain, Ga.

IV.1.3.7. Filtro para medio cultivo

Filtro desechable estéril FP 030/3. Schleicher & Schuell . 0,2 μm ; 7 bar max. Lote n° AZ1069-3.

IV.1.3.8. Campana de flujo laminar

IV.1.3.9. Fármacos

IV.1.3.9.1. Anestésicos tópicos y otros colirios

-Clorhidrato de tetracaína y oxibuprocaina (Colircusí anestésico doble ®, 1 y 4 mg/ml, Laboratorios Cusí, El Masnou, España).

-Fluoresceína sódica y oxibuprocaina (Colircusí Fluotest ®, 2,5 y 4 mg/ml, Laboratorios Cusí, El Masnou, España).

IV.1.3.9.2. Soluciones de Irrigación

-Solución salina balanceada (BSS[®], IOLAB Pharmaceuticals, Claremont, Estados Unidos).

IV.1.3.9.3. Sedantes y Anestésicos

Se han utilizado los siguientes medicamentos:

-Hidroclorato de ketamina 5% (Ketolar[®], 50mg/ml, Laboratorios Parker-Davis-USA)

-Hidroclorato de xilacina 2% (Rompún[®], 10 ml, solución inyectable al 2%, Bayer Pharma -Francia)

IV.1.3.9.4. Antibióticos

-Penicilina 50 µg/ ml.

-Estreptomicina 50 µg/ ml.

-Neomicina 100 µg/ ml.

-Anfotericina B 2.5 µg/ ml. Albecet[®] presentado en suspensión estéril isotónica. Cada ml de la suspensión contiene: Anfotericina B USP, 5.0 mg (5000 UI); La-dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 3,4 mg; L-a- dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), 1,5 mg (en forma de sales de sodio y amonio).

IV.1.3.9.5. Películas fotográficas

Se han empleado películas fotográficas Kodak Ektachrome Elite 100 (Eastman Kodak Company, Rochester, Estados Unidos) y película de diapositiva Agfacrome[®] de 100-asa.

IV.1.3.9.6. Suturas

-Poliglactina de 9/0 (Vicryl). Ethicon Inc, Jonson & Johnson Co, Somerville, NJ.

- Nylon Monofilamento (10/0) Alcon.

IV.1.3.9.7. Cuchilletes desechables

- Cuchillete de 15° y 30° Alcon Surgical Ophthalmic knife.

IV.2. MÉTODOS

IV.2.1. ESTABULACIÓN

Los conejos albinos de la raza New Zealand fueron mantenidos en las instalaciones del Centro de Investigación del Hospital Universitario “La Fe” de Valencia. El mantenimiento de la cepa en estado puro corrió a cargo del Servicio de Veterinaria del citado Centro. En las instalaciones, los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20°C) y humedad (60%), bajo ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas, 8:00 a 20:00 y de 20:00 a 8:00. Durante su estabulación fueron albergados individualmente con acceso libre a agua y a una dieta estándar para conejos (pienso de mantenimiento para conejos Purina®, Gallina Blanca, Barcelona).

IV.2.2. ANESTESIA

Todos los animales fueron siempre anestesiados antes de cualquier exploración o tratamiento con inyecciones intramusculares de hidrocloreto de ketamina 5% (Ketolar[®]) a razón de 40 mg por Kg de peso e hidrocloreto de xilacina 2% (Rompún[®]) a la dosis de 7 mg por Kg de peso, después de que una mezcla tópica de clorhidrato de tetracaína al 0.1% y clorhidrato de oxibuprocaína al 0.4% se instilase en la córnea. La utilización de hidrocloreto de ketamina se prefirió a la del fenobarbital porque la dosis letal del último se

halla muy próxima a la terapéutica (Bastida G 1981). Aunque el hidrocloreto de ketamina puede inducir un aumento discreto de la presión intraocular (Corsen G 1967), dicho efecto potencial no interfiere en modo alguno con ninguno de los experimentos planteados en esta tesis doctoral.

En los distintos tiempos planeados, los animales fueron sacrificados, sin ser sometidos a sufrimiento alguno, mediante la inyección intravenosa de cloruro potásico, previa canalización de la vena marginal de la oreja.

IV.2.3. CAUSTICACIONES

IV.2.3.1. Preparación de los discos de filtro

Se ha utilizado papel de filtro WHATMAN # 3[®], debido a que presentan una buena adaptación a la superficie corneal cuando están húmedos (figura IV.3.). Estos filtros (de 90mm de diámetro) se han troquelado en círculos de 16 mm de diámetro. Cada uno de estos círculos se ha subdividido en 4 fragmentos con el objeto de utilizar una de estas unidades en cada uno de los ojos de los animales de experimentación. Cada uno de ellos tiene por objeto cubrir la córnea superior y 3mm de conjuntiva perilímbica (figura IV.4.). Los fragmentos de disco así obtenidos, previamente pesados, se sumergen en solución de NaOH 1 N, durante 45 segundos, volviendo a ser pesados con el objeto de comprobar su homogeneidad.

IV.2.3.2. Pesado de los filtros y del cáustico

Se ha utilizado la balanza electrónica de precisión, modelo Recator 6110[®], con precisión de 0.001gramo. Sobre ella se pesaba el papel de filtro seco y posteriormente el

filtro humedecido, calculando el peso del cáustico retenido restando al peso del filtro humedecido el peso del filtro y el del peso de cáustico que quedaba retenido sobre la balanza.



Figura IV.4.: Superficie anterior del animal de experimentación con el filtro de papel humedecido con sosa cáustica 0,1 N depositado, para provocar la cusicación.

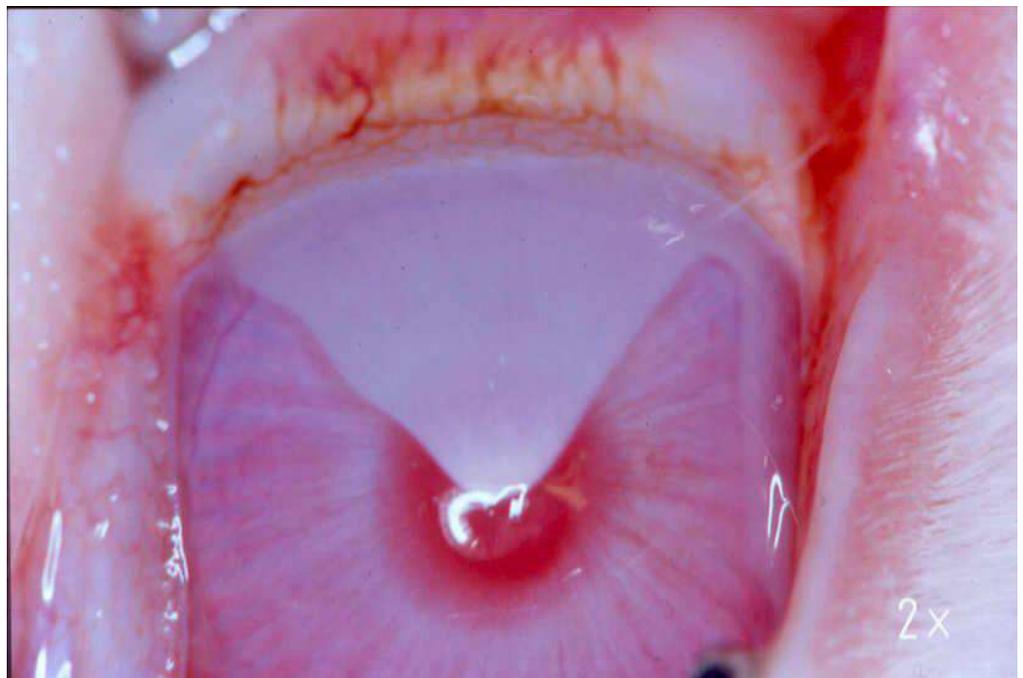


Figura IV.5.: Aspecto de la causticación ocular inmediatamente después de retirar el filtro húmedo.

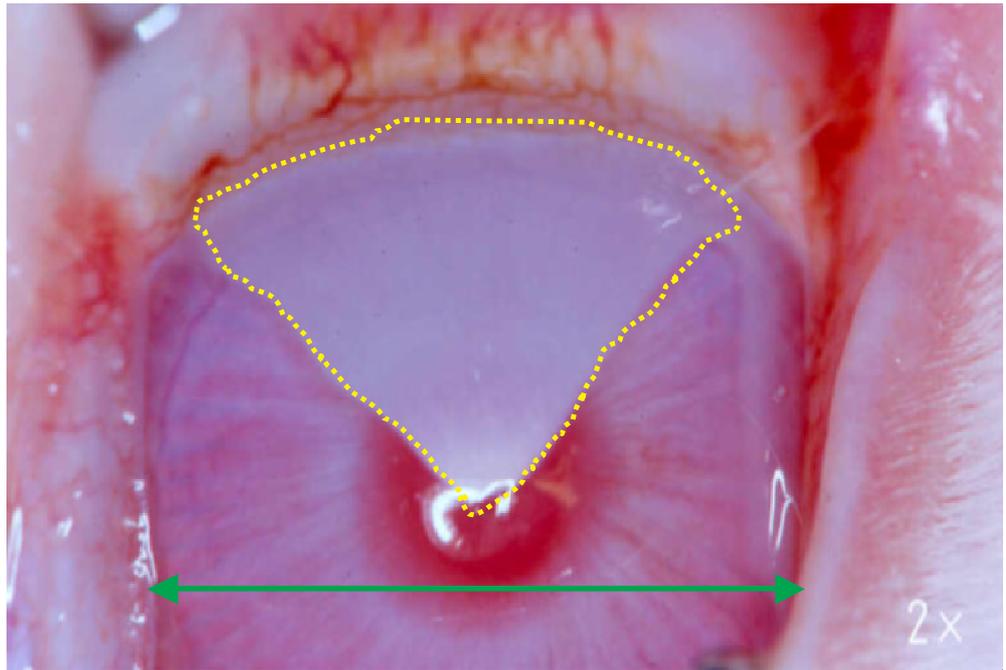


Figura IV.6.: Medida de áreas y diámetro blanco-blanco de la superficie ocular del ojo de conejo.

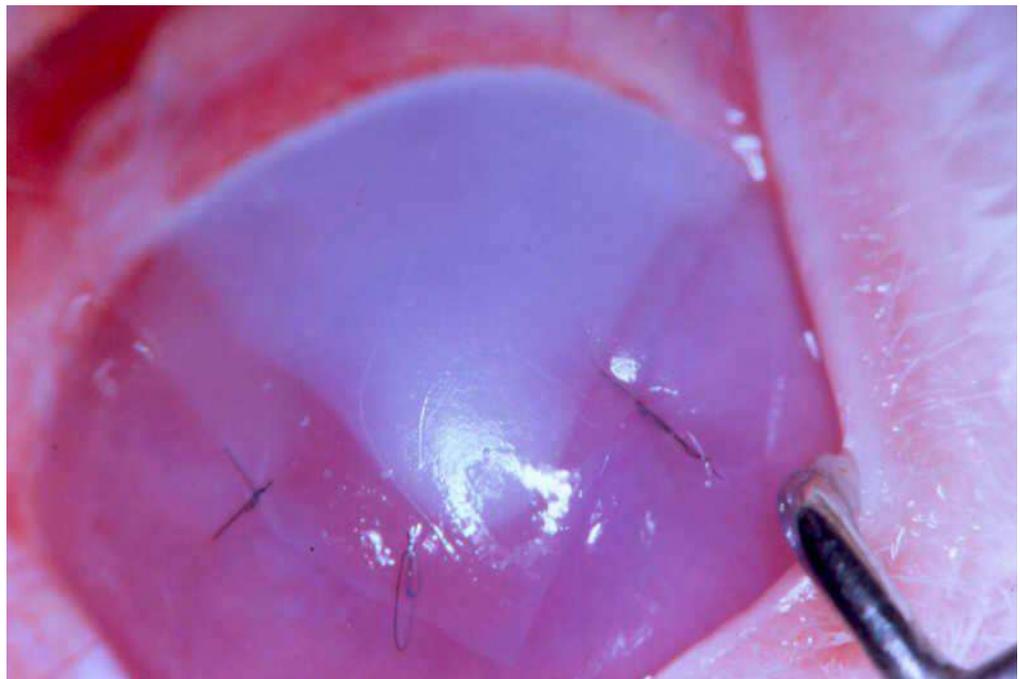


Figura IV.7.: Aspecto de la superficie ocular del ojo de conejo inmediatamente tras el trasplante de MA.

IV.2.3.3. Causticaciones

Se realizaban sobre el ojo del animal de experimentación bajo anestesia general. Se colocaba primero sobre los párpados del ojo derecho del animal un blefarostato. Bajo control microscópico, se ha practicado fotografía de control de la superficie ocular. A continuación, se ha procedido al marcado del centro geométrico de la superficie corneal para marcar el límite inferior de la zona en la que se aplica 1/4 de disco humedecido en solución cáustica (NaOH 1N), manteniéndolo en esta posición durante 45 segundos (figura IV.4.). Transcurrido dicho tiempo se ha lavado de la superficie ocular durante 1 minuto empleando 15 ml de solución salina balanceada (BSS[®]) en todos los casos. Tras el lavado realizamos una nueva fotografía. Este es el aspecto que presentaba la superficie ocular de uno de los conejos de los animales de experimentación (mismo aspecto tanto del grupo control como del grupo trasplante de MA) inmediatamente tras la causticación. (figura IV.5). Mediante las fotografías obtenidas y con la aplicación de un programa informático realizábamos la medición de áreas (figura IV.6.) tanto de opacidad, como de neovasos que explicaremos en apartados posteriores más detalladamente. A continuación, realizábamos el trasplante de MA, dependiendo el momento de trasplante, del grupo al que perteneciera el animal (figura IV.7.).

Los animales de experimentación, que tras aplicarle este modelo experimental de causticación durante 45 segundos, sufrieron microperforaciones (figura IV.8.) y/o endoftalmitis (figura IV.9.) han sido excluidos del experimento, ya que de incluirlos, partiríamos de una situación no homogénea para luego hacer comparables los resultados.

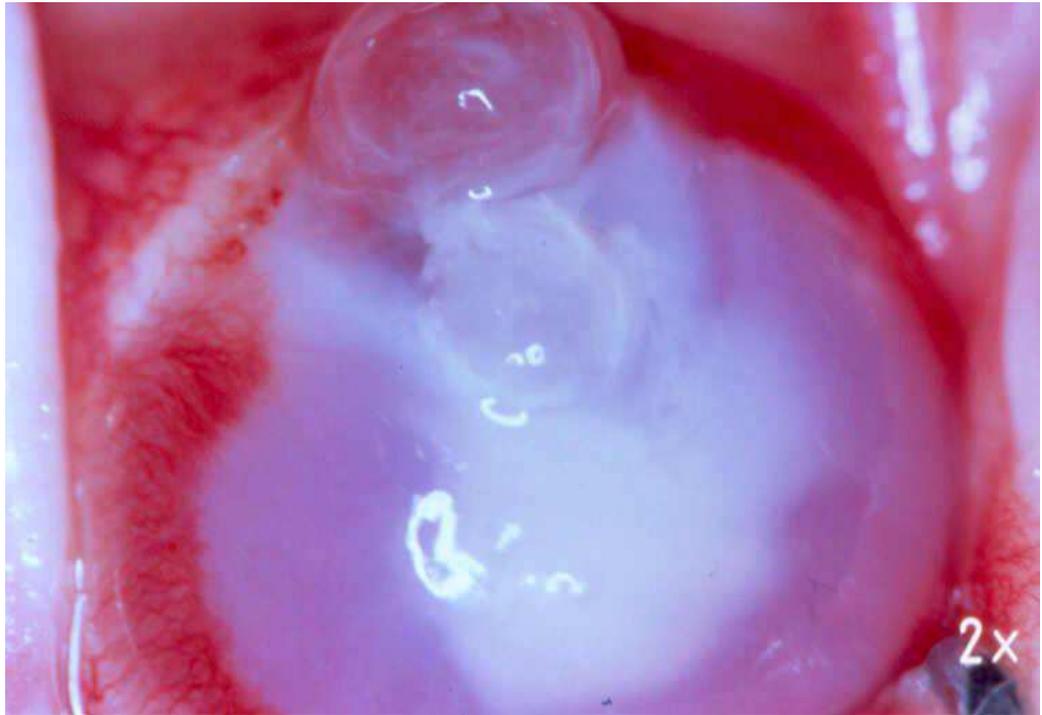


Figura IV.8.: Animal nº 8 con microperforación tras la causticación experimental estándar. Fue excluído del estudio.

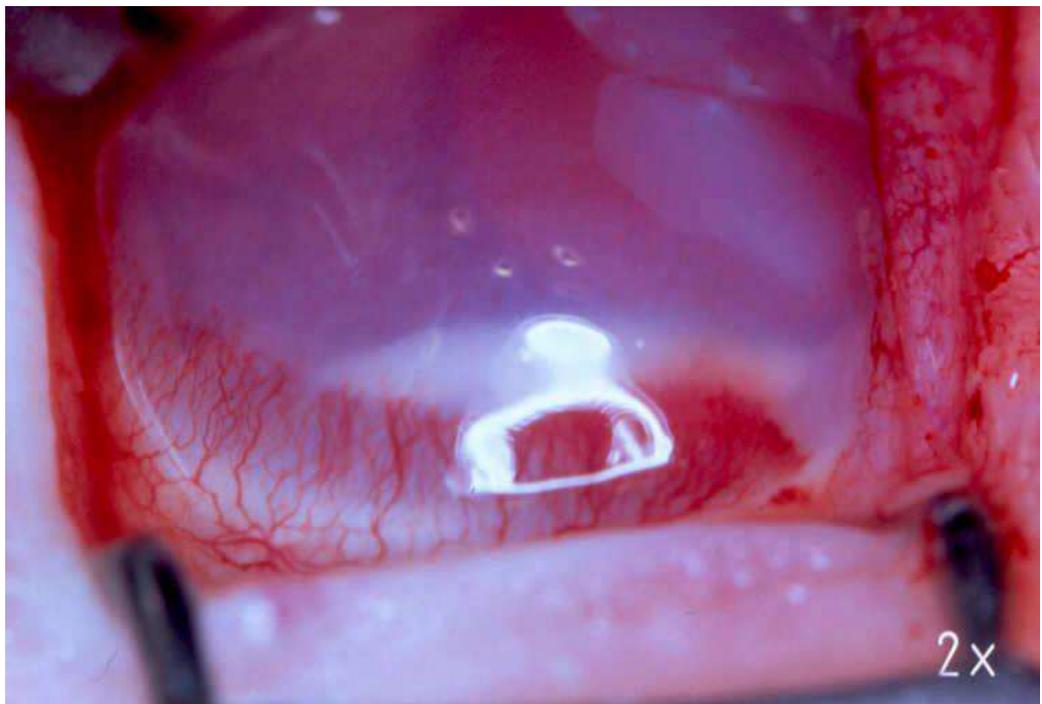


Figura IV.9.: Edofoalmitis con hipopion. Caso excluído del estudio. Animal nº 22.

IV.2.4. PROTOCOLO de OBTENCIÓN y PREPARACIÓN de la MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA.

Obtenemos la placenta (figura IV.10) inmediatamente después de una cesárea electiva de un feto sano y tras consentimiento informado de la madre. Las cesáreas programadas tienen lugar en el Departamento de Ginecología del Hospital Universitario “La Fe” de Valencia. Preferimos que sean cesáreas electivas, porque las pacientes están mejor controladas desde un punto de vista serológico. Previamente, se ha descartado, mediante pruebas serológicas, los virus de inmunodeficiencia humana (VIH), de la hepatitis tipo B y C y la sífilis. Posteriormente, recogemos la placenta fresca completa en un contenedor estéril (figura IV.11.). Tras ello, la membrana se limpia de coágulos de sangre (figura IV.12.) y se sumerge en suero fisiológico que contiene en dilución (figura IV.13.): Penicilina, 50 mg/ml; Estreptomina, 50 mg/ml; Neomicina, 100 mg/ml, y Anfotericina B, mg /ml. A continuación todo el procesado de la membrana amniótica se realiza bajo campana de flujo laminar (figura IV.14. arriba izquierda) para asegurar mayor esterilidad. La membrana amniótica se separa del resto del corion mediante disección roma a través de los espacios virtuales situados entre estos dos tejidos (figura IV.15 abajo). Este es el aspecto de la MA una vez separada del corion (figura IV.16, figura IV.17). A continuación, la MA se extiende sobre un papel de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 μm (figura IV.18.). La superficie epitelial de la membrana amniótica debe colocarse hacia arriba no contactando con el papel de filtro, mientras que la superficie estromal debe ponerse en contacto con el papel. El papel con la membrana amniótica adherente se corta en círculos de 2 cm de radio almacenándose antes del trasplante a -80 °C en placas de Petri estériles conteniendo el medio de cultivo durante un mes (figuras IV.19-21). Pasado este

mes, se volverá a corroborar la seronegatividad de la madre para VIH, Hepatitis B y C, así como sífilis. El medio de conservación que se utilizará será 50% DMEM y 50% glicerol y previamente a su almacenado se habrá filtrado a través de un filtro de Millipore de 0,22 micras para asegurar la esterilidad (figura IV.14 arriba derecha).



Figura IV.10.: Imagen de placenta humana completa fresca tras la cesárea electiva.



Figura IV.11.: Placenta en contenedor estéril.



Figura IV.12.: Lavado de la placenta para retirar los coágulos hemáticos.

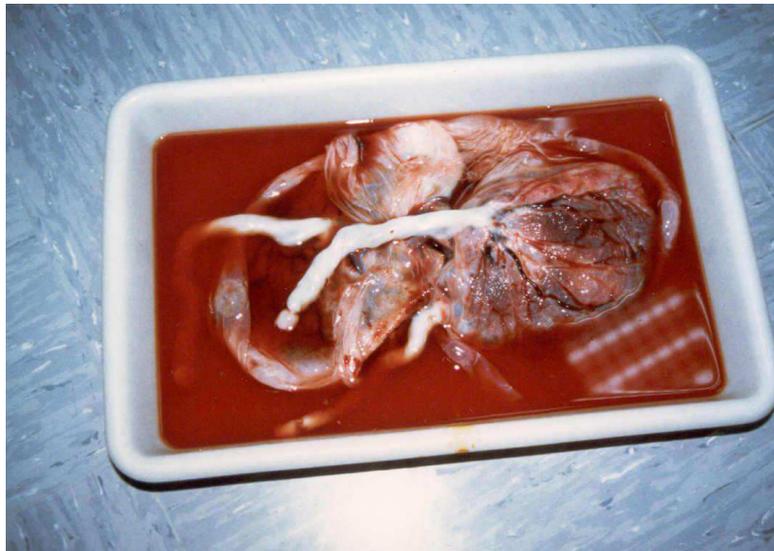


Figura IV.13.: Placenta sumergida en solución salina estéril y antibióticos.

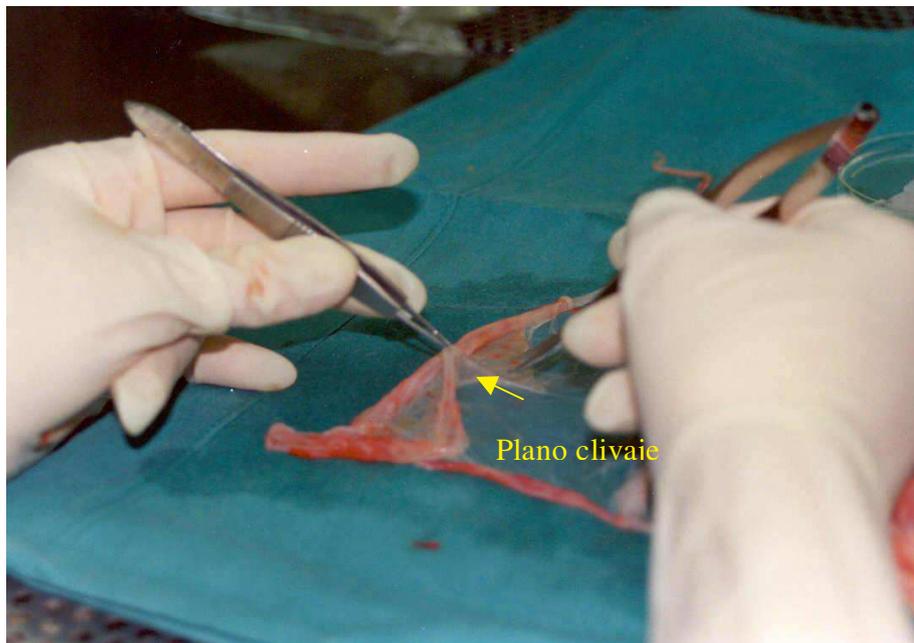


Figura IV.14.: Arriba izquierda. Campana de flujo laminar. Arriba derecha. Filtrado del medio.

Figura IV.15.: Abajo. Disección roma mediante pinzas sin dientes, para no rasgar la MA, y tijeras Wescott.

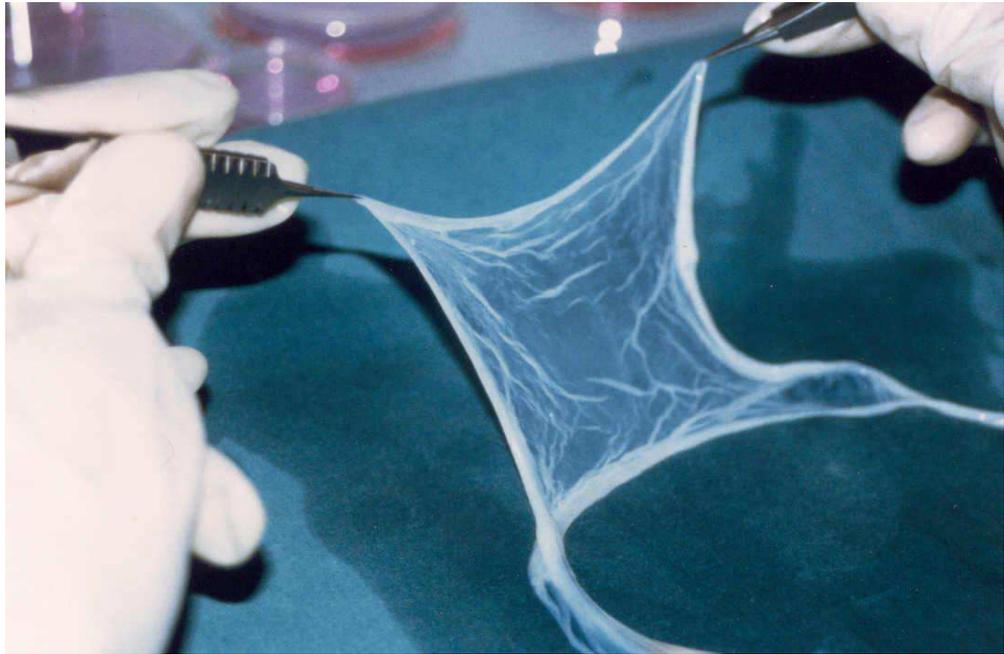


Figura IV.16.: Fragmento de MA.

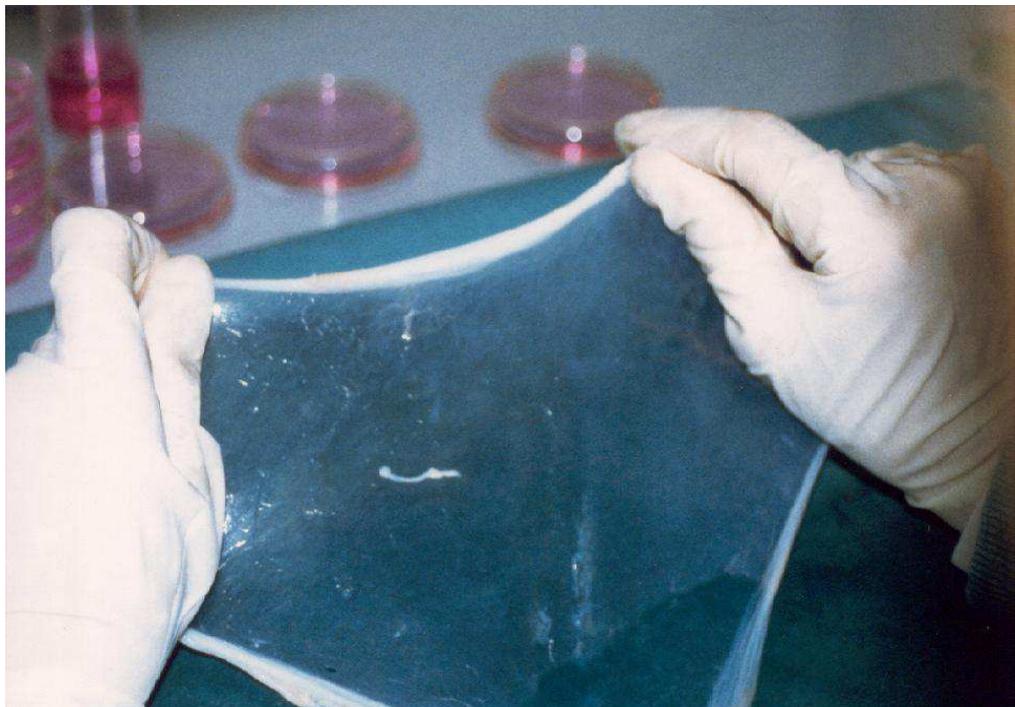


Figura IV.17.: Aspecto de otro fragmento de MA extendido.

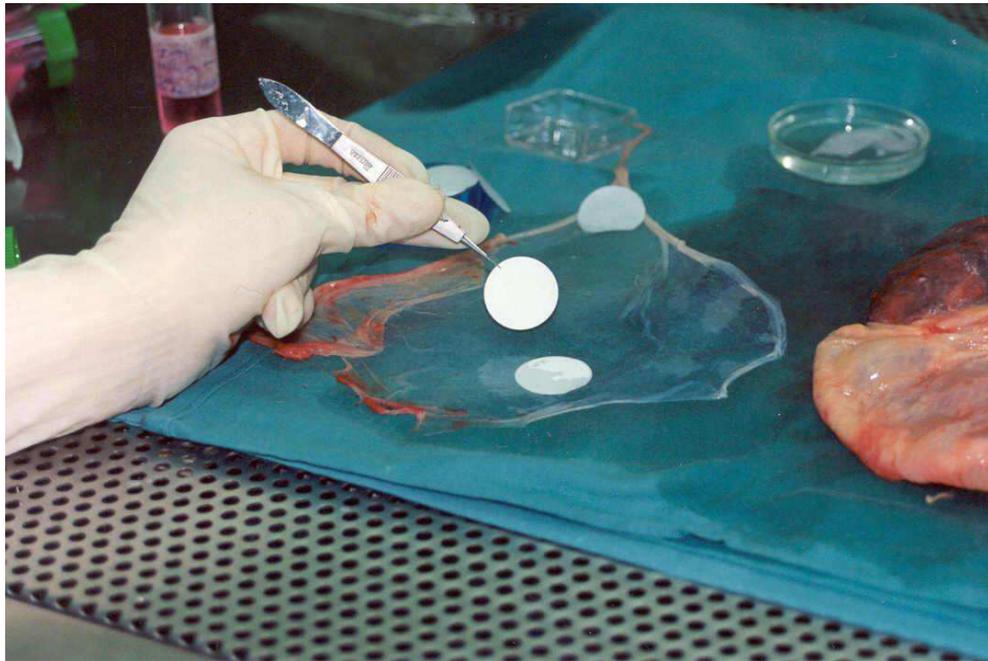
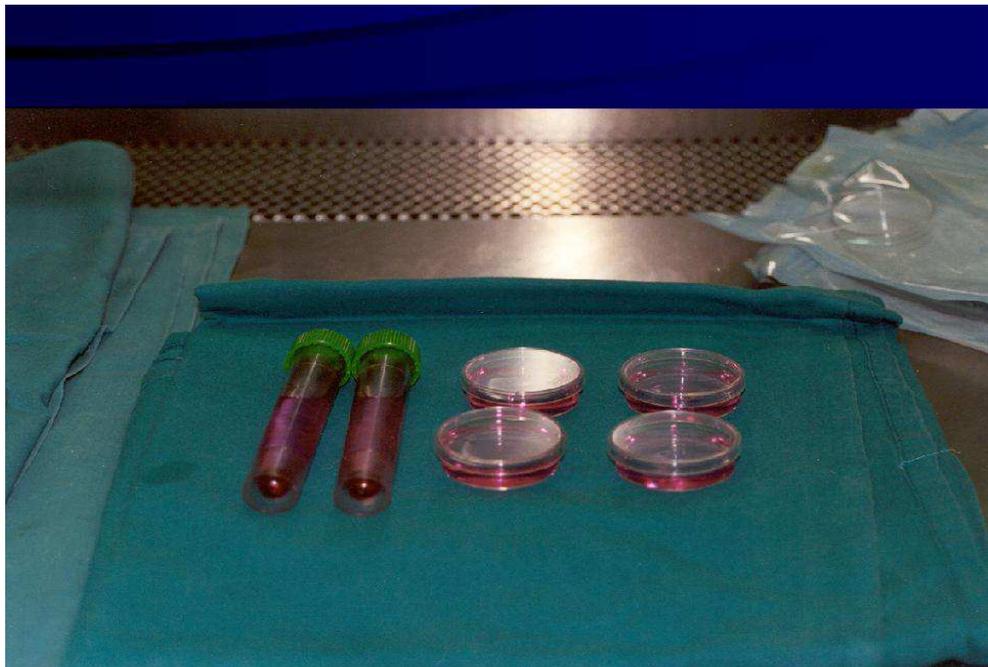


Figura IV.18.: Pegado del filtro referenciador de 0,45 micras a la cara estromal de la MA.

Figura IV.19.: Placas de Petri conteniendo medio de cultivo para almacenar la membrana.



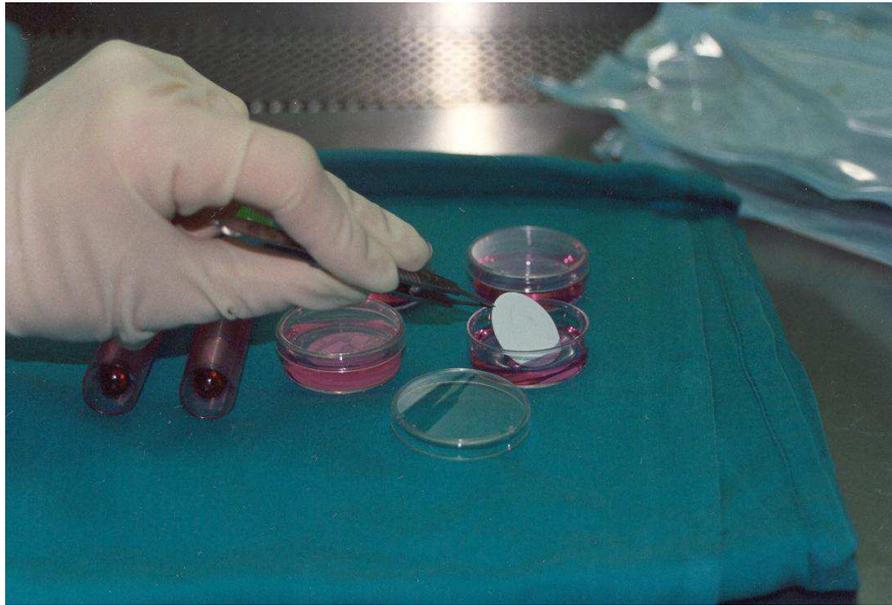


Figura IV.20.: Modo de colocar el fragmento de MA del tamaño deseado dentro del medio de cultivo.

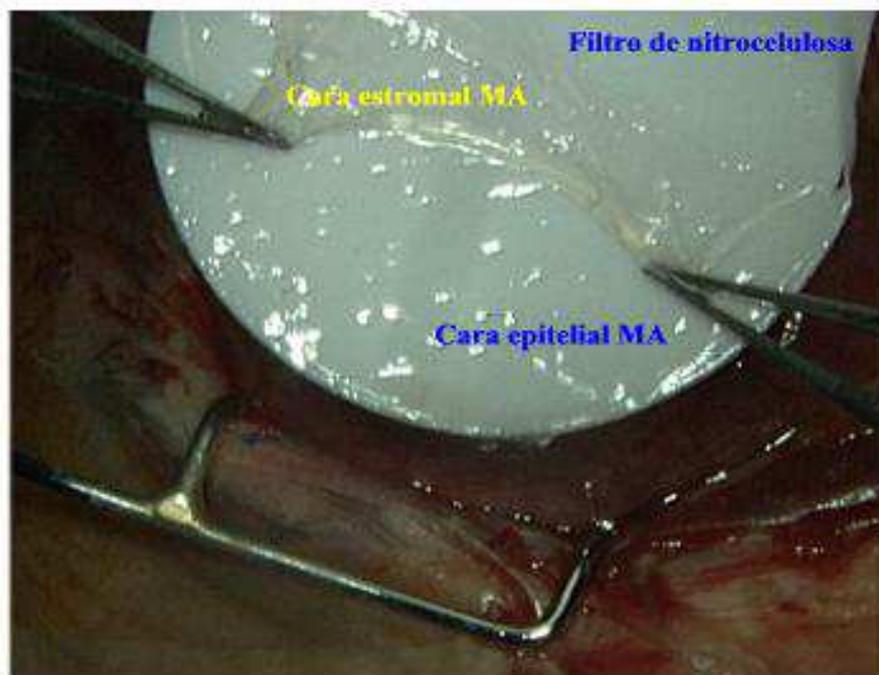


Figura IV.21.: Membrana amniótica adherida al papel de filtro de nitrocelulosa por la cara estromal.



Figura IV.22.: Placas de Petri embaladas herméticamente y numeradas previamente a su congelación.

IV.2.5. TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA

Las intervenciones en los animales de experimentación se han realizado en el quirófano del Centro de Investigación del Hospital Universitario “La Fe” de Valencia, bajo microscopio quirúrgico.

Se ha procedido bajo anestesia general de cada uno de los animales:

IV.2.5.1. Preparación del lecho receptor.

En el ojo receptor, causticado, se procedió a la deseepitelización corneal y conjuntival, y a la escarificación del pannus fibrovascular, si existiera, en una zona comprendida entre las 10:00 y 2:00 horas.

IV.2.5.2. Técnica quirúrgica.

La MA se sutura siempre sobre la superficie ocular del conejo con su lado epitelial hacia arriba y la superficie mesenquimal en contacto con el ojo, para facilitar la adherencia de la membrana a la superficie ocular. Por este motivo es importante ser capaz de distinguir ambas caras teniéndolas referenciadas. Esto, es fácil, cuando la membrana es fresca, pero con membranas criopreservadas a - 80 °C llega a ser difícil. La mayoría de los cirujanos han desarrollado una técnica que las referencia (por ejemplo, colocar la membrana sobre un papel de nitrocelulosa con el estroma de la MA adherido al papel. Otros utilizan sutura para referenciar o un bolígrafo de tinta indeleble para marcar, o la hemosteta que se adhiere a modo de “vítreo” a la zona mesenquimal-estromal mientras que no se adhiere a la parte epitelial).

La MA se coloca sobre la superficie ocular y la cortamos del tamaño adecuado de tal manera que la pieza final es ligeramente mayor que el área de la zona causticada a cubrirse (2 mm de reborde). A la zona corneal suturamos la MA con nylon monofilamento

10/0 y a la conjuntiva y epiesclera con Vycril 9-0. Las suturas de nylon se retiran a las 3 semanas y las de Vycril se reabsorben espontáneamente.

Los trasplantes de membrana amniótica se han realizado en los siguientes tiempos:

- **Inmediato** (1^{er}, día tras la causticación).
- **Precoz** (7^o día, tras la causticación).
- **Tardío** (30^o día, tras la causticación).

IV.2.6. SEGUIMIENTO CLÍNICO

Los animales han sido controlados, bajo sedación, tras la causticación, a las 24 horas y a los 3, 7, 14, 30, 60 y 90 días.

Estos controles fotográficos han incluido:

♣ Fotografía del segmento anterior

♣ Descripción:

- 1.- Opacidad corneal
- 2.- Úlcera corneal
- 3.- Área de neovasos totales
- 4.- Superficie conjuntival alterada
- 5.- Paquimetrías

IV.2.6.1. Adquisición de las imágenes

Para la toma de imágenes se utilizó una cámara fotográfica (figura IV.1-2.) a la que se adaptó un objetivo macro con aumento de lente x 2. Se empleó en todos los casos

película de diapositiva Agfacrome® de 100-asa. Todo el proceso de digitalización y posterior tratamiento de las imágenes se realizó a partir de diapositivas del segmento anterior de conejo que se escanearon y se trataron digitalmente mediante un programa informático de medición de áreas. Para la presentación de los resultados utilizamos las impresoras a color mencionadas en epígrafes anteriores.

Las imágenes digitalizadas están formadas por una combinación de puntos o *pixels*. Después de fotografiar las imágenes mediante el equipo fotográfico mencionado y en película de 35 mm, éstas diapositivas fueron escaneadas (HP Scanjet 5370 C) en idénticas condiciones. Mediante el programa (Image Tool) se calcula automáticamente el valor de un área determinada. Si consideramos una determinada área, el “valor total R” es la suma del valor R (1 a 255) de cada píxel en el área seleccionada. El “valor medio R” es la proporción entre el valor total R y el número de píxels del área por 255.

IV.2.7. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Una vez concluído el seguimiento del estudio (3 meses tras la causticación), se procedió al sacrificio de los animales de experimentación. Tras sedación, según describimos anteriormente, se practica la administración de cloruro potásico, previa a la canalización de la vena marginal situada en las orejas del animal. Tras el sacrificio procedimos a la extracción del globo ocular completo de cada uno de los animales. Los globos fueron fijados en paraformaldehído al 10% y remitidos para su estudio histológico al departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “La Fe” (Valencia).

IV.2.8. MÉTODOS DE ESTUDIO HISTOLÓGICO

Tras el sacrificio de los animales a los 90 días del estudio experimental, se realizaron estudios de microscopía óptica tanto con hematoxilina–eosina (HE) como técnicas de inmunohistoquímica (proteína S-100, Ki 67 y CD.34). Los elementos estudiados que fueron registrados, derivados de dicho estudio, fueron:

- 1 Estado conjuntival
- 2 Inflamación del limbo
- 3 Necrosis del limbo
- 4 Presencia de calcificaciones
- 5 Características del epitelio
 - Número de capas
 - Presencia de células caliciformes
 - Morfología
- 6 Úlceras epiteliales
- 7 Inflamación estromal
- 8 Neovascularización

Se extrajeron los globos oculares y se fijaron mediante inmersión en una solución de paraformaldehído al 10% a un PH de 7.4.

Para la enucleación se realizó una peritomía conjuntival de 360 °, sección de la musculatura extraocular, así como sección de los vasos sanguíneos y el nervio óptico. Una vez extraído el globo ocular se limpió la túnica escleral de tejido orbitario anejo y se

realizó una esclerotomía para permitir una mayor impregnación intraocular del fijador en el que se sumergiría el globo.

IV.2.8.1. Tinción con hematoxilina-eosina

Los globos oculares fueron fijados en formaldehído al 10% a temperatura ambiente de 22 a 25 grados centígrados durante un tiempo superior a 96 horas.

Previamente a la realización de la inclusión de los tejidos en parafina se realizaron cortes anteroposteriores de la pieza para que el segmento anterior del globo ocular pudiera ser seccionado adecuadamente mediante un microqueratomo. Posteriormente las piezas fueron procesadas mediante el aparato automático Histosec[®]. Para lograr la inclusión de las piezas en un bloque de parafina con los siguientes tiempos:

- Formaldehído 10%..... 1 hora
- Alcohol de 80 °..... 1 hora
- Alcohol de 96°..... 1 hora
- Alcohol de 96°..... 1 hora
- Alcohol de 96°..... 1 hora
- Alcohol absoluto..... 1 hora
- Alcohol absoluto..... 1 hora
- Alcohol absoluto..... 1 hora
- Xilol.....1 y ½ hora
- Xilol.....1 y ½ hora
- Parafina..... . 1 hora
- Parafina..... 1 hora

-Parafina..... 1 hora

-Parafina..... 1 hora

El bloque de parafina se ha cortado utilizando un microtomo de rotación (cuchilla fija y bloque móvil) de 5 micras de espesor. Los cortes se realizaron siguiendo el eje anteroposterior del ojo. A continuación se tiñeron con hematoxilina de Harris y eosina acuosa al 2% mediante el siguiente procedimiento:

-Colocación sobre el portaobjetos recubierto con poli-L-lisina.

-Desparafinado:

-15 minutos en estufa a 70° centígrados.

-Xilol 5 minutos en estufa a 50° centígrados.

-Rehidratación de la preparación:

-Alcohol absoluto en estufa a 50° centígrados.

-Alcohol de 96° en estufa a 50° centígrados.

-Lavado con agua destilada fuera de la estufa.

-Tinción:

-Hematoxilina durante 7 minutos.

-Lavado con agua.

-Alcohol de 70° con ácido clorhídrico al 5%.

-Lavado en agua destilada.

-Agua amoniacal al 3% durante 10 segundos.

-Eosina durante 4 minutos.

-Deshidratación de la preparación:

- Alcohol de 80°
- Alcohol de 96°
- Alcohol absoluto
- Xilol

-Colocación del cubre con medio de montaje de Eukitt®

IV.2.8.2. Técnicas de Inmunohistoquímica

Se han empleado estas dos técnicas: Proteína S-100 (marcador de tejido nervioso) y ki-67 y CD 34 (marcadores de proliferación celular), pero no hemos obtenido resultados concluyentes comparando grupo trasplante y membrana amniótica. Por lo que no hemos expuesto resultados.

IV.2.9. TRATAMIENTO MÉDICO

Ninguno de los animales de experimentación incluidos en este estudio fue sometido a tratamiento tópico ni sistémico, antibiótico o antiinflamatorio, tras la causticación.

IV.2.10. GRUPOS DE ESTUDIO

Se establecieron los siguientes 4 grupos de estudio:

Grupo Control

Este grupo constaba de 10 ojos derechos de 10 conejos. Tras las causticaciones practicadas según se ha descrito anteriormente, fueron seguidos clínicamente durante 90 días, practicando las exploraciones en los momentos mencionados: inmediatamente y en

los días 1, 3, 7, 14, 30, 60, y 90 tras la causticación. A los 90 días, tras sacrificio, los ojos fueron enucleados, fijados y sometidos a estudio morfológico.

Grupo trasplante a las 24 horas

Este grupo constaba de 10 ojos derechos de 10 conejos. Tras las causticaciones practicadas según se ha descrito anteriormente, se procedió a realizar un trasplante de membrana amniótica (MA) a las 24 horas de realizada la causticación experimental. El seguimiento clínico fue practicado inmediatamente y en los días 1, 3, 7, 14, 30 y 90 tras la causticación. A los 90 días tras la causticación, tras sacrificio del animal, los ojos fueron enucleados, fijados y sometidos a estudio morfológico.

Grupo trasplante a los 7 días

Este grupo constaba de 10 ojos derechos de 10 conejos. Tras las causticaciones practicadas según se ha descrito, se procedió a practicar trasplante de MA a los 7 días de practicada aquélla. El seguimiento clínico fue practicado inmediatamente y en los días 1, 3, 7, 14, 30, 60 y 90 tras la causticación. A los 90 días, tras sacrificio del animal, los ojos fueron enucleados, fijados y sometidos a estudio morfológico.

Grupo trasplante a los 30 días

Este grupo constaba también de 10 ojos derechos de 10 conejos. Tras las causticaciones practicadas según se ha descrito, se procedió a practicar trasplante de MA a los 30 días de practicada aquélla. El seguimiento clínico fue practicado inmediatamente y en los días 1, 3, 7, 14, 30, 60 y 90 tras la causticación. A los 90 días, tras sacrificio, los ojos fueron enucleados, fijados y sometidos a estudio morfológico.

IV.2.11. METODOLOGÍA DE ESTUDIO ESTADÍSTICO

Todos los datos u observaciones de este estudio experimental han sido recogidos siempre por el investigador principal. Describimos los métodos estadísticos utilizados para el análisis de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, siguiendo las directrices propuestas por Downie y Health (1977). Los datos fotográficos y morfológicos de los 40 conejos (40 ojos) intervenidos se han ordenado para su introducción en una base de datos computerizados. Los diferentes análisis estadísticos se han realizado con la aplicación informática SPSS® para Windows versión 7.5.

IV.2.11.1. IDENTIFICACIÓN

-Cada uno de los animales lleva asignado un número del 1 al 40, indicando si es ojo derecho (OD) o si es ojo izquierdo (OI). Generalmente hemos realizado el experimento en el OD de todos los animales. Salvo en aquellos que hemos excluído del estudio por diversas causas: microperforación, endoftalmitis, (figura IV.8. y IV.9.) técnica inadecuada.... En estos casos hemos continuado el experimento con el OI del animal.

-Grupo al que pertenece: Control, Trasplante MA 1d, Trasplante MA 7d y Trasplante MA 30d.

-La identificación la hemos rotulado en la oreja correspondiente del animal mediante un bolígrafo de tinta indeleble y en cada una de las jaulas que los albergaba.

Ej: 3 OD GC (Se refiere al animal nº 3 del experimento, la lesión en su ojo derecho y pertenece al grupo control).

15 OI GTMA 7d (animal nº 15, lesión en el ojo izquierdo y pertenece al grupo trasplante membrana amniótica 7 días).

IV.2.11.2. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

La medida de la tendencia central utilizada en el análisis de los datos obtenidos, es la media, definida como aquel valor de una distribución del cual la suma de las desviaciones es nula. Puede calcularse como la suma de los datos dividida por el número de casos, según:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{N} \text{ siendo:}$$

\bar{X} = media población

X = valor obtenido

N = número de casos

La medida de dispersión de la distribución de los datos calculada en todos los grupos es la desviación estándar (DE) de la muestra. La desviación estándar se define como la raíz cuadrada de la varianza de la distribución. Otros estadísticos de dispersión utilizados fueron el intervalo de confianza, los límites de la distribución y la distribución de frecuencias de las variables cuantitativas agrupadas por rangos.

IV.2.11.3. ESTADÍSTICA ANALÍTICA

En todas las comparaciones estadísticas establecidas con las pruebas que se detallarán a continuación se ha considerado que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando la probabilidad de que la diferencia no fuera tal sino debida al azar (error tipo I) era inferior al 5% ($p \leq 0,05$). Se han comparado la distribución de las **variables cuantitativas** entre los dos grupos (control y trasplante membrana amniótica) mediante la prueba **de t-student** para muestras independientes si la asunción de homocedasticidad ha sido correcta y entre los cuatro grupos mediante la prueba **ANOVA**.

II.2.11.3.1. Prueba t de Student para contraste de diferencia de medias

La prueba *t*-student se empleó para establecer comparaciones entre los parámetros estudiados entre dos grupos. Para establecer la diferencia entre los valores de medias, en poblaciones que siguen la distribución normal, obtenidas en los diferentes grupos ensayados para la variable respuesta estudiada se recurrió aun contraste de diferencia de medias en el que se establece una hipótesis nula. Se establece una hipótesis nula. Esta hipótesis consiste en la ausencia de diferencias entre las medias de las dos poblaciones para la variable respuesta estudiada. Suponiendo que dos poblaciones tengan la misma media para la variable estudiada, el cociente entre la diferencia de medias muestrales de las dos muestras extraídas de cada población y la desviación típica de esa diferencia se distribuye según una distribución *t* de Student, según la ecuación:

$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_{D\bar{X}}}$	<p>siendo: $t =$ razón t de Student</p> <p>\bar{X}_1 y $\bar{X}_2 =$ medias de los grupos</p> <p>$s_{D\bar{X}} =$ error típico de la diferencia</p>
--	--

El contraste estadístico más adecuado para un número de datos menor de 30 es la prueba t de Student. Por otra parte, la comprobada robustez de esta prueba nos ha permitido utilizarla en los casos en que no se verificaba la hipótesis de normalidad de las poblaciones comparadas.

En esta Tesis Doctoral se han realizado dos tipos de comparaciones. Por un lado, dentro de una misma muestra se ha valorado una variable antes y después de realizar el tratamiento con membrana amniótica tras la causticación, para lo cual se ha utilizado la t de Student para datos apareados, considerando como control los valores de la variable obtenidos de forma previa al tratamiento, y el ojo contralateral no tratado. Los resultados de estas comparaciones se detallan en el texto a lo largo del capítulo "Resultados", acompañando a la descripción de la evolución del parámetro considerado. Por otra parte, otras comparaciones se refieren a poblaciones diferentes, valorando la diferencia existente entre el valor medio de un mismo parámetro en dos grupos experimentales, para tiempos iguales tras el inicio del tratamiento. En este caso, el tipo de prueba t de Student utilizado es el de datos no apareados, y sus resultados aparecen en las figuras y tablas, señalando los puntos de la evolución en que los valores obtenidos en un grupo son significativamente distintos de los obtenidos en otro.

En ambas situaciones se ha utilizado el contraste de dos colas o bilateral, ya que se pretendía establecer la diferencia entre las medias de las diferentes poblaciones, sin presuponer la dirección de esta diferencia.

IV.2.11.3.2. Análisis de la varianza (ANOVA)

La prueba de la t de student es una herramienta potente para establecer la diferencia entre la medias de dos poblaciones. Sin embargo, en ocasiones se plantea la necesidad de comparar más de dos poblaciones. En este caso, el análisis de la varianza (ANOVA), compara simultáneamente todas las poblaciones y contrasta una hipótesis nula general que consiste en afirmar que no existe diferencia alguna entre las medias de la variable respuesta estudiada en las diferentes poblaciones a estudiar.

IV.2.11.3.3. Prueba de Chi-cuadrado. Prueba exacta de Fisher

La distribución de las variables cualitativas entre los dos grupos (control y trasplante de MA) se estudió mediante la prueba de chi-cuadrado con corrección de Yates o prueba exacta de Fisher cuando fue necesario. Se estableció $p=0.05$ en formulación bilateral para las dos comparaciones.

La distribución de las variables cualitativas en las tablas de contingencia entre los cuatro grupos (control, trasplante 24 horas, trasplante 7 días y trasplante 30 días) no ha cumplido los requisitos para realizar el cálculo estadístico de chi-cuadrado. Tampoco nos ha parecido apropiado la recategorización con colapso de categorías por lo que no hemos calculado ningún estadístico.

IV.2.12. INVESTIGACIÓN CLÍNICA

En este apartado expondremos nuestra experiencia clínica en pacientes con diversas patologías oftálmicas a lo largo de un periodo de 5 años. Contrastaremos nuestra experiencia y la compararemos con otros autores. Revisando la literatura en torno al empleo de MA en múltiples patologías: pterigion primario y recidivante, simbléfaron, causticaciones, descompensaciones corneales, microperforaciones corneales,... hemos encontrado casuísticas con resultados muy diversos. No se pretende con esta Tesis realizar análisis estadístico inferencial sino sólo describir los resultados.

IV.2.12.A. PACIENTES

Desde febrero de 1998 hasta Enero de 2003, han sido intervenidos mediante injertos de membrana amniótica en el Departamento de Oftalmología del Hospital “La Fe” 64 ojos de 63 pacientes. Las patologías tratadas las clasificamos en:

- Defectos epiteliales persistentes..... ..9
- Simbléfaron.....3
- Pterigion primario y recidivante19
- Descompensaciones endoteliales post cirugía27
- Causticaciones por ácido sulfúrico.....1
- Microperforaciones post-queratitis herpética.....1
- Microperforación postdegeneración calcárea.....2
- Microperforación postdehiscencia de sutura tras QP.....1
- Microperforación en glaucoma congénito.....1

Los casos intervenidos, todos recibieron tratamiento corticoideo y antibioterapia tópica a razón de 4 veces al día durante periodos de 2 semanas a 1 mes tras la cirugía. En todos los casos empleamos para suturar Vycril de 8 ó 9/0, sutura reabsorbible que desaparecía a las 3-4 semanas tras la cirugía.

El seguimiento clínico se realizó al día siguiente de la intervención, 1ª semana, 15 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses y 1 año tras la cirugía. En algunos casos controlamos a los pacientes a los 2 y 4 años tras la intervención, especialmente las microperforaciones. Durante los controles clínicos realizamos controles fotográficos con la misma cámara empleada que para realizar el estudio experimental (véase apartado materiales).

IV.2.12.B. TÉCNICA QUIRÚRGICA

(véase apartado I.15. INTRODUCCIÓN, página 108).

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS.

V.1. METODOLOGÍA DE ESTUDIO ESTADÍSTICO

Todos los datos u observaciones obtenidas de este estudio experimental han sido recogidos siempre por el mismo investigador principal. Describimos los métodos estadísticos utilizados para el análisis de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. Los datos fotográficos y morfológicos de los 40 conejos (40 ojos) intervenidos, se han ordenado para su introducción en una base de datos computerizados. De los 40 ojos que forman parte de este estudio, 10 pertenecen e al grupo control y 30 han sido sometidos a trasplante de membrana amniótica (MA) en diferentes tiempos (1^{er} día, 7 días y 30 días tras producir la causticación experimental). Los análisis estadísticos se han realizado con la aplicación informática SPSS[®] para Windows.

V.1.1. IDENTIFICACIÓN ANIMALES

-Cada uno de los animales lleva asignado un número del 1 al 40, indicando si es ojo derecho (OD) o si es ojo izquierdo (OI).

-Grupo al que pertenece: Control, Trasplante MA 1, Trasplante MA 7 y Trasplante MA 30.

V.1.2. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

La medida de la tendencia central utilizada en el análisis de los datos obtenidos, es la media, definida como aquel valor de una distribución del cual la suma de las desviaciones es nula.

$$X = \frac{\sum\beta}{n} \quad \text{donde: } X = \text{media de la población}$$

$\sum\beta =$ suma de todos los valores en la muestra.

$n =$ número de valores en la población.

La medida de dispersión de la distribución de los datos calculada en todos los grupos es la desviación estándar de la muestra. La desviación estándar se define como la raíz cuadrada de la varianza de la distribución. Otros estadísticos de dispersión utilizados fueron el intervalo de confianza, los límites de la distribución y la distribución de frecuencias de las variables cuantitativas agrupadas por rangos.

V.1.3. ESTADÍSTICA ANALÍTICA

Se han comparado la distribución de las variables cuantitativas entre los dos grupos (control y trasplante de membrana amniótica) mediante la prueba de t-student para muestras independientes si la asunción de homocedasticidad ha sido correcta

V.2. RESULTADOS

Abordaremos la descripción de los resultados desde varios puntos de vista:

V.2.A. DESCRIPCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.

V.2.B. COMPARACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL ENTRE GRUPO CONTROL Y GRUPO TRASPLANTADO.

V.2.C. COMPARACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL ENTRE GRUPO CONTROL, GRUPO TRASPLANTE 1^{er} DÍA, GRUPO TRASPLANTE 7 DÍAS Y GRUPO TRASPLANTE 30 DÍAS.

V.2.D. EXPERIENCIA CLÍNICA.

V.2.A. DESCRIPCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

Se estudiaron los siguientes aspectos:

V.2.A.1. Peso de los animales de experimentación.

V.2.A.2. Peso de los filtros Whatman # 3 secos.

V.2.A.3. Peso de los filtros Whatman # 3 humedecidos.

V.2.A.4. Peso del cáustico (NaOH 1N).

V.2.A.5. Opacidad corneal.

V.2.A.6. Úlcera corneal.

V.2.A.7. Área total de neovasos.

V.2. A.8. Superficie conjuntival alterada.

V.2.A.9. Paquimetrías.

V.2.A.1. Peso de los animales de experimentación.

En la tabla V.2.A.1 registramos los pesos medios de los animales de experimentación empleados a lo largo de todo el proceso (90 días). El peso mínimo de los conejos al inicio del experimento fue de 1569 gramos mientras que el máximo fue de 2784 gramos. Los animales fueron alimentados ad libitum y de manera homogénea. La mayoría de ellos ganaron peso a lo largo del experimento (figura V.2.A.1). A los 90 días el peso mínimo final fue de 2678 gramos, mientras que el peso máximo fue de 3900 gramos. En la tabla V.2.A.1. pueden apreciarse otros datos como el peso medio, mediana, desviación estándar y coeficiente de variación.

La mediana para cada corte temporal es similar a la media, expresión de la simetría de la distribución ponderal de los 10 conejos

La desviación estándar (DE) en todos los momentos estudiados (tabla V.2.A.1) presenta un coeficiente de variación mínimo de 7.78% el día 90 y máximo de 13.58% el día 0, lo que nos muestra que la distribución se encuentra suficientemente agrupada.

	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 3	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 30	DÍA 60	DÍA 90
Mínimo	1569	1721	1800	1800	1959	1940	2232	2678
Máximo	2784	2769	2789	2880	2980	3003	3654	3900
Media	2072,9	2112,3	2150,2	2265,1	2481,3	2664,3	2906,1	3168,3
DE	281,64	258,35	261,20	304,66	302,34	292,04	280,36	246,57
Mediana	1996,5	2128,5	2139,5	2191,5	2458,5	2673,5	2982,5	3124,5
Coef Var	13,58%	12,23%	12,1%	13,45%	12,18%	10,96%	9,64%	7,78%

Tabla V.2.A.1.: Evolución del peso en g (gramos) de los animales de experimentación.

EVOLUCIÓN PESO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN (gramos)

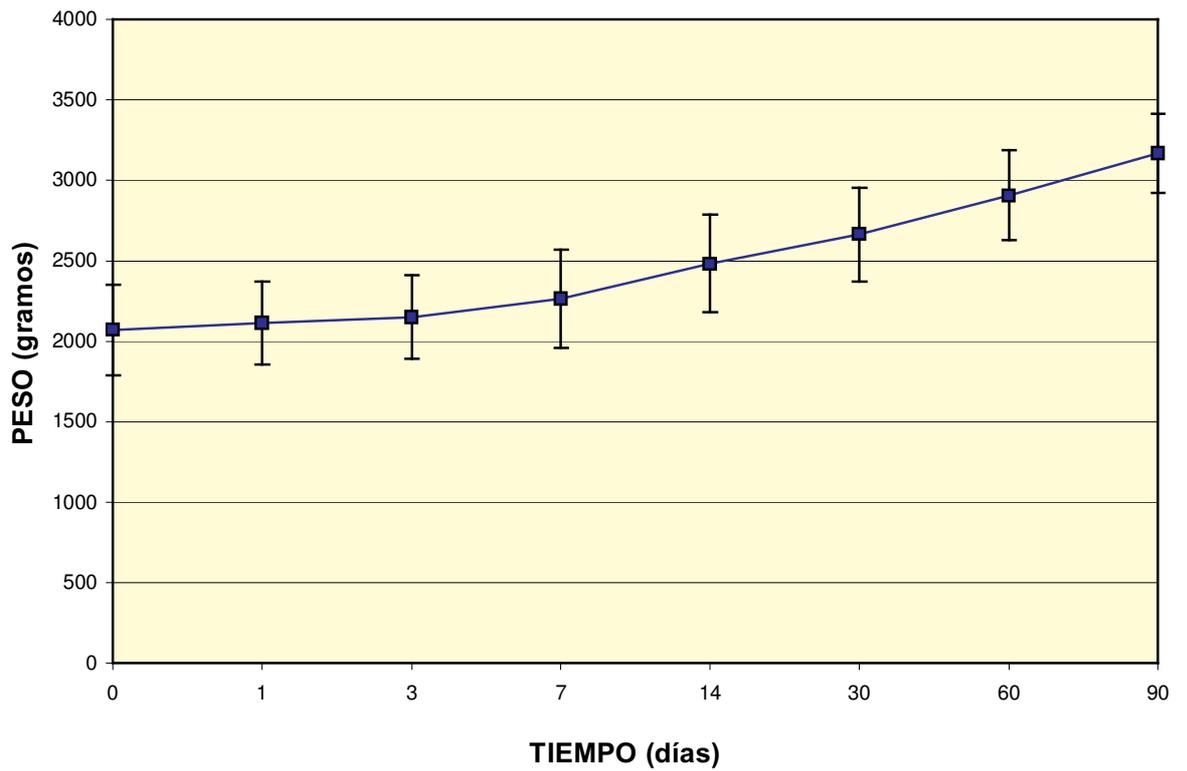


Figura V.2.A.1.: Evolución del peso (gramos) de los animales de experimentación.

V.2.A.2. Peso de los filtros de Whatman # 3 secos

La tabla V.2.A.2 registra los pesos de los fragmentos triangulares de filtro Whatman # 3 secos utilizados en los experimentos. El peso mínimo del filtro seco ha sido de 0.012 gramos y el máximo de 0.0132 gramos. El peso medio de los filtros ha sido de 0,01244 gramos.

La mediana (0,01235), es muy similar a la media (0,01244), expresión de la simetría de la distribución ponderal de los filtros empleados.

La desviación estándar (tabla V.2.A.2) presenta un coeficiente de variación del 2,6%, lo que expresa que la distribución se encuentra suficientemente agrupada.

	Filtros secos
Mínimo	0,012
Máximo	0,0132
Media	0,01244
Desviación Estándar	0,00032
Mediana	0,01235
Coef. Var	2.57%

Tabla V.2.A.2.: Peso (gramos) de los filtros Whatman # 3 secos.

V.2.A.3. Peso de los filtros de Whatman# 3 humedecidos

La tabla V.2.A.3 registra los pesos de los filtros Whatman #3 utilizados en los experimentos, una vez humedecidos en la solución NaOH 1N durante 45 segundos. El peso mínimo fue de 0,068 gramos y el máximo de 0,099 gramos. El peso medio de los filtros humedecidos fue de 0,084 gramos.

La mediana (0,085), es muy similar a la media (0,0847), expresión de la simetría de la distribución ponderal de los filtros empleados.

La desviación estándar (tabla V.2.A.3) presenta un coeficiente de variación de 10,62% lo que expresa que la distribución se encuentra suficientemente agrupada.

	Filtros humedecidos
Mínimo	0,068
Máximo	0,099
Media	0,0847
Desviación Estándar	0,009
Mediana	0,085
Coef. Var	10,62 %

Tabla V.2.A.3.: Peso (gramos) de los filtros humedecidos.

V.2.A.4. Peso del cáustico (NaOH 1N)

La tabla V.2.A.4 registra el peso del cáustico (NaOH 1N) utilizado en cada caso. El peso mínimo ha sido de 0,055 gramos y el máximo de 0,086 gramos. El peso medio del cáustico utilizado ha sido de 0,072 gramos.

La mediana (0,07275) y la media (0,07228) tienen valores muy similares, expresión de la simetría de la distribución ponderal del cáustico utilizado en los 10 casos.

El peso del cáustico se ha obtenido mediante la sustracción del peso de los filtros humedecidos al peso de los filtros secos.

La desviación estándar (tabla V.2.A.4) presenta un coeficiente de variación de 7.82% lo que expresa que la distribución se encuentra suficientemente agrupada.

	Peso cáustico
Mínimo	0,055
Máximo	0,086
Media	0,072
Desviación Estándar	0,0092
Mediana	0,074
Coef. Var	12,7%

Tabla V.2.A.4.: Peso (gramos) del cáustico (NaOH 1N).

V.2.A.5. Área de opacidad corneal

En la tabla V.2.A.5 se registra el área, expresada en mm^2 , de las opacidades corneales observadas en los animales de experimentación a lo largo del proceso. La opacidad corneal mínima al inicio del experimento (día 0) fue de $42,12 \text{ mm}^2$ y la máxima de $47,4 \text{ mm}^2$. Como se aprecia en la tabla V.2.A.5 y figuras V.2.A.5.1-5, la variable opacidad corneal presenta un valor inicial medio (día 0) de $44,569 \text{ mm}^2$ mientras que el área de opacidad media a los 90 días fue de $47,57 \text{ mm}^2$.

La mediana (tabla V.2.A.5) para cada corte temporal es parecida a la media, expresión de la simetría de la distribución respecto a la opacidad corneal de los 10 conejos.

La desviación estándar en todos los momentos investigados (tabla V.2.A.5) presenta un coeficiente de variación mínimo del 3,45% (día 3) y máximo de 5,4% (día 30 y 90) lo que expresa que la distribución se encuentra suficientemente agrupada.

OPACIDAD CORNEAL

	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 3	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 30	DÍA 60	DÍA 90
Mínimo	42,12	43,16	45,12	42,32	41,02	40,1	41,43	42,67
Máximo	47,45	49,6	50,32	49,51	48,51	49,27	51,98	49,56
Media	44,569	45,636	47,457	46,54	45,503	46,509	47,452	47,575
Mediana	43,36	44,58	47,78	46,5	46,14	47,23	47,9	48,38
DE	2,03	2,05	1,64	2,23	2,14	2,55	2,31	2,57
Coef Var	4,55%	4,49%	3,45%	4,79%	4,7%	5,4%	4,86%	5,41%

Tabla V.2.A.5.: Superficie (mm²) de las opacidades corneales.

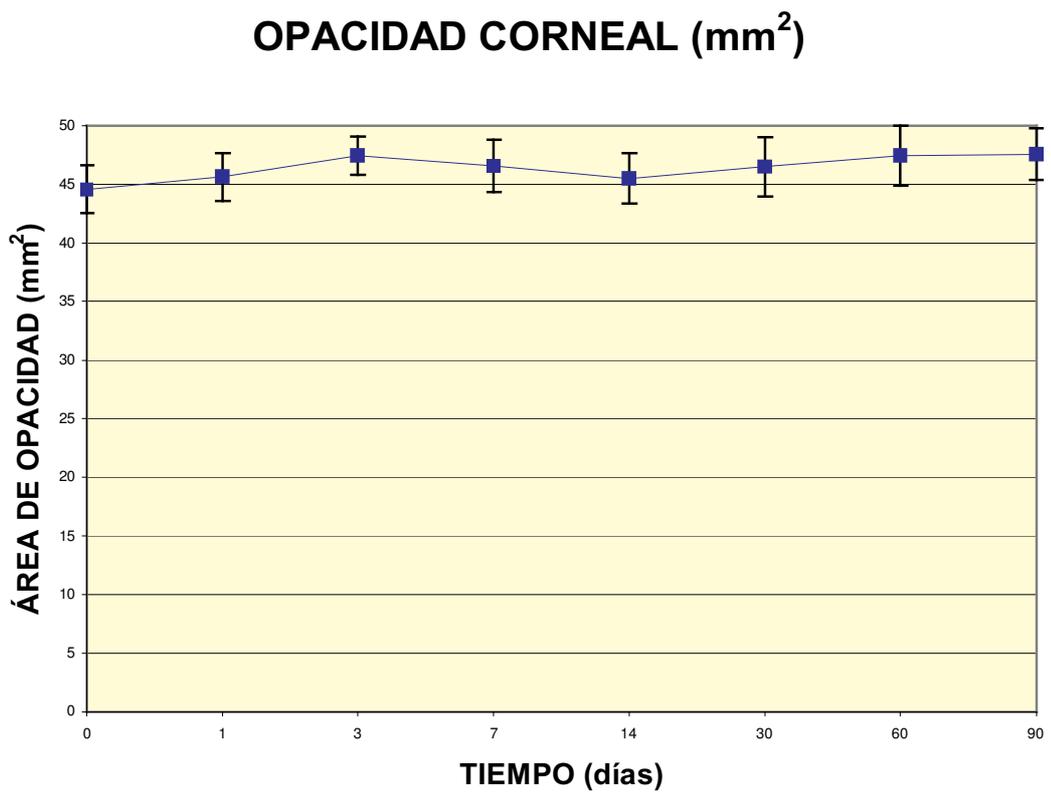


Figura V.2.A.5.1.: Superficie de opacidad corneal total (mm²).

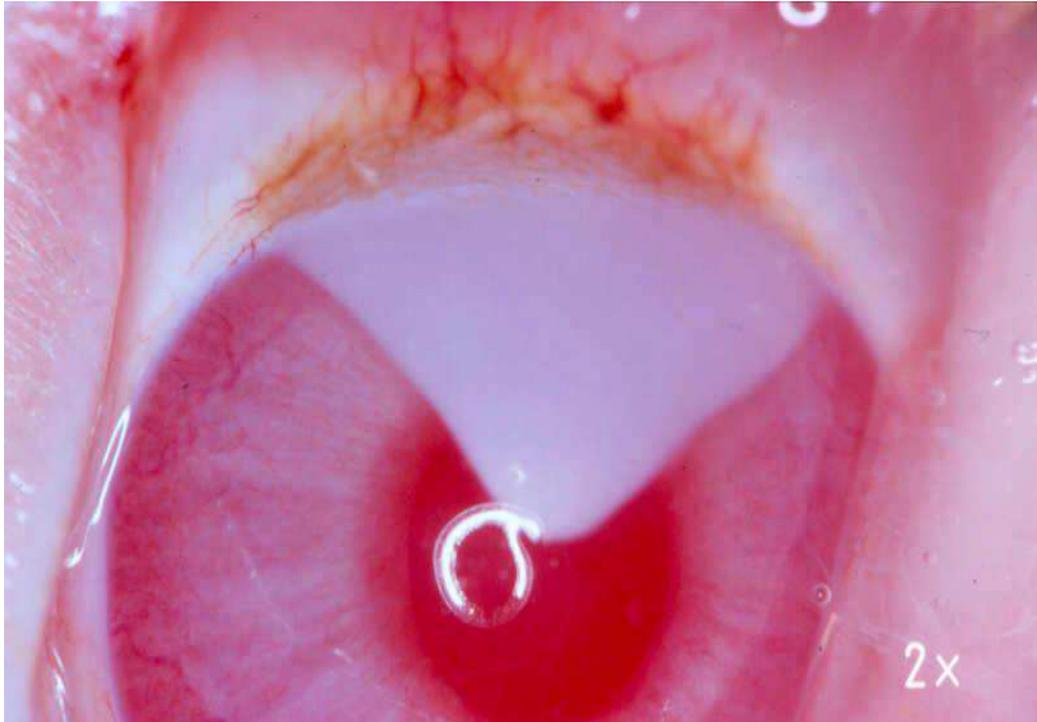


Figura V.2.A.5.2.: Opacidad corneal inmediatamente tras causticación.

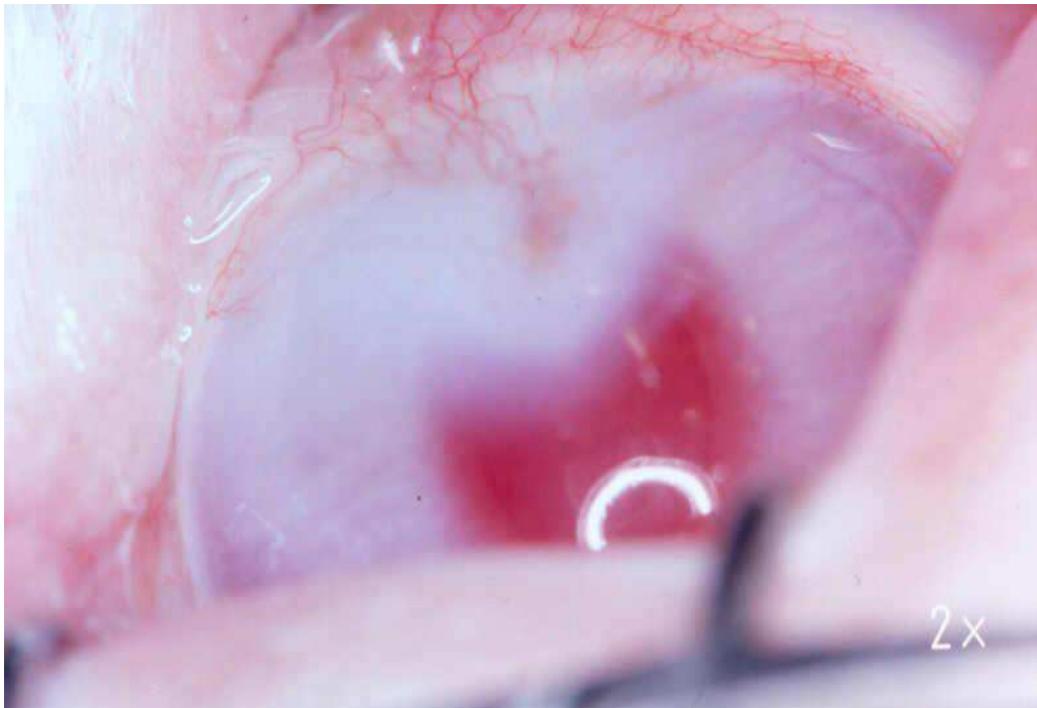


Figura V.2.A.5.3.: Opacidad corneal a los 7 días tras la causticación de la superficie ocular.

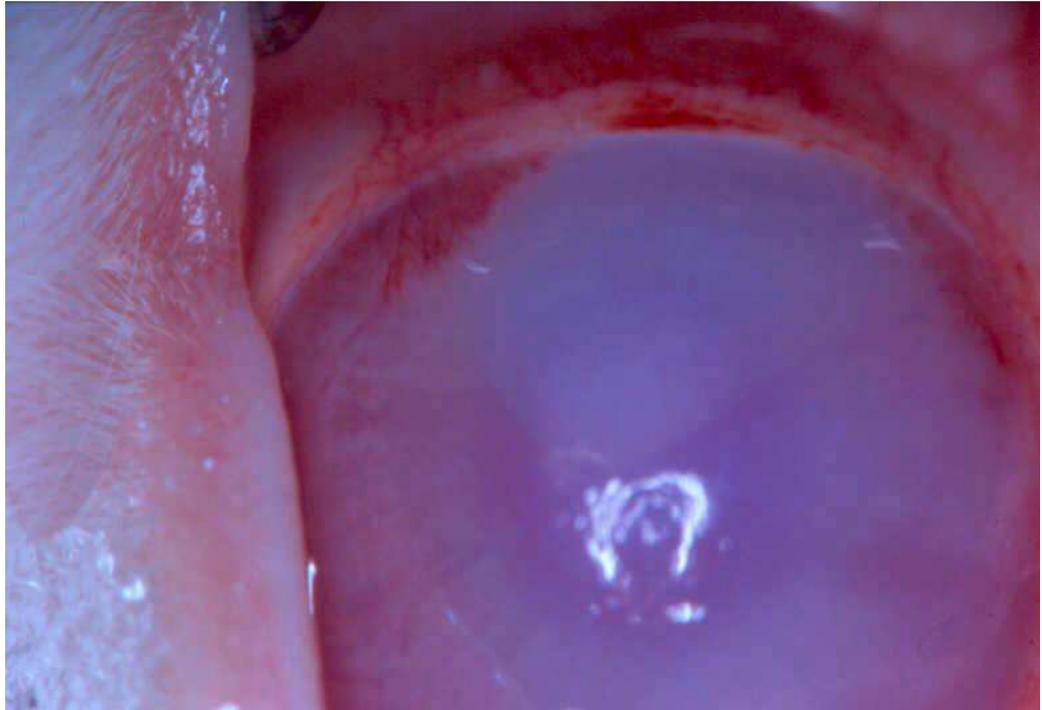


Figura 2.A.5.4.: Opacidad corneal a los 30 días tras la causticación de la superficie ocular.

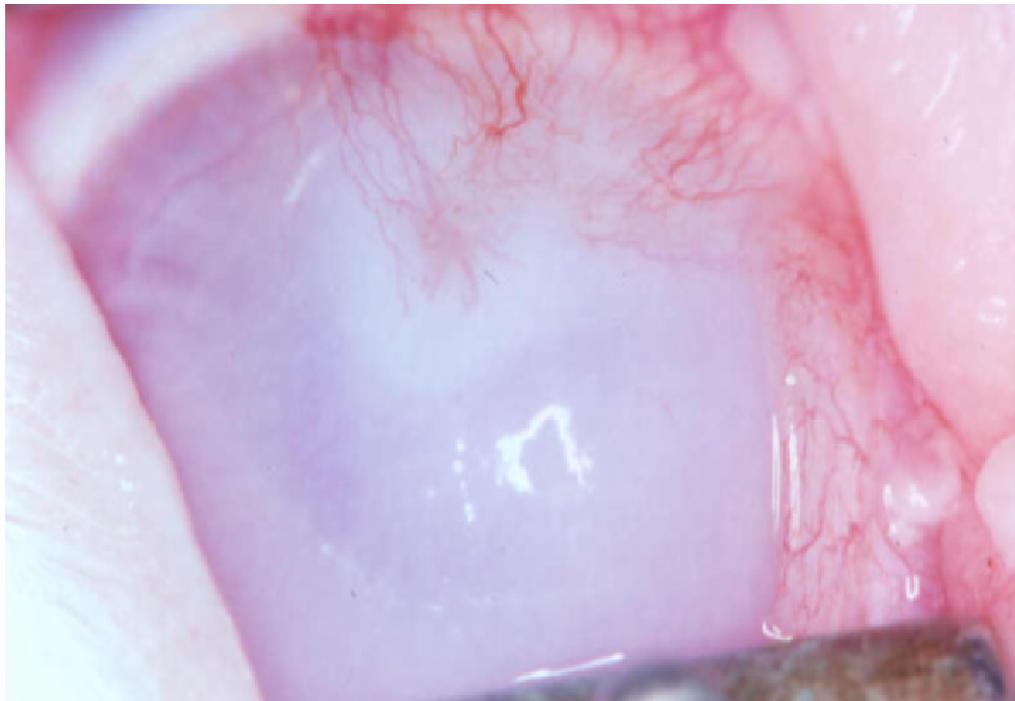


Figura V.2.A.5.5.: Opacidad corneal a los 90 días tras la causticación de la superficie ocular.

V.2.A.6. Área de úlcera corneal

En la tabla V.2.A.6 se registra el área expresada en mm^2 de las úlceras corneales observadas en los animales de experimentación a lo largo del proceso. La úlcera corneal mínima al inicio del experimento (día 0) fue de $42,12 \text{ mm}^2$ mientras que el área de la úlcera máxima en dicho momento fue de $47,45 \text{ mm}^2$. El valor inicial medio de la variable úlcera corneal fue de $44,56 \text{ mm}^2$ mientras que el medio al final del experimento (día 90) fue de $1,61 \text{ mm}^2$ (tabla V.2.A.6, figura V.2.A.6).

La mediana para cada corte temporal es similar a la media, expresión de la simetría de la distribución respecto a la variable úlcera corneal en los 10 conejos.

La desviación estándar en los momentos investigados (tabla V.2.A.6) presenta un coeficiente de variación mínimo de 4,55% (día 0) y máximo de 35% (día 90). Analizando el coeficiente de variación en cada corte de tiempo observamos que la distribución está suficientemente agrupada por no superar el 33%. Salvo levemente día 90.

ÚLCERA CORNEAL

	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 3	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 30	DÍA 60	DÍA 90
Mínimo	42,12	23,67	12,45	4,23	4,56	3,21	1,99	0,98
Máximo	47,45	29,99	17,45	10,9	9,93	6,9	4,09	2,56
Media	44,569	27,07	15,61	7,98	7,501	4,39	2,86	1,61
Mediana	43,36	27,35	16,02	7,96	8,035	4,23	2,66	1,35
DE	2,03	2,23	1,58	2,1	1,69	1,059	0,81	0,57
Coef.Var	4,55%	8,23%	10,12%	26,31%	22,53%	24,12%	28,32%	35 %

Tabla V.2.A.6.: Superficie (mm²) de úlcera corneal.

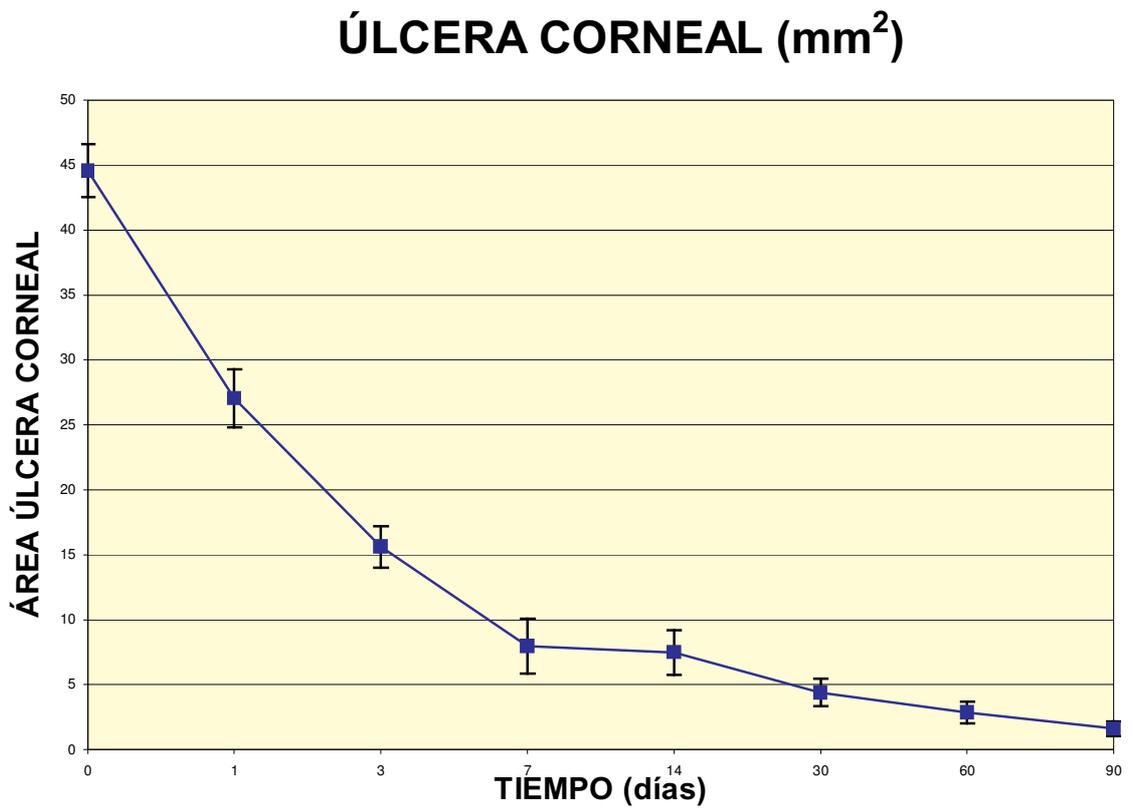


Figura V.2.A.6.: Superficie de úlcera corneal total (mm²).

V.2.A.7. Área de neovasos total

En la tabla V.2.A.7 se registran las superficies de las zonas de la córnea que presentan neovasos en los animales de experimentación a lo largo de los 90 días de seguimiento. A partir del tercer día algunos de los conejos, comenzaron los primeros signos de neovascularización incipiente que se objetivaron al séptimo día de evolución. La superficie total de neovasos mínima en córnea al 7º día fue de 7mm^2 y la máxima de 24mm^2 . El valor medio del área de neovasos inicial el 7º día del experimento fue de $14,6\text{mm}^2$, mientras que el valor medio el día 90 fue de $29,25\text{mm}^2$ (tabla V.2.A.7, figura V.2.A.7).

La mediana para cada corte temporal es similar a la media, expresión de la simetría de la distribución respecto a la variable área de neovasos en la córnea de los 10 conejos (tabla V.2.A.7).

La desviación estándar en todos los momentos investigados (tabla V.2.A.7) presenta un coeficiente de variación mínimo del 29,26% (día 90) y máximo del 63,26% (día 3), lo que expresa que la distribución no se encuentra suficientemente agrupada, salvo los días 60 y 90 donde si se encuentra suficientemente agrupada.

ÁREA TOTAL DE NEOVASOS CORNEALES

	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 3	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 30	DÍA 60	DÍA 90
Mínimo	0	0	0	7	10,6	12,45	1679	21,75
Máximo	0	0	1,2	24	41,67	42,67	42,3	41,33
Media	0	0	0,49	14,6	23,26	27,095	27,63	29,25
DE	0	0	0,31	6,13	10,27	10,084	9,065	7,69
Mediana	0	0	0,45	12,5	19,33	23,26	24,5	25,82
Coef Var	0%	0%	63,26%	41,98%	44,15%	37,21%	32,80%	29,26%

Tabla V.2.A.7: Superficies (mm²) de neovasos corneales.

ÁREA DE NEOVASOS TOTALES (mm²)

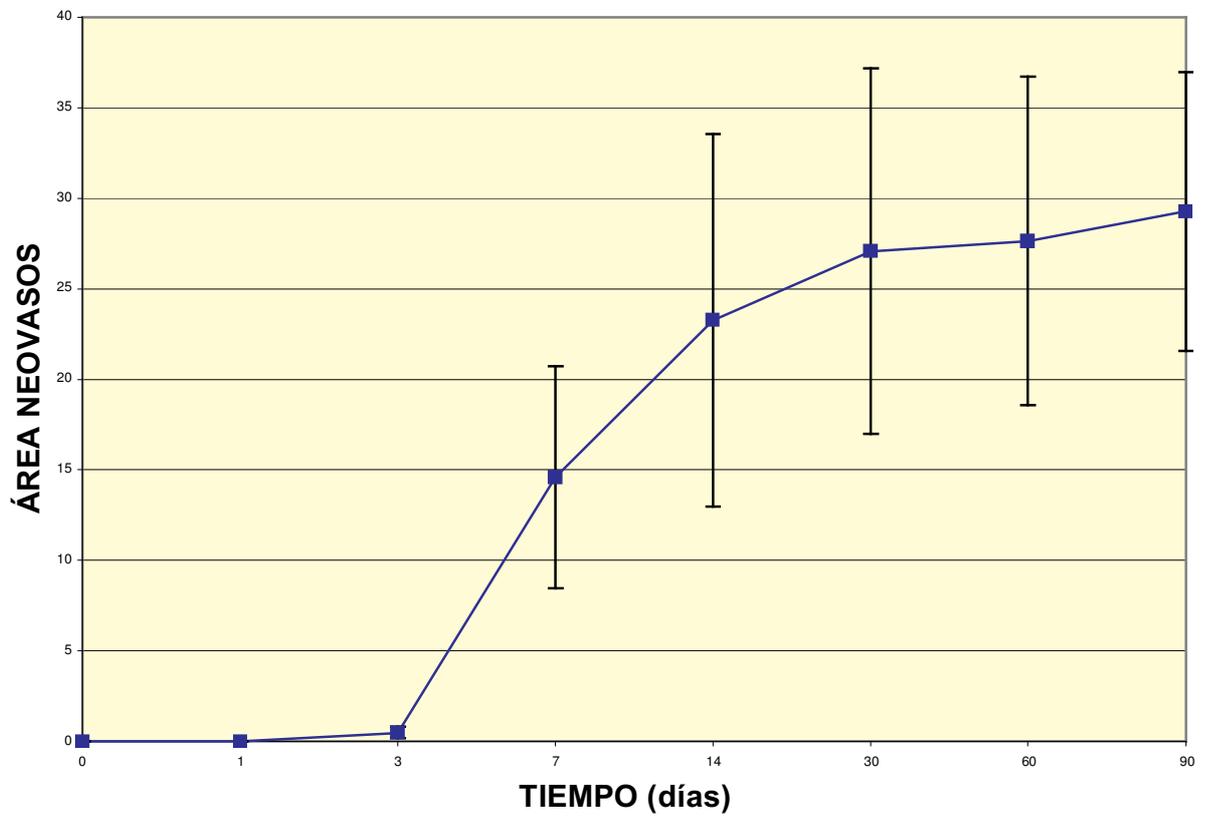


Figura V.2.A.7.: Superficie de neovasos totales (mm²).

V.2.A.8. Superficie conjuntival alterada.

En la tabla V.2.A.8 se registra el área expresada en mm^2 de la superficie conjuntival alterada observada macroscópicamente en los animales de experimentación a lo largo del proceso. La superficie conjuntival alterada mínima al inicio del experimento (día 0) fue de $35,68 \text{ mm}^2$ mientras que el área de la conjuntiva alterada máxima en dicho momento fue de $56,22 \text{ mm}^2$. El valor inicial medio de la variable superficie conjuntival alterada fue de $44,13 \text{ mm}^2$, mientras que el valor medio al final del experimento (día 90) fue de $26,13 \text{ mm}^2$ (tabla V.2.A.8, figura V.2.A.8).

La mediana para cada corte temporal es similar a la media, expresión de la simetría de a distribución respecto a la variable superficie conjuntival alterada en los 10 conejos. La desviación estándar en los momentos investigados (tabla V.2.A.8) presenta un coeficiente de variación mínimo de 16%(día 0) y máximo de 40% (día 7). Analizando el coeficiente de variación en cada corte de tiempo observamos que la distribución esta suficientemente agrupada.

SUPERFICIE CONJUNTIVAL ALTERADA

	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 3	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 30	DÍA 60	DÍA 90
Mínimo	35,68	30,40	24,27	16,85	14,07	14,86	12,36	12,83
Máximo	56,22	57,23	48,75	48,63	39,09	39,03	33,27	36,61
Media	44,13	41,99	35,01	28,51	25,27	24,36	23,89	26,13
DE	7,42	9,25	7,84	11,52	7,39	7,39	6,69	8,69
Mediana	41,83	42,02	35,57	23,96	25,38	25,24	25,92	28,92
Coef Var	16%	22%	22%	40%	29%	30%	27%	31%

Tabla V.2.A.8.: Superficies (mm^2) de conjuntiva alterada.

SUPERFICIE CONJUNTIVAL ALTERADA

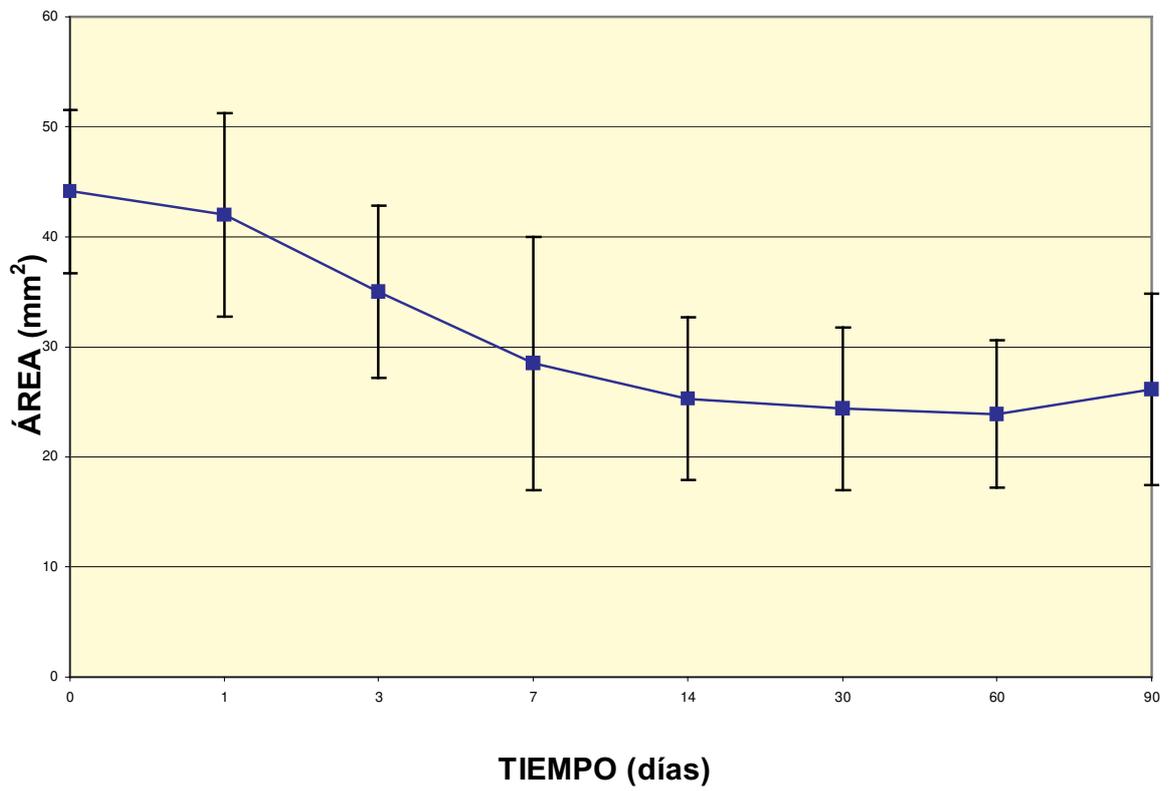


Figura V.2.A.8.: Superficie conjuntival alterada (mm²).

V.2.A.9. Paquimetrías

V.2.A.9.1. Paquimetrías en zona A (mm)

La tabla V.2.A.9.1. registra las paquimetrías medidas en la zona A en los animales de experimentación a lo largo del proceso experimental. La paquimetría mínima inicial en dicha zona ha sido de 0,395 mm y la máxima de 0,440 mm. Como puede apreciarse (figura V.2.A.9.1) la paquimetría en la zona A presenta un valor medio inicial de 0,414 mm (día 0) incrementándose hasta el día 3, momento a partir del cual presenta una disminución hasta alcanzar un valor final medio de 0,4742 mm.

La mediana para cada corte temporal es similar a la media, expresión de la simetría de la distribución paquimétrica en la zona A para los 10 conejos.

La desviación estándar en todos los momentos investigados (tabla V.2.A.9.1) presenta un coeficiente de variación mínimo de 1,9% (día 14) y máximo de 6,2% (día 1), lo que expresa que la distribución se encuentra suficientemente agrupada.

PAQUIMETRÍAS EN ZONA A

	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 3	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 30	DÍA 60	DÍA 90
Mínimo	0,395	0,679	0,798	0,658	0,56	0,689	0,512	0,442
Máximo	0,44	0,883	0,891	0,702	0,704	0,734	0,578	0,502
Media	0,414	0,81	0,843	0,675	0,6729	0,706	0,544	0,474
DE	0,012	0,051	0,034	0,0155	0,04	0,014	0,021	0,019
Mediana	0,413	0,816	0,853	0,6735	0,6795	0,7005	0,548	0,472
Coef Var	2,8%	6,2%	4%	2,2%	5,9%	1,9%	3,8%	4%

Tabla V.2.A.9.1.: Espesor corneal (mm) zona A.

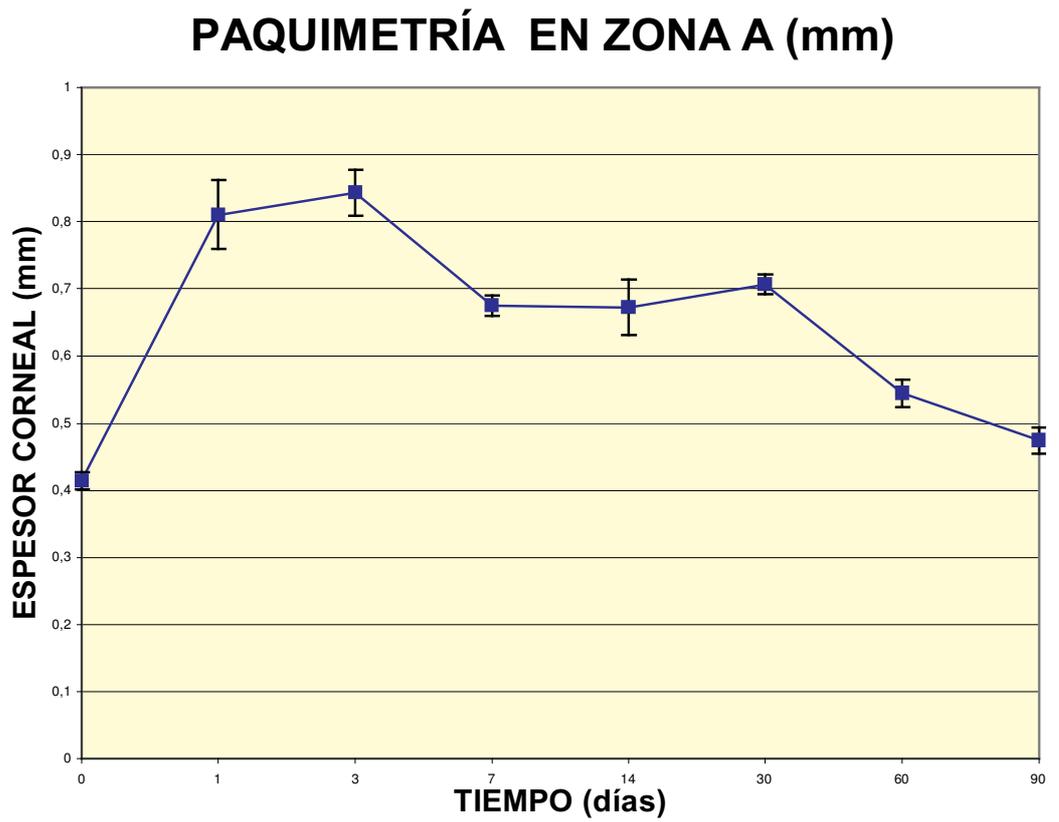


Figura V.2.A.9.1.: Espesor corneal (mm) en zona A.

V.2.A.9.2. Paquimetrías en zona B (mm)

La tabla V.2.A.9.2 registra las paquimetrías medidas en la zona B en los animales de experimentación a lo largo del proceso experimental. La paquimetría mínima inicial en dicha zona ha sido de 0,362 mm y la máxima de 0,495 mm. Como puede apreciarse (figura V.2.A.9.2.) la paquimetría en la zona B presenta un valor medio inicial de 0,438 mm incrementándose hasta el día 3, momento a partir del cual presenta una disminución hasta alcanzar un valor final medio de 0,652 mm.

La mediana para cada corte temporal es similar a la mediana, expresión de la simetría de la distribución paquimétrica en la zona B para los 10 conejos.

La desviación estándar en todos los momentos investigados (tabla V.2.A.9.2) presenta un coeficiente de variación mínimo de 9% (día 0) y máximo de 23% (día 30), lo que expresa que la distribución se encuentra suficientemente agrupada.

PAQUIMETRÍAS EN ZONA B

	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 3	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 30	DÍA 60	DÍA90
Mínimo	0,362	0,489	0,541	0,43	0,431	0,439	0,466	0,449
Máximo	0,495	0,884	0,94	0,81	0,998	1,02	0,92	0,82
Media	0,438	0,722	0,753	0,65	0,775	0,855	0,773	0,652
DE	0,039	0,131	0,116	0,117	0,163	0,201	0,159	0,108
Mediana	0,441	0,782	0,748	0,615	0,846	0,956	0,83	0,653
Coef Var	9%	18%	15%	18%	21%	23%	20%	16%

Tabla V.2.A.9.2.: Paquimetrías (mm) en zona B.

PAQUIMETRÍAS EN ZONA B (mm)

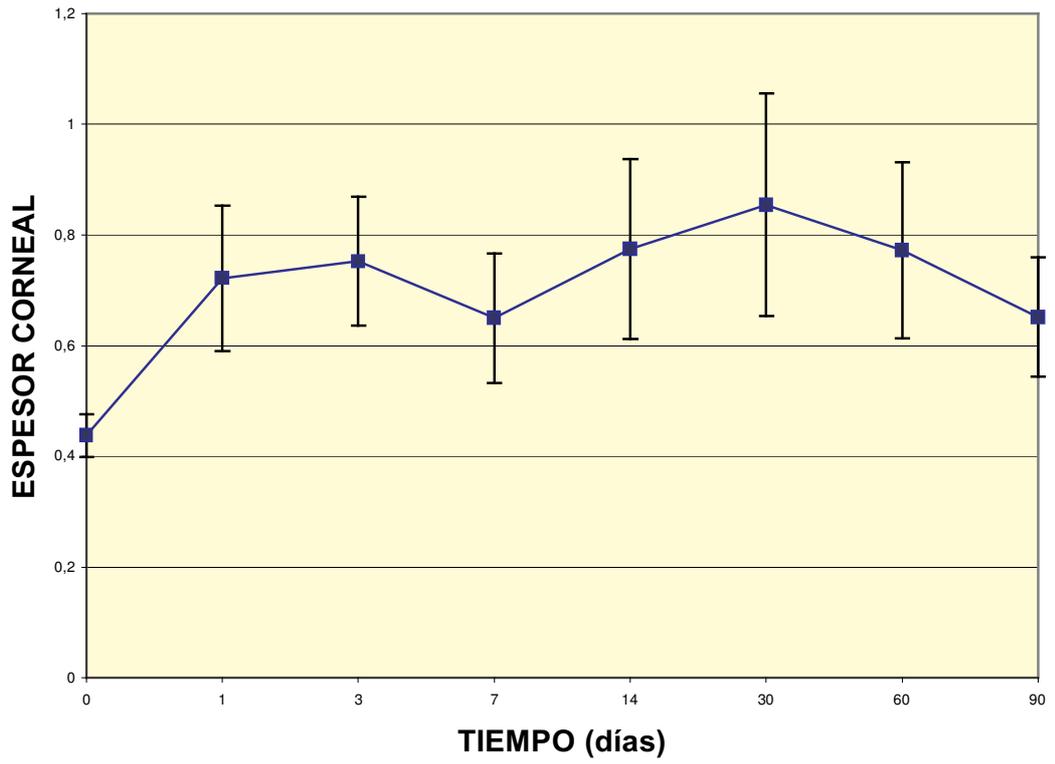


Figura V.2.A.9.2.: Espesor corneal (mm) en zona B.

V.2.A.9.3. Paquimetrías en zona C (mm)

La tabla V.2.A.9.3 registra las paquimetrías medidas en la zona C en los animales de experimentación a lo largo del proceso experimental. La paquimetría mínima inicial en dicha zona ha sido de 0,305 mm y la máxima de 0,375 mm. Como puede apreciarse (figura V.2.A.9.3.) la paquimetría en la zona C presenta un valor medio inicial de 0,352 mm incrementándose hasta el día 3, momento a partir del cual presenta una disminución hasta alcanzar un valor final medio de 0.363 mm.

La mediana para cada corte temporal es similar a la media, expresión de la simetría de la distribución paquimétrica en la zona C para los 10 conejos.

La desviación estándar en todos los momentos investigados (tabla V.2.A.9.3.) presenta un coeficiente de variación mínimo de 5% (día 0) y máximo de 27% (día 7), lo que expresa que la distribución se encuentra suficientemente agrupada.

PAQUIMETRÍAS EN ZONA C

	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 3	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 30	DÍA 60	DÍA 90
Mínimo	0,305	0,489	0,423	0,334	0,289	0,314	0,33	0,325
Máximo	0,375	0,781	1,048	0,817	0,601	0,431	0,404	0,41
Media	0,352	0,563	0,705	0,504	0,442	0,378	0,364	0,363
DE	0,021	0,082	0,19	0,137	0,085	0,035	0,03	0,032
Mediana	0,36	0,547	0,677	0,458	0,435	0,376	0,362	0,353
Coef Var	5%	14%	26%	27%	19%	9%	8%	8%

Tabla V.2.A.9.3: Paquimetrías (mm) en la zona C.

PAQUIMETRÍAS EN ZONA C (mm)

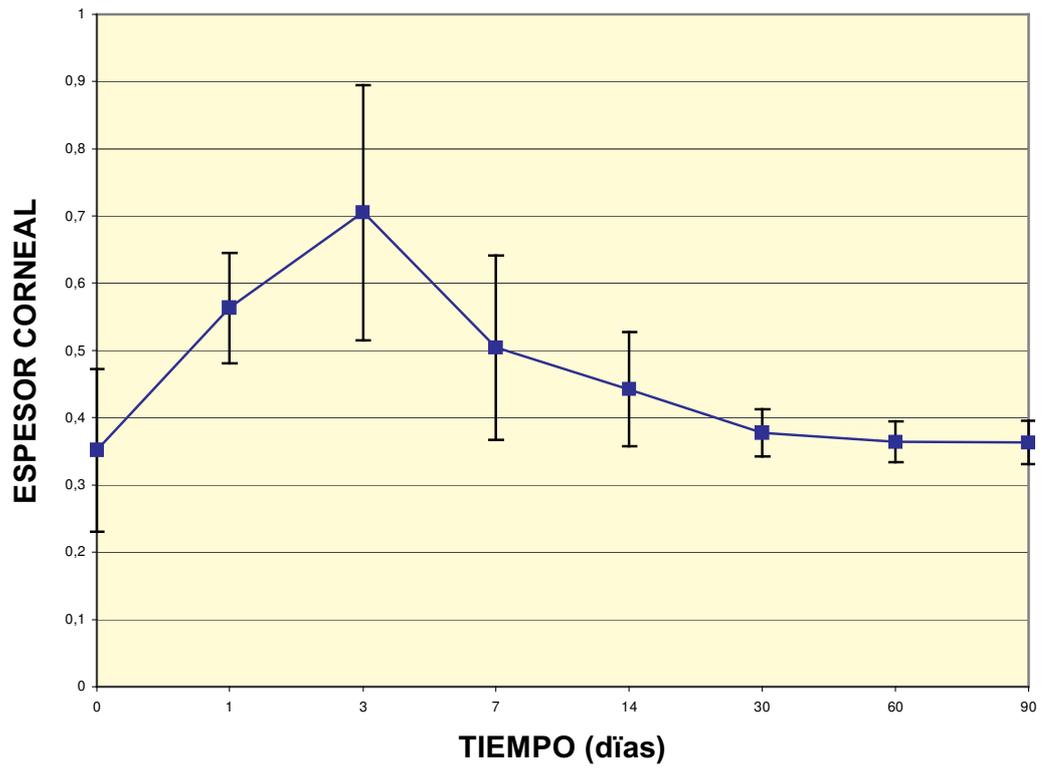


Figura V.2.A.9.3.: Espesor corneal (mm) en zona C.

V.2.A.10. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Tras sacrificio, al finalizar el estudio experimental, según se ha descrito en el capítulo de material y métodos, todos los globos oculares fueron sometidos a estudio histológico, detallándose a continuación los datos observados:

1. Características del epitelio corneal:

1.1. Número de capas. De todos los casos estudiados, en ningún caso el epitelio ha presentado un número normal de capas (4-5 capas). En el 20% (2 casos) de los casos el epitelio ha presentado entre 2-3 capas mientras que en el 80% de los casos (8 casos) el epitelio ha sido prácticamente atrófico, con 1 o ninguna capa.

1.2. Presencia de células caliciformes. En el 70 % de los casos (7 casos) se han observado células caliciformes y no se han observado en 3 de los casos (30%).

1.3. Morfología. En general los epitelios de los 10 ojos de conejo presentaban características de atrofia tras la causticación.

2. Características del estroma corneal:

De los 10 ojos estudiados, se ha observado inflamación estromal en el 100%(10 casos) de los casos.

2.1 Presencia de células inflamatorias en estroma corneal

-Eosinófilos. Se ha objetivado la presencia de eosinófilos en el 100% de los casos (10 casos).

-Linfocitos Se ha objetivado la presencia de eosinófilos en el 100% de los casos (10 casos).

-Polimorfonucleares. No se han observado en el 60% (6 casos) y si en el 40% (4 casos).

-Células plasmáticas. Se han observado en el 100% (10 casos) de los casos.

3. Estado de la conjuntiva.

De los 10 ojos estudiados, el 40% de los casos (4 casos) han presentado una conjuntiva de aspecto normal y en el 60% (6 casos) la misma ha sido considerada como patológica.

4. Neovascularización.

En el estudio histológico, se ha observado neovascularización en el 100% de los casos (10 ojos), en el 80% (8 casos) la neovascularización ha infiltrado el tercio externo de la córnea y en el 20% (2 casos) se ha extendido a capas más profundas.

V.2.B. COMPARACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL ENTRE GRUPO CONTROL Y GRUPO TRASPLANTADO.

Compararemos los dos grupos de estudio establecidos, de n=10 ojos el grupo control y n=30 ojos del grupo trasplante:

- Grupo control
- Grupo trasplantado con membrana amniótica

Estudiaremos los siguientes aspectos:

V.2.B.1. Peso de los animales de experimentación.

V.2.B.2. Peso de los filtros Whatman # 3 secos.

V.2.B.3. Peso de los filtros Whatman # 3 humedecidos.

V.2.B.4. Peso del cáustico (NaOH 1 N).

V.2.B.5. Opacidad corneal.

V.2.B.6. Úlcera corneal.

V.2.B.7. Área total de neovasos.

V.2.B.8. Alteración conjuntival.

V.2.B.9. Paquimetrías.

V.2.B.10. Estudio histológico.

V.2.B.1. Peso de los animales de experimentación.

En la tabla V.2.B.1 registramos las medias y desviaciones estándar de los pesos de los conejos durante todo el experimento, tanto del grupo control (n=10) como del grupo trasplante de membrana amniótica (n=30). Mediante la prueba t-student para muestras independientes, comparamos las medias de los pesos entre ambos grupos y no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

VARIABLE	Grupo Control	Grupo TMA	p
PESO día 0	2072,9	2127,9	NS
PESO día 1	2112,3	2180,46	NS
PESO día 3	2150,2	2222,26	NS
PESO día 7	2265,1	2356,73	NS
PESO día 14	2481,3	2570,2	NS
PESO día 30	2664,3	2757,2	NS
PESO día 60	2906,1	2872,1	NS
PESO día 90	3168,3	3116,73	NS

Tabla V.2.B.1.: Peso (gramos) de los animales de experimentación.

EVOLUCIÓN PESO ANIMALES EXPERIMENTACIÓN

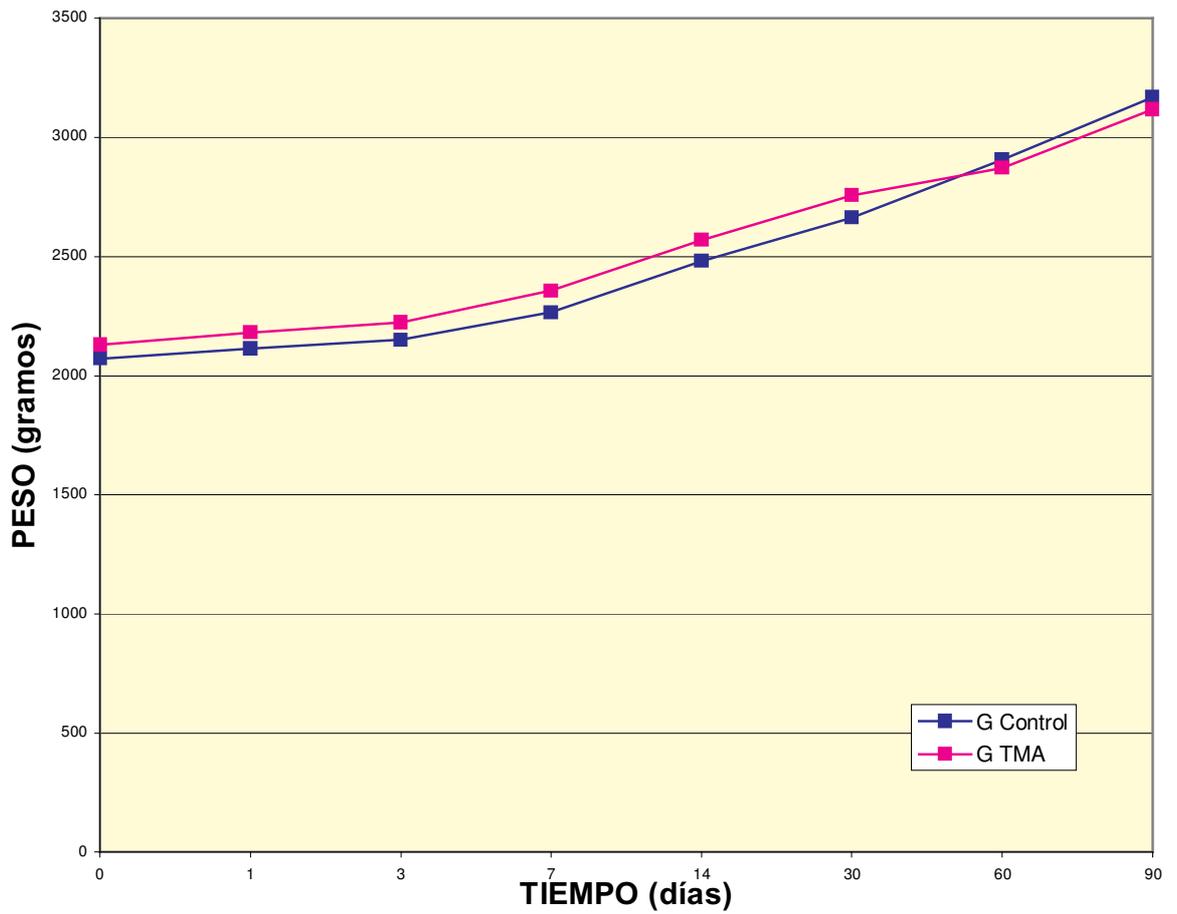


Figura V.2.B.1.: Peso (gramos) de los animales de experimentación.

V.2.B.2. Peso de los filtros Whatman # 3 secos.

Mostramos en la tabla V.2.B.2. las medias y la desviaciones estándar de los pesos de los filtros Whatman # 3 secos empleados en los experimentos tanto del grupo control (n=10) frente al grupo trasplante de membrana amniótica (n =30).

Comparando mediante la prueba de t-student, para muestras independientes, no se observaron diferencias significativas (tabla V.2.B.2) referentes al peso del filtro utilizado en ambos grupos.

VARIABLE	Grupo Control	Grupo TMA	p
Peso filtro	0,012 (±0,001)	0,013 (±0,001)	NS

Tabla V.2.B.2.: Peso (gramos) de los filtros Whatman # 3 secos.

V.2.B 3. Peso de los filtros Whatman # 3 humedecidos.

La tabla V.2.B.3. registra las medias y las desviaciones estándar de los pesos de los filtros de Whatman # 3 utilizados en los experimentos, una vez humedecidos en la solución de NaOH 1N durante 45 segundos, en el grupo control (n =10) frente al grupo con trasplante de membrana amniótica (n =30).

De la comparación de las medias mediante la prueba de t-student , para muestras independientes, no se observan diferencias significativas (Tabla V.2.B.3.), en lo referente al peso del filtro humedecido utilizado entre ambos grupos.

VARIABLE	Grupo Control	Grupo TMA	p
Peso f. húmedo	0,012 (±0,007)	0,013 (±0,011)	NS

Tabla V.2.B.3.: Peso (gramos) de los filtros Whatman # 3 humedecidos.

V.2.B 4. Peso del cáustico (NaOH 1 N).

La Tabla V.2.B.4 registra las medias y las desviaciones estándar de los pesos del cáustico utilizado en los experimentos, una vez humedecidos en la solución de NaOH 1N durante 45 segundos, en el grupo control (n=10) frente al grupo con trasplante de membrana amniótica (n =30).

De la comparación de las medias mediante la prueba de t-student, para muestras independientes, no se observan diferencias significativas (tabla V.2.B.4), en lo referente al peso del cáustico utilizado entre ambos grupos.

VARIABLE	Grupo Control	Grupo T MA	p
Peso cáustico	0,063 (± 0,007)	0,066 (± 0,007)	NS

Tabla V.2.B 4.: Peso (gramos) del cáustico (NaOH 1N).

V.2.B.5. Opacidad corneal.

La tabla V.2.B.5 registra las medias de las superficies de las opacidades corneales observadas en los animales de experimentación del grupo control (n=10) frente al grupo trasplante de membrana amniótica (n=30) a lo largo del proceso experimental (figura V.2.B.5).

De la comparación de medias mediante la prueba de t-student, para muestras independientes, no se observan diferencias significativas entre ambos grupos en las observaciones practicadas en los días 0 y 1, siendo significativa ($p < 0,05$) a partir del 3^{er} día y ganando cada vez más significación ($p < 0,001$) a partir de los días 30, 60 y 90 . (tabla V.2.B.5).

OPACIDAD CORNEAL

EXPLORACIÓN	Grupo Control	Grupo TMA	p
DÍA 0	44,56	44,17	NS
DÍA 1	45,63	43,9	NS
DÍA 3	47,45	39,3	<0,05
DÍA 7	46,54	36,68	<0,001
DÍA 14	45,5	34,07	<0,001
DÍA 30	46,5	32,42	<0,001
DÍA 60	47,45	30,48	<0,001
DÍA 90	47,57	28,002	<0,001

Tabla V.2.B. 5.: Superficies (mm²) de las opacidades corneales.

OPACIDAD CORNEAL COMPARACIÓN ENTRE GRUPO CONTROL Y GRUPO TRASPLANTE MA

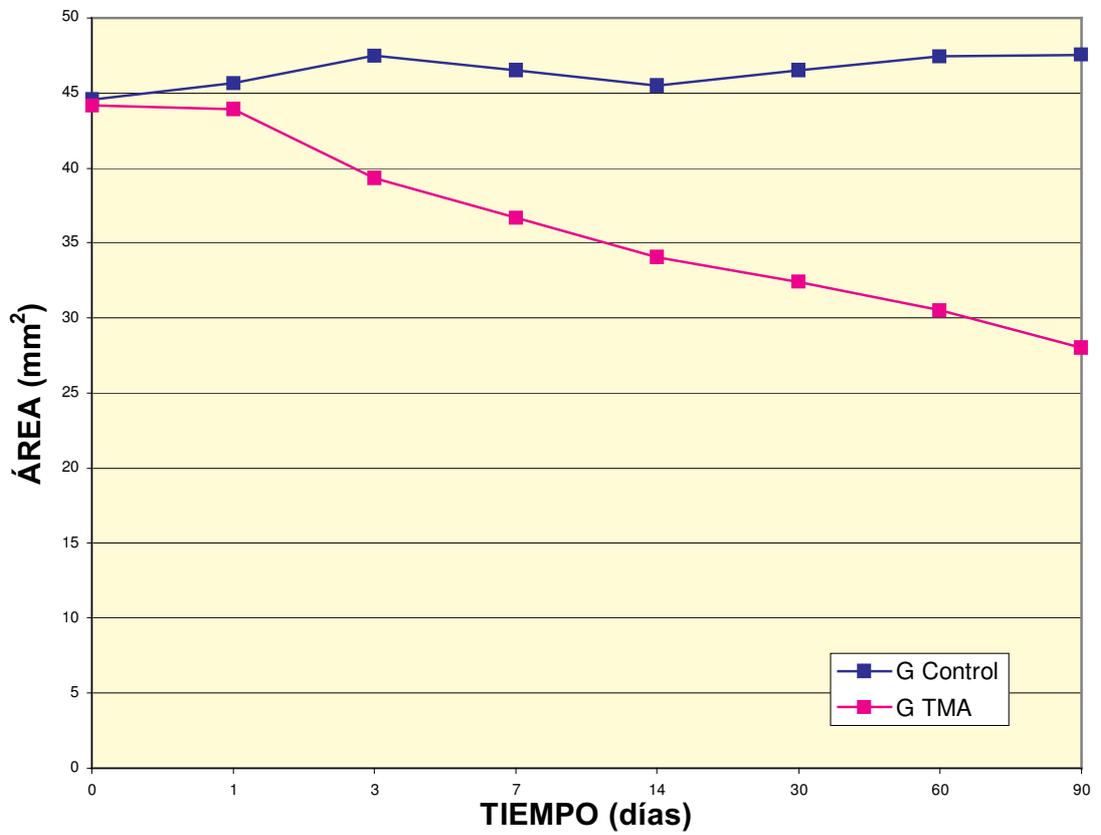


Figura V.2.B.5.1.: Superficie de opacidad corneal total (mm²).

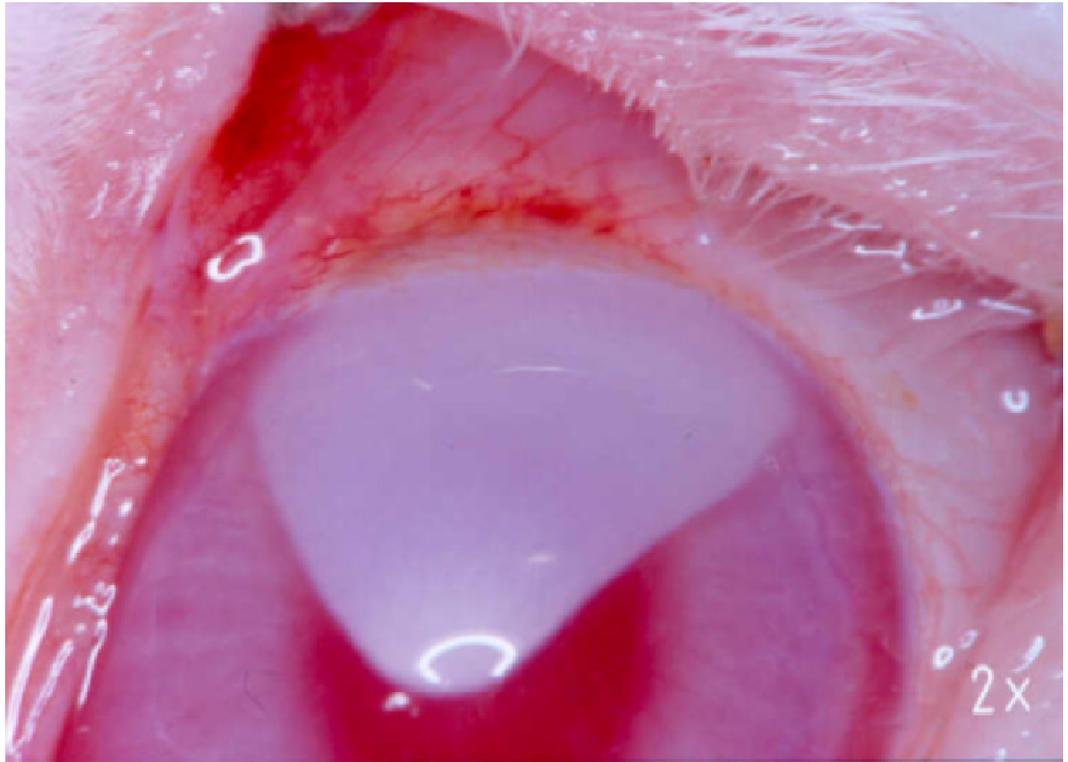


Figura V.2.B.5.2.: Opacidad corneal tras causticación (Grupo control).

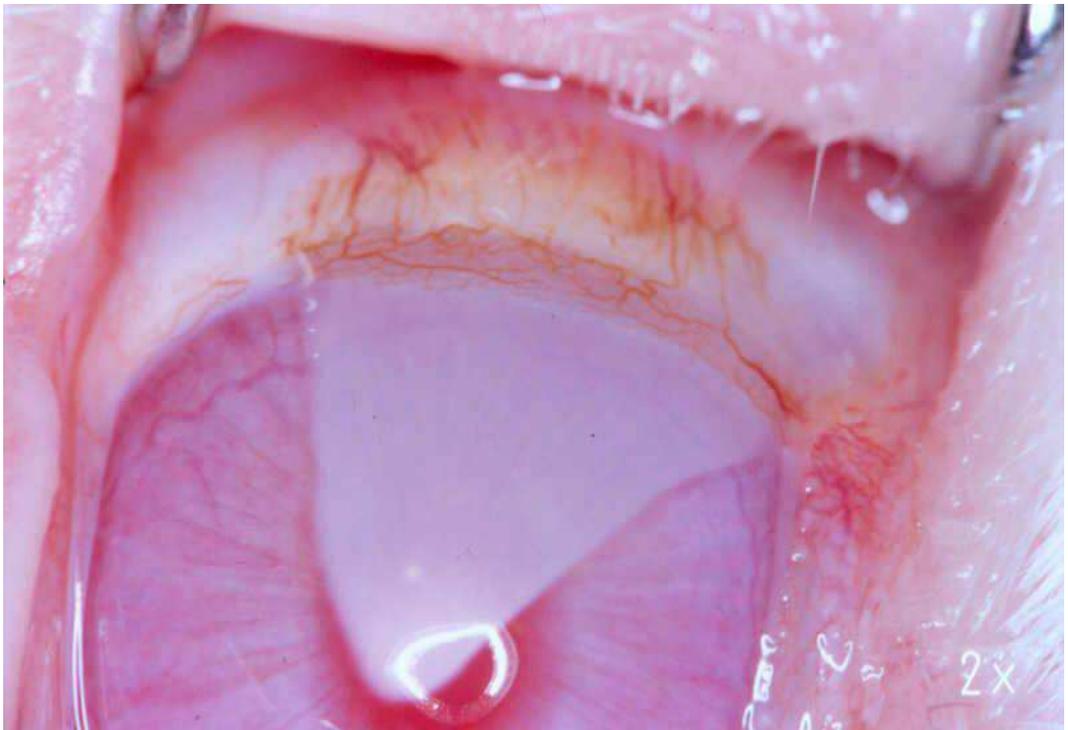


Figura V.2.B.5.3.: Opacidad corneal tras causticación (Grupo Trasplante de MA).



Figura V.2.B.5.4.: Opacidad corneal 90 días tras la causticación (Grupo Control)

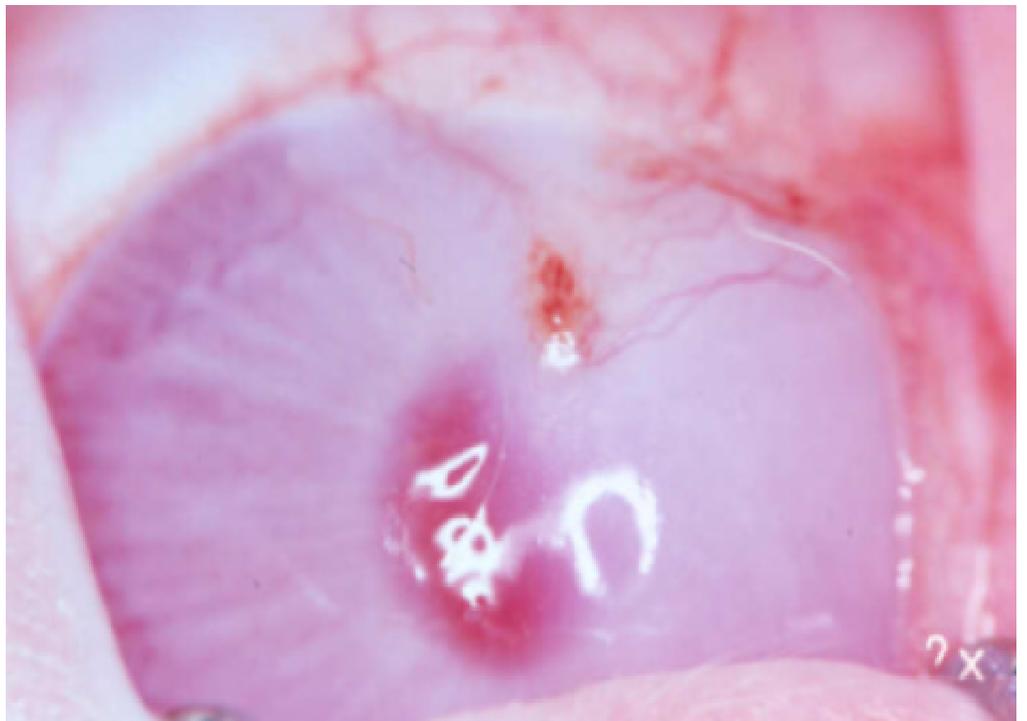


Figura V.2.B.5.5.: Opacidad corneal a los 90 días tras la causticación (Grupo Trasplante de MA).

V.2.B.6. Úlcera corneal.

La tabla V.2.B.6 registra las medias de las superficies de las úlceras corneales observadas en los animales de experimentación del grupo control (n=10) frente al grupo trasplante de membrana amniótica (n=30) a lo largo del proceso experimental (figura V.2.B 6).

De la comparación de medias mediante la prueba de t-student, para muestras independientes, no se observan diferencias significativas entre ambos grupos en las observaciones practicadas en los días 0 y 1, siendo significativa ($p < 0,05$) en el día 90 y altamente significativa ($p < 0,01$) en los días 3, 7, 14, 30 y 60.

ÚLCERA CORNEAL

EXPLORACIÓN	Grupo Control	Grupo TMA	p
DÍA 0	44,56	44,17	NS
DÍA 1	27,069	26,25	NS
DÍA 3	15,61	11,213	<0,001
DÍA 7	7,98	5,68	<0,01
DÍA 14	7,5	3,27	<0,001
DÍA 30	4,393	1,77	<0,001
DÍA 60	2,84	0,66	<0,01
DÍA 90	1,607	0,18	<0,05

Tabla V.2.B.6.: Superficies (mm²) de las úlceras corneales.

ÚLCERA CORNEAL

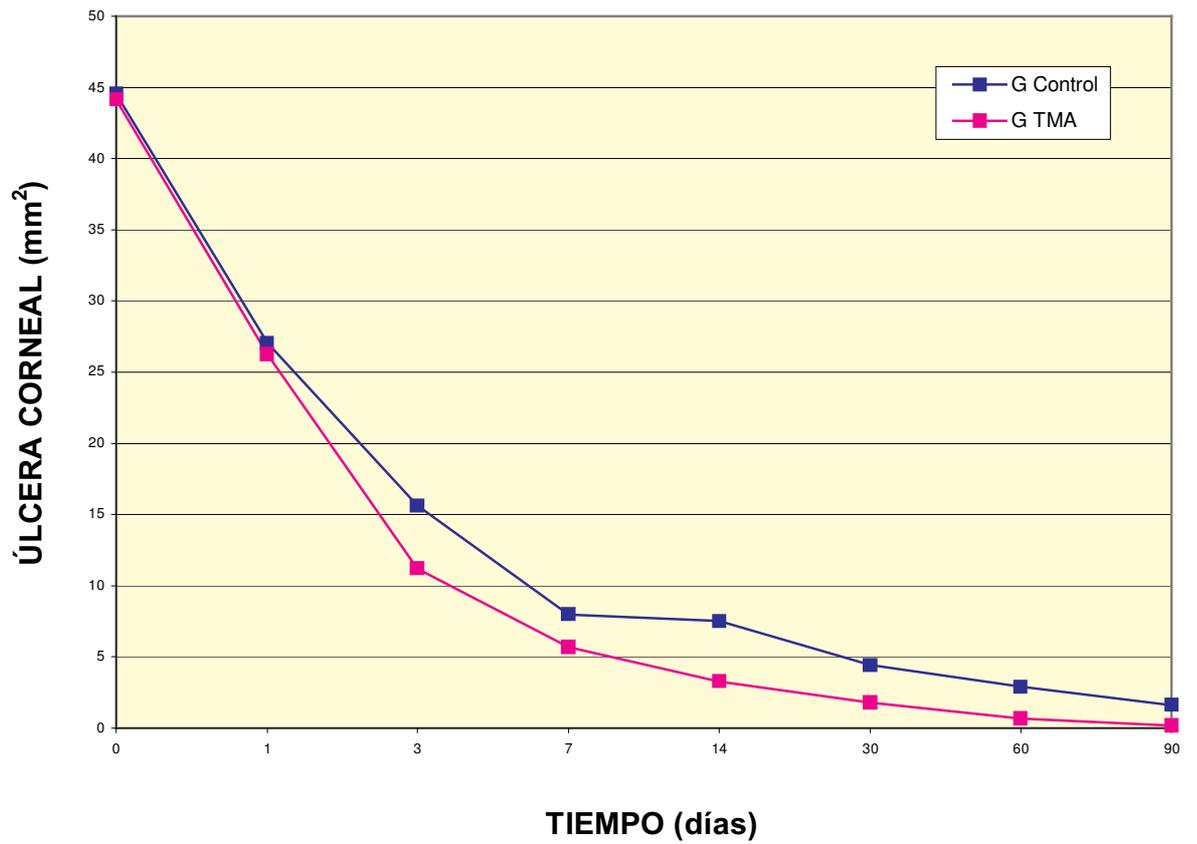


Figura V.2.B 6.: Superficies (mm²) de las úlceras corneales.

V.2.B.7. Superficie conjuntival alterada

En la tabla V.2.B.7 se registran las medias de la superficie conjuntival alterada observada macroscópicamente en los animales de experimentación a lo largo del proceso en el grupo control (n=10) frente al grupo trasplante de MA (n =30) (figura V.2.B.7.).

De la comparación de medias mediante la prueba de t-student, para muestras independientes, no se observan diferencias significativas entre ambos grupos en las observaciones practicadas en los días 14 y 30, siendo altamente significativas ($p < 0,001$) en los días 0, 1, 3 y 90, y significativas en los días 7 y 60 ($p < 0,01$).

SUPERFICIE CONJUNTIVAL ALTERADA

EXPLORACIÓN	Grupo Control	Grupo TMA	p
DÍA 0	44,13	32,47	<0,001
DÍA 1	41,99	33,31	<0,001
DÍA 3	35,05	28,49	<0,001
DÍA 7	28,51	26,07	<0,01
DÍA 14	25,27	24,73	NS
DÍA 30	24,36	23,98	NS
DÍA 60	23,89	21,01	<0,01
DÍA 90	26,12	19,63	<0,001

Tabla V.2.B.7.: Superficies (mm^2) de conjuntiva alterada.

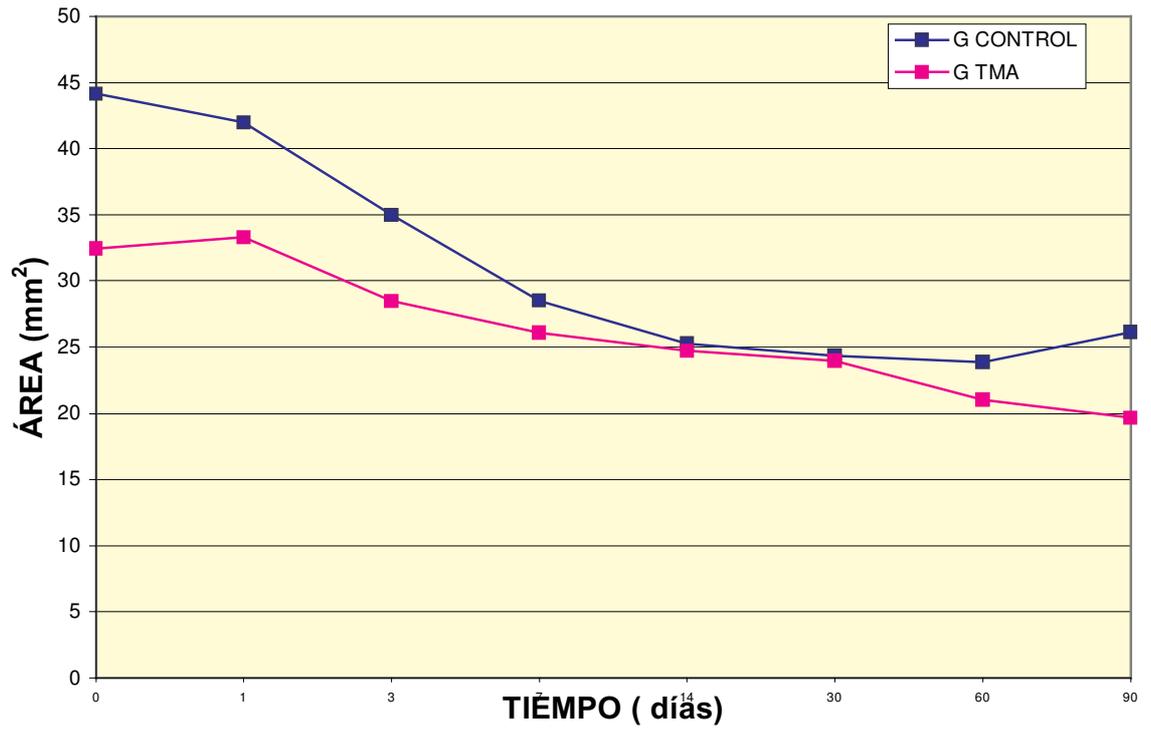
SUPERFICIE CONJUNTIVAL ALTERADA

Figura V.2.B.7.: Superficies (mm²) de conjuntiva alterada.

V.2.B.8. Área total de neovasos.

La tabla V.2.B.8. registra las medias de las superficies de las opacidades corneales observadas en los animales de experimentación del grupo control (n=10) frente al grupo trasplante de membrana amniótica (n=30) a lo largo del proceso experimental (figura V.2.B.8.1-5).

De la comparación de medias mediante la prueba de t-student, para muestras independientes, no se observan diferencias significativas entre ambos grupos en las observaciones practicadas en los días 0, 1, 3, y 7, siendo significativa ($p < 0,05$) los días 14 y 30, y altamente significativa ($p < 0,001$) en los días 60 y 90.

ÁREA TOTAL DE NEOVASOS

EXPLORACIÓN	Grupo Control	Grupo TMA	p
DÍA 0	0	0	NS
DÍA 1	0	0	NS
DÍA 3	0,497	0,69	NS
DÍA 7	14,6	13,07	NS
DÍA 14	23,26	18,33	<0,01
DÍA 30	27,095	23,41	<0,05
DÍA 60	27,63	19,1	<0,001
DÍA 90	29,25	15,75	<0,001

Tabla V.2.B.8.: Superficies (mm²) de los neovasos totales.

ÁREA TOTAL DE NEOVASOS (mm²)

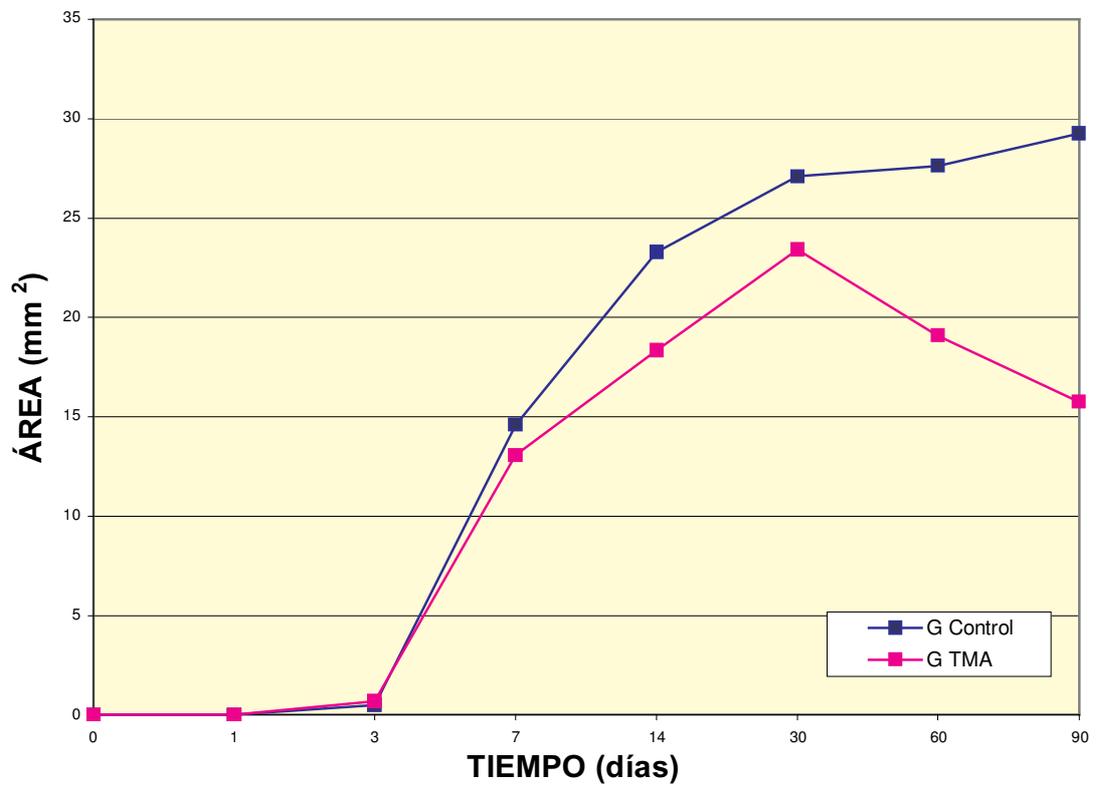


Figura V.2.B.8.1.: Superficies (mm²) de los neovasos totales.

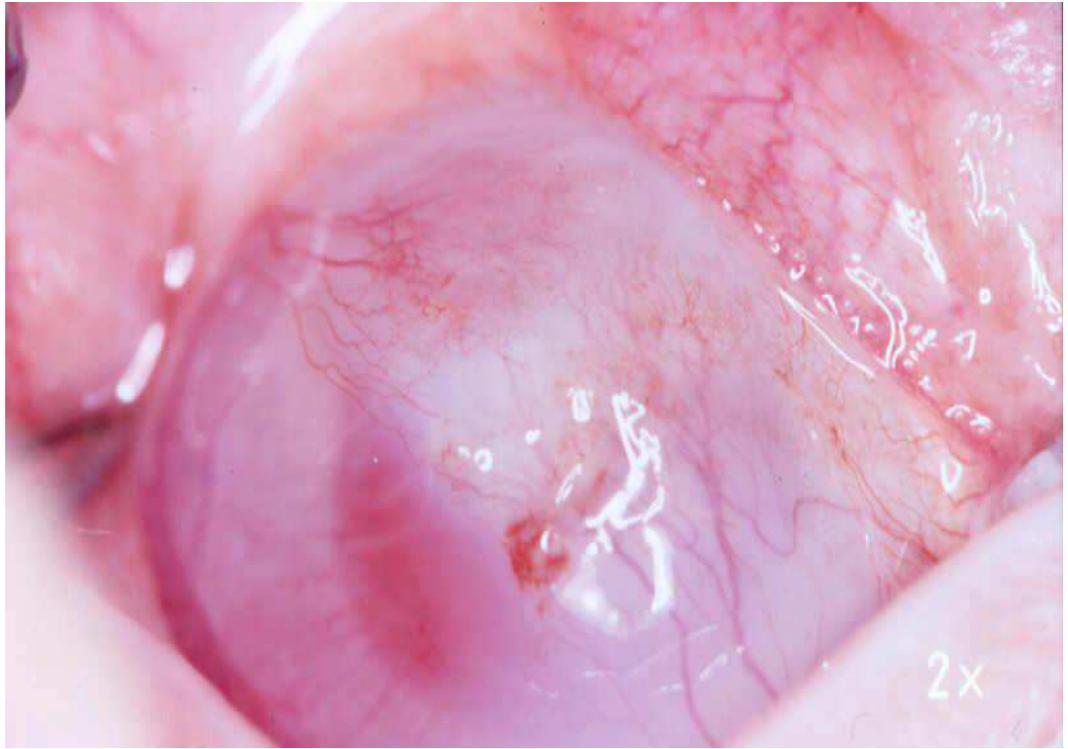


Figura V.2.B.8.2.: Área total de neovasos a los 90 días tras la causticación (Grupo Control, conejo nº 7 del experimento. Ojo derecho).

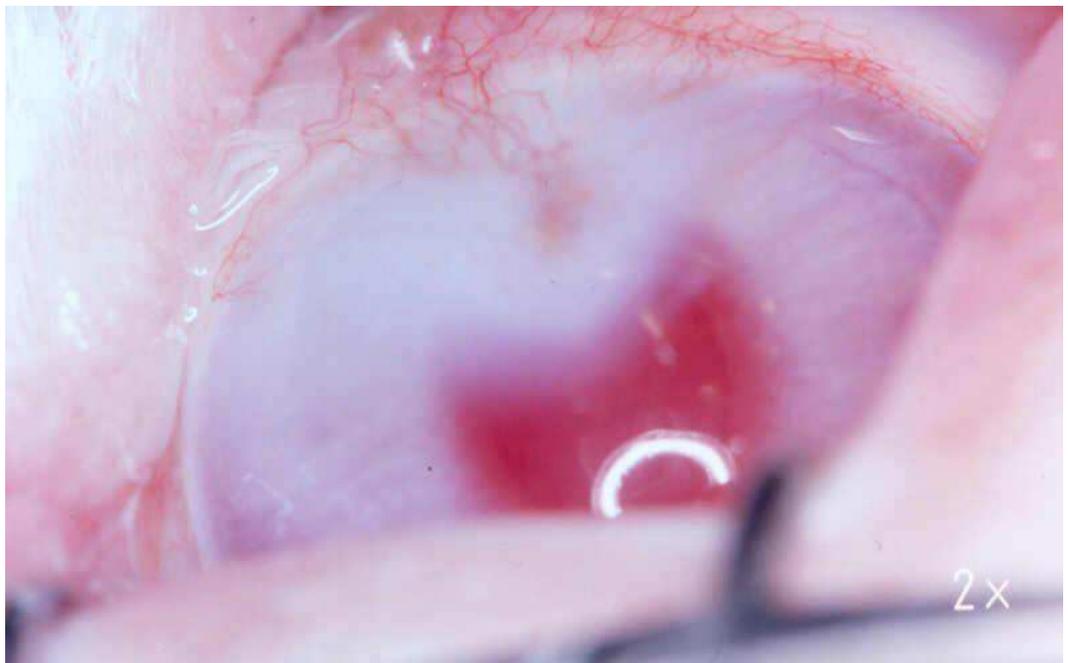


Figura V.2.B.8.3.: Área total de neovasos a los 90 días tras la causticación (Grupo trasplante MA 7 días, conejo nº 12 del experimento. Ojo derecho).

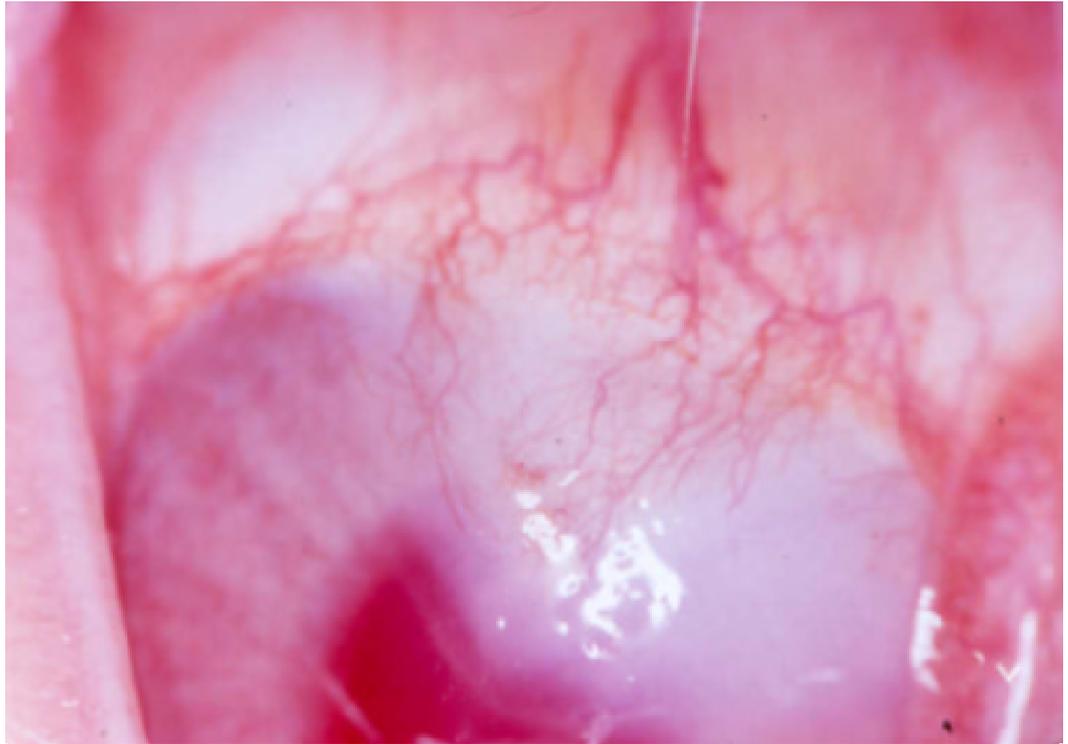


Figura V.2.B 8.4: Área total de neovasos a los 30 días tras la causticación (Grupo trasplante MA 7 días, conejo n° 26 del experimento. Ojo derecho).

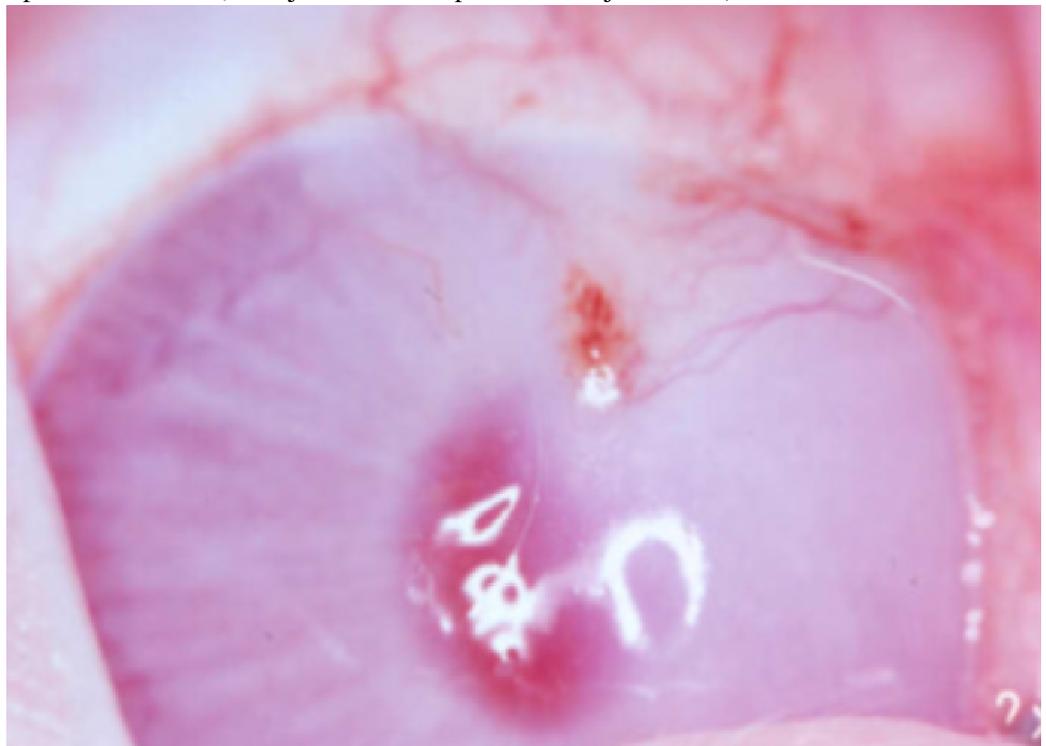


Figura V.2.B 8.5: Área total de neovasos a los 30 días tras la causticación (Grupo trasplante MA 7 días, conejo n° 17 del experimento. Ojo derecho).

V.2.B.9. Paquimetrías**V.2.B 9.1. Paquimetrías en zona A**

La tabla registra las paquimetrías medias en la zona A en los animales de experimentación del grupo control (n=10) frente al grupo trasplante de membrana amniótica (n=30) a lo largo del proceso experimental (figura V.2.B.9.1).

De la comparación de medias mediante la prueba de t-student, para muestras independientes, no se observan diferencias significativas entre ambos grupos en ninguno de los momentos estudiados.

PAQUIMETRÍAS EN ZONA A

EXPLORACIÓN	Grupo Control	Grupo TMA	p
DÍA 0	0,414	0,417	NS
DÍA 1	0,81	0,803	NS
DÍA 3	0,843	0,841	NS
DÍA 7	0,675	0,667	NS
DÍA 14	0,672	0,67	NS
DÍA 30	0,706	0,695	NS
DÍA 60	0,544	0,472	NS
DÍA 90	0,474	0,474	NS

Tabla V.2.B 9.1: Paquimetrías (mm) en la zona A.

PAQUIMETRÍAS EN ZONA A

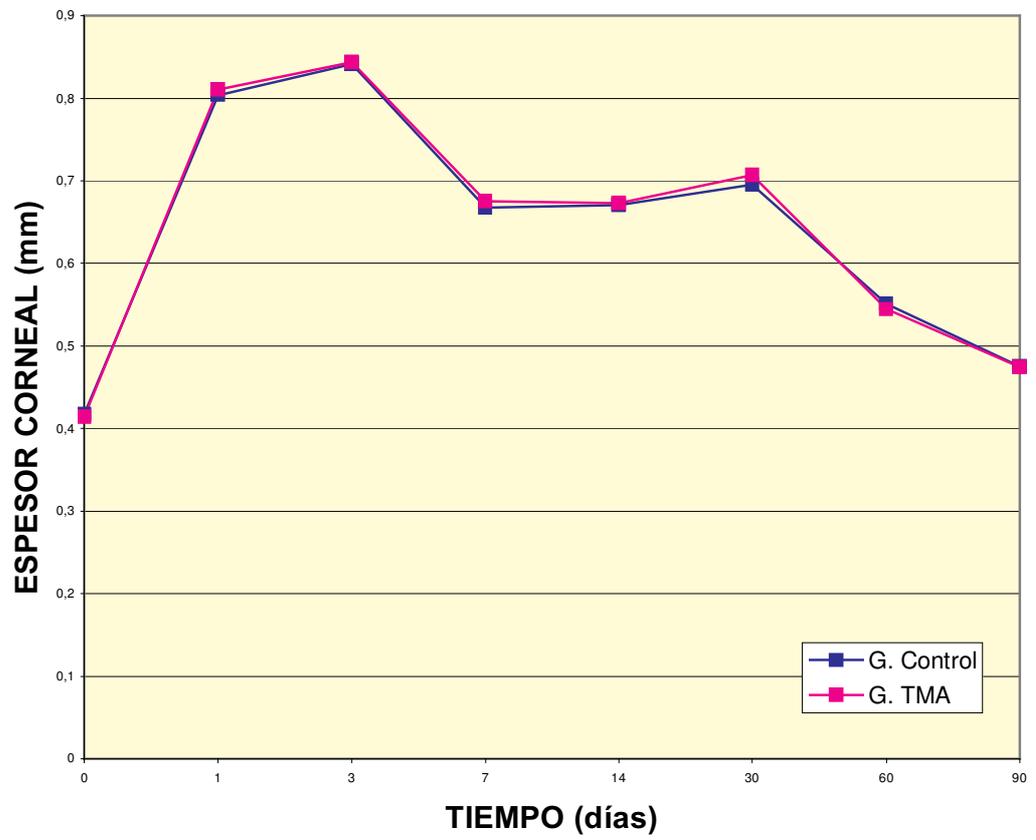


Figura V.2.B.9.1.: Espesor corneal (mm) en zona A.

V.2.B 9.2. Paquimetrías en zona B

La tabla V.2.B.9.2. registra las paquimetrías medias en la zona B en los animales de experimentación del grupo control (n=10) frente al grupo trasplante de membrana amniótica (n=30) a lo largo del proceso experimental (figura V.2.B.9.2).

De la comparación de medias mediante la prueba de t-student, para muestras independientes, sólo se observan diferencias significativas ($p < 0,05$), entre ambos grupos, en las observaciones realizadas los días 30, 60 y 90.

PAQUIMETRÍAS EN ZONA B

EXPLORACIÓN	Grupo Control	Grupo TMA	p
DÍA 0	0,438	0,447	NS
DÍA 1	0,722	0,716	NS
DÍA 3	0,753	0,750	NS
DÍA 7	0,650	0,652	NS
DÍA 14	0,775	0,747	NS
DÍA 30	0,855	0,714	<0,001
DÍA 60	0,773	0,693	<0,001
DÍA 90	0,652	0,528	<0,001

Tabla V.2.B.9.2: Paquimetrías (mm) en la zona B.

PAQUIMETRÍAS EN ZONA B

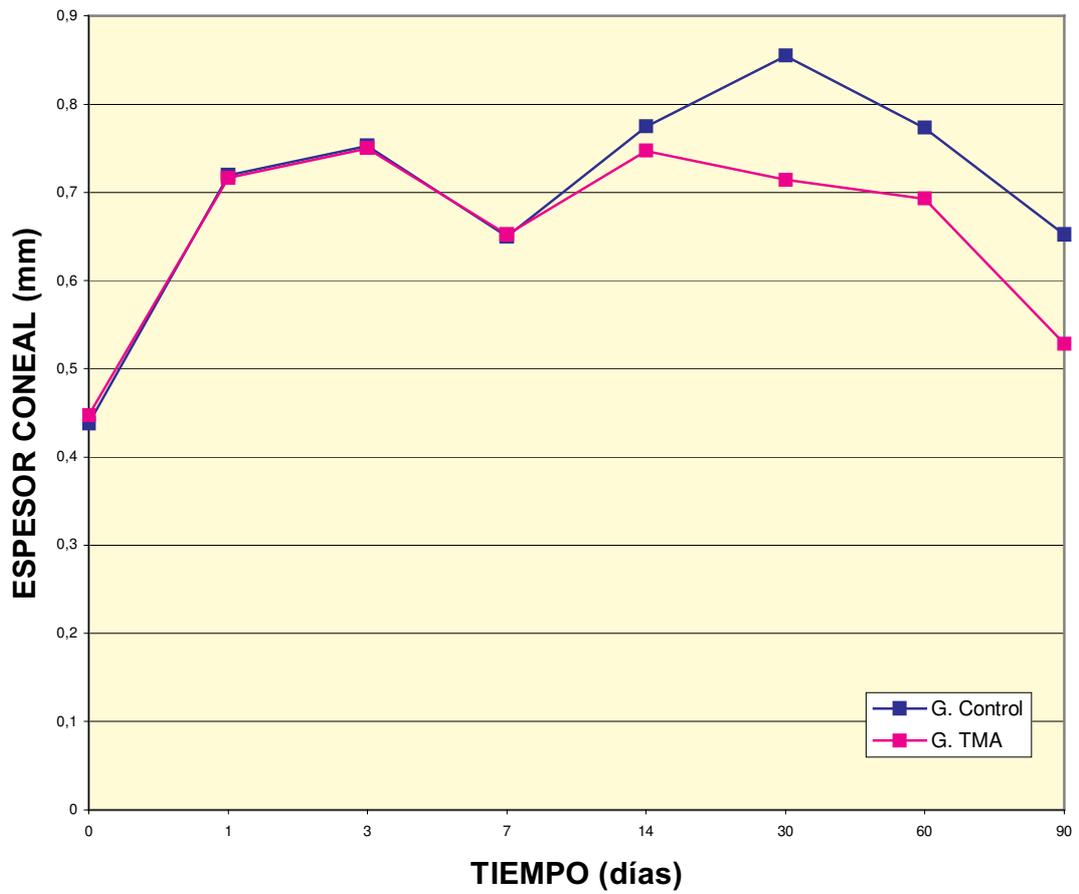


Figura V.2.B.9.2: Espesor corneal en mm en la zona B.

V.2.B 9.3. Paquimetrías en zona C

La Tabla V.2.B.9.3 registra las paquimetrías medias medidas en la zona C en los animales de experimentación del grupo control (n=10) frente al grupo trasplante de membrana amniótica (n=30) a lo largo del proceso de experimentación (figura V.2.B.9.3.)

De la comparación de medias mediante la prueba de t-student, para muestras independientes, sólo se observan diferencias significativas ($p < 0,05$), entre ambos grupos, en las observaciones realizadas los días 30 y 90.

PAQUIMETRÍAS EN ZONA C

EXPLORACIÓN	Grupo Control	Grupo TMA	p
DÍA 0	0,352	0,379	NS
DÍA 1	0,563	0,567	NS
DÍA 3	0,705	0,710	NS
DÍA 7	0,504	0,516	NS
DÍA 14	0,442	0,453	NS
DÍA 30	0,378	0,419	< 0,01
DÍA 60	0,364	0,398	NS
DÍA 90	0,363	0,407	< 0,01

Tabla V.2.B 9.3: Paquimetrías (mm) en la zona C.

PAQUIMETRÍA EN ZONA C

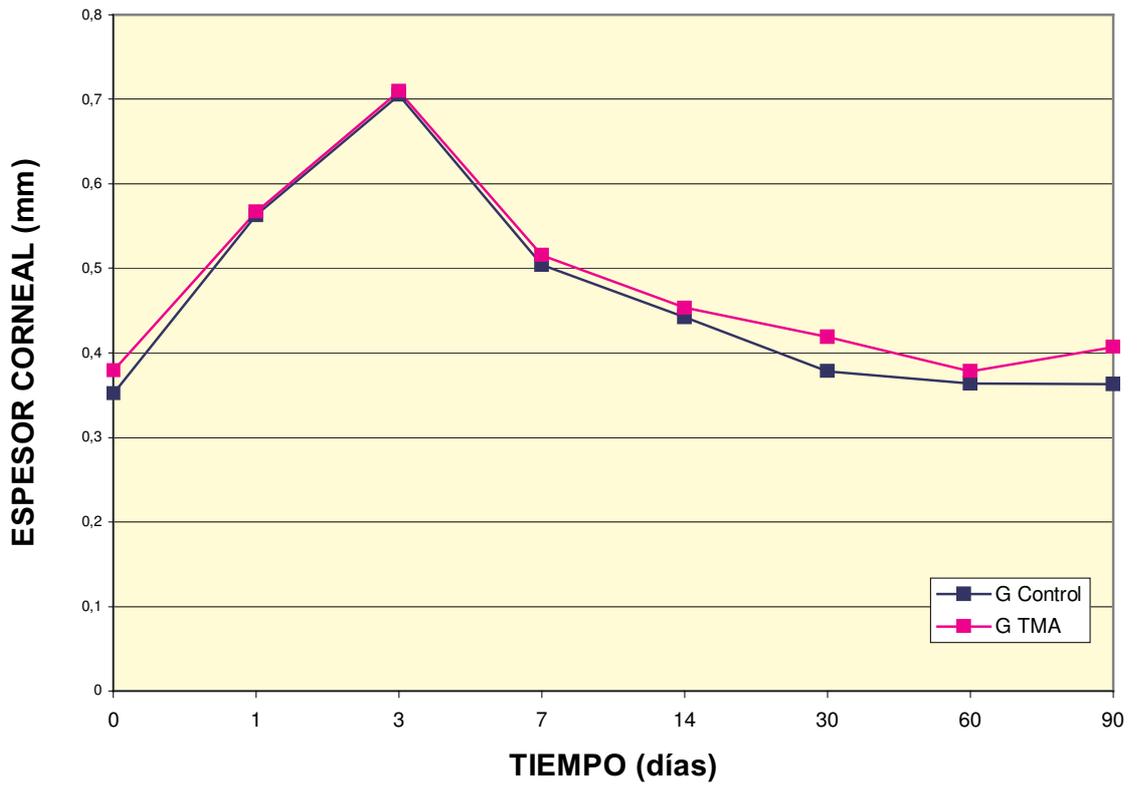


Figura V.2.B.9.3.: Espesor corneal (mm) en la zona C.

V.2.B.10. ESTUDIO HISTOLÓGICO COMPARATIVO

Tras sacrificio, al finalizar el estudio experimental, según se ha descrito en el capítulo IV (Material y Métodos), todos los globos oculares fueron sometidos a estudio histológico, detallándose a continuación los hallazgos observados.

V.2.B.10.1. Estado de la conjuntiva

El estado final de la conjuntiva, en estudio histológico tras sacrificio de los animales de experimentación, es marcadamente distinto entre los dos grupos (control-transplante de membrana amniótica). Mediante el test de Fisher las diferencias entre dichos grupos son significativas ($p < 0,01$). Mientras que sólo el 40% (4 casos) del grupo control ($n=10$) presenta características de normalidad en su conjuntiva, el 90% (27 casos) del grupo con transplante MA ($n=30$) recupera esas características de normalidad. Es decir, con la práctica de transplante de MA existen 2,25 veces de mayor probabilidad de recuperar un aspecto conjuntival normal.

V.2.B.10.2. Existencia y tipo de inflamación en el limbo

En el estudio histológico tras sacrificio, no existen diferencias significativas ($p > 0,05$ según el test de Fisher) respecto a la presencia de inflamación en el limbo entre ambos grupos (control-transplante MA); mientras que el 80% (8 casos) del grupo control ($n=10$) presentaban inflamación (5 casos -50%- de tipo granulomatoso y 3 - 30%- de tipo no granulomatoso), el 66,67% (20 casos) del grupo con transplante de MA ($n=30$) también la presentaban (9 casos -30%- de tipo granulomatoso y 11 -36,67% de tipo no granulomatoso).

V.2.B.10.3. Necrosis del limbo

En el estudio histológico del limbo, tras sacrificio, se observaron signos de necrosis en el 60% (6 casos)(en 3 casos -30%- la necrosis se limitaba al 50% de la profundidad limbar y en otros 3 -30%- comprometía más del 50% de su espesor) de los casos del grupo control (n=10) y en el 43,33% (13 casos)(en 11 casos -36,66%-la necrosis se limitaba al 50% de la profundidad limbar y sólo en 2 -6,67%- comprometía más del 50% de su espesor) del grupo con transplante de MA (n=30), no siendo las diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos según el test de Fisher.

V.2.B.10.4. Presencia de calcificaciones

El estudio histológico del limbo permitió la observación de calcificaciones en el 60%(6 casos) del grupo control (n=10) y en el 30% (9 casos) del grupo con transplante de MA (n = 30), no siendo las diferencias significativas ($p > 0,05$) según el test de Fisher.

V.2.B.10.5. Características del epitelio

-Número de capas.

En ningún caso del grupo control (n=10) se observó un epitelio con un número normal de capas (4-5), mientras que el 63,33% (19 casos) del grupo con transplante de MA (n=30) presentaban un número normal de capas (4-5)(figura V.2.B.10.1), diferencias que, mediante el test de Fisher, son altamente significativas ($p < 0,001$). El 70% (7 casos) del grupo control presentaba un epitelio de características atróficas (1-2 capas)(figura V.2.B.10.2) mientras que dichas características no se observaron en ninguno de los casos del grupo con transplante de MA (figura V.2.B.10.3-4).

-Presencia de células caliciformes.

Se observó la presencia de células caliciformes (figura V. 2. B. 10. 5) en el 70% (7 casos) del grupo control (n=10) y sólo en el 6,67% (2 casos) del grupo con transplante de MA (n=30) diferencias que, según el test de Fisher, son altamente significativas ($p < 0,001$).

-Morfología.

En ningún caso del grupo control (n=10) el epitelio presentó características normales en relación con la morfología de las células epiteliales, mientras que el 76,67% (23 casos) del grupo con transplante de MA (n=30) presentaban una morfología epitelial similar a la del epitelio corneal sano. Dichas diferencias, analizadas según el test de Fisher, son altamente significativas ($p < 0,001$).

-Úlceras epiteliales

En el estudio histológico de las córneas, en el 80% (8 casos) del grupo control (n = 10) se observó la presencia de úlceras epiteliales, circunstancia que sólo se presentó en el 16,67% (5 casos) del grupo con transplante de MA (n=30), diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) según el test de Fisher.

V.2.B.10.6. Inflamación estromal.

Se observó la presencia de inflamación en el estroma corneal en el 100% (10 casos) de los casos del grupo control (n=10) y en el 86,67% (26 casos) del grupo con transplante de MA(n=30), diferencias que, según el test de Fisher, no son significativas ($p > 0,05$).

Presencia de células inflamatorias en estroma corneal:

-Linfocitos. Se observó su presencia en el 100% (10 casos) de los casos del grupo control (n=10) y en el 86,67% (26 casos) de los casos del grupo con transplante de MA (n=30), diferencias no significativas ($p>0,05$) según el test de Fisher (figura V.2.B.10.4).

-Polimorfonucleares (PMN). Se observó su presencia en el 140% (4 casos) de los casos del grupo control (n=10) y en el 20% (6 casos) de los casos del grupo con transplante de MA (n=30), diferencias no significativas ($p>0,05$) según el test de Fisher.

-Eosinófilos Se observaron en el 100% de los casos de los casos del grupo (10 casos de 10) y en el 87,67 % (26 casos) de los casos del grupo trasplante de MA (figura V.2.B.10.4, 6, 7, 8).

-Células plasmáticas. Se observó su presencia en el 100% (10 casos) de los casos del grupo control (n =10) y en el 80% (24 casos) de los casos del grupo con transplante de MA (n=30), diferencias no significativas ($p>0,05$) según el test de Fisher.

V.2.B.10.7. Neovascularización

En el estudio histológico tras sacrificio, la presencia de neovasos se observó en el 100% (10 casos) del grupo control (n=10) y en el 96,66% (29 casos) del grupo con transplante de MA (n=30), diferencias que no son significativas ($p>0,05$) según el test de Fisher.

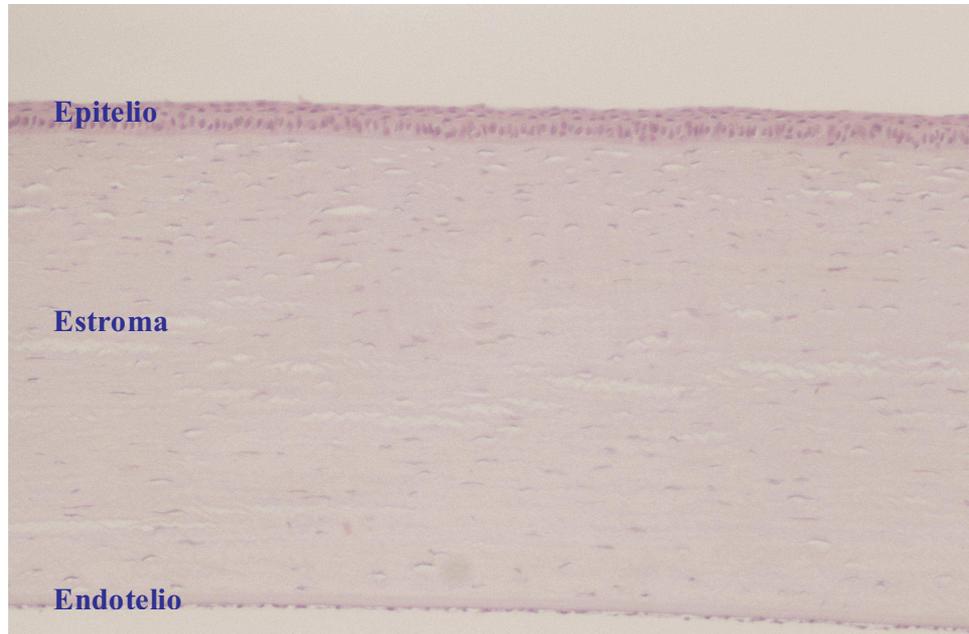


Figura V.2.B.10.1: Estructura microscópica de córnea de conejo de apariencia normal. Microscopía óptica (HE). Epitelio, Estroma, Endotelio.

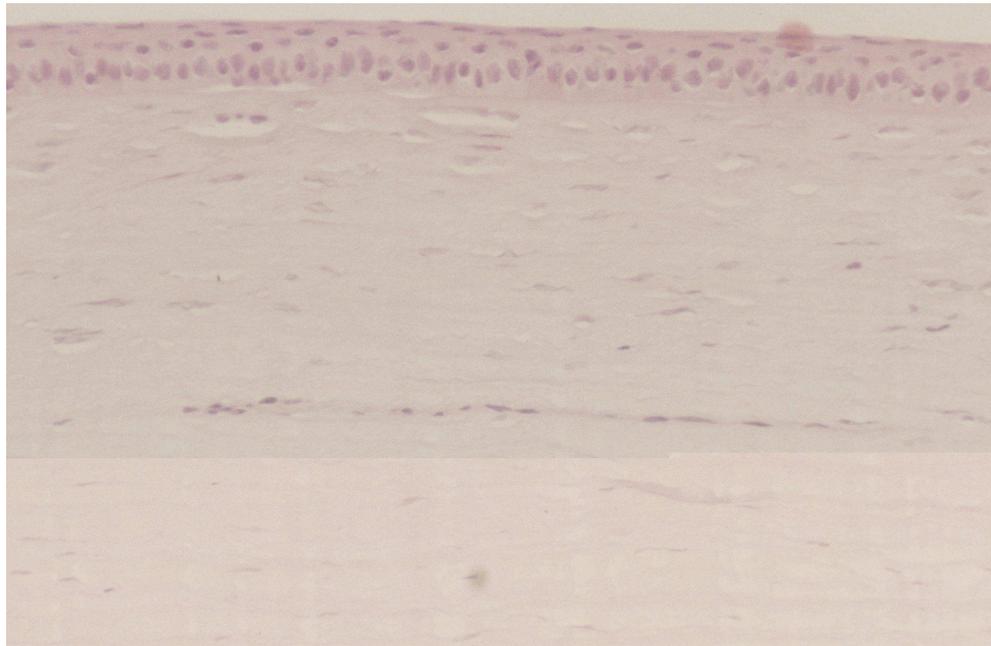


Figura V.2.B.10.2: Estructura microscópica epitelio y estroma corneal. Epitelio regenerado tras la causticación y posterior trasplante de membrana amniótica. Neovascularización estromal leve. Grupo trasplante MA. Microscopía óptica (HE).

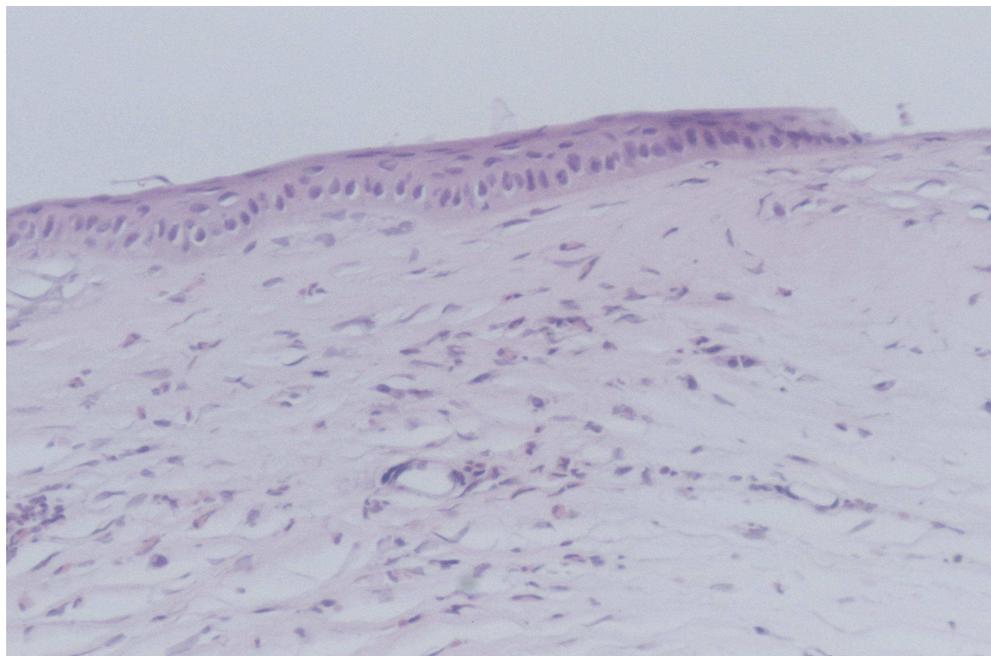


Figura V.2.B.10.3: Estructura microscópica epitelio y estroma corneal. Epitelio corneal atrófico. Desestructuración de las fibras de colágeno estromales. Luces vasculares neoformadas Grupo control. Microscopía óptica (HE).

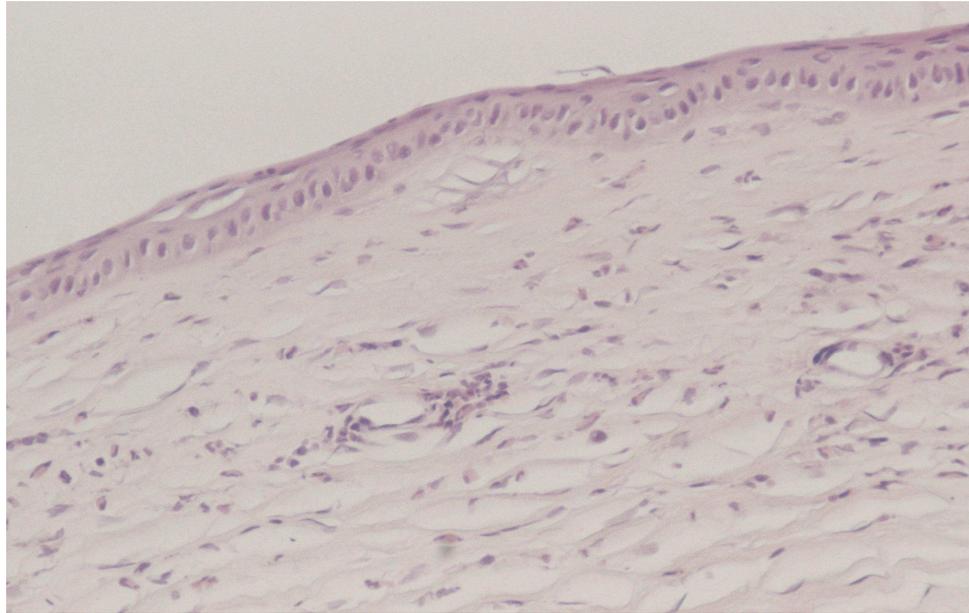


Figura V.2.B.10.4: Estructura microscópica corneal. Epitelio corneal con disminución número de capas celulares. Infiltrado inflamatorio crónico linfocitario con infiltrado de eosinófilos. Neovascularización estromal. Grupo control Microscopía óptica (HE).

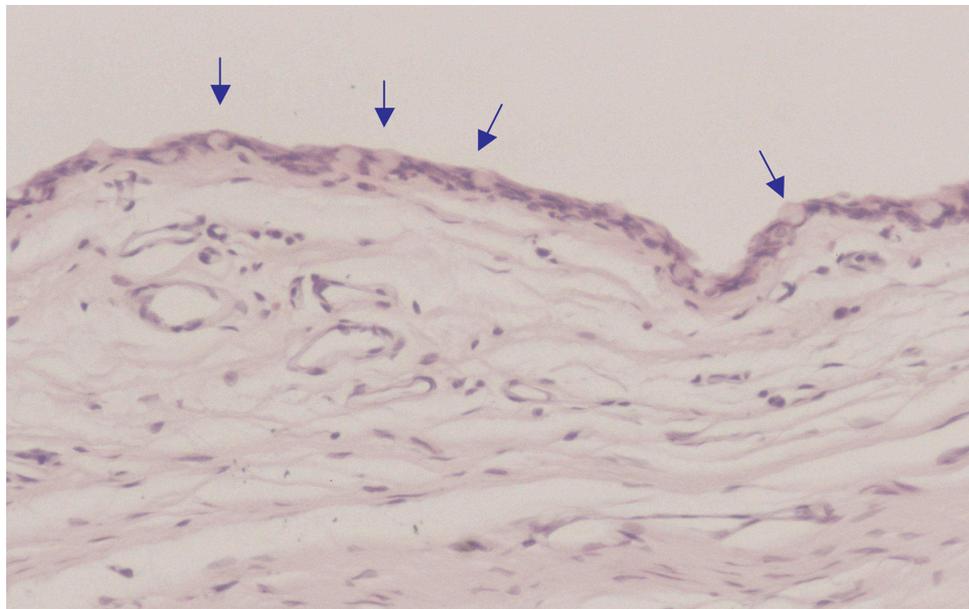


Figura V.2.B.10.5.: Presencia de células caliciformes (flechas) “tipo epitelio conjuntival” en el epitelio corneal regenerado tras la causticación. Microscopía óptica (HE).

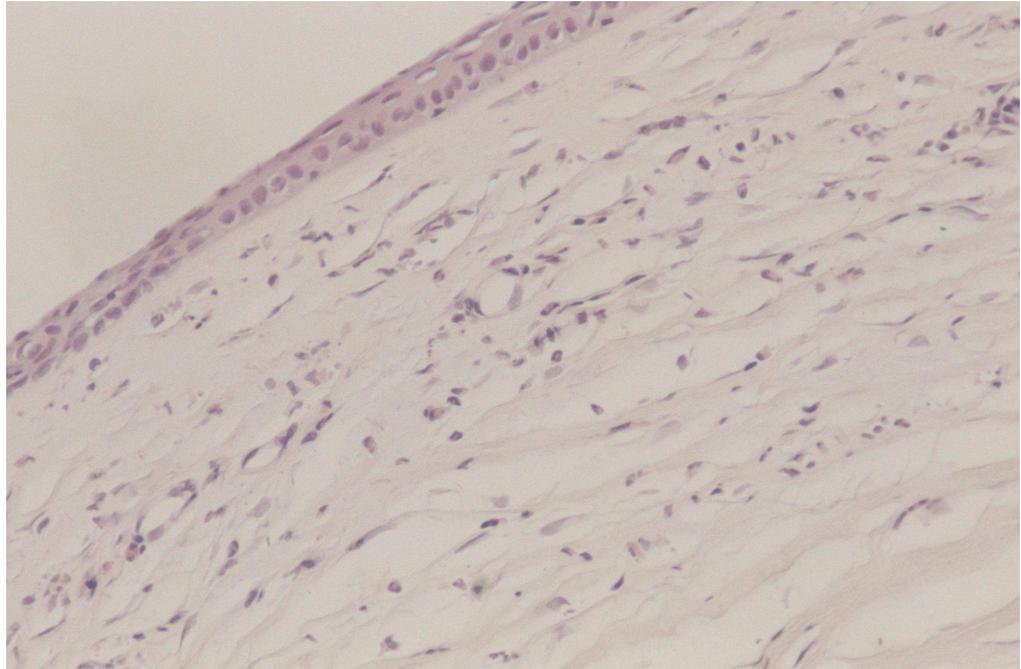


Figura V.2.B.10.6: Atrofia del epitelio corneal. Infiltrado eosinofílico. Neovascularización estromal. Grupo control. Microscopía óptica (HE).

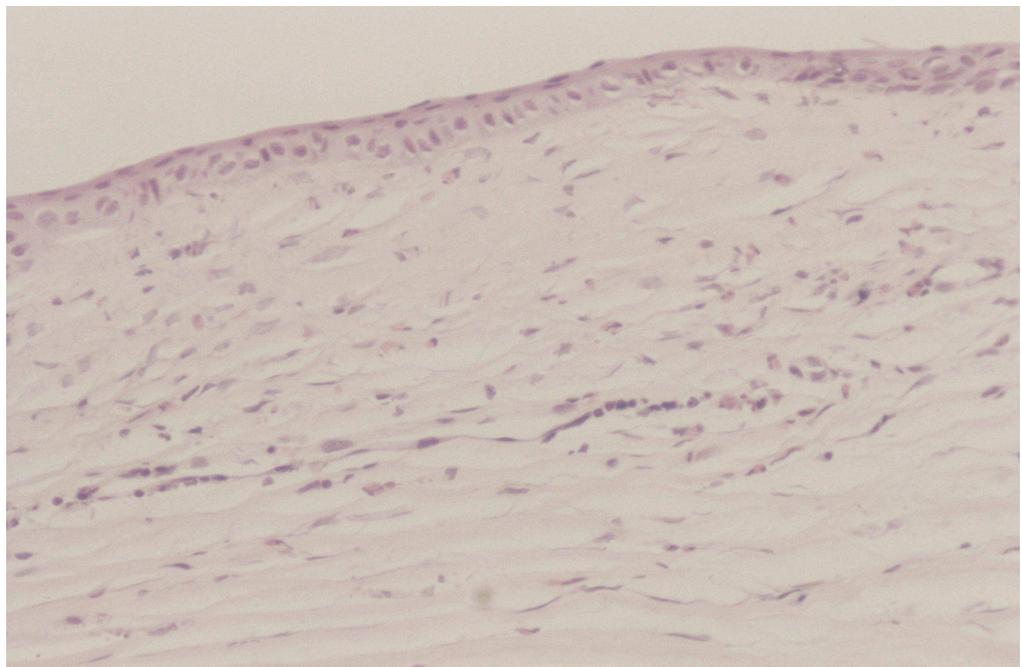


Figura V.2.B.10.7: Atrofia del epitelio corneal. Infiltrado eosinofílico. Neovascularización estromal. Grupo control Microscopía óptica (HE).

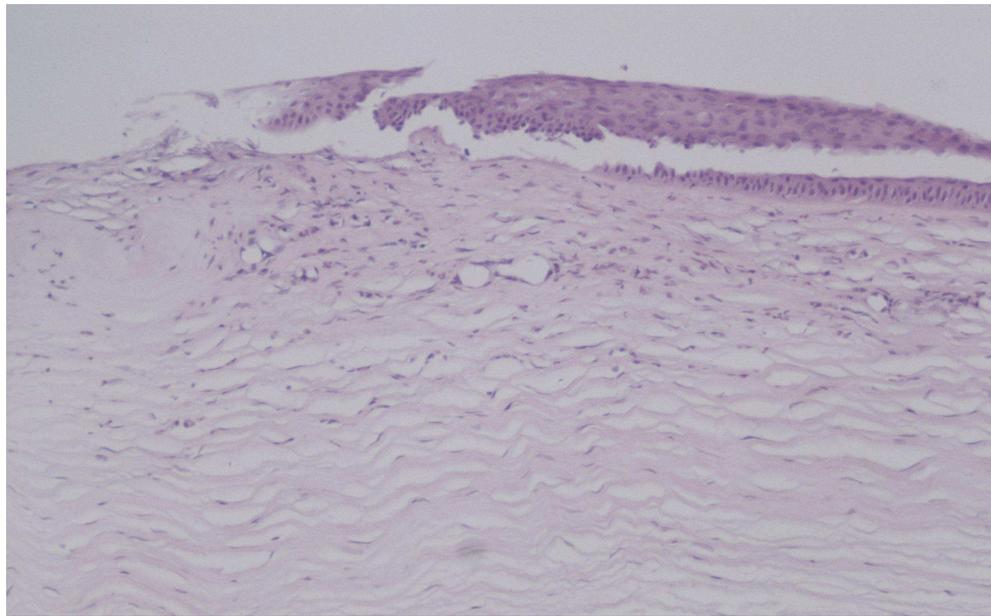


Figura V.2.B.10.8.: Atrofia del epitelio corneal. Plano de clivaje entre epitelio y estroma. Infiltrado eosinofílico. Neovascularización estromal. Grupo control Microscopía óptica (HE).

V.2.C. COMPARACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL ENTRE GRUPO CONTROL Y GRUPO TRASPLANTE 1^{er} DIA, GRUPO TRASPLANTE MEMBRANA AMNIÓTICA 7 DÍAS, GRUPO TRASPLANTE MEMBRANA AMNIÓTICA 30 DÍAS.

Compararemos los cuatro grupos de estudio establecidos, de 10 (n=10) ojos cada uno:

- Grupo control
- Grupo trasplante 1^{er} día
- Grupo trasplante 7 días
- Grupo trasplante 30 días

Estudiaremos los siguientes aspectos como se ha especificado en el apartado IV de MATERIAL y MÉTODOS:

V.2.C.1. Peso de los animales de experimentación.

V.2.C.2. Peso de los filtros Whatman # 3 secos.

V.2.C.3. Peso de los filtros Whatman # 3 humedecidos.

V.2.C.4. Peso del cáustico (NaOH 1 N).

V.2.C.5. Opacidad corneal.

V.2.C.6. Úlcera corneal.

V.2.C.7. Úlcera conjuntival

V.2.C.8. Área total de neovasos

V.2.C.9. Paquimetrías

V.2.C.1. Peso de los animales de experimentación.

La Tabla V.2.C.1 registra las medias de los pesos de los animales de experimentación: grupo control (n=10), grupo trasplante de membrana amniótica 24 horas (n=10). Grupo trasplante membrana amniótica 7 días (n=10) y grupo trasplante membrana amniótica 30 días (n=10), a lo largo del experimento (figura V.2.C.1).

De la comparación de las medias mediante la prueba ANOVA, para muestras independientes, sólo se observan diferencias mínimamente significativas ($p < 0,05$) (tabla V.2.C.1) entre grupos, las exploraciones practicadas el día 30.

VARIABLE	G. Control	G. TMA 1d	G. TMA 7d	G. TMA 30 d	p
DÍA 0	2072,9	2035,5	2218,8	2129,4	NS
DÍA 1	2112,3	2052,2	2198,7	2290,5	NS
DÍA 3	2150,2	2065,3	2254	2347,5	NS
DÍA 7	2265,1	2146,9	2387,4	2535,9	NS
DÍA 14	2481,3	2429,8	2549,8	2731	NS
DÍA 30	2664,3	2662	2701	2908,6	<0,05
DÍA 60	2906,1	2778	2810,9	3027,4	NS
DÍA 90	3168,3	3124,9	3035,7	3189,6	NS

Tabla V.2 C.1.: Evolución peso (gramos) de los animales de experimentación.

EVOLUCIÓN PESO ANIMALES EXPERIMENTACIÓN

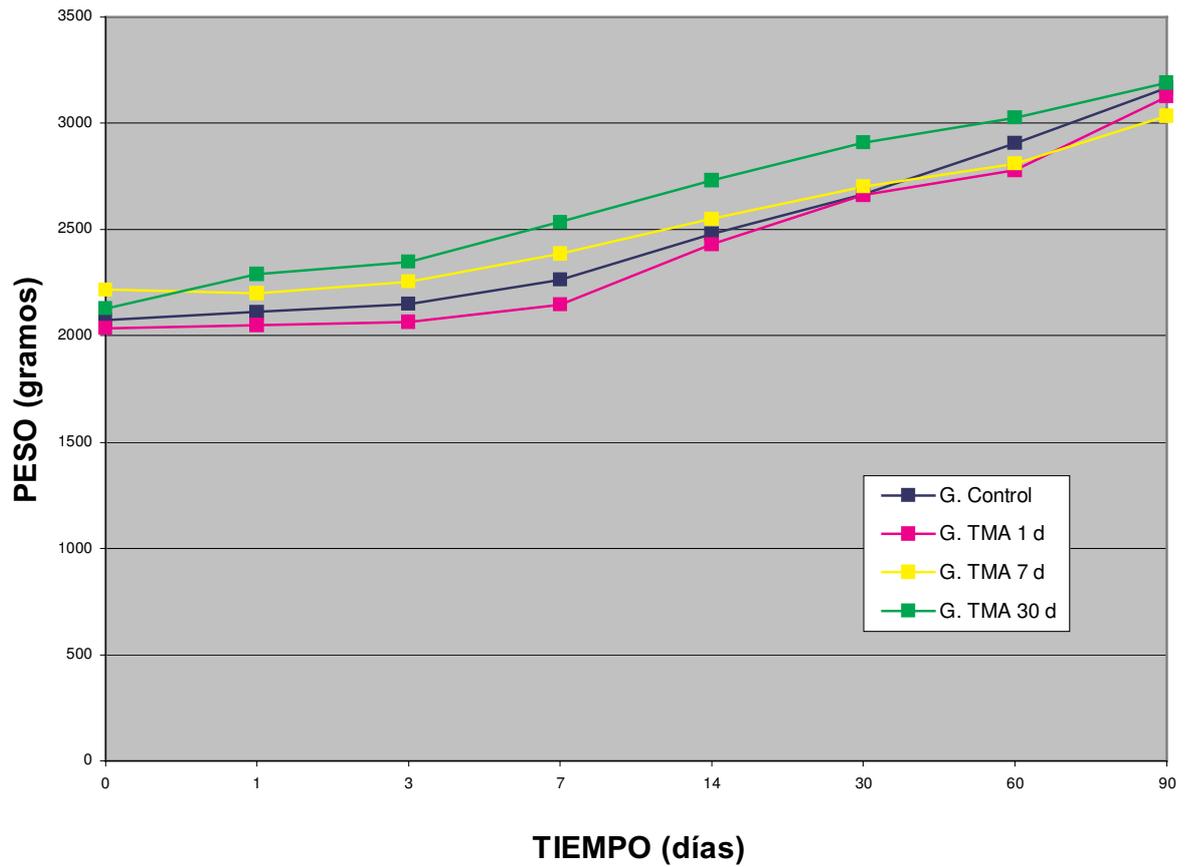


Figura V.2.C.1.: Peso (gramos) de los animales de experimentación.

V.2.C.2. Peso de los filtros Whatman # 3 secos.

La tabla V.2.C.2 registra las medias de los pesos de los filtros Whatman # 3 utilizados en los experimentos para grupo control (n=10), grupo trasplante de MA 24 horas (n=10), grupo trasplante MA 7 días (n=10) y grupo trasplante membrana amniótica 30 días (n=10).

De la comparación de medias mediante la prueba ANOVA, para muestras independientes, no se observan diferencias significativas (tabla V.2.C.2), en lo referente a peso de filtro utilizado entre los grupos.

VARIABLE	G. Control	G.TMA 1d	G TMA 7d	G. TMA 30d	p
peso filtro	0,01241	0,01241	0,01239	0,01255	NS

Tabla V.2.C.2.: Peso (gramos) de los filtros secos de Whatman # 3.

V.2.C.3. Peso de los filtros Whatman # 3 humedecidos.

La tabla V.2.C.3 registra las medias de los pesos de los filtros Whatman # 3 utilizados en los experimentos para grupo control (n=10), grupo trasplante de MA 24 horas (n=10), grupo trasplante MA 7 días (n=10) y grupo trasplante MA 30 días (n=10).

De la comparación de medias mediante la prueba ANOVA, para muestras independientes, no se observan diferencias significativas (tabla V.2.C 3), en lo referente al peso de filtro utilizado entre los grupos.

VARIABLE	G. Control	G.TMA 1d	G TMA 7d	G. TMA 30d	p
p filtro húm	0,0768	0,0897	0,0821	0,0903	NS

Tabla V.2.C. 3.: Peso en gramos de los filtros de Whatman # 3 humedecidos.

V.2.C.4. Peso del cáustico (NaOH 1 N).

La Tabla V.2.C.4. registra las medias de los pesos del cáustico utilizado en los experimentos para grupo control (n=10), grupo trasplante de MA 24 horas (n=10), grupo trasplante MA 7 días (n=10) y grupo trasplante MA 30 días (n=10).

De la comparación de medias mediante la prueba ANOVA, para muestras independientes, no se observan diferencias significativas (tabla V.2.C.4), en lo referente a peso de cáustico utilizado entre los grupos.

VARIABLE	G. Control	GTMA 1d	G TMA 7d	G. TMA 30d	p
Peso cáustico	0,06439	0,07729	0,06971	0,07775	NS

Tabla V.2.C.4.: Peso (gramos) del cáustico (NaOH 1N).

V.2.C.5. Opacidad corneal.

La tabla V.2.C.5. registra las medias de las superficies de las opacidades corneales observadas en los animales de experimentación del grupo control (n=10), grupo trasplante membrana amniótica 24 horas (n=10), grupo trasplante membrana amniótica 7 días (n=10) y grupo trasplante membrana amniótica 30 días (n=10)(figura V.2.C.5.).

De la comparación de medias mediante la prueba ANOVA para muestras independientes, se observan diferencias significativas entre grupos en los días 3 y 7 ($p < 0,05$) y altamente significativas ($p < 0,001$) entre grupos en los días 14, 30, 60 y 90 (tabla V.2.C.5.). Al inicio del experimento (días 0 y 1) no se encuentran diferencias significativas entre los cuatro grupos.

Del estudio de contraste de medias mediante el test de Tukey en los días 30, 60 y 90 el grupo control presenta diferencias significativas ($p < 0,001$), con el grupo TMA 24 horas, con el grupo TMA 7 días y también con el grupo trasplante membrana amniótica 30 días. Por ello puede considerarse que, en lo referente a la opacidad corneal, el grupo trasplante de membrana amniótica 7 días presenta la evolución más favorable. Aunque, no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres grupos, pero si de cada uno con respecto al control (figura V.2.C.5.).

OPACIDAD CORNEAL

	G. Control	G TMA 1d	G TMA 7d	GTMA 30d	p
DÍA 0	44,569	44,20	43,606	44,776	NS
DÍA 1	45,636	43,80	44,458	44,498	NS
DÍA 3	47,457	39,22	38,752	40,7	<0,05
DÍA 7	46,54	36,71	37,47	37,5	<0,01
DÍA 14	45,503	34,1	34,436	35,5	<0,001
DÍA 30	46,509	32,39	31,888	34,1	<0,001
DÍA 60	47,452	30,47	27,769	32,6	<0,001
DÍA 90	47,575	28,1	25,523	31,69	<0,001

Tabla V.2.C.5.: Superficies (mm²) de las opacidades corneales

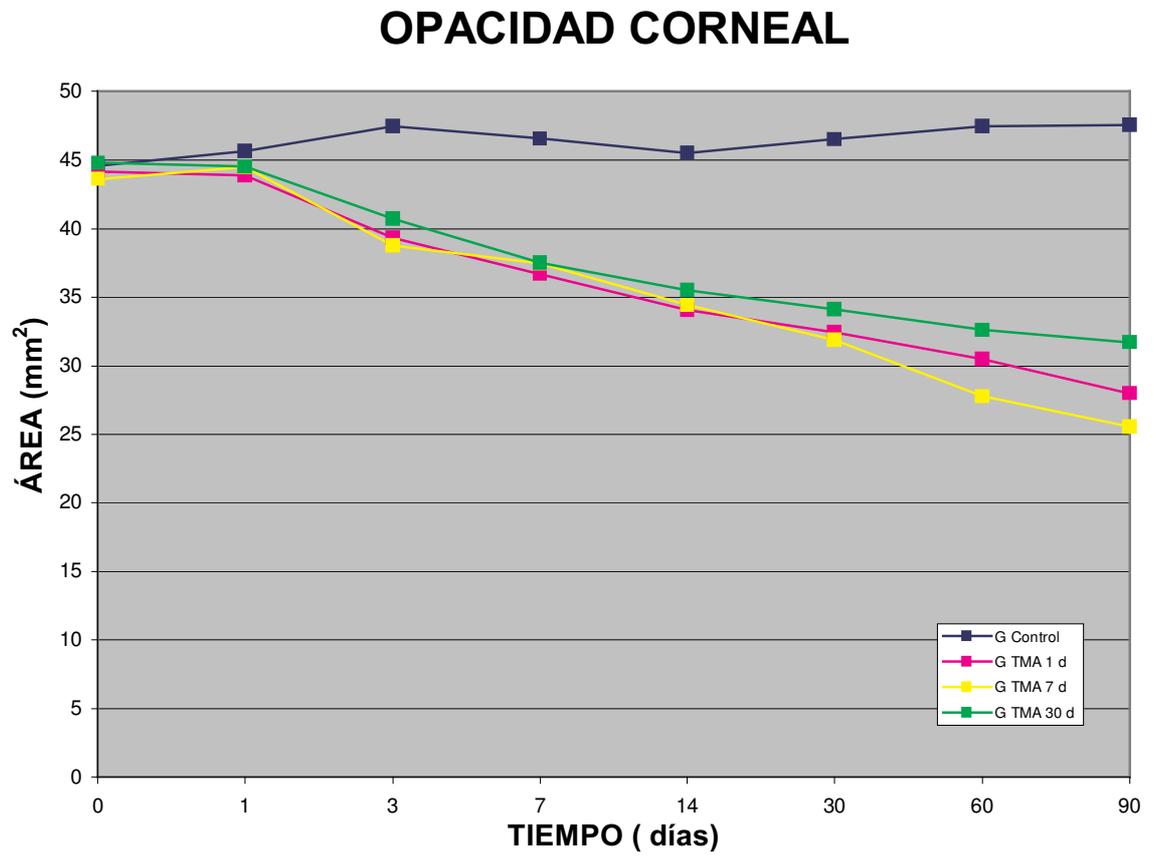


Figura V.2.C.5.: Área (mm²) de opacidad corneal.

V.2.C.6. Úlcera corneal.

La tabla V.2.C.6. registra las medias de las superficies de las úlceras corneales observadas en los animales de experimentación del grupo control (n=10), grupo trasplante membrana amniótica 24 horas (n=10), grupo trasplante membrana amniótica 7 días (n=10) y grupo trasplante membrana amniótica 30 días (n=10)(figura V.2.C.6.).

De la comparación de medias mediante la prueba ANOVA para muestras independientes, se observan diferencias (tabla V.2.C.6.) significativas ($p < 0,05$) entre grupos en los días 3, 7, 30 y 60 y altamente significativa ($p < 0,001$) en el día 14.

Del estudio de contraste de medias mediante el test de Tukey en el día 60 el grupo control presenta diferencias significativas con el grupo trasplante membrana amniótica 24 horas ($p < 0,05$), TMA 7 días ($p < 0,01$) y TMA 30 días ($p < 0,05$). En el día 90, el grupo control no presenta diferencias significativas con el grupo trasplante membrana amniótica 24 horas, pero si con los grupos TMA 7 días y TMA 30 días.

ÚLCERA CORNEAL

	G. Control	GTMA 1d	G TMA 7d	GTMA 30d	p
DÍA 0	44,569	44,12	43,606	44,77	NS
DÍA 1	27,069	26,45	25,796	26,6	NS
DÍA 3	15,61	12,31	12,598	10,65	<0,01
DÍA 7	7,98	6,26	5,917	5,601	<0,05
DÍA 14	7,501	4,33	3,859	2,99	<0,001
DÍA 30	4,393	2,4	1,64	1,86	<0,01
DÍA 60	2,86	1,218	0,65	0,41	<0,01
DÍA 90	1,607	0,54	0,233	0,094	NS

Tabla V. 2. C 6.: Superficies (mm²) de las úlceras corneales.

ÚLCERA CORNEAL

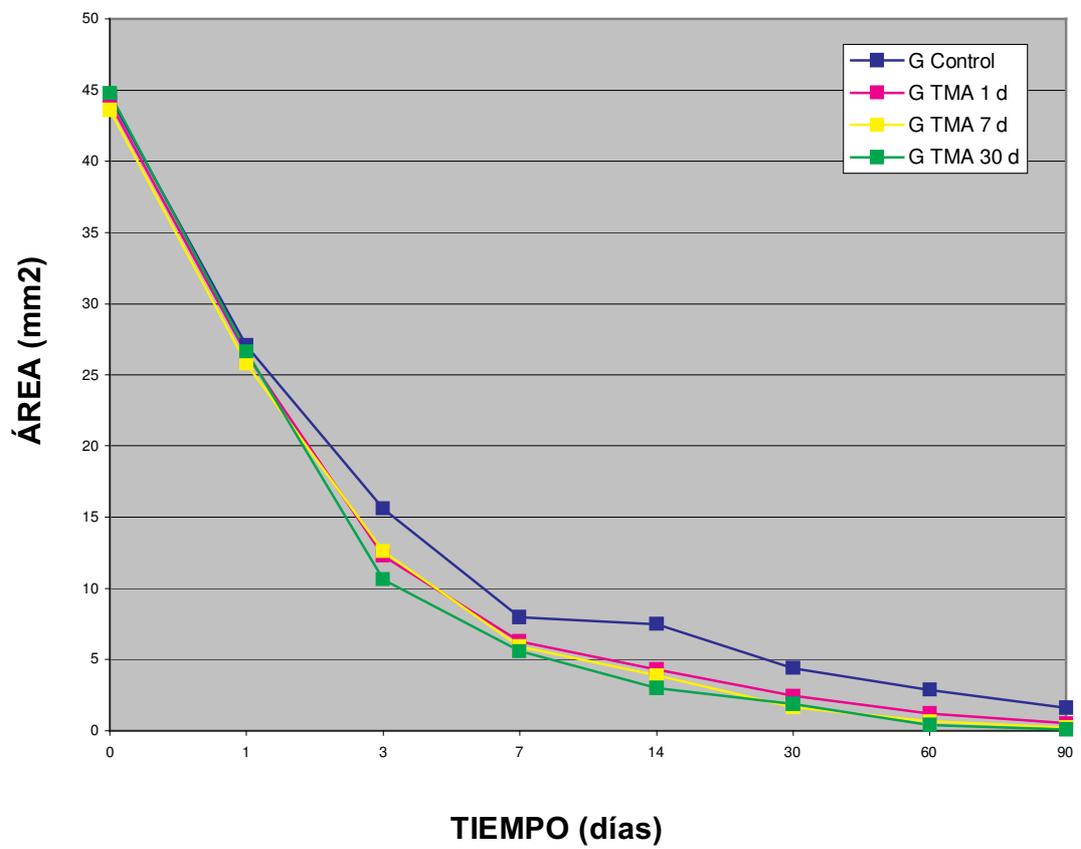


Figura V.2.C.6.: Superficies (mm²) de las úlceras corneales.

V.2.C.7. Superficie conjuntival alterada

La tabla V.2.C.7 registra las medias de las superficies conjuntivales alteradas en los animales de experimentación del grupo control (n=10), grupo trasplante de membrana amniótica 1^{er} día (n=10), grupo trasplante de membrana amniótica 7 días (n=10) y grupo trasplante de membrana amniótica 30 días (n=10)(figura V.2.C.7).

De la comparación de medias mediante la prueba de ANOVA, para muestras independientes, se observan diferencias (tabla V.2.C.7) significativas, entre grupos, para $p < 0,05$ en los días 14, 30 y 60 y para $p < 0,01$ en los días 1, 3, y 90, siendo altamente significativas ($p < 0,001$) en el día 0.

Del estudio de contraste de medias mediante el test de Tukey, en el día 60 el grupo con trasplante de 1^{er} día presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) con el grupo trasplante 7 días. En el día 90, el grupo control presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) con los grupos trasplante 7 y 30 días y no con el grupo trasplante de MA 1^{er} día .

SUPERFICIE CONJUNTIVAL ALTERADA

	G. Control	G TMA 1d	G TMA 7d	GTMA 30d	p
DÍA 0	44,13	33,20	32,50	31,71	<0,001
DÍA 1	41,99	32,53	32,87	34,52	<0,01
DÍA 3	35,01	28,34	29,87	27,25	<0,01
DÍA 7	28,51	26,66	24,00	27,24	NS
DÍA 14	25,27	25,55	21,87	26,75	<0,05
DÍA 30	24,36	25,46	20,83	25,64	<0,05
DÍA 60	23,89	25,05	17,70	20,27	<0,05
DÍA 90	26,13	25,14	16,47	17,27	<0,01

Tabla V.2. C.7.: Superficie (mm²) de la superficie conjuntival alterada.

CONJUNTIVA ALTERADA

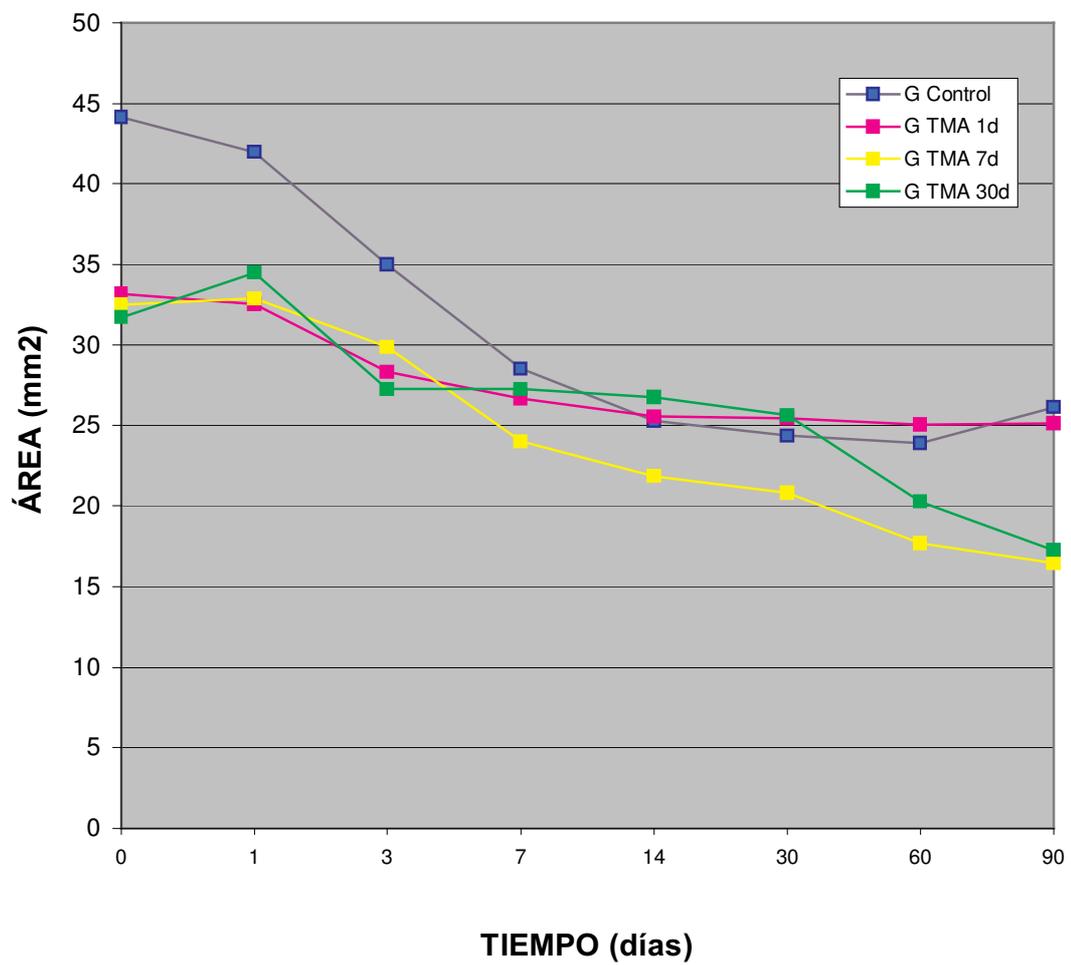


Figura V.2.C.7.: Superficie (mm²) de la superficie conjuntival alterada.

V. 2.C. 8. Área total de neovasos

La tabla V.2.C.8. registra las medias de las superficies de la córnea que presentan neovasos observadas en los animales de experimentación del grupo control (n=10), grupo trasplante membrana amniótica 24 horas (n=10), grupo trasplante membrana amniótica 7 días (n=10) y grupo trasplante membrana amniótica 30 días (n=10)(figura V.2.C.8.).

De la comparación de medias mediante la prueba ANOVA para muestras independientes, se observan diferencias (tabla V.2.C.8), entre grupos, altamente significativas ($p < 0,001$) en los días 60 y 90 (Figura V.2.C.8.1-4).

Del estudio de contraste de medias mediante el test de Tukey, en los días 60 y 90 el grupo control presenta diferencias significativas con el grupo trasplante membrana amniótica 24 horas ($p < 0,05$) y altamente significativas ($p < 0,001$) con los dos restantes.

ÁREA TOTAL DE NEOVASOS EN CÓRNEA

	G. Control	GTMA 1d	G TMA 7d	GTMA 30d	p
DÍA 0	0	0	0	0	NS
DÍA 1	0	0	0	0	NS
DÍA 3	0,497	0,55	0,558	0,83	NS
DÍA 7	14,6	14,68	24,68	11,84	NS
DÍA 14	23,26	17,026	17,026	19,67	NS
DÍA 30	27,095	19,84	19,84	22,67	NS
DÍA 60	27,63	16,155	18,54	17,87	<0,001
DÍA 90	29,25	12,334	13,76	14,942	<0,001

Tabla V.2.C.8.: Superficie (mm²) de las zonas totales de córnea con neovascularización.

ÁREA DE NEOVASOS

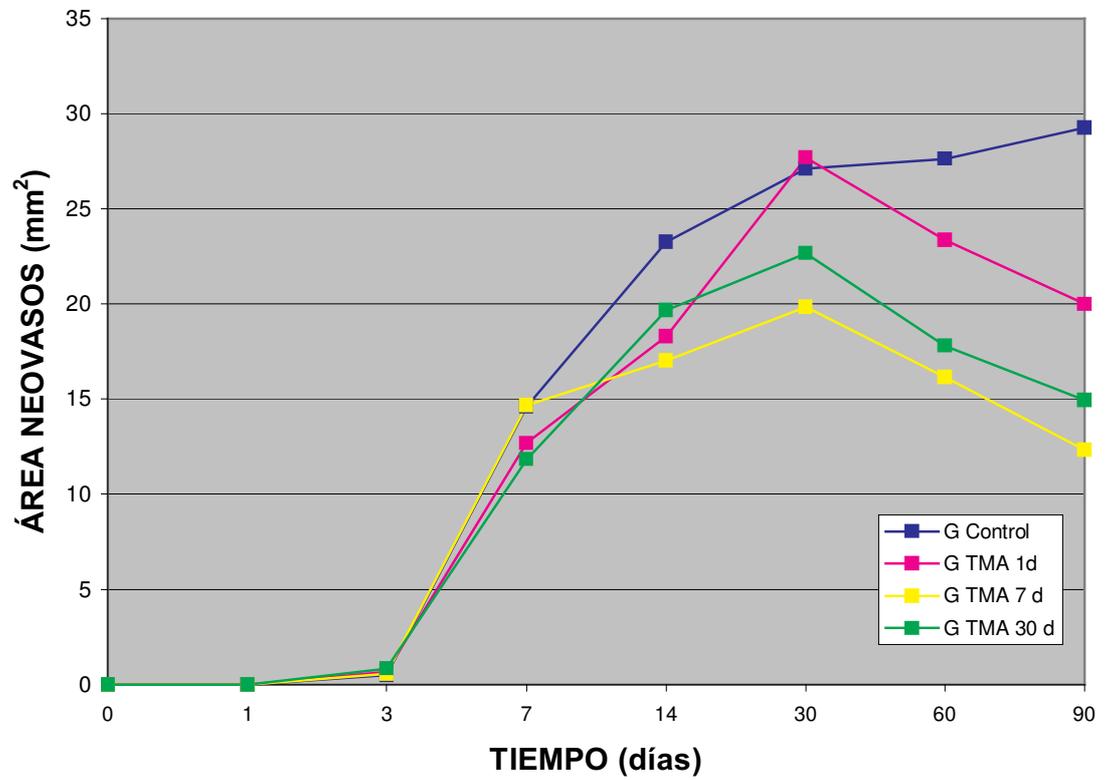


Figura V.2.C.8.: Área de neovasos totales.

V.2.C.9. Paquimetrías**V.2.C.9.1. Paquimetrías en zona A**

La tabla V.2.C 9.1 registra las paquimetrías medidas en la zona A en los animales de experimentación del grupo control (n = 10), grupo trasplante membrana amniótica 1^{er} día (n = 10), grupo trasplante membrana amniótica 7 días (n = 10) y grupo trasplante membrana amniótica 30 días (n = 10)(figura V.2.C 9.1).

De la comparación de medias mediante la prueba ANOVA, para muestras independientes, no se observan diferencias significativas (tabla V.2.C.9.1) entre grupos, en ninguno de los días observados

PAQUIMETRÍAS EN ZONA A

	G. Control	G TMA 1d	G TMA 7d	GTMA 30d	p
DÍA 0	0,412	0,4236	0,409	0,4185	NS
DÍA 1	0,81	0,812	0,7755	0,8228	NS
DÍA 3	0,843	0,8366	0,8313	0,8565	NS
DÍA 7	0,675	0,6755	0,6527	0,6746	NS
DÍA 14	0,672	0,6763	0,6484	0,6875	NS
DÍA 30	0,706	0,7011	0,6672	0,718	NS
DÍA 60	0,544	0,5476	0,5494	0,5569	NS
DÍA 90	0,551	0,4752	0,469	0,48	NS

Tabla V.2.C.9.1.: Espesor corneal (mm) en la zona A.

PAQUIMETRÍAS ZONA A (mm)

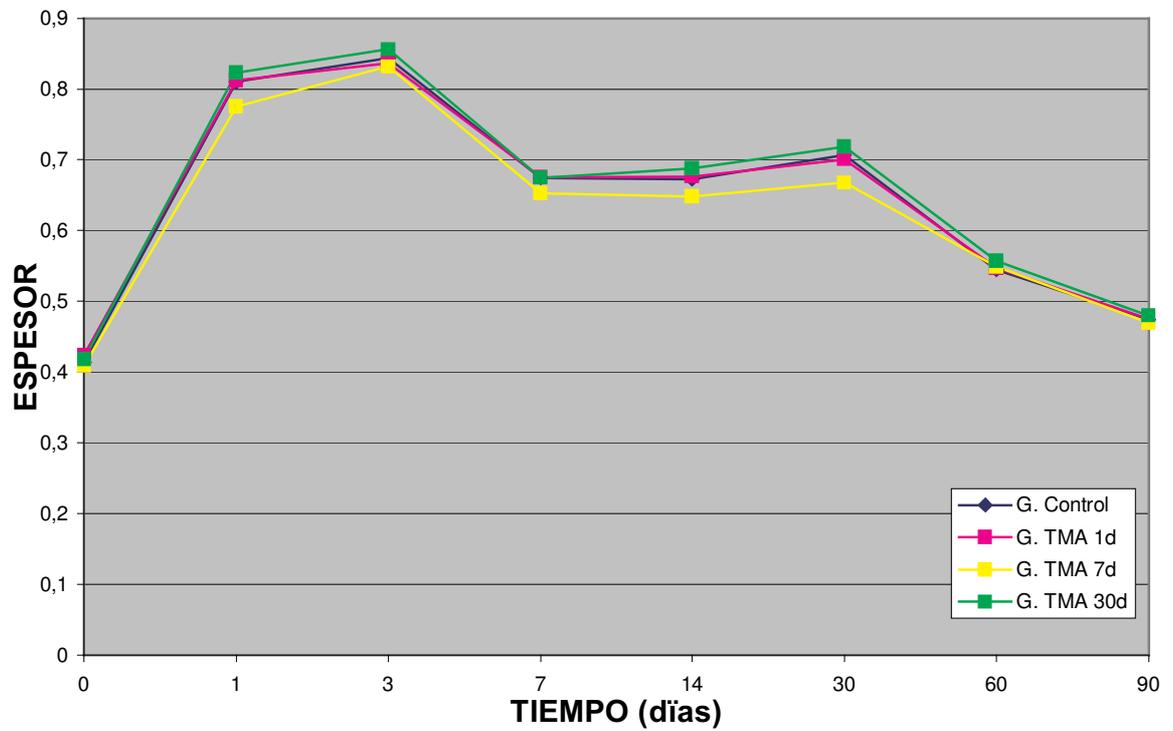


Figura V.2.C 9.1.: Espesor corneal (mm) en zona A.

V.2.C.9.2. Paquimetrías en zona B

La tabla V.2.C.9.2 registra las paquimetrías medidas en la zona B en los animales de experimentación del grupo control (n=10), grupo trasplante membrana amniótica 1^{er} día (n=10), grupo trasplante membrana amniótica 7 días (n=10) y grupo trasplante membrana amniótica 30 días (n =10)(figura V.2.C.9.2).

De la comparación de medias mediante la prueba ANOVA, para muestras independientes, se observan diferencias significativas (tabla V.2.C.9.2),entre grupos, en los días 14 ($p < 0,05$), altamente significativas ($p < 0,001$) en los días 30 y 60.

PAQUIMETRÍAS EN ZONA B

	G. Control	GTMA 1d	G TMA 7d	GTMA 30d	p
DÍA 0	0,438	0,448	0,442	0,449	NS
DÍA 1	0,722	0,698	0,741	0,709	NS
DÍA 3	0,753	759	0,761	0,73	NS
DÍA 7	0,650	0,681	0,663	0,613	NS
DÍA 14	0,775	0,582	0,903	0,757	<0,05
DÍA 30	0,855	0,499	0,888	0,756	<0,01
DÍA 60	0,773	0,499	0,847	0,735	<0,01
DÍA 90	0,652	0,543	0,573	0,47	NS

Tabla V.2.C 9.2.: Espesores corneales (mm) en zona B.

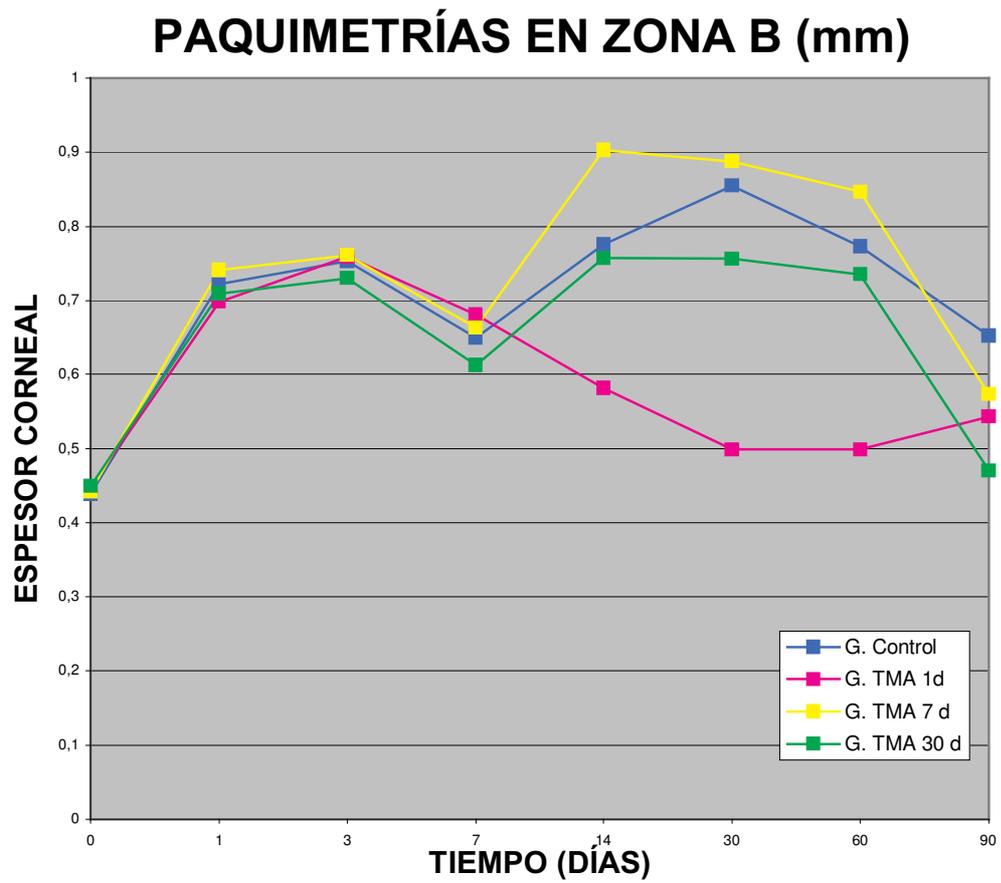


Figura V.2.C.9.2.: Espesores corneales (mm) en zona B.

V.2.C.9.3. Paquimetrías en zona C.

La tabla V.2.C.9.3 registra las paquimetrías medidas en la zona C en los animales de experimentación del grupo control (n =10), grupo trasplante membrana amniótica 1 día (n=10), grupo trasplante membrana amniótica 7 días (n=10) y grupo trasplante membrana amniótica 30 días (n=10)(figura V.2.C.9.3).

De la comparación de medias mediante la prueba ANOVA, para muestras independientes, se observan diferencias significativas entre grupos (tabla V.2.C.9.3), para ($p < 0,05$) tras la causticación y en los días 1 y 7, ($p < 0,01$) el día 30 y altamente significativas ($p < 0,001$) en el días 14, 60 y 90 tras la causticación.

PAQUIMETRÍA EN ZONA C.

	G. Control	GTMA 1d	G TMA 7d	GTMA 30d	p
DÍA 0	0,352 (\pm 0,021)	0,423	357	0,358	<0,05
DÍA 1	0,563 (\pm 0,082)	0,632	0,547	0,521	<0,05
DÍA 3	0,705 (\pm 0,190)	0,691	0,709	0,731	NS
DÍA 7	0,504 (\pm 0,137)	0,602	0,483	0,464	<0,05
DÍA 14	0,442 (\pm 0,085)	0,529	0,424	0,406	<0,001
DÍA 30	0,378 (\pm 0,035)	0,456	0,403	0,398	<0,01
DÍA 60	0,364 (\pm 0,030)	0,454	0,372	0,368	<0,001
DÍA 90	0,363 (\pm 0,032)	0,476	0,37	0,377	<0,001

Tabla V.2.C.9.3.: Espesores corneales (mm) en la zona C.

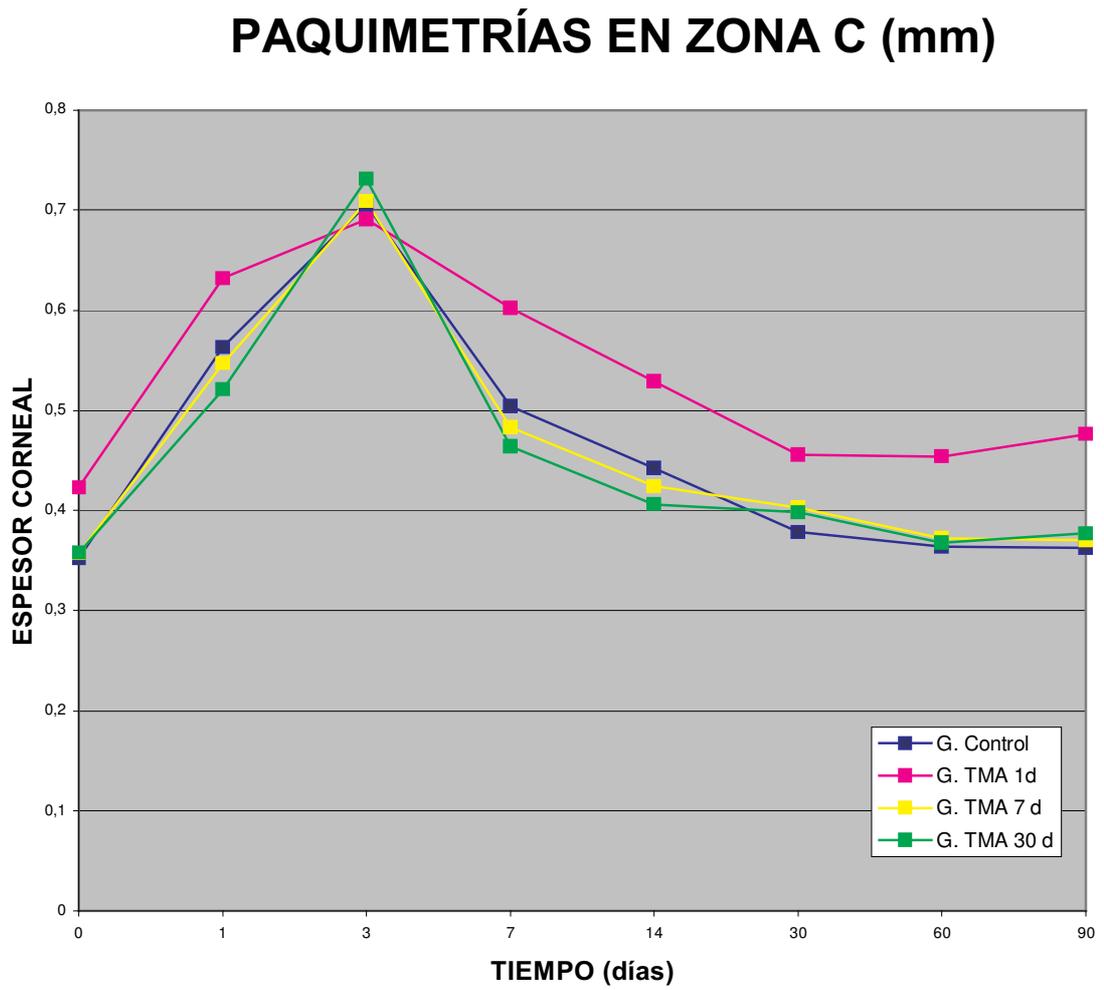


Figura V.2.C.9.3.: Espesores corneales (mm) en zona C.

V.2.D. EXPERIENCIA CLÍNICA CON TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA.

Expondremos los casos intervenidos durante 5 años, especialmente aquellos donde la MA amniótica nos ha resultado más útil y ha tenido éxito. En términos generales, en el tratamiento de patologías predominantemente conjuntivales, como el pterigion primario y ciertos casos de pterigion recidivante diferimos de otros autores pues consideramos que la terapia convencional (excisión simple con injerto conjuntival libre o rotatorio) es más efectiva en nuestras manos que el trasplante de MA.

V.2.D.1. Descompensaciones corneales postcirugía de la catarata.

Aplicamos injertos circulares de MA sobrepasando 1 mm de limbo a 27 pacientes intervenidos de cataratas, 8 casos tras extracción extracapsular y 19 casos postfacóemulsificación, que sufrían descompensación endotelial. Clínicamente los pacientes aquejaban intenso dolor y agudeza visual de cuenta dedos a 1 metro o menor. La mayoría de ellos estaban en lista de espera para queratoplastia penetrante y para calmar el intenso dolor portaban una lente de contacto terapéutica que se cambiaba cada mes o con mayor frecuencia si la perdían. Realizamos trasplante de 1 sola capa de MA a modo de lente de contacto terapéutica suturada a limbo de manera continua (figura V.2.D.1.A, B y C). La sutura empleada en todos los casos fue el Vicryl de 9/0 alternando puntada en epiesclera cada dos puntadas conjuntivales. Previamente al TMA, realizábamos desepitelización mediante alcohol absoluto al 20%.

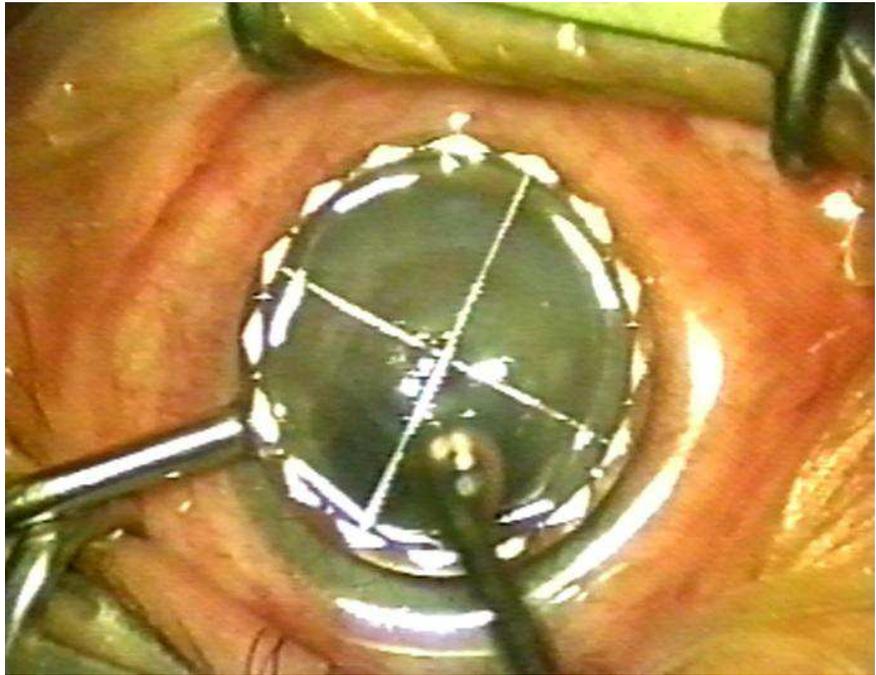


Figura V.2.D.1.A: Colocación de marcador de queratotomía radial e instilación de varias gotas de alcohol absoluto al 20%, paso previo a la desepitelización.

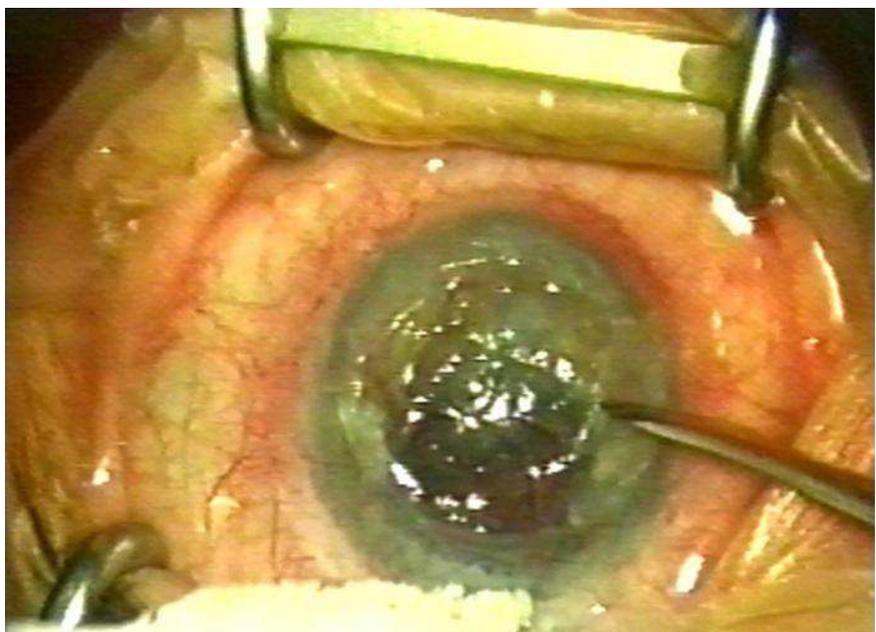


Figura V.2.D.1.B.: Desepitelización mecánica mediante hemosteta y escarificador.

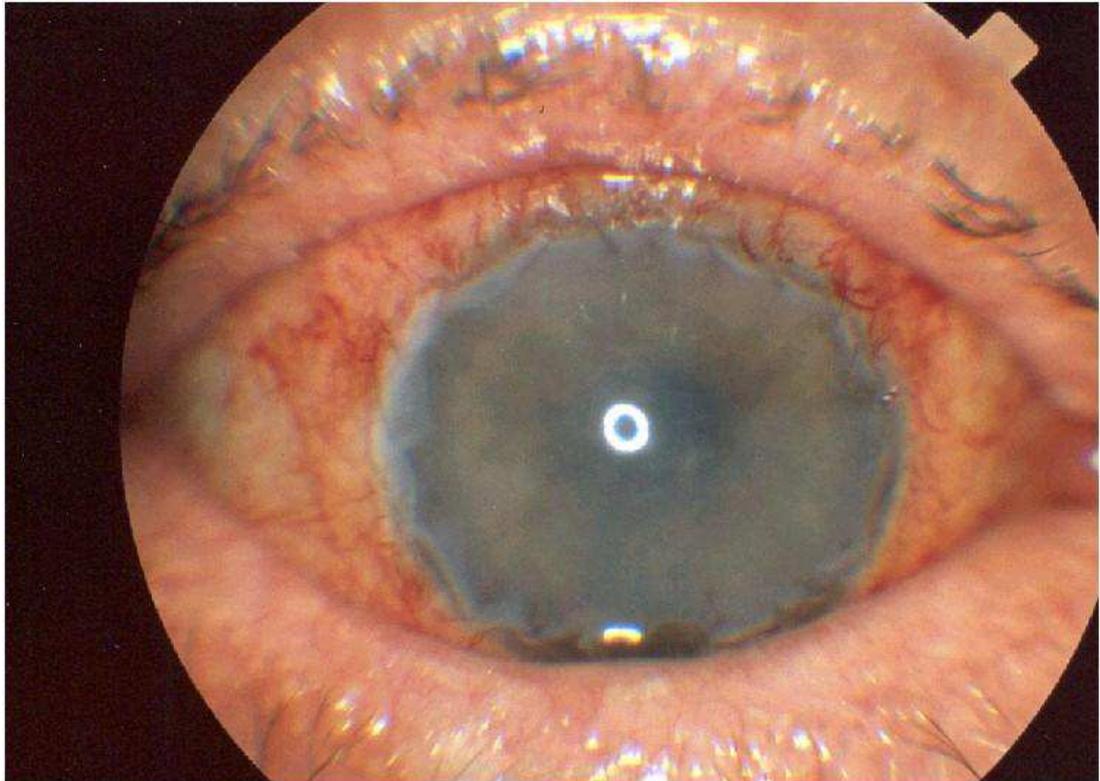


Figura V.2.D.1.C.: Descompensación corneal postfacioemulsificación recubierta con monocapa de membrana amniótica. Sutura continua con Vycrrl 9/0. Aspecto inmediatamente tras la cirugía.

El tratamiento postoperatorio recibido en todos los casos fue de colirio Tobradex[®], 2 gotas 3 veces al día durante 4 semanas con descenso progresivo en las 2 últimas semanas. El proceso natural en la mayoría de los casos fue la desintegración progresiva de la membrana en tres semanas. En el 100% de los casos se consiguió una disminución tanto del dolor como de las molestias subjetivas de los pacientes durante un periodo de 1 año o superior (media 13 ± 4 meses). En cuanto a la ganancia de agudeza visual, la constatamos objetivamente sólo en 7 de los 27 casos (26%, 2 extracapsular y 5 faco). Cuatro pacientes consiguieron una agudeza visual lejana de 0,1 y 3 de ellos más de 0,1. El empleo de MA en estos casos resultó muy beneficioso en nuestras manos como procedimiento paliativo previo al trasplante de córnea. Por otro lado la mayoría de

estos pacientes son de edad avanzada y tienen ciertas dificultades en ponerse las lentes de contacto terapéuticas para paliar el dolor. Por tanto la lente de contacto biológica de MA puede resultar una buena alternativa.

V.2.D.2. Degeneración corneal calcárea con microperforación ocular.

Realizamos trasplante de MA con múltiples capas en 2 ojos de una paciente padecedora de Síndrome de sequedad ocular secundario enfermedad injerto contra huésped (EICH tras un trasplante allogénico de médula ósea - enfermedad subyacente, hemoglobinuria paroxística nocturna). La EICH suele ocurrir de semanas a meses tras el trasplante de médula ósea y se manifiesta de manera sistémica afectando a: piel, hígado, tracto gastrointestinal...(Shulman HM y Sullivan KM, 1980). La afectación oftálmica suele darse en el 10% de los casos, siendo la manifestación más frecuente la queratoconjuntivitis sicca, lagoftalmos cicatricial, la conjuntivitis estéril y uveítis (Franklin RM y Kenyon KR 1983).

Las complicaciones severas de defectos epiteliales persistentes y ulceración estromal están relacionados con la situación concomitante de ojo seco y suelen controlarse mediante terapia convencional que incluye colirios y pomadas lubricantes, oclusión del punto lagrimal mediante tapones y tarsorrafia. Sin embargo, las úlceras profundas y las perforaciones corneales tras importante adelgazamiento corneal requieren queratoplastia lamelar y penetrante, parches conjuntivales, parche escleral que tapone la perforación, tarsorrafia o sellado de la perforación mediante pegamento tisular (Portnoy SL e Insler MS, 1989). Sin embargo hay un riesgo inherente con el uso de tejidos homólogos y la aplicación de adhesivos tisulares, no es siempre fácil.

Por ello consideramos que en estos casos, el trasplante de MA podía ser una buena alternativa. Realizamos el implante de tres capas múltiples de tamaño creciente desde dentro hacia fuera (la última capa la suturamos al limbo esclero-corneal). El aspecto de uno de los ojos (OD) de la paciente de 20 años, a la lámpara de hendidura en el momento previo a la cirugía, fue el de una gran placa de degeneración calcárea con adelgazamiento corneal inferior incluso microperforación de 1,5 x 2 mm con hernia de iris (Figura V.2.D.2.1). Antes de perforarse esta úlcera corneal, fue tratada inicialmente mediante la aplicación de una lente de contacto terapéutica blanda, colirio de tobramicina reforzado y vendaje compresivo. Debido a la intolerancia de la lente de contacto y a la no disponibilidad de una córnea donante en ese tiempo, se decidió utilizar varios injertos de MA para cerrar la perforación ocular (véase técnica multicapa).

Durante la cirugía se realizó la mayor excisión posible de las placas calcáreas y desbridando la mayor parte de tejido necrótico posible de las paredes y base de la úlcera para exponer la córnea sana. Así esta zona sana, sirve de base firme para suturar la MA al tejido corneal vecino sano. Se emplearon 3 capas circulares de MA y se empleó Vycril de 9-0 para suturar (Figura V.2D.2.2). Nos aseguramos de haber mantenido la orientación fisiológica correcta de la membrana (epitelio hacia arriba y estroma hacia abajo, con las tres capas). Este procedimiento se realizó bajo anestesia general. En el postoperatorio la paciente recibió colirio de corticoides y antibiótico cada 3-4 horas durante 6-8 semanas. Tras suspender progresivamente este tratamiento se le instauró tratamiento con colirio de lágrimas artificiales.

La MA se reabsorbió parcialmente a las seis semanas tras la cirugía y de modo completo a los 6 meses cuando la microperforación estaba completamente cicatrizada. A

los 20 meses de seguimiento (Figura V.2.D.2.3) tanto el grosor epitelial como estromal permanecieron estables con mantenimiento de la profundidad de cámara anterior y efecto Seidel negativo. A los 48 meses, seguía estable. Mediante el trasplante de MA la agudeza visual no mejoró sustancialmente, pero si resultó un procedimiento tectónico seguro y eficaz para sanear la superficie ocular hasta la realización de una queratoplastia penetrante.

Respecto al empleo de MA en el tratamiento de microperforaciones y úlceras profundas existe bastante controversia. Para muchos autores la MA resulta un método eficaz tanto de manera aislada (Solomon A 2002, Kruse FE 1999 y 2001, Peris Martínez C 2001), como acompañada de pegamentos tisulares (Duchense B 2001) para el tratamiento de microperforaciones incluso con descemetocel. Otros autores se muestran reacios en cuanto a la utilidad de la MA en el tratamiento de perforaciones oculares (Ferreira de Souza R 2001), especialmente en perforaciones tras quemaduras químicas con descemetocel.

Según nuestra escasa experiencia en el tratamiento de microperforaciones oculares, (6 casos), para tratamiento con éxito de estas lesiones se requiere más de una capa de MA (Técnica multicapa). Previamente desbridamos el tejido necrótico de alrededor hasta dejar tejido sano. La primera capa que se coloca es de aproximadamente el tamaño de úlcera profunda-microperforación, para que la MA actúe a modo de membrana basal sobre la que migren las células sanas de la periferia de la lesión. La última capa a modo de lente de contacto biológica suturada a limbo.

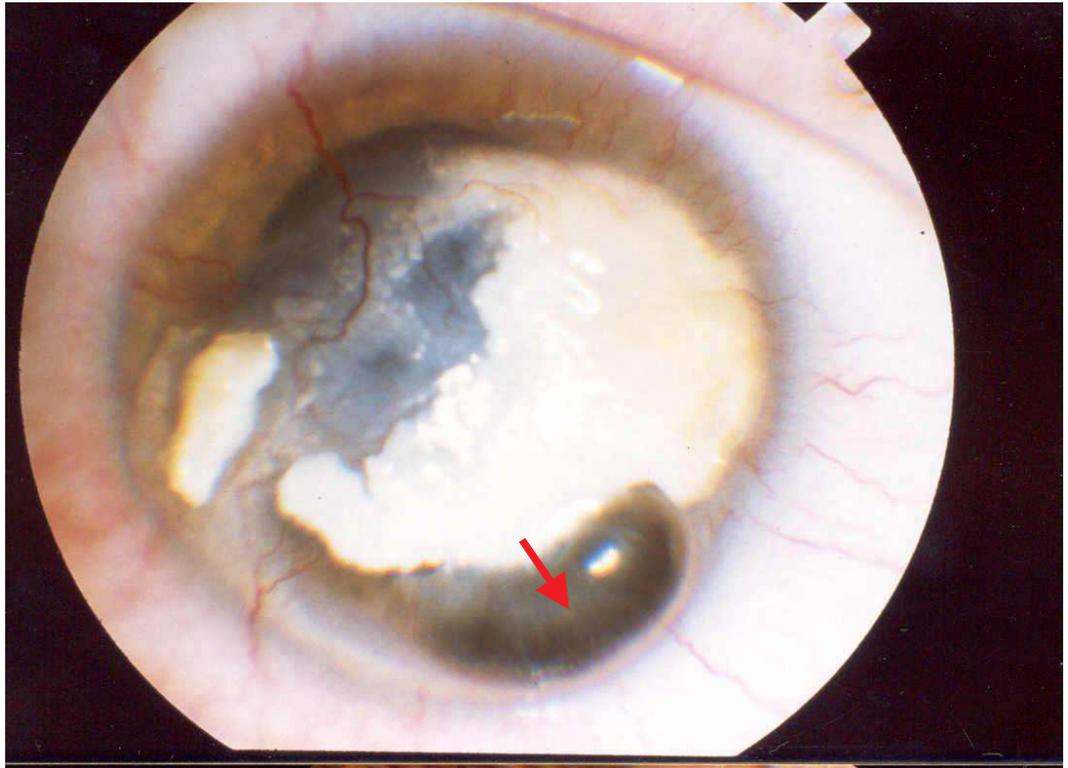


Figura V.2.D.2.1.: Imagen previa al TMA mostrando mediante biomicroscopía la degeneración corneal calcárea (gran placa blanquecina y satélite) y una úlcera profunda con microperforación de 1,5 x.2 mm con hernia de iris (flecha roja) en el ojo derecho.

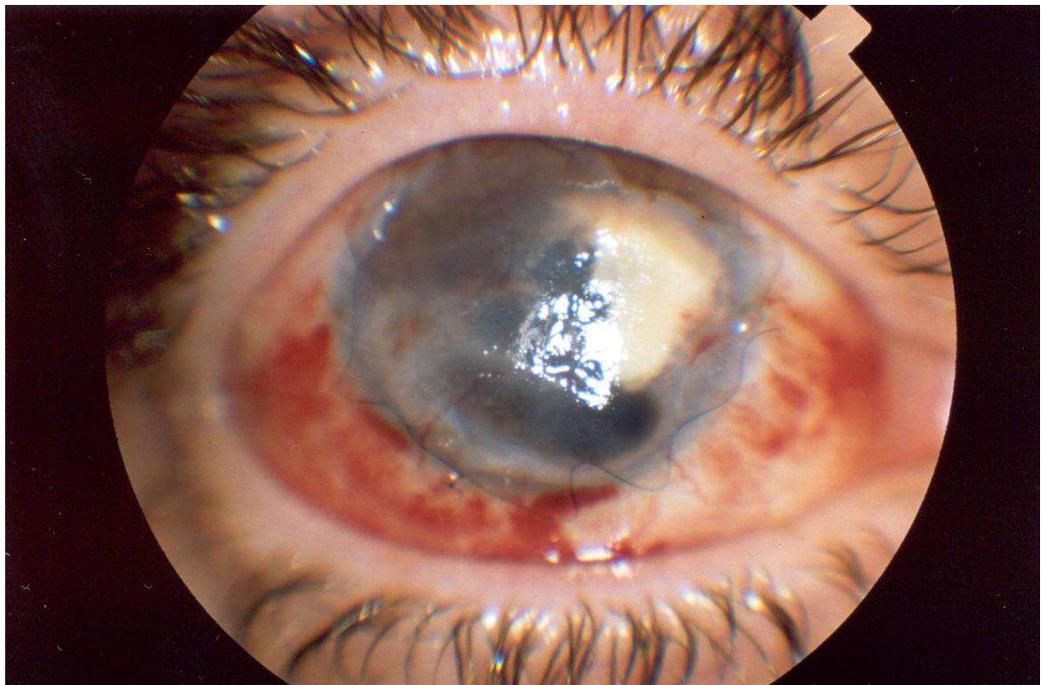


Figura V.2.D.2.2.: Imagen postrasplante de MA en el primer día tras el postoperatorio inmediato con el injerto de 3 capas de MA suturado a limbo

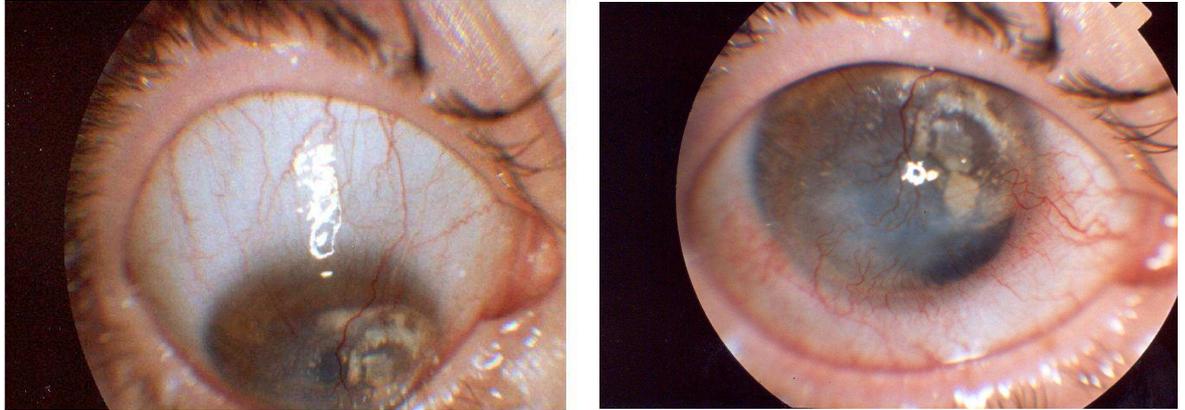


Figura V.2.D.2.3.: Imagen postoperatoria tardía 20 meses tras la intervención. Nótese que la microperforación permanece cerrada.

V.2.D.3. Causticación ocular por ácido sulfúrico.

Realizamos trasplante de MA en un caso de microperforación corneal de tras causticación con ácido sulfúrico (figura V.2.D.3). Taponamos la perforación, del mismo modo que anteriormente, con múltiples capas de MA permaneciendo ocluída durante el periodo de seguimiento que pudimos revisarla (8 meses). Dado que la paciente era de nacionalidad india, regresó a su país y no tuvimos un seguimiento mayor.



Figura V.2.D.3.: Microperforación corneal con efecto Seidel positivo tras causticación ácido sulfúrico en la que se realizó trasplante múltiple de MA

V.2.D.4. Microperforación ocular secundaria a úlcera metaherpética.

Paciente de 57 años de edad con úlcera metaherpética recidivante. En el último episodio cursó con microperforación. Como tratamiento tectónico se empleó trasplante triple de MA para coaptar la herida, mientras se esperaba el trasplante corneal definitivo (Figura V.2.D.4.).

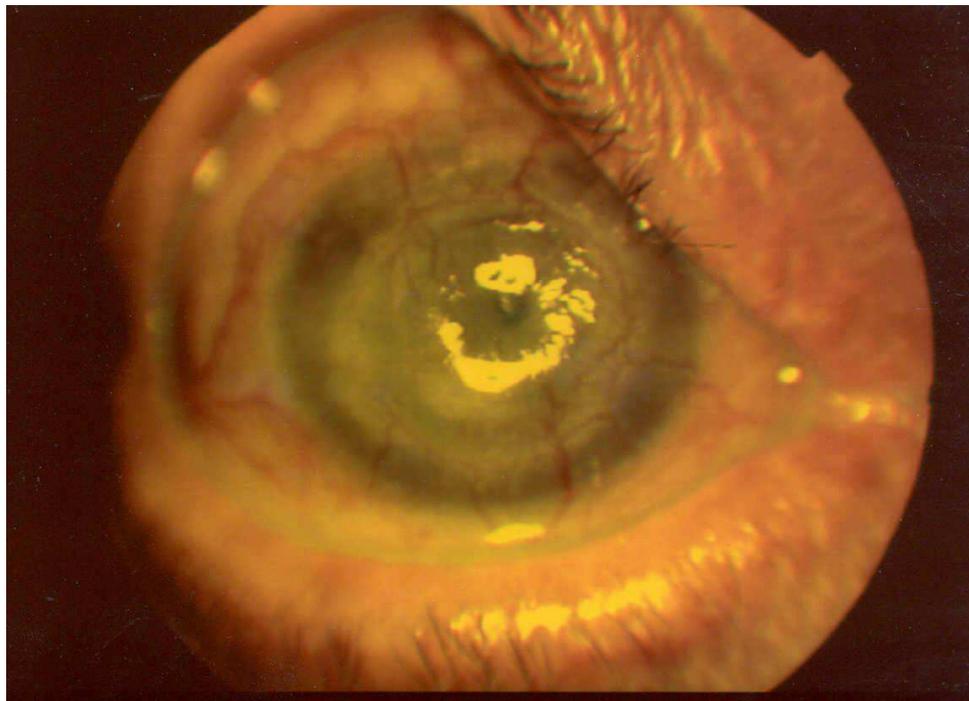


Figura V.2.D.4.: Detalle de la cirugía trasplante de MA en microperforación en paciente con úlcera metaherpética. Triple capa de MA.

V.2.D.5. Dehiscencia de sutura y "lisis-melting" corneal en paciente con queratoplastia penetrante.

Paciente de 65 años al que realizamos un trasplante corneal como consecuencia de leucomas corneales secundarios a queratitis metaherpética. La cirugía resultó sin complicaciones con trasplante de un injerto corneal de buena calidad de 7,25 mm de diámetro sobre lecho receptor de 7,5 mm. Se suturó mediante 8 puntos sueltos y posterior sutura continua de nylon monofilamento 10/0.

Un mes tras la cirugía, acudió de urgencias por dolor en el ojo trasplantado y pérdida de visión. Mediante biomicroscopía se constató la presencia de una dehiscencia de la sutura continua del lado nasal (ojo izquierdo) (figura V.2.D.5.1), microperforación

inferior de 1.5 mm con úlcera estromal profunda (flecha amarilla) y comienzo de lisis corneal. Dado que no podíamos realizar un nuevo trasplante corneal de urgencia por carecer de donaciones y a la falta de tejido conjuntival periférico que nos permitiera taponar la microperforación, decidimos realizar trasplante de MA multicapa con tres fragmentos. El fragmento más interno empleado con la “técnica de MA como injerto”, es decir recorte de MA (epitelio hacia arriba y estoma hacia abajo) para que se adapte al defecto de la úlcera estromal con la intención de que se produzca una epitelización superficial de la MA.

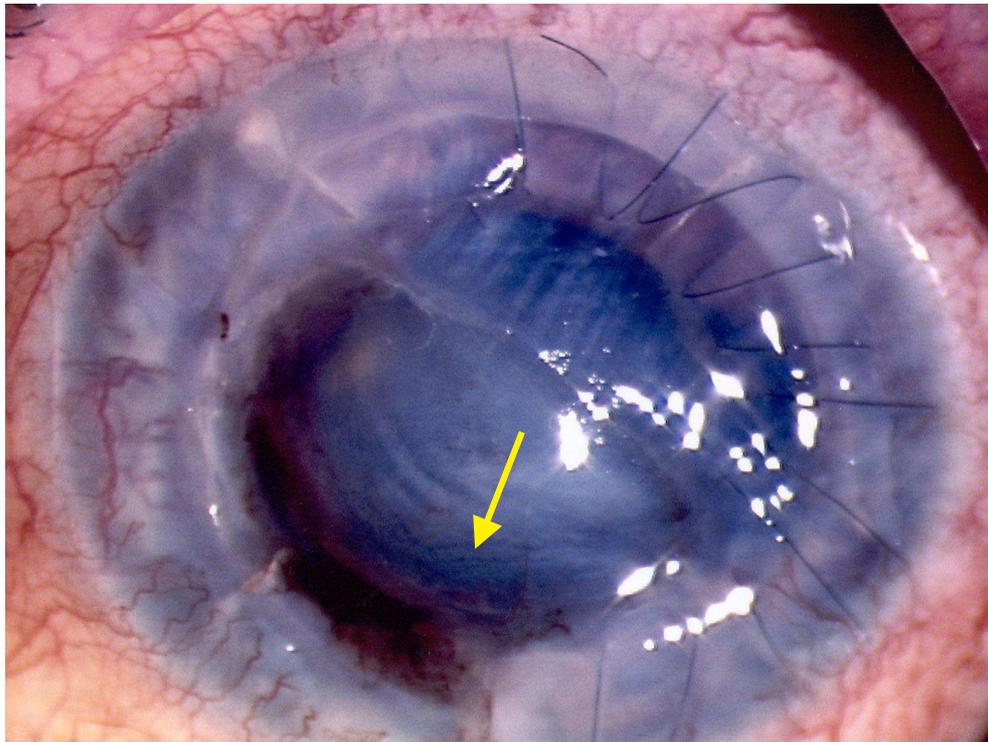


Figura V.2.D.5.1.: Biomicroscopía de queratoplastia penetrante con dehiscencia de la sutura continua (flecha amarilla). Úlcera corneal profunda inferior con comienzo de autólisis del injerto corneal. Un mes post-trasplante corneal.

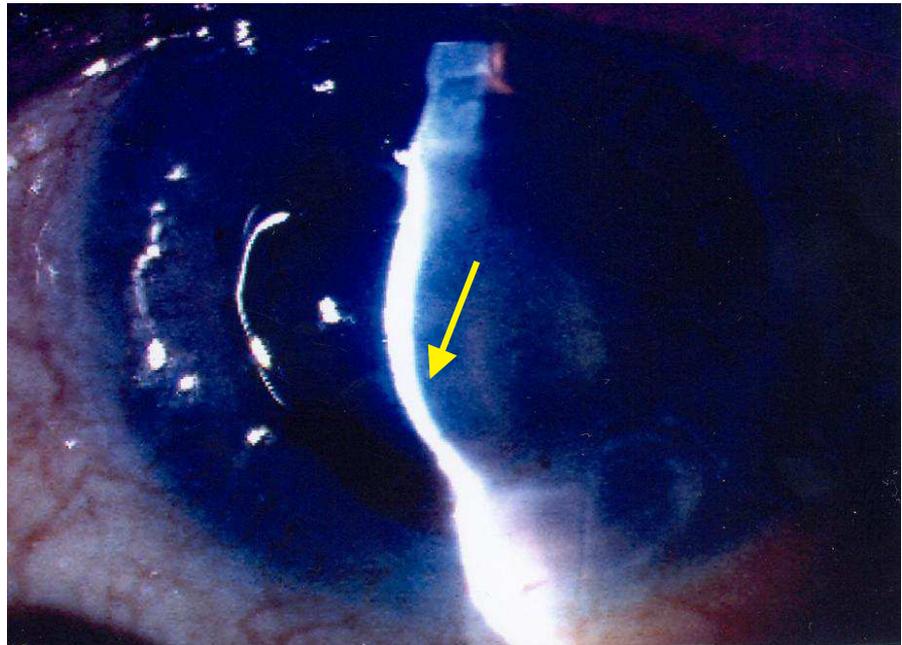


Figura V.2.D.5.2.: Imagen del mismo paciente anterior. Corte anteroposterior mediante lámpara de hendidura.

Los 2 fragmentos más superficiales de MA se trasplantaron con la “técnica como parche”, es decir, recubrir la córnea entera y amplias zonas de conjuntiva perilémbica (figura V.2.D.5.3) como protección.

Cuando implantamos la MA como injerto, la cara epitelial-membrana basal de la MA debe colocarse siempre hacia arriba para conseguir una buena epitelización sobre dicha membrana basal. Implantándola como parche se puede emplear indistintamente la cara epitelial-membrana basal hacia arriba o hacia abajo, ya que con ambas técnicas se han obtenido buenos resultados y ningún trabajo publicado ha demostrado que una posición sea superior a la otra (Azuara-Blanco A 1999, Gris O 2002). La MA cuando la empleamos como parche se reabsorbe entre 4-6 semanas perilémbica (figura V.2.D.5.4), aunque en muchos casos la MA acaba desprendiéndose antes de la disolución (a pesar de

la suturas) por el efecto mecánico del parpadeo. En estos casos emplear una lente de contacto en el postoperatorio ayuda a mantener durante más tiempo el implante de MA (Letko E 2001, Gris O 2002).

En este caso el trasplante múltiple de MA ha servido para coaptar la microperforación varios meses después hasta realizar un nuevo trasplante (Figura V.2 D 5.5).

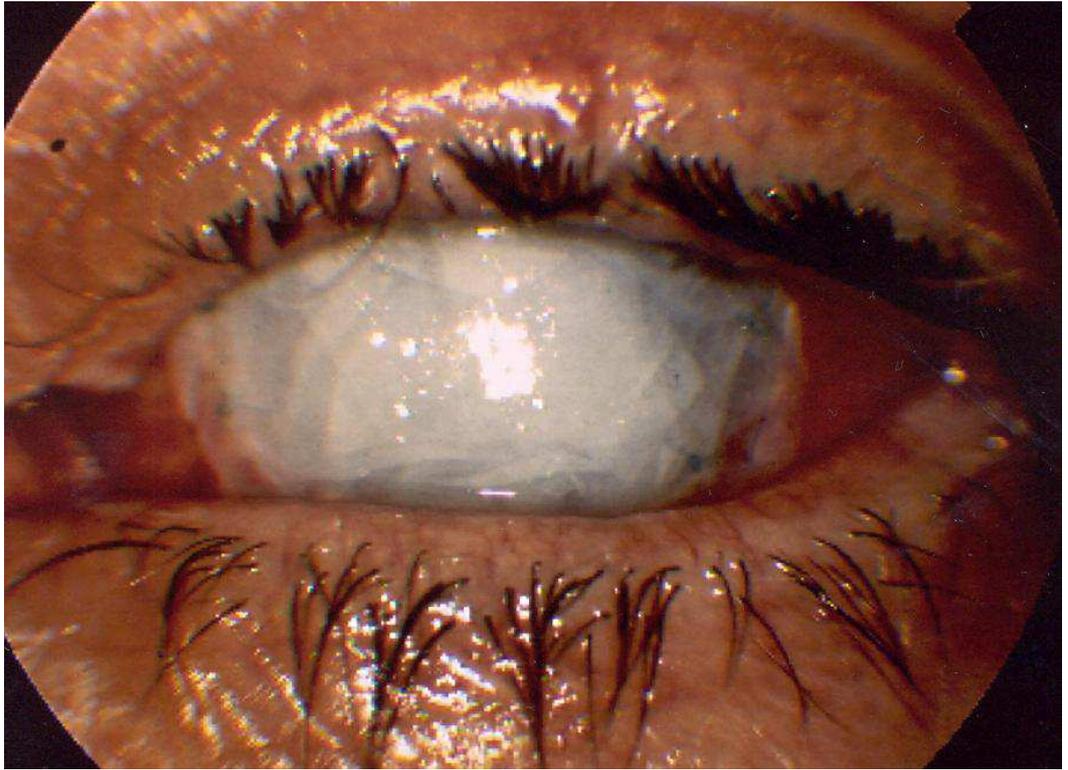
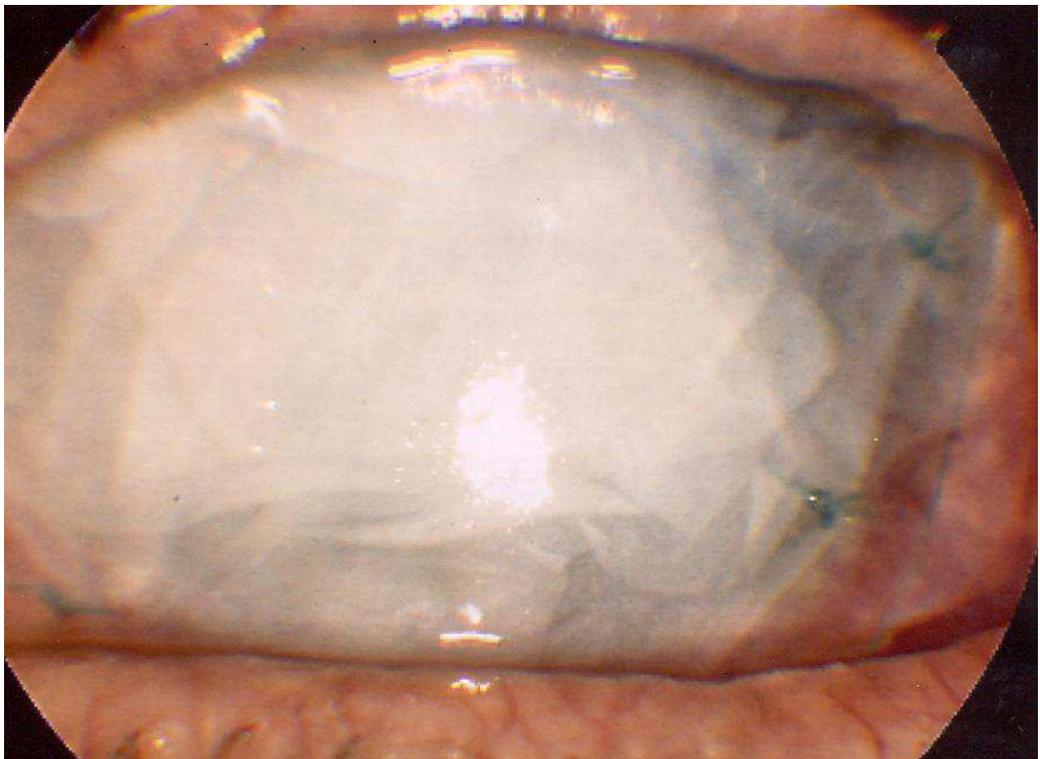


Figura V.2 D 5.3: Aspecto inmediatamente tras el trasplante múltiple de MA.



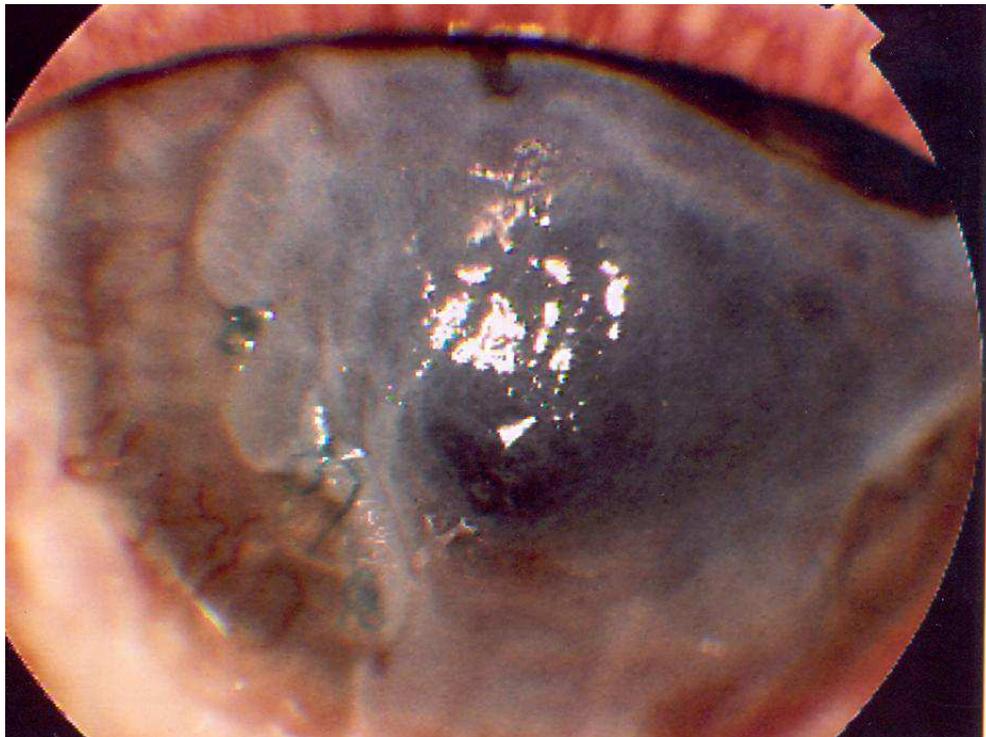
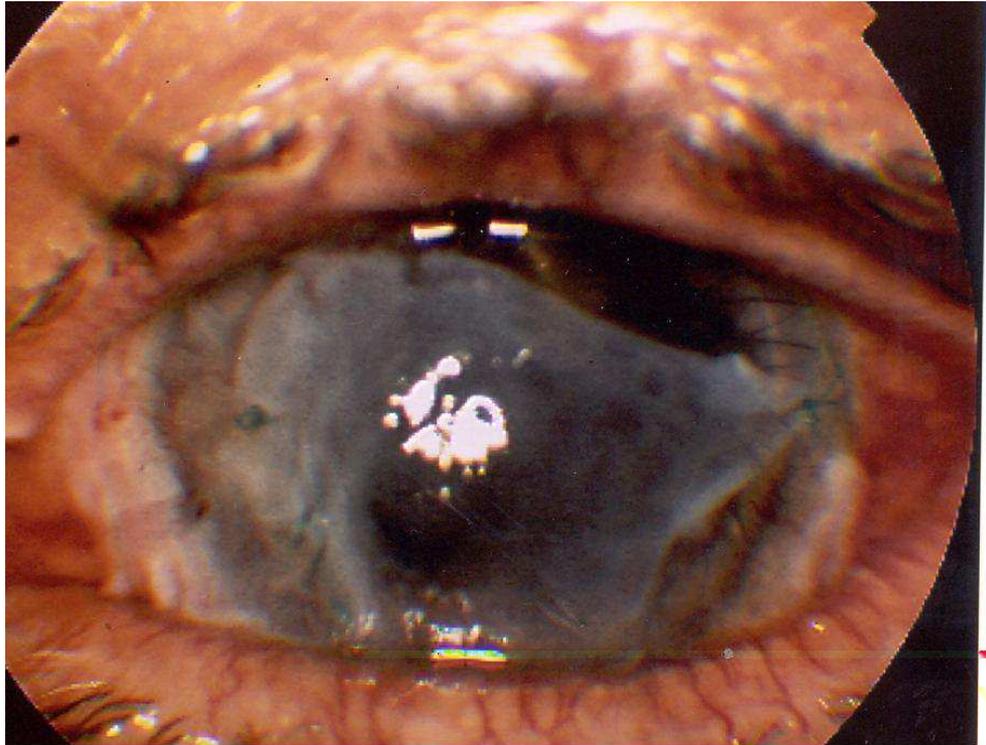


Figura V.2.D.5.4.: Aspecto del mismo ojo 2 semanas tras la cirugía cuando se van desintegrando las capas más superficiales de MA.

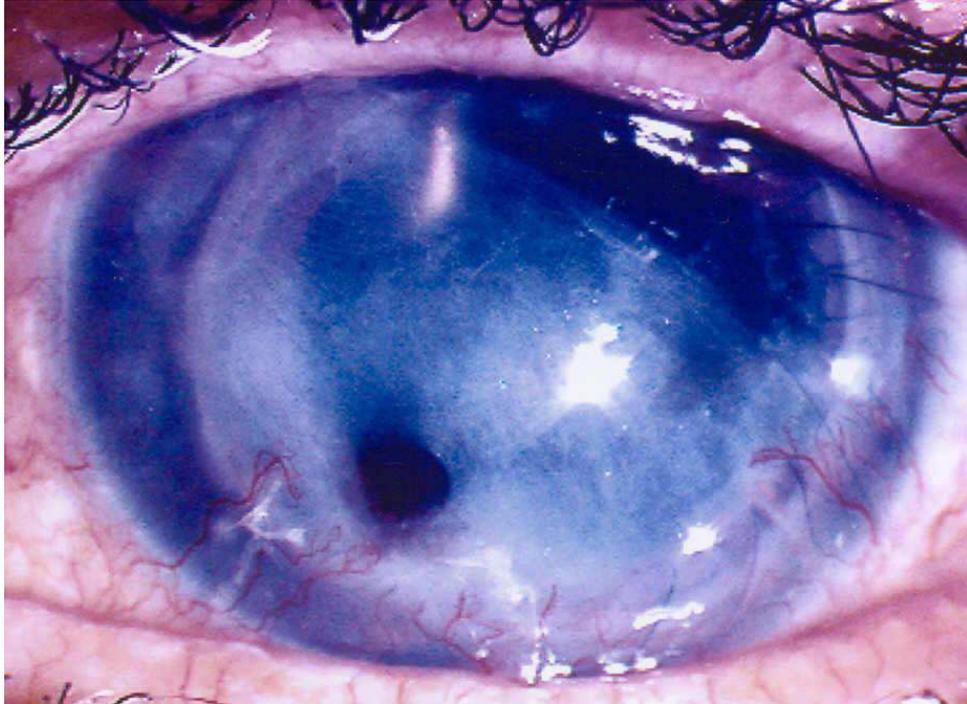


Figura V.2.D.5.5: Aspecto del mismo ojo 4 meses tras la cirugía. La microperforación permanece sellada formando una bulla en el lugar por donde antes se filtraba humor acuoso.

V.2.D.6. Microperforación en megalocórnea secundaria a glaucoma congénito

En este caso la MA se empleó con la misma finalidad tectónica que en los casos anteriores de microperforación. Es decir en espera de una queratoplastia penetrante. En este paciente se había realizado un previo intento de oclusión de la microperforación mediante el empleo de pegamento tisular, pero el intento fracasó. Con la MA permaneció ocluido durante 7 meses (figuras V.2 D.6.1 y V.2 D.6.2).

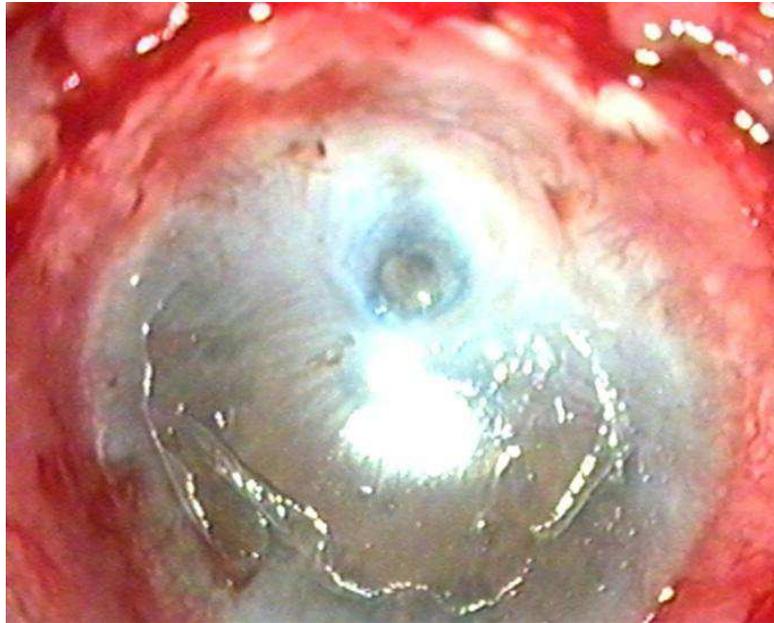


Figura V.2.D.6.1.: Microperforación superior.
Imagen intraoperatoria tras la desepitelización.

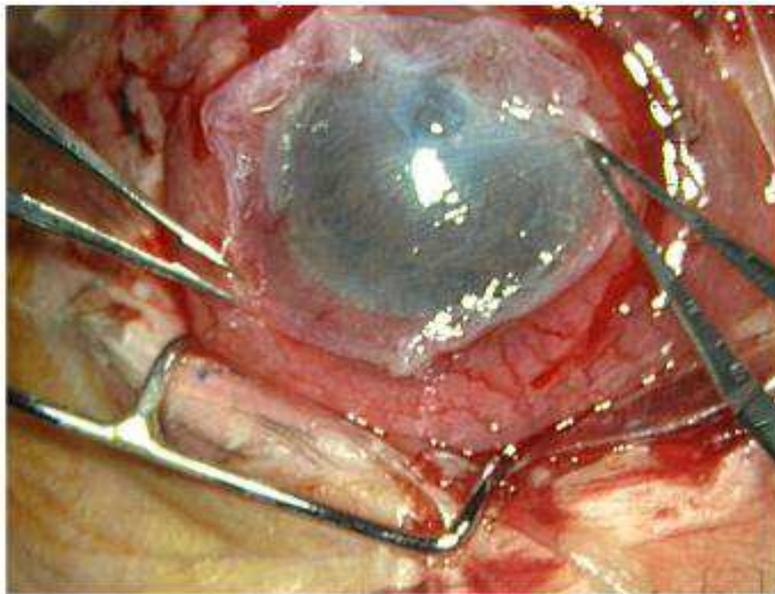


Figura V.2.D.6.2.: El mismo caso durante la intervención aplicando el injerto de MA.

V.2.D.7. Pterigion primario y recidivante.

Hemos empleado injertos de MA como sustituto de la conjuntiva en el tratamiento de 19 pterigiones (figura V.2.D.7.). Doce de ellos son casos severos de recidivas Cinco de estos 12 casos habían recidivado 3 veces ó más. Los 7 casos restantes fueron casos de pterigion primario. La literatura reportada demuestra que el injerto de MA puede ser empleado para reconstruir la superficie conjuntival “como sustituto conjuntival”, constituyendo una alternativa a la conjuntiva tras la eliminación de lesiones conjuntivales grandes tales como el pterigion (Tseng SCG 1997, Prabhasawat P 1997), neoplasia conjuntival intraepitelial (Tseng SCG 1997) y conjuntivocalasia (Meller D 2000). Según estos autores, estos resultados se consiguen aunque la zona reconstruída, sea grande, siempre que el lecho subyacente no sea isquémico y la conjuntiva que la rodea tenga un epitelio y estroma subconjuntival normal.

Si embargo, en nuestra experiencia con MA, sólo hemos obtenido buenos resultados en 3 casos de los 7 primarios y en 4 de los 12 recidivantes. Hemos observado con los pterigiones recidivantes que algunos permanecen estables y sin recidivar 2-3 meses, pero con el paso del tiempo, 12-24 meses, la mayoría han recidivado. Por ello, al igual que otros autores (Prabhasawat P 1997), consideramos que el autoinjerto de conjuntiva rotatorio o libre sigue teniendo un índice de recidivas menor tras la resección del pterigion primario o recurrente.

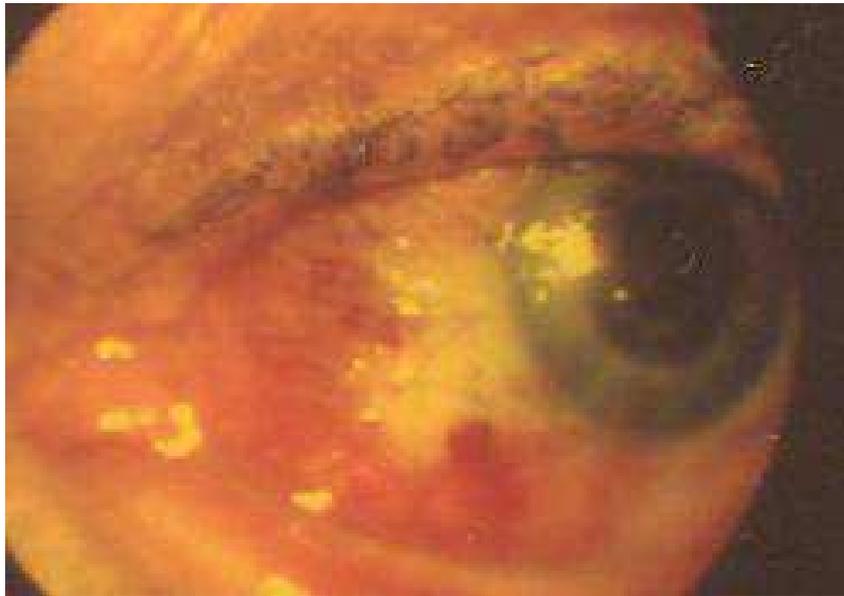


Figura V.2.D.7: Aspecto ojo tras la resección de pterigion y aplicación de injerto de MA para cubrir el defecto.

V.2.D.8. Simbléfaron.

Realizamos TMA en 3 casos de simbléfaron recidivantes de párpado inferior con bridas extensas (2 tras causticación con lejía durante labores domésticas y 1 traumático tras herida perforante con objeto punzante). Dos de ellos se habían intervenido en dos ocasiones (figura V.2.D.8.1) y el tercero (traumático) en una sola ocasión. La técnica quirúrgica empleada en los tres casos fue similar. Desbridamiento quirúrgico de las adherencias al ras del globo ocular mediante pinzas conjuntivales y tijeras Wescott. Extirpación de la zona conjuntival necrosada. Posteriormente recortamos un fragmento de MA de tamaño doble o un poco mayor de la extensión superficial de la conjuntiva extirpada. A continuación aplicamos la MA con la cara epitelial hacia arriba sobre la esclera desnuda, fondo de saco amplio y conjuntiva tarsal. Suturamos con puntos sueltos

de Vycril 9/0 de borde a borde. Es importante no olvidar un par de puntos en el fondo de saco conjuntival para evitar sinequias (figura V.2.D.8.2). Por último mantenemos una cáscara de Illig (conformador) durante 1-2 meses según tolerancia.

Los resultados han sido relativamente satisfactorios. Dos de los casos se han mantenido sin sinequias desde la intervención, hace 25 y 39 meses respectivamente. Mientras que el tercer caso recidivó a los 11 meses de la cirugía, posteriormente se volvió a realizar la misma técnica permaneciendo hasta ahora sin recidivar (4 meses después).

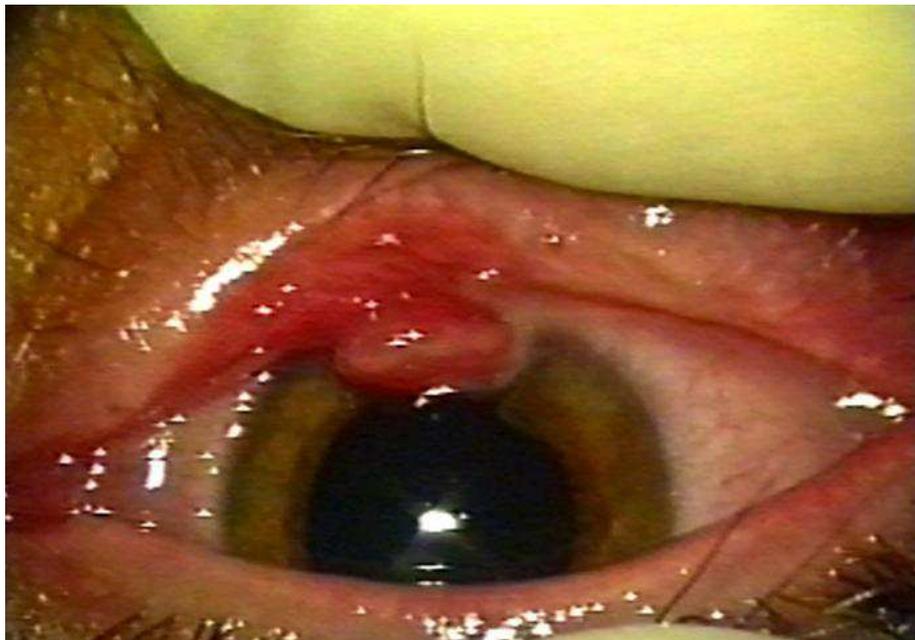


Figura V.2.D.8.1.: Imagen preoperatoria. Simbléfaron tras causticación con lejía.

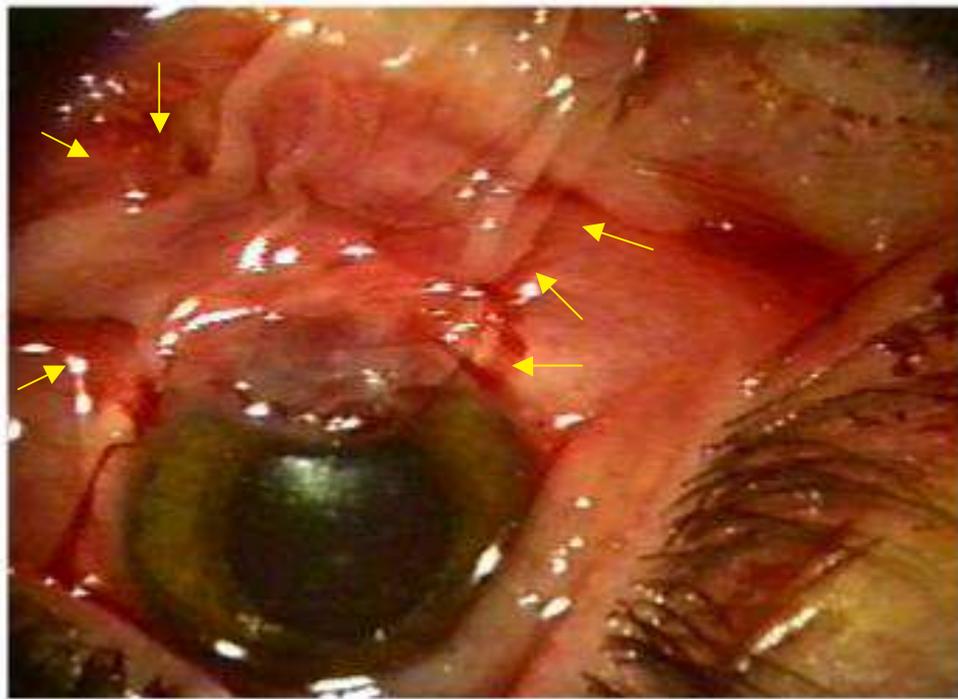
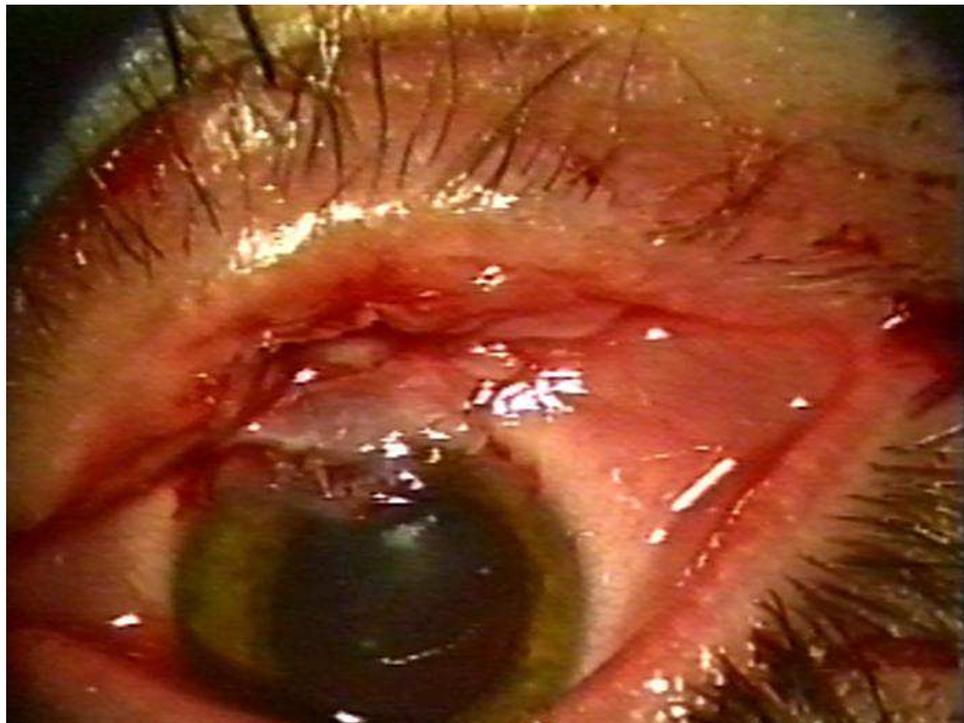


Figura V.2.D.8.2.: Arriba. Simbléfaron tras causticación en el momento de la extensión de la MA y creación de un nuevo fondo de saco conjuntival con la MA. Abajo. Aspecto en el postoperatorio inmediato.



VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

VI.1. ELECCIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE CAUSTICACIÓN CORNEAL REPRODUCIBLE PARA VALORAR EL EFECTO DEL TRASPLANTE DE MA SOBRE LA EVOLUCIÓN CLÍNICA.

La severidad de una causticación depende de varios factores: tipo de cáustico, cantidad, concentración, duración de la exposición al cáustico. Por tanto en el modelo experimental propuesto controlaremos dichos aspectos:

- 1) El tipo de cáustico.
- 2) Concentración.
- 3) Peso del cáustico.
- 4) Tiempo de exposición sobre la superficie ocular.

De las siguientes clasificaciones de causticaciones oculares que hemos encontrado tras revisión bibliográfica, la clasificación de Ballen (1964) fue una de las primeras en reconocer el daño limbar. Roper Hall (1965), en su clasificación, hacía especial referencia al grado de isquemia, y necrosis limbar, como factor predictivo, considerando la extensión del daño. Antiguamente se relacionaba el daño límbico con el pronóstico evolutivo de la causticación, y se reconocía al limbo esclero-corneal como una estructura diferenciada de la conjuntiva adyacente implicada en el pronóstico de las causticaciones oculares. Un decenio después, se relacionaría el compromiso limbar con la pérdida de las células primordiales, así como se reconocería su importancia en la epitelización corneal (Thoft RA 1979, Friend J 1978). Así, Thoft (1979) sugería su

propia clasificación en la que se relacionaba el estado corneal y el límbico con el pronóstico visual. Con los conocimientos actuales pensamos que la clasificación de Thoft permanece plenamente vigente y que su manejo, además de sus implicaciones pronósticas, permite orientaciones terapéuticas según el grado de la lesión observada.

Sin embargo, la extensión del daño epitelial conjuntival asociado, es otra variable de considerable significación pronóstica no tomada en cuenta por los anteriores. Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, Dua y colaboradores (Dua HS 2001) proponen una significativa modificación de la clasificación de Roper-Hall para las quemaduras de la superficie ocular. Esta clasificación tiene en cuenta no sólo el daño limbar y en qué cantidad, contando horas de reloj, sino también el porcentaje de daño conjuntival (Dua HS 1994, 1998), complementando así a la de Roper Hall.

Aunque está reconocido que la afectación del limbo, conjuntiva y epiesclera puede complicar la curación en causticaciones corneales por álcalis (Pfister RR 1993), la mayor parte de modelos experimentales propuestos se han limitado, en general a causticar la córnea central bien empleando contenedores (Pfister RR 1976) o filtros humedecidos en cáustico (Ormerod LD 1989, Obenberger J 1975). Dichos modelos sólo reproducen parcialmente las situaciones observadas en la clínica.

Dado que el experimento del que es objeto esta tesis tiene como uno de sus objetivos el evaluar la eficacia del trasplante de MA en las causticaciones de la superficie ocular que presenten compromiso límbico, creímos oportuno el tomar como modelo experimental, con ciertas modificaciones, un modelo experimental con causticación empleando un filtro impregnado con sosa cáustica y que implicara al limbo sectorialmente (Ormerod y cols 1989, Mendicute J 1997).

VI.1.1. ELECCIÓN DEL TIPO DE CÁUSTICO

En los experimentos hemos utilizado el hidróxido sódico (NaOH) para provocar las quemaduras de la superficie ocular, por ser uno de los más frecuentes en clínica (Roper Hall 1965), también es el cáustico más frecuentemente empleado en la literatura científica (Ormerod LD 1989, Obenberger J 1985, Mendicute JJ 97, Meller 2000, Pan Z 2002).

Uno de los principales objetivos del estudio es evaluar la eficacia del trasplante de MA en la reconstrucción y regeneración de la superficie ocular tras causticación experimental, circunstancia que puede ser determinante en los procesos de reparación corneal (Burns FR 1989), por tanto interesaba escoger un cáustico que la comprometiera profundamente. La capacidad de las sustancias alcalinas, y en especial el NaOH, para comprometer las estructuras oculares ha sido sobradamente comprobada en la literatura científica (Burns FR 1989, Pfister RR 1983, Ormerod LD 1989.). Otros cáusticos empleados como el n-heptanol, a pesar de comprometer el epitelio corneal, no aseguran la destrucción completa de las células madre limbares y para lograr reproducir un fracaso límbico deben apoyarse en resecciones quirúrgicas del área perilímbica (Tasi RFJ 1990, 1995, 2000). El n-heptanol no lesiona la membrana basal ni la matriz extracelular estromal (Cintron C 1979), por lo que el daño estromal es escaso y puede que no sea un buen cáustico para estudiar los procesos de reparación estromal.

En definitiva, interesaba evaluar no sólo la regeneración de la superficie epitelial corneal tras trasplante de MA sino también, de producirse, su influencia en la evolución de los procesos de reparación estromal propiamente dichos (evolución de la opacificación, del edema y de la neovascularización corneal). Aspectos que no son

totalmente reproducibles con la utilización de n-heptanol y cuya evolución viene condicionada, entre otros factores, por los procesos de curación epitelial (Berman MB 1983, McCulley JP 1987). Por ello era necesaria la utilización de un cáustico que en situación de partida indujera el daño epitelial y estromal suficiente como para evaluar su evolución posterior.

En el modelo que hemos aplicado, con la causticación practicada según se ha descrito en el capítulo de Resultados, se han logrado lesiones (defectos epiteliales) que han presentado una distribución simétrica y suficientemente agrupada (tabla V.2.A.5 y V.2.A.6). Es de destacar que aunque la tendencia de las úlceras es hacia la curación, se ha observado en la mayoría de los casos defectos epiteliales persistentes, opacidad permanente y tendencia a la recidiva.

El NaOH ha permitido diseñar un modelo en el que el daño estromal, expresado como el área de opacificación, ha sido también fácilmente reproducible. Otros signos indirectos de la reparación estromal como la evolución de la neovascularización y el edema corneal también han sido de una homogeneidad aceptable (tabla V.2.A.7.-9).

VI.1.2. CONCENTRACIÓN DEL CÁUSTICO

Hemos empleado la concentración de 1 normal (1N) de NaOH por varios motivos:

- 1) Con esta concentración aseguramos provocar una lesión lo suficientemente agresiva como para que no cure *ad integrum* de manera espontánea tras 45 segundos de exposición sobre la superficie corneal.

2) El uso de mayores concentraciones (2N, 3 N) podría destruir la estructura de los filtros empleados(Whatman # 3) (Mendicute J 1997).

3) El uso de mayores concentraciones (2N, 3 N) podría provocar lesiones con microperforación ocular que nos obligaría a retirar del estudio a dicho animal.

4) El empleo de concentraciones menores y un tiempo de menor exposición provocaba lesiones de la superficie ocular que se curaban de manera espontánea *ad integrum* con el paso del tiempo y por tanto no sería valorable el efecto de la membrana amniótica en el experimento.

VI.1.3. EMPLEO DE FILTROS

Otros modelos experimentales de causticación corneal descritos en la literatura utilizan otras alternativas a los papeles de filtro para practicar la causticación como los contenedores. La utilización de filtros, creemos que es más sencilla en el manejo y de mayor reproducibilidad.

En el modelo empleado, al igual que el descrito por Ormerod LD (1989) y Mendicute J (1995) se ha descrito papel de filtro Wathman # 3 por su fácil adaptabilidad a la curvatura corneal cuando está húmedo. Así podemos lograr una causticación uniforme tanto de la córnea como del limbo. Hemos empleado sectores de 1/4 de círculo (16 mm de diámetro) al igual que el modelo de causticación empleado por Mendicute (Mendicute J 1997).

Los pesos de los filtros (tabla V.2.A.2), han presentado un peso medio de 0,012 gramos y una desviación estándar de 0,00032 gramos, por lo que pueden considerarse como homogéneos en todos los casos.

VI.1.4. TIEMPO DE EMPAPADO DE LOS FILTROS EN LA SOLUCIÓN CÁUSTICA.

Para decidir el tiempo de humedecimiento de los filtros se estudió la saturación de los mismos tras exposición al cáustico durante 10, 20, 30 y 60 segundos. Empleamos 25 filtros en cada grupo y observamos que a partir de los 20 segundos de humedecimiento no se lograba retener un mayor peso de cáustico. Pasado este tiempo el papel era incapaz de retener mayor cantidad de cáustico, bien por alcanzar su saturación o por destrucción de la matriz estructural del filtro (Ormerod LD 1989).

Según Mendicute (1995) los filtros alcanzan la saturación al humedecerse durante al menos 30 segundos en NaOH 1N. Basándonos en las observaciones mencionadas de Ormerod, Mendicute y nuestras observaciones hemos humedecido los filtros durante 45 segundos en NaOH 1 N pues en nuestra experiencia, en ese tiempo alcanzan la saturación. De esta forma se ha logrado homogeneidad aceptable del peso del cáustico utilizado (tabla V.2.A.4.), con un valor medio de 0,072 gramos y una desviación estándar de 0,0092.

VI.1.5. TIEMPO DE EXPOSICIÓN AL CÁUSTICO

El tiempo de exposición al cáustico condiciona la destrucción observada tanto a nivel epitelial como estromal, así como los cambios estructurales observados posteriormente. Por ejemplo, para el n-heptanol, la incidencia de neovascularización corneal observada varía del 14%, para exposiciones de 30 segundos, (Shapiro MS 1981), al 68% cuando el cáustico se aplica durante 60 segundos (Cawston TE 1981).

El cáustico fue aplicado en nuestro estudio durante 45 segundos, tiempo con el que hemos observado la destrucción del epitelio y hemos evitado el desarrollo de ulceraciones estromales y microperforaciones.

VI.1.6. ELECCIÓN DE LA ZONA DE CAUSTICACIÓN

Las causticaciones se practicaron en la zona superior de la córnea debido a que, en el conejo, existen ciertas diferencias en la distribución de células madre, siendo más numerosas en dicha zona, como también sucede en humanos (Wiley L 1991). Por ello las causticaciones en esa zona tendrán, en teoría, mayor repercusión funcional.

Sin embargo, es posible otra lectura: considerando que las zonas limbares mediales y laterales presentan menor población de células primordiales (Wiley L 1991) estando, además, menos protegidas, una causticación de dicha zona haría más factible el fracaso de las células primordiales y por ello la invasión conjuntival. Consideramos que si la causticación se practicara en las zonas mediales y laterales, además de su mayor dificultad técnica, persistiría un mayor número de células primordiales en las zonas adyacentes superior e inferior y que sus descendientes (células amplificadoras transitorias), a las que se les reconoce movilidad (Tseng 1989), pudieran iniciar los procesos de reparación epitelial en la zona por migración como se ha observado en humanos (Dua HS, 1990).

VI.1.7. TÉCNICAS DE SEGUIMIENTO CLINICO

VI.1.7.1. Fotografías de segmento anterior

Para el seguimiento clínico de las causticaciones se eligió el estudio de las fotografías tomadas en los diferentes momentos del experimento. Pensamos que dicho proceder permite un estudio más detallado de los aspectos valorados, constituye un documento permanente e ilustra los hallazgos descritos en el capítulo de resultados (V- Resultados). También permite valorar con mayor exactitud algunos aspectos, como los defectos epiteliales, con la utilización de colorantes y filtros adecuados.

Por otro lado, la documentación gráfica acorta el tiempo de exploración y permite la aplicación posterior de técnicas planimétricas que posibilitan cuantificar los datos observados.

VI.1.7.2. Planimetría

Las técnicas planimétricas, habiendo sido profusamente utilizadas en el estudio dinámico de los procesos de reparación epitelial, se han basado en el estudio de fotografías que necesitaban considerar la magnificación tanto de la toma como de la impresión, procesos en los que pueden ir introduciéndose errores. Con la técnica propuesta y utilizada por nosotros no se hace necesaria la consideración de la magnificación en cuanto que, en todas las fotos, queda recogida una medida estándar conocida de referencia (identificación del animal de experimentación), a partir del cual se obtiene el factor de escala correspondiente.

Una de las limitaciones de la técnica planimétrica descrita es la consideración de las superficies como proyecciones planas, siendo la córnea una superficie convexa. Ha sido sugerido que los datos obtenidos por estudio de fotografías deberían recoger la

corrección matemática necesaria que reconociese la curvatura corneal (Ormerod LD 1989) que, en el conejo, presenta un radio de 7,3 mm (Prince JH 1965). Estando de acuerdo con ésta sugerencia, pensamos que, no habiendo considerado dicha corrección, el error cometido debe ser mínimo dado el radio de curvatura corneal y, en cualquier caso, idéntico en todos los casos observados.

Otra de las limitaciones de la utilización de fotografías del segmento anterior para su valoración planimétrica viene condicionada por la posición del globo que, en ocasiones, pudiera estar girado obteniéndose una proyección oblicua. Se ha intentado en todos los casos posicionar el globo de forma paralela al plano fotográfico.

Entre sus ventajas, permite cuantificar los hallazgos, circunstancia que posibilita su análisis estadístico.

VI.1.7.3. Paquimetría

Las paquimetrías en las zonas de causticación presentan dificultades para su medición y, en ocasiones, han requerido cierta insistencia para su correcta medición. Inevitablemente, ésta circunstancia ha podido suponer una agresión añadida sobre el epitelio corneal, agresión que, por otro lado, y en cualquier caso, ha sido similar en todos los animales estudiados.

VI.1.8. CONDICIONES EXPERIMENTALES INICIALES

Las condiciones experimentales iniciales como peso de los animales de experimentación (tabla V.2.A.1)(figura V.2.A.1), peso de los filtros secos (tabla V.2.A.2), peso de los filtros humedecidos (tabla V.2.A.3) y peso del cáustico (tabla V.2.A.4) presentan medianas similares a la media, expresión de la simetría de la

distribución, y desviaciones estándar con coeficientes de variación inferiores al 33%, lo que expresa que la distribución se encuentra suficientemente agrupada. Estos hechos confirman la homogeneidad de las condiciones experimentales. En nuestro modelo, con la causticación practicada según se ha descrito en el apartado de Material y Métodos, se lograron defectos epiteliales de 44, 569 mm² de media (DE = 2,03 mm²). Es de destacar que aunque la tendencia de las úlceras ha sido hacia la curación (tabla V.2.A.6) se han observado, en la mayor parte de los casos, defectos epiteliales persistentes y con tendencia a la recidiva.

El NaOH ha permitido diseñar un modelo en el que el daño estromal, expresado como el área de opacificación, ha sido fácilmente reproducible en la fase inicial del proyecto experimental (tabla V.2.A.5), presenta unos valores relativamente homogéneos con una superficie corneal afectada de 44,569 de media (DE = 2,03).

VI.2. CÉLULAS STEM

El concepto de células “stem”, “madre”, “primordiales” o “pluripotenciales” aunque ya no es nuevo para la mayoría de los oftalmólogos, todavía sigue siendo una entelequia para explicar una serie de fenómenos de reparación de la superficie ocular. En nuestra práctica clínica diaria, a menudo nos encontramos ante enfermedades de la superficie ocular con una epitelización corneal retrasada así como un retraso en la cicatrización, y habitualmente fijamos nuestra atención en el área defectuosa e ignoramos el origen de las células stem en el limbo donde está la potencia proliferativa.

VI.2.1. Concepto de Células madre

Las células stem están presentes por definición en todos los tejidos con capacidad de autorregeneración. Estas células tienen un largo periodo de vida, un gran potencial de división y están implicadas en el reemplazo celular y en la regeneración de los tejidos. La mayoría de nuestros conocimientos sobre las células stem viene de estudios sobre células sanguíneas y algunos tejidos epiteliales como por ejemplo el epitelio intestinal, el epitelio seminífero y el de la epidermis de la piel. Basándose en estudios de cinética celular, todas las células de un tejido que provienen de un linaje celular determinado pueden ser situadas en uno de los dos siguientes compartimentos tisulares: proliferativo y no proliferativo (diferenciativo). Véase figura I-9 (Tseng 1989). Las células en el compartimento proliferativo son capaces de inducir mitosis celular con síntesis de DNA. Este compartimento incluye las células Stem y las células transitorias amplificadoras (TAC) que se derivan de cada mitosis de la célula stem y amplifican su número llevando a cabo varias ruedas de división celular. Las células en el compartimento no proliferativo, diferenciativo, son en teoría todas células postmitóticas que están predestinadas a la diferenciación celular. En un compartimento posterior, las células en diferentes estadios de diferenciación pueden identificarse durante el proceso de maduración tisular. La última expresión del aspecto funcional del tejido se alcanza por las células de diferenciación terminal (TDC). Todas las células, excepto las células stem tienen una vida limitada y están destinadas a morir.

VI.2.2. Propiedades de las células stem

Las células stem son las responsables últimas del reemplazamiento celular y de la regeneración tisular, para ello poseen una serie de propiedades que las hacen capaces de todo ello.

Proliferación libre de error

De modo ideal, la mitosis libre de error es absolutamente esencial para que no haya ningún error genético en el nivel de las células stem, que se reproduzca de manera permanente y continúa a todo el clon de células, resultando en una anomalía celular y por tanto de disfunción. Para minimizar cualquier error en las mitosis de las células stem, se han desarrollado diferentes mecanismos de protección: **pobre diferenciación, protección anatómica y regulación especial.**

VI.2.3. ¿Existen las células stem?

Identificación de las células stem

Todos los métodos para identificar las células stem, hasta la actualidad son indirectos. Los marcadores directos de las células stem no han sido todavía establecidos. En el sistema hematopoyético, las células stem pueden observarse por medio del crecimiento de su única célula resultante del crecimiento clonal en el cultivo *in vitro* de agar o *in vivo* en el bazo. Incluso en estos modelos donde más rápidamente se han establecido, no podemos decir exactamente cuál es una célula stem y cuál no. En la epidermis, por ejemplo, es bien conocido que no todas las células basales son células stem. La heterogeneidad de las células de la capa basal de la epidermis viene dada mediante su marcador de timidina, la distribución del receptor EGF (factor de crecimiento epidérmico) y su respuesta a los promotores tumorales. La utilización de

secciones paralelas de la superficie cutánea nos ha conducido a descubrir que la epidermis está constituida de unidades de células adyacentes llamadas unidades proliferativas epidérmicas. Esas unidades proliferativas epidérmicas están hechas de 10-15 capas de células, pero sólo las células basales proliferan. Entre estas 10-11 células basales de una unidad proliferativa epidérmica se presume que la central es una célula madre la cual puede identificarse mediante un marcador de timidina.

VI.2.4. ¿Dónde están las células stem del epitelio corneal?

De entre todos los epitelios, el epitelio corneal puede considerarse único, debido a que es un epitelio estratificado altamente diferenciado. Al igual que la epidermis, múltiples hemidesmosomas unen las células, pero a diferencia de la epidermis, sólo el epitelio corneal no está queratinizado en circunstancias normales. Esta estructura altamente organizada, es la responsable de la escasa permeabilidad celular a los solutos no iónicos y al agua y juega un importante papel en el mantenimiento de la transparencia para poder ejercer la función visual. Es bien sabido que el epitelio corneal es un tejido de rápida autorregeneración en condiciones regulares. No sabemos exactamente dónde están estas células, pero varios hechos nos van orientando poco a poco a la resolución de este gran enigma.

El mayor avance en la biología molecular de la superficie ocular en la última década fue el hallazgo de Schemer, Galvin y Sun (1986), quienes utilizando anticuerpos monoclonales AE 5 contra la queratina K 3 (específica de epitelio corneal) demostraron que las células progenitoras del epitelio corneal o Stem cells se localizan en la región basal del limbo. Esto implicaba que en caso de una herida del epitelio corneal la regeneración depende del buen estado de las células madre. Se ha observado que

marcadores radiactivos, incorporados en las células de las capas más basales se han visto posteriormente en capas de células más superficiales y han desaparecido en 4 a 6 días por descamación. Los defectos epiteliales centrales corneales de espesor completo curan rápidamente si hay células periféricas epiteliales sanas, por un proceso de migración.

Todavía el concepto de células stem en la actualidad sigue siendo algo desconocido. Su conocimiento es esencial para comprender los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la cicatrización de las heridas tanto durante los procesos normales como patológicos de la córnea. Revisaremos los datos clínicos acumulados en la literatura hasta la fecha:

-Clínicamente se han observado líneas de migración pigmentadas desde la región limbar después de la cicatrización de un defecto epitelial excéntrico (Tseng SC 1989, Davanger y Evensen 1971). Se especuló la teoría de que las estructuras limbares servían de soporte regenerativo de las células epiteliales. Las células basales mitóticas se marcaron con timidina (H_3) el índice mitótico del epitelio corneal tendía a ser mayor hacia la periferia sugiriendo que las células basales periféricas eran más activas en la síntesis de DNA

Por otro lado, las neoplasias conjuntivales intraepiteliales (CIN), un estado precanceroso que presumiblemente afecta a las células stem, se encuentra predominantemente en la región limbar.

Incluso las lesiones que implican la córnea, denominadas neoplasias coneales intraepiteliales, también se han observado contiguas al limbo adyacente (Waring GO III 1974).

Movimiento centrípeto celular

Varios estudios han demostrado que el origen de la proliferación celular y migración proviene de la periferia de la córnea, sugiriendo que hay un movimiento centrípeto responsable del reemplazamiento de la pérdida celular sobre la córnea central tanto como consecuencia de un hecho traumático como atraumático.

VI.3. TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA EN LA CAUSTICACIÓN CORNEAL CON COMPROMISO LIMBICO

La regeneración de un epitelio corneal sano sobre un estroma corneal que previamente haya sufrido una causticación es, a menudo y todavía en la actualidad, uno de los retos más difíciles a los que se enfrenta la Oftalmología (Burns FR 1989).

También, es un hecho conocido que la curación espontánea de una córnea causticada con escasa evidencia de reepitelización lleva implícitas importantes secuelas como vascularización, cicatrización y defectos epiteliales persistentes y recurrentes. En éstas situaciones la córnea curará con la formación de un importante pannus fibrovascular que comprometerá el pronóstico de la queratoplastia y dificultará la recuperación visual (McCulley JP 1987, Mattax JB 1988, Buxton JN 1993).

Si realizamos el trasplante corneal, sin enfriar el proceso, el epitelio del botón corneal donante que, en éstas situaciones se aconseja conservar para evitar defectos epiteliales precoces, es reemplazado progresivamente por el del huésped. Si éste no es normal, circunstancia frecuente en las causticaciones, es el epitelio conjuntival el que lo sustituye, siendo frecuente la presencia de defectos epiteliales persistentes que

condicionan una superficie corneal irregular y crónicamente inflamada que es insuficiente para mantener un estroma transparente (Friend J 1978, Kaye DB 1980).

De éstas observaciones, cabe suponer que si el epitelio periférico corneal y limbar del receptor está comprometido, la práctica de una queratoplastia aseguraría un epitelio competente mientras sobrevivan sus células. Al ser reemplazadas éstas por el epitelio corneal periférico del receptor, o por el conjuntival, si la barrera limbar no es competente, las manifestaciones típicas de la enfermedad de células primordiales corneales pueden hacerse patente apareciendo el riesgo de defectos epiteliales persistentes, inflamación crónica y tendencia a la neovascularización que comprometerán la transparencia del injerto (Clínica de deficiencia limbar parcial o total-Reinhard T 1999).

De lo mencionado, la necesidad de recuperar una superficie epitelial estable, y la necesidad de que dicha recuperación se produzca rápidamente para evitar secuelas que comprometen el pronóstico de la queratoplastia, se deduce que si la reepitelización no se produce, o se encuentra gravemente diferida a pesar de los tratamientos médicos habituales, debe plantearse la intervención quirúrgica con objeto de lograr el reemplazamiento de la superficie ocular, hecho que condicionará los procesos de reparación estromal y posibilitará la recuperación funcional (McCulley 1987).

En nuestro conocimiento (comunicación personal), fue José I Barraquer (1965) el primer autor que propuso la práctica de trasplante de epitelio límbico, conjuntivo-corneal, tomado del otro ojo, con objeto de mejorar el epitelio de la córnea dañada por una causticación, como técnica preparatoria para la práctica de la queratoplastia. Pero en ocasiones la disponibilidad de limbo y por tanto de células Stem del ojo contralateral no

es tan sencilla, de ahí la necesidad de otras técnicas, aparte de la de trasplante de limbo, para el tratamiento de estas patologías de la superficie ocular cuyo origen común es la existencia de déficit limbar como consecuencia de causticaciones oculares.

Kim y Tseng en 1995, fueron los primeros en reintroducir el uso de la MA para reconstruir la superficie ocular en conejos tras la extracción completa del epitelio corneal e inducir quirúrgicamente una deficiencia de células madre.

Diversos autores (Meller D 1999, 2000, Sridhar 2000, Pan Z 2002), apoyados en evidencias clínicas, han sugerido su utilidad en causticaciones de la superficie ocular. Mantienen que en dichas situaciones el trasplante de membrana amniótica solucionaba los defectos epiteliales persistentes y que podía prevenir el desarrollo de ulceración y neovascularización corneal.

Tsai, Sun y Tseng (1990, 1995) establecieron la eficacia del trasplante límbico en la restauración de la superficie corneal tras causticaciones, en un modelo practicado en conejos. Dichos autores practicaban las causticaciones con n-heptanol y aseguraban la eliminación de las células primordiales con queratectomías de la zona limbar, pues es conocido que el n-heptanol es capaz de eliminar el epitelio corneal pero que produce escasos cambios a nivel estromal y es insuficiente para asegurar la destrucción de las células primordiales corneales (Kruse FE 1994), destrucción que en el modelo se practicaba con intervención quirúrgica. Pensamos que éste modelo, aunque basado en causticaciones, no reproduce las situaciones graves observadas en clínica en cuanto que la capacidad de penetración del n-heptanol es limitada, por lo que los cambios estromales producidos pueden no ser comparables con los observables en las causticaciones, especialmente si éstas son producidas por álcalis.

Para evaluar la eficacia del trasplante de MA en la regeneración de la superficie corneal tras causticación experimental en el ojo del conejo, nos vimos en la necesidad de escoger un modelo que contemplara los cambios observados a nivel corneal en dichas situaciones y en el que se asegurara el fracaso de las células primordiales. El modelo ha sido discutido previamente en este apartado.

Reproducido el modelo, se establecieron dos grupos experimentales (véase apartado IV. Material y Métodos). El primero (n=10) sirvió de control y el segundo (n=30) fue sometido a trasplante de MA en diferentes momentos del seguimiento según se ha descrito.

VI.3.1. CONDICIONES EXPERIMENTALES INICIALES

Las condiciones experimentales iniciales entre el grupo control (n=10) y el grupo con trasplante de MA (n=30) no presentaron diferencias significativas en lo referente a las siguientes variables consideradas: peso inicial de los animales de experimentación (tabla V.2.B.1), peso de los filtros Whatman#3 secos (tabla V.2.B.2), peso de los filtros humedecidos (tabla V.2.B.3), peso del cáustico NaOH 1N (tabla V.2.B.4), opacidad corneal (tabla V.2.B.5), úlcera corneal (tabla V.2.B.6), superficie conjuntival alterada (tabla V.2.B.7), área de neovasos (tabla V.2.B.8) y paquimetrías en zonas A (tabla V.2.B.9.1), B (tabla V.2.B.9.2) y C (tabla V.2.B.9.3). De lo mencionado puede deducirse la homogeneidad de las condiciones experimentales, hecho que hace que los grupos sean comparables.

VI.3.2. SEGUIMIENTO CLÍNICO

VI.3.2.1. Epitelización-úlceras corneal

El grupo con transplante de MA presentó una mejor evolución en lo referente a la resolución de la ulceración corneal, presentando diferencias significativas con el grupo control en los días 3, 7, 14, 30 y 60 ($p < 0,01$) y 90 ($p < 0,05$) (tabla V.2.B.6). Este hecho puede ser interpretado como que la práctica de transplante de MA reduce la duración de los defectos epiteliales persistentes tras causticación, como ha sido sugerido por otros autores (Pan Z, 2002). Apoya ésta observación el hecho, confirmado histológicamente (día 90), de que en el 80% (8 casos de 10) de los casos del grupo control se observó la presencia de úlceras epiteliales, circunstancia que sólo se presentó en el 16,67% (5 casos de 30) de los casos del grupo con transplante de MA, diferencias que son altamente significativas ($p < 0,001$). Además, la tendencia del grupo con transplante de MA a desarrollar defectos epiteliales recidivantes fue menor si analizamos los casos de cada grupo de forma aislada.

Por otro lado, estudiada la morfología del epitelio corneal resultante, en ningún caso del grupo control se observó un epitelio con un número normal de capas (4-5), mientras que el 63,33% de los casos del grupo con transplante de MA presentaban un número normal de capas (4-5), diferencias que son altamente significativas ($p < 0,001$). También se observaron células caliciformes en el 70% de los casos del grupo control y sólo en el 6,67% de los del grupo con trasplante de MA, diferencias que, también, son altamente significativa ($p < 0,001$). En ningún caso del grupo control el epitelio presentó características normales en relación con la morfología de las células epiteliales, mientras que el 76,67% del grupo con transplante de MA presentaban una morfología epitelial

similar a la del epitelio corneal sano; dichas diferencias son altamente significativas ($p < 0,001$).

El hecho de que el epitelio corneal en los casos del grupo control, no hayamos podido considerarlo “normal” ni en cuanto al número de capas ni en su morfología apoyan la suposición del posible origen conjuntival de este epitelio resultante y ser una expresión indirecta del fracaso de las células madre corneales. Para confirmar este supuesto hubiéramos requerido un estudio del fenotipo epitelial resultante con los anticuerpos monoclonales AE-5 (específico de córnea) y AM-3 (específico de conjuntiva) (Tsai RJ, Tseng SCG 1995)(Kim JC, Tseng SCG 1995).

De las observaciones mencionadas puede concluirse que el transplante de MA favorece la curación de los defectos epiteliales corneales en el modelo estudiado.

En nuestra opinión, apoyados en los datos referidos, en causticaciones de la superficie corneal en las que no se observen signos de reepitelización en las primeras fases de su evolución pudiera plantearse la práctica de transplante de MA, técnica a la que reconocemos capacidad para regenerar una superficie epitelial estable.

VI.3.2.2. Alteración de la conjuntiva

El grupo con transplante de MA presentó diferencias significativas con el grupo control respecto a la superficie conjuntival alterada inmediatamente tras la causticación ($p < 0,001$), al 1^{er} día ($p < 0,001$), a los 3 días ($p < 0,001$) y los 7 días ($p < 0,01$), momento a partir del cuál no se observan diferencias entre ambos grupos hasta la exploración practicada en el día 60 y 90, donde las diferencias vuelven a ser significativas ($p < 0,01$)(tabla V.2.B.7). Estas diferencias son corroboradas en el estudio histológico,

donde se observa que mientras sólo el 40% de los casos del grupo control presenta características de normalidad en su conjuntiva, el 90% de los casos del grupo con transplante de MA las recupera, diferencias que son significativas ($p < 0,01$) (tabla V.2.B.7). Es decir, con la práctica de transplante de MA existe una mayor probabilidad de recuperar un aspecto conjuntival normal.

Tenemos que considerar que ambos grupos Control y MA presentaban diferencias significativas respecto al estado de la conjuntiva en la situación de partida día 0) (tabla V.2.B.7). Este aspecto, área de conjuntiva alterada, no ha podido ser controlado en el experimento, y ha influido en el resultado final de este parámetro.

Siendo un hecho conocido, como se ha mencionado, que en ausencia o disfunción de células epiteliales corneales o limbares, el epitelio conjuntival puede comprometerse o colaborar en la regeneración epitelial corneal (McCulley 1987) sería deseable que el mismo fuera normal. El transplante de MA favorece dicha normalización, probablemente sirviendo de sustrato para la proliferación de células primordiales de la zona sana de la periferia, mejorando el entorno limbar y por tanto la regeneración epitelial a partir del epitelio conjuntival.

VI.3.2.3. Opacidad corneal

El grupo con transplante de MA presentó una mejor evolución de la opacidad corneal, presentando diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) con el grupo control en los días 7, 14, 30, 60 y 90 (tabla V.2.B.5) (figura V.2.B.5). La reducción del tamaño de la opacificación estromal debe ser interpretada como expresión de los procesos de reparación estromal (McCulley 1987, Burns FR 1989), por lo que puede plantearse que

el trasplante de MA los favorece, siempre que exista un substrato con suficientes fibroblastos para la formación de nuevo colágeno.

Los mecanismos a través de los cuales el trasplante de MA puede favorecer los procesos de reparación estromal guardan relación con las propiedades que se le atribuyen a la MA (Introducción. I.10. Propiedades MA).

El trasplante de MA también logra modificar la tendencia observada en el grupo control, grupo en el que a partir del día 14, la opacidad corneal no sólo no mejora sino que, incluso, presenta una ligera tendencia a empeorar (figura V.2.B.5). Practicado el trasplante, la opacidad corneal presenta una tendencia constante a disminuir de tamaño (figura V.2.B.5), circunstancia que puede estar condicionada por la calidad del epitelio regenerado. En éste estudio, los casos que presentan mejor evolución de la opacidad corneal son aquellos en los que se ha producido mejor regeneración epitelial.

Estos hechos, siendo ciertos para el modelo experimental descrito y que utiliza NaOH 1N como cáustico, pudieran no producirse en causticaciones más severas en las que existiera una deficiencia de fibroblastos, necesarios para la formación de nuevo colágeno (Berman M 1980). Pensamos que para que la regeneración de un epitelio corneal competente favorezca la reparación estromal su substrato debe conservar cierta potencialidad y los procesos que favorecen el desarrollo de ulceración estromal controlados. Probablemente existan interacciones entre regeneración de la superficie epitelial y procesos de reparación estromal; tanto la regeneración epitelial favorecerá la reparación estromal como ésta contribuirá a la regeneración epitelial.

VI.3.2.4. Neovascularización

En el grupo control, sin trasplante, todos los ojos presentaron tendencia a un aumento del área corneal con neovascularización. En el grupo con trasplante de MA se observó, una vez practicado el trasplante de MA, una tendencia a la regresión de la neovascularización presentando diferencias significativas los días 14 y 30 ($p < 0,05$) y altamente significativas ($p < 0,001$) con el grupo control en los días 60 y 90 (tabla V.2.B.8)(figura V.2.B.8.1). Característicamente, los ojos trasplantados presentaron, inicialmente, su tendencia progresiva a la regresión de la neovascularización a partir de la zona donde se practicó el trasplante, persistiendo aunque en regresión los neovasos de las zonas adyacentes, zonas que, próximas a la zona causticada, se beneficiaron en menor grado, por lo menos en el tiempo de seguimiento (3 meses), de los beneficios del trasplante de MA. Tsai y colaboradores (1990), en causticaciones con n-heptanol, observaron la misma tendencia en la evolución de la neovascularización una vez practicado trasplante límbico, tendencia que no observaron si el trasplante era exclusivamente conjuntival. Del mismo modo Kim y Tseng (1995), también en causticaciones con n-heptanol, observaron en el grupo de conejos con trasplante de MA mayor aclaración del estroma corneal con nula o mínima vascularización respecto al grupo control.

Habiendo sido relacionada la regresión de la neovascularización con la recuperación del fenotipo epitelial corneal (véase I. Introducción, pág 92 Propiedades I:10.9), regresión observada en éste estudio experimental, puede pensarse que la misma se debe a la recuperación de las características del epitelio corneal observadas en el

grupo con trasplante de MA. La capacidad para inhibir la angiogénesis de la MA se comenta en la Introducción.

VI.3.2.5. Edema corneal

Considerando que, tras causticación por álcalis, la recuperación del edema corneal puede considerarse un signo de curación estromal (Burns FR 1989), pensamos que mediante la paquimetría ultrasónica podríamos evaluar la evolución del edema corneal en 3 zonas (A, B y C). Siendo la zona A y C (paquimetrías en zona adyacente a la córnea causticada) y la zona B (paquimetría sobre zona causticada). Ormerod LD (1989) describió de forma subjetiva los cambios edematosos observados a nivel corneal tras causticación, y Mendicute J (1995, 1997) del mismo modo, los describió de forma objetiva empleando un paquímetro ultrasónico.

En las paquimetrías practicadas en la zona A (alejada de la zona causticada), no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el trasplante de MA en la mayor parte de los momentos estudiados (tabla V.2.B.9.1). Mientras que en las paquimetrías practicadas en la zona C (también alejada de la zona causticada) (tabla V.2.B.9.3) sólo se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los días 30 y 90. Por ello, estos resultados deben ser interpretados con cierta precaución y dudamos, no de la capacidad del paquímetro para medir espesores corneales sino de si lo que mide es sólo edema, pues probablemente, los fenómenos de curación tanto a nivel epitelial como estromal sean más complejos.

En las paquimetrías practicadas en las zonas B (sobre la zona causticada) sólo se observaron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$), entre ambos grupos los días 30, 60 y 90 (tabla V.2.B 9.2).

De ello deducimos que, tanto en el grupo control como en el grupo con TMA, las paquimetrías presentaron un aumento notable especialmente durante los tres primeros días. Pero mientras las paquimetrías observadas en las zonas A y C, alejadas de la causticación, regresaron a valores próximos a la normalidad (día 90), las de la zona causticada (zona B) presentaron valores superiores al finalizar el experimento. Probablemente, en las zonas alejadas de la causticación sólo se produce el edema estromal condicionado por procesos inflamatorios y siendo el epitelio “normal”, regresa a valores “normales”. Sin embargo, en las zonas causticadas, el espesor corneal viene condicionado no sólo por el edema, que en teoría, debería regresar al regenerarse mejor el epitelio con el trasplante de MA, sino también por procesos de cicatrización estromal que no serán completamente reversibles. A la luz de los resultados, no hemos podido extraer conclusiones en cuanto a la “validez” de la paquimetría ultrasónica (al menos el empleado en este estudio) para el seguimiento del edema corneal tanto en zonas causticadas como alejadas de la causticación.

De lo expuesto podemos concluir, que el modelo experimental aplicado presenta una alta uniformidad en la situación de partida en lo que se refiere al peso del cáustico utilizado, opacidad, y úlcera corneal inicial. Sin embargo, la superficie conjuntival alterada sólo ha presentado diferencias significativas entre grupos los días 0, 1, 3 y 7, no existiendo diferencias a partir del día 14 (tabla V.2.B.7). Puede sugerirse, por lo tanto,

que además del trasplante de MA, sólo la superficie conjuntival alterada al inicio ha podido condicionar los resultados finales, dado que el resto de las condiciones experimentales no han presentado diferencias entre los grupos.

VI.3.3. UTILIDAD DEL TRASPLANTE DE MA SOBRE UN MODELO DE CAUSTICACIÓN CORNEAL CON COMPROMISO LÍMBICO

Por lo tanto, pudiera deducirse que con la práctica del trasplante de MA (en este caso la técnica quirúrgica empleada en el modelo experimental es la técnica “intracapa-injerto”, (véase Introducción, pág 110, figura I.18) se consiguen dos objetivos: 1) que las células epiteliales presentes en la zona sana, próxima a la zona causticada (supuestamente células primordiales y células amplificadoras transitorias) retornen las funciones de reepitelización corneal usando como sustrato la membrana basal de la MA; y 2) que las células primordiales retornen su función de barrera entre la córnea y la conjuntiva, previniendo el crecimiento epitelial conjuntival sobre la córnea.

De las observaciones mencionadas, la recuperación de un epitelio corneal similar al normal y regresión de la neovascularización tras el trasplante de MA, pueden hacerse las siguientes suposiciones:

1. El epitelio de los casos trasplantados es diferente del de los casos no trasplantados o, dicho de otro modo, el epitelio de los casos trasplantados pudiera ser de origen limbar y el de los no trasplantados de origen conjuntival (hecho no probado por no haber realizado estudio con anticuerpos monoclonales específicos para cada epitelio). En la primera situación se aseguraría una superficie epitelial estable y no así en la segunda. Ambos epitelios, diferentes histológicamente, pudieran ser también

diferentes en la producción de factores antiangiogénicos (citoquinas) o el epitelio de origen conjuntival, con mayor capacidad angiogénica que el de origen corneal, pudiera producir factores que induzcan mayor neovascularización estromal, como sucede en el grupo control.

2. La regeneración epitelial inducida por la práctica de transplante de MA favorece los procesos de reparación estromal y la recuperación de la transparencia óptica del estroma.

Cuando se compromete la curación del epitelio corneal, pueden derivarse cambios estructurales (ulceración estromal corneal) y funcionales (opacidad o falta de transparencia corneal) de indeseables consecuencias (Maldonado MB 1995).

Tras la causticación, durante la fase reparadora precoz, el epitelio corneal y los queratocitos continúan proliferando en un esfuerzo por restaurar estructural y funcionalmente la superficie ocular normal y el estroma (McCulley JP 1987, Tseng 1989). En las formas menos severas, la reepitelización se asocia a la reparación estromal con la recuperación de transparencia y eliminando el riesgo de ulceración estéril. En las formas más severas, la reepitelización se encuentra retrasada o, incluso, parada. En éstos casos puede producirse una proteólisis excesiva en el estroma con adelgazamiento y riesgo de perforación (McCulley JP 1987). De ahí la importancia de promover la reparación epitelial.

En la fase reparadora tardía, pueden darse dos situaciones. En algunos casos, la epitelización se ha completado, hecho que sucede, en general, cuando se han conservado células primordiales. En otros, donde se incluyen aquellos casos con peor pronóstico, la reepitelización corneal se produce a partir del epitelio conjuntival debido al daño

permanente, o ausencia, de células primordiales. En éstos casos, la superficie ocular curará con importante vascularización y cicatrización, deficiencia mucínica y de células caliciformes y erosiones epiteliales persistentes y recurrentes. Si no se produce ulceración estromal estéril, la córnea curará con importante pannus fibrovascular que comprometerá la recuperación visual.

De lo mencionado debería deducirse que si el trasplante de MA logra el reestablecimiento de una superficie epitelial estable y más similar a la de la córnea normal, circunstancia que hemos demostrado en el presente proyecto experimental, se favorecerían los procesos de reparación estromal comeal y debería esperarse una mejor recuperación de la transparencia corneal. Del estudio de la evolución de la opacidad comeal se observa que el grupo con trasplante de MA presenta una evolución favorable en la recuperación de la transparencia corneal mientras que el grupo control no presenta cambios manifiestos (tabla V.2.B.5); las diferencias entre las áreas de opacidad corneal observadas en los días 30, 60 y 90 son altamente significativas ($p < 0,001$) entre ambos grupos. Puede deducirse que la práctica de trasplante de MA favorece también la recuperación de la transparencia corneal, hecho que probablemente guarde relación con la recuperación de un epitelio corneal estable que permitirá un normal desarrollo de los procesos de reparación estromal y que, como se ha mencionado, presentará menor capacidad angiogénica que el epitelio de origen conjuntival observado en el grupo control, siendo un hecho conocido que el grado de neovascularización se correlaciona con la opacidad corneal (Maldonado MB 1995).

VI.3.4. MOMENTO ÓPTIMO EN LA PRÁCTICA DE TMA SOBRE UN MODELO DE CAUSTICACIÓN CORNEAL CON COMPROMISO LÍMBICO

Establecida la utilidad del TMA, nos planteamos cuál puede ser el momento óptimo para su práctica en dicho modelo experimental.

Clásicamente, otras técnicas como el trasplante de conjuntiva, el trasplante de limbo, la queratoepiqueratoplastia, etc..., se practicaban de forma diferida, no antes de los 6 meses tras la causticación, con el objeto de mejorar la superficie ocular, bien con finalidad terapéutica o como preparación para el trasplante de córnea (Thoft RA1984, 1982, 1979; Barraquer JI 1965).

Actualmente, varios autores suponen que el trasplante límico y otras técnicas de reconstrucción de la superficie ocular, pueden ser practicadas tan pronto se superen los procesos inflamatorios, pero no tan tarde como para que los cambios observados, condicionados por la inflamación crónica, sean irreversibles (Tsai RFJ 1995, Kenyon KR, Tseng SCG 1989). Pero, en clínica es difícil precisar el momento en el que pueden considerarse concluidos los procesos inflamatorios que acompañan a toda causticación. Por ello, se sugiere (aunque no ha sido demostrado) que las técnicas de reconstrucción de la superficie ocular pueden ser practicadas tan pronto como se objete que el tratamiento médico ha resultado insuficiente para completar la reepitelización (erosiones epiteliales recurrentes, signos de neovascularización corneal,...) por fracaso de las células primordiales. Junto al seguimiento clínico, que permitirá la identificación de estos hallazgos de fracaso limbar, la utilización de citologías de impresión pudiera ser

eficaz para la identificación de patrones epiteliales patológicos (Dart J 1997, Kenyon KR 1989).

Del estudio de la evolución de los parámetros estudiados en el modelo experimental aplicado, se deduce que entre los días 7 y 14 se producen importantes cambios evolutivos que, vienen condicionados por la mejoría de los procesos inflamatorios agudos. Por ello creemos que el trasplante practicado a las 24 horas puede ser considerado como *inmediato*, el practicado a los 7 días como *precoz* y el practicado a los 30 días como *tardío*.

VI.3.4.1. Condiciones experimentales iniciales

Las condiciones iniciales entre GC (n=10), grupo TMA 1d (n=10), grupo TMA 7d (n=10) y grupo TMA 30d (n=10), no presentaron diferencias estadísticamente significativas en lo referente a casi todas las variables (peso animales, peso cáustico, opacidad corneal, úlcera corneal, neovasos totales y paquimetrías), pero si presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) respecto a la variable superficie conjuntival alterada (figura V.2.C.7 y tabla V.2.C.7.) y paquimetría en zona C (figura V.2.C.9.3 y tabla V.2.C.9.3). Por lo tanto, puede deducirse que la homogeneidad de las condiciones experimentales iniciales entre los grupos hace que sean comprobables.

VI.3.4.2. Seguimiento clínico

Se consideran las diferencias observadas entre grupos en las exploraciones de los días 60 y 90, dado que en las observaciones previas no todos los casos, como grupo TMA 30d, habían sido trasplantados.

a) Úlcera corneal, epitelización. De lo mencionado en el capítulo de Resultados (tabla V.2.C.6 y figura V.2.C.6) puede deducirse, que en general, no existen diferencias

importantes respecto a este parámetro. La epitelización es prácticamente completa a los 90 días en los 4 grupos considerados. Puede concluirse que el grupo TMA 30 d es de los tres grupos, el más favorable respecto a la variable úlcera corneal. Los grupos TMA 1d y TMA 7d (TMA “precoz”) tienen una evolución levemente menos favorable respecto al grupo TMA 30d (TMA “tardío”), hecho que se corresponde con lo sugerido por otros autores en cuanto a la práctica diferida de técnicas restructoras de la superficie ocular para obtener mejores resultados (Thoft RA1984, 1982, 1979; Barraquer JI 1965).

b) Opacidad corneal. De lo mencionado en el capítulo de Resultados (figura V.2.C.5. y tabla V.2.C.5) en las observaciones realizadas los días 60 y 90, se observaron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre los grupos. Al contrario que con la variable úlcera corneal, obtenemos mejores resultados en cuanto al parámetro opacidad corneal (observación día 60 y 90) con el grupo TMA 7d (TMA “precoz”). Este hecho es especialmente llamativo, cuando, en general, se ha aconsejado la práctica de técnicas de reconstrucción de la superficie ocular cuando los signos de inflamación aguda han disminuído (Thoft RA1984, 1982, 1979; Barraquer JI 1965).

c) Alteración de la conjuntiva. De lo mencionado en el capítulo de Resultados (figura V.2.C.7. y tabla V.2.C.7), la evolución más favorable respecto al estado de la conjuntiva se dio en el grupo TMA 7d, pero tiende a igualarse con el grupo TMA 30d en la observación practicada el día 90. Aunque de este parámetro, no podemos extraer conclusiones, puesto que partimos (día 0) de una situación no homogénea con respecto al grupo control (figura V.2.C.7).

d) Neovascularización. De lo mencionado en el capítulo de Resultados (figura V.2.C.8. y tabla V.2.C.8), se observan diferencias altamente significativas, entre los

grupos los días 60 y 90. El grupo control presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) con el grupo TMA 1d y altamente significativas ($p < 0,001$) con los dos restantes (observación día 90). La evolución más favorable respecto a la disminución de neovasos la ha presentado el grupo TMA 7d.

e) Edema corneal. En este apartado caben las mismas lecturas que las mencionadas en epígrafe VI.3.2.5. por lo que no será motivo de nueva discusión.

Con los datos aquí presentados, podría sugerirse que el momento óptimo para la práctica del TMA, en el ojo de conejo, está comprendido entre los días 7 y 30 tras la causticación (“momento precoz”), a diferencia de lo sugerido por otros autores. Dado que, dependiendo del parámetro estudiado, los resultados son más favorables en el grupo TMA 7 d (opacidad corneal, neovasos, alteración conjuntival) que en el grupo TMA 30d (“momento tardío”)(úlceras corneales) no creemos oportuno, tras los resultados de este estudio, aventurarnos a sugerir el momento más adecuado para la realización del TMA. Estamos de acuerdo con los autores que sugieren que las técnicas, en general, de reconstrucción de la superficie ocular (trasplante de limbo, trasplante de conjuntiva,...) deben practicarse tan pronto como se superen los procesos inflamatorios, pero no tan tarde como para que los cambios observados, condicionados por la inflamación crónica sean irreversibles (Thoft RA 1984, Barraquer JI 1965).

VI.4. APLICACIONES CLÍNICAS EN OFTALMOLOGÍA DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA. Revisión de la literatura y comparación con nuestra experiencia clínica.

VI.4.1. Queratopatía bullosa.

Es una de las complicaciones de la cirugía de la catarata. Actualmente es una patología bastante frecuente dado el fenómeno de universalización de la facoemulsificación y a la precocidad de la indicación de la cirugía de la catarata. Esta patología es el resultado de la descompensación del endotelio corneal. Clínicamente se caracteriza por edema estromal y epitelial con producción de bullas. La mayoría de los pacientes se quejan de intenso dolor dependiendo de la mayor o menor extensión de la lesión. Habitualmente el tratamiento suele ser paliativo del dolor hasta la espera de realizar un procedimiento más definitivo como es la queratoplastia penetrante. Muchos de estos pacientes son portadores crónicos de una lente de contacto terapéutica que vamos reponiendo periódicamente para calmar el dolor.

En 27 casos de descompensación corneal secundaria a cirugía catarata (8 mediante extracción extracapsular y el resto facoemulsificación) hemos realizado trasplante de MA previa desepitelización corneal con alcohol absoluto al 20% (véase Material y Métodos-Resultados). Hemos empleado la MA como “parche o sobrecapa”, funcionando esencialmente la MA como una lente de contacto biológica temporal. La MA se estira alrededor de toda la córnea y se sutura de manera continua a limbo sano. En 10 de los 27 pacientes intervenidos hemos tenido que repetir la técnica en 2 ocasiones. En todos los pacientes ha habido disminución, incluso desaparición de la sintomatología (dolor, lagrimeo y fotofobia). Se consiguió que durante varios meses (14

± 4,6 meses) los pacientes estuvieran sin sintomatología o con ella más larvada, sin necesidad de emplear lentilla de contacto terapéutica. La evaluación de la córnea mediante lámpara de hendidura ha mostrado también en todos los casos una disminución del edema. En cuanto a la recuperación de agudeza visual, en nuestra experiencia es una recuperación subjetiva por parte del paciente, al ganar transparencia la córnea. No hemos detectado ganancia de líneas de visión franca como otros autores (Mrukwa-Kominek E, 2002).

En este grupo, hemos obtenido en general resultados clínicos muy satisfactorios con el empleo de MA, reduciendo la inflamación y facilitando la epitelización (Meller D 2000). Mientras algunos autores tienen una experiencia positiva con el empleo de MA para el tratamiento de esta patología (Mrukwa-Kominek E 2002, Espana EM 2003, Petric I 2002). Otros como Siennicka A (Siennicka A 2003) no la consideran una técnica eficiente en el tratamiento de la queratopatía bullosa. Probablemente estos autores parten de queratopatías bullosas más severas, asociadas en la mayoría de los casos a quemaduras oculares térmicas o químicas, de ahí que sus resultados sean menos satisfactorios.

VI.4.2. Pterigion primario y recidivante/simbléfaron (Patología predominantemente conjuntival)

La literatura reporta, con resultados satisfactorios en la mayoría de los casos, el empleo de MA para reconstruir la superficie ocular tras la resección más o menos extensa de lesiones conjuntivales como pterigion primario y recidivante (Prabhasawat P 1997, Shimazaki J 2003, Kawasaki S 2003), simbléfaron (Tseng SCG 1997, Tsubota

1996, Barabino S 2003). Con el implante de MA conseguimos facilitar la epitelización, manteniendo el fenotipo epitelial normal con células caliciformes reduciendo la inflamación, vascularización y cicatrización.

Tras la resección de una lesión conjuntival (simbléfaron, pterigion, ..) queda una zona escleral 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, para evitar esta complicación eran los implantes de mucosa oral (Hosni FA 1974, Shore JW 1992) o autoinjertos de la propia conjuntiva, si estaba disponible (Vastine DW, 1982), y así recubrir el defecto resultante. Estas técnicas no están exentas de complicaciones, en el caso de la mucosa bucal se plantea un problema de comportamiento fisiológico distinto y un problema estético importante. En los autoinjertos de conjuntiva se trasladaba el problema a una amplia resección conjuntival del ojo contralateral, que muchas veces no está disponible. Con el empleo de MA los resultados de estos casos ha mejorado significativamente consiguiendo una curación de las lesiones a partir del tejido circundante según múltiples autores (Prabhasawat P 1997, Shimazaki J 2002, 2003, Tseng SCG 1997, Tsubota 1996,...). Para ellos, el trasplante de MA se muestra como técnica de primera elección tras resección de patologías conjuntivales mínimas o extensas (pterigion, simblefaron, penfigoide ocular cicatricial, síndrome de Stevens Johnson,...). Sin embargo, nuestra experiencia con la MA no es tan positiva en es estas patologías predominantemente conjuntivales.

Hemos empleado injertos de MA como sustituto de la conjuntiva en el tratamiento de 19 pterigiones (Peris-Martínez C, 1998, 1999, 2002). Doce de ellos son

casos severos de recidivas. Cinco de estos 12 casos habían recidivado 3 veces ó más. Los 7 casos restantes fueron casos de pterigion primario. Si embargo en nuestra experiencia, con MA sólo hemos obtenido buenos resultados en 3 casos de los 7 primarios y en 4 de los 12 recidivantes, tras un periodo de seguimiento de 22 ± 4 meses. Hemos observado con los pterigiones recidivantes, que algunos permanecen estables y sin recidivar 2-3 meses, pero con el paso del tiempo, 12-24 meses, la mayoría han recidivado. Por ello, al igual que otros autores (Prabhasawat P 1997), consideramos que el autoinjerto de conjuntiva rotatorio o libre sigue teniendo, un índice de recidivas menor tras la resección del pterigion primario o recurrente, superando a la MA.

Realizamos TMA en 3 casos de simbléfaron de párpado inferior recidivantes con bridas extensas (2 tras causticación con lejía durante labores domésticas y 1 traumático tras herida perforante con objeto punzante. Los resultados han sido relativamente satisfactorios. Dos de los casos se han mantenido sin sinequias desde la intervención, hace 25 y 39 meses respectivamente. Mientras que el tercer caso recidivó a los 11 meses de la cirugía, posteriormente se volvió a realizar la misma técnica permaneciendo hasta ahora sin recidivar (4 meses después). Es importante realizar amplios fondos de saco conjuntivales con MA para evitar recidivas (Peris-Martínez 1999, Solomon 2003).

En el tratamiento del simbléfaron con MA es muy importante valorar el periodo de seguimiento de estos pacientes. Al los pocos meses tras la cirugía podemos tener muy buenos resultados y con el paso del tiempo encontrar recidivas.

VI.4.3. Úlceras profundas y microperforaciones

Es controvertido el empleo de MA en el tratamiento de microperforaciones y úlceras profundas. Para muchos autores la MA resulta un método eficaz tanto de manera aislada (Solomon. A 2002, Kruse FE, Messmer EM, Peris Martínez C 1999, 2001) como acompañada de pegamentos tisulares (Duchense B 2001) para el tratamiento de microperforaciones incluso con descemetocele. Otros autores se muestran reacios en cuanto a la utilidad de la MA en el tratamiento de perforaciones oculares (Ferreira de Souza R 2001), especialmente perforaciones tras quemaduras químicas con descemetocele.

Según nuestra escasa experiencia en el tratamiento de microperforaciones oculares, (6 casos), para tratamiento con éxito de estas lesiones se requiere más de una capa de MA (Técnica multicapa) para conseguir resultados satisfactorios, como concluyen la mayor parte de los autores citados.

VI.4.4. Limitaciones clínicas de la MA

El trasplante de MA tiene sus limitaciones. El trasplante de MA es un trasplante sustrato y por lo tanto, no puede ser empleado para tratar patologías con una deficiencia total de las células madre. Dado que el trasplante de MA aún depende del tejido huésped para proveer células epiteliales y mesenquimales no se puede esperar que reconstruya la superficie ocular que tenga deficiencia lagrimal acuosa severa, queratinización, difusa (Tsubota K 1999), ausencia de parpadeo en estados neurotróficos severos e isquemia estromal. Si estas situaciones (deficiencia limbar total) no son tratadas previamente, son contraindicaciones para el trasplante de MA.

Una membrana amniótica crioconservada no tiene componentes celulares viables (Addis PJ 2001), su influencia sobre el tejido receptor circundante es temporal. La membrana trasplantada que llega a cubrirse con epitelio receptor estará eventualmente incorporada al receptor a través del “turnover” de una matriz extracelular normal. La membrana trasplantada que se emplea como parche de injerto (sobrecapa) se deshará una vez que el epitelio de regeneración se cure por debajo.

VII. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados discutidos anteriormente se llega a las siguientes conclusiones:

VII.1. INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

1. Se ha empleado un modelo experimental de causticación corneal con implicación límbica que produce una lesión reproducible.
2. El modelo experimental descrito cumple criterios clínicos de fracaso de células primordiales corneales, como lo demuestran las observaciones clínicas (defectos epiteliales persistentes y tendencia a la neovascularización) e histológicas (epitelio de características atróficas, presencia de células caliciformes y signos de inflamación crónica).
3. Los hallazgos clínicos e histológicos observados apoyan la hipótesis de la necesidad de las células primordiales corneales para la regeneración de un epitelio corneal normal tras causticación.
4. El trasplante de membrana amniótica permite la regeneración de un epitelio corneal similar al normal tras causticaciones reproducidas según el modelo propuesto, según se ha comprobado histológicamente.

5. La regeneración epitelial inducida por la realización del trasplante de membrana amniótica mejora los procesos de reparación estromal facilitando la regresión de la opacidad y la de los neovasos corneales permitiendo con ello una mejor recuperación de la transparencia corneal.

6. De lo mencionado en los epígrafes 4 y 5, puede concluirse que el trasplante de membrana amniótica mejora la evolución clínica de las causticaciones reproducidas según el modelo experimental propuesto.

VII.2. INVESTIGACIÓN CLÍNICA

De los pacientes que hemos intervenido realizando trasplantes de membrana amniótica, los mejores resultados, en nuestra experiencia, los hemos obtenido especialmente con 2 patologías:

1 -Tratamiento de las descompensaciones corneales (queratopatía bullosa) post-cirugía de la catarata. En estos casos la MA nos ha resultado muy útil como procedimiento paliativo hasta un posterior trasplante corneal. Ha servido como alternativa a las lentes de contacto terapéuticas para disminuir el dolor. Hay que tener en cuenta que la mayoría de estos pacientes operados de cataratas, debido a su edad avanzada, tienen mayor dificultad para recambiarse la lente de contacto, así la MA actúa de lente de contacto permanente. En algunos casos se ha conseguido también ganancia

de agudeza visual debido a una mayor ganancia de transparencia corneal, pero es sólo subjetiva, ya que no se ha traducido en ganancia de líneas de visión.

2 -Tratamiento de microperforaciones corneales con técnica de trasplante múltiple de MA consiguiendo la oclusión temporal en la mayoría de los casos.

Sin embargo, en otras patologías de la superficie ocular con mayor implicación conjuntival, (pterigion especialmente primarios, simbléfaron y procesos sinequiantes con restricción de la motilidad ocular), hemos encontrado una mayor recidiva de la patología previa y con mayor agresividad tras el trasplante de membrana amniótica. En estos casos hemos encontrado superior a la membrana amniótica el empleo de injertos conjuntivales libres tanto del ojo contralateral como del mismo ojo afecto.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. MÉTODO BIBLIOGRÁFICO

Hemos seguido los “Requisitos de Uniformidad” recomendados en un principio por el grupo de Vancouver y con posterioridad por el Comité Internacional de Editores de revistas médicas, enumerando las citas bibliográficas de forma consecutiva y ordenadas alfabéticamente, e identificamos las referencias en el texto, tablas y figuras entre paréntesis.

A

ABEL R JR, BINDER PS.

Intraoperative evaluation of the lens during penetrating keratoplasty.

Ann Ophthalmol 1975; 7: 1631-1633.

ADDS PJ, HUNT CJ, DART J.

Amniotic membrane grafts, “fresh” or frozen ?. a clinical and in vitro comparison.

B J Ophthalmol 2001; 85: 905-907.

ADINOLFI M.

HLA typing of amniotic fluid cells.

Prenat Diagn 1982; 2: 147.

ADINOLFI M, AKLE CA, MCCOLL I, FENSOM AH, TANSLEY L,

CONNOLLY P, HSI BL, FAULK WP, TRAVERS P, BODMER WF.

Expression of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells.

Nature 1982; 295: 325-327.

ADINOLFI M, MCCOLL I, CHASE D, FENSOM AH, WELSH K, BROWN S,

MARSH J, THICK M, DEAN M.

Transplantation of fetal fibroblasts and correction of enzymatic deficiencies in patients with Hunter's or Hurler's disorders.

Transplantation 1986; 42: 271-274.

AKLE C, MCCOLL I, DEAN M, ADINOLFI M, BROWN S, FENSOM AH, MARSH J, WELSH K.

Transplantation of amniotic epithelial membranes in patients with mucopolysaccharidoses.

Exp Clin Immunogenet 1985; 2: 43-48.

ALLDREDGE OC, KRACHMER JH.

Clinical types of corneal transplant rejection. Their manifestations, frequency, preoperative correlates and treatment.

Arch Ophthalmol 1981; 99: 599-604.

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

Amniotic membrane transplantation after the primary surgical management of band keratopathy.

Cornea 2001; 20: 354-361.

ARONSON SB, ELLIOTT JH, MOORE TE JR, O'DAY DM.

Pathogenetic approach to therapy of peripheral corneal inflammatory disease.

Am J Ophthalmol 1970; 70: 65-90.

ASHWORTH MF, MORTON KE, DEWHURST J, LILFORD RJ, BATES RG.

Vaginoplasty using amnion.

Obstet Gynecol 1986; 67: 443-446.

ASSOULINE M.

Neurophysiologie épithélial. En: Rigal D (ed). L'épithélium cornéen. Rapport de la Soc Fr Ophthalmol. Masson, Paris, 1993; 28-40.

AVILA M, ESPANA M, MORENO C, PENA C.

Reconstruction of ocular surface with heterologous limbal epithelium and amniotic membrane in a rabbit model.

Cornea 2001; 20: 414-420.

AZUARA-BLANCO A, PILLAI CT, DUA HS.

Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction.

Br J Ophthalmol 1999; 83: 399-402.

B

BALLEN PH.

Treatment of chemical burns of the eye.

Eye, Ear Nose Throat Mon 1964; 43: 57.

BARABINO S, ROLANDO M, BENTIVOGLIO G, MINGARI C, ZANARDI S, BELLOMO R, CALABRIA G.

Role of amniotic membrane transplantation for conjunctival reconstruction in ocular-cicatricial pemphigoid.

Ophthalmology 2003; 110: 474-480.

BARNES MJ, CONSTABLE BJ, MORTON LF, ROYCE PM.

Age-related variations in hydroxylation of lysine and proline in collagen.

Biochem J 1974; 139: 461-468.

BARRAQUER JI.

Estado actual de la histioterapia en Oftalmología.

Comunicación solicitada. Congreso de la Sociedad Oftalmológica Hispano-Americana. Barcelona 1951.

BARRAQUER JI: EN: KING JH, MC TIGUE JW (eds).

Program and Abstracts of the cornea I World Congress. Butterworth, London 1965; 345.

BASTIDA G, ROBLES J, SANCHEZ M, MONTAÑES C.

Anestesia para cirugía experimental oftalmológica.

Arch Soc Esp Oftalmol 1981; 41: 1271-1276.

BEN-HANAN I, LANDSHMAN N, ASSIA E, BELKIN M.

Further evidence for the involvement of immunoregulatory processes in corneal alkali burns: effects of immunosuppression and convalescent serum.

Ophthalmic Res 1986; 18: 288-291.

BEN HANAN Y, LANDSHMAN N, AVNI I, KARSIK A, BELKIN M.

Indications for the role of the immune system in the pathogenesis of corneal alkali burns.

Br J Ophthalmol 1983; 67: 635-637.

BENNETT TO, PEYMAN GA, RUTGARD J.

Intracameral phosphate buffer in alkali burns.

Can J Ophthalmol 1978; 13: 93-95.

BERMAN MB, CAVANAGH HD, GAGE J.

Regulation of collagenase activity in the ulcerating cornea by cyclic-AMP.

Exp Eye Res 1976; 22: 209-218.

BERMAN M, DOHLMAN CH, GNADINGER M, DAVISON P.

Characterization of collagenolytic activity in the ulcerating cornea.

Exp Eye Res 1971;11: 255-7.

BERMAN M, LEARY R, GAGE J.

Collagenase from corneal cell cultures and its modulation by phagocytosis.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1979; 18: 588-601.

BERMAN M, LEARY R, GAGE J.

Evidence for a role of the plasminogen activator-plasmin system in corneal ulceration.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1980; 19: 1204-1221.

BERMAN MB, MANSEAU E, LAW M.

Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1983; 24: 1358.

BERMAN MB, MANSEAU E, LAW M, AIKEN D.

Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1983; 24: 1358-1366.

BEUERMAN RW, SCHIMMEELPFENNIG B.

Sensory denervation of the cornea affects epithelial properties.

Exp Neurol 1980; 69: 196-201.

BEUERMAN RW, TANELIAN DL.

Corneal pain evoked by thermal stimulation.

Pain 1979; 7: 1-14.

BOUDREAU N, SYMPSON CJ, WERB Z, ET AL.

Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix.

Science 1995; 267: 891-893.

BRAZZELL RK, STERN ME, AQUAVELLA JV, BEUERMAN RW, BAIRD L.

Human recombinant epidermal growth factor in experimental corneal wound healing.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1991; 32: 336-340.

BRODOVSKY SC, MCCARTY CA, SNIBSON G, LOUGHNAN M, SULLIVAN L, DANIELL M, TAYLOR HR.

Management of alkali burns : an 11-year retrospective review.

Ophthalmology 2000; 107:1829-1835.

BRON AJ, GOLDBERG MF.

Vortex patterns of the corneal epithelium.

Trans Ophthalmol Soc UK 1973; 93: 455-472.

BROWN AL.

Lime burns of the eye: Use of rabbit peritoneum to prevent severe delayed effects.

Arch Ophthalmol 1941; 26: 522-525.

BROWN SI, TREGAKIS MP, PEARCE DB.

Treatment of the alkali burned cornea.

Am J Ophthalmol 1972; 74: 361.

BROWN SI, WELLER CA, VIDRICH AM.

Effect of corticosteroids on corneal collagenase of rabbits.

Am J Ophthalmol 1970; 70: 744 -747.

BUCK RC.

Cell migration in repair of mouse corneal epithelium.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1979; 18: 767-784.

BUCK RC.

Hemidesmosomes of normal and regenerating mouse corneal epithelium.

Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1982; 41: 1-16.

BUNDENZ DL, BARTON K, TSENG SC.

Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs.

Am J Ophthalmol 2000; 130: 580-8.

BUNDENZ DL, BARTON K, TSENG SCG.

Repair of leaking glaucoma filtering blebs using preserved human amniotic membrane graft.

Invest Ophthalmol Surg Lasers 1998; 29: 428-431.

BURGERS JK, NELSON RJ, QUINLAN DM, WALSH PC.

Nerve growth factor, nerve grafts and amniotic membrane grafts restore erectile function in rats.

J Urol 1991; 146: 463-468.

BURGER K.

Artificial vaginal reconstruction with the help of amnios.

Zentralblatt Fur Gynakol 1937; 2437-2440.

BURNS FR, PATTERSON CA. CHEMICAL INJURIES: Mechanisms OF CORNEAL DAMAGE AND REPAIR. En: Beuerman RW, Crosson CE, Kaufman HE (eds). Healing processes in the cornea. Gulf Publishing Company, Houston 1989; 45-48.

BUXTON JN, BUXTON DF, WESTPHALEN JA.

Indications and contraccidictions of penetrating keratoplasty. En: Brightbill FS (eds). Corneal surgery: theory, technique and tissue. Mosby, St Louis, 1993, 77-88.

C

CAMERON JD, WATERFIELD RR, STEFFES MW, FURCHT LT.

Quantification of corneal organ culture migration: central and peripheral epithelium.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1989; 30: 2407-2413.

CAO Z, SAID N, WU HK, KUWABARA I, LIU FT, PANJWANI N.

Galectin-7 as a potential mediator of corneal epithelial cell migration.

Arch Ophthalmol 2003; 121: 82-86.

CARON LA, ET AL.

Topical fibronectin in a rabbit alkali burn model of corneal ulceration.

Invest Ophthalmol Vis Sci 26 (suppl) 1985; 176.

CASTROVIEJO R, CARDONA H, DE VOE AG.

Present status of prosthokeratoplasty.

Am J Ophthalmol 1969; 68: 613-625.

CAWSTON TE.

Connective tissue catabolism in relation to cornea.

Tras Ophtahlmol Soc UK 1981; 98: 329-334.

CEJKOVA J, LOJDA Z, OBENBERG J, HAVRANKOA E.

Alkali burns of the rabbit cornea. II. A histochemical study og glycosaminoglycans.

Histochemistry 1975; 45: 71-75.

CENEDELLA RJ.

Role of transcription, translation, and protein turnover in controlling the distribution of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 2133-2141.

CENEDELLA RJ, FLESCHNER CR.

Kinetics of corneal epithelium turnover in vivo. Studies of lovastatin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 1957-1962.

CENEDELLA RJ, FLESCHNER C.

Cholesterol biosynthesis by the cornea. Comparison of rates of sterol synthesis with accumulation during early development. *J Lipid Res* 1989; 30: 1079-1084.

CENEDELLA RJ, FLESCHNER CR, CEJKOVA J, LOJDA Z, OBENBERG J, HAVRANKOVA E.

Alkali burns of the rabbit cornea. II. A histochemical study of glycosaminoglycans. *Histochemistry* 1975; 45: 71-75.

CHEN JJY, TSENG SCG.

Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 1301-1314.

CHEN WYW, MUI MM, KAO WW, LIU CY, TSENG SC.

Conjunctival epithelial cells do not transdifferentiate in organotypic cultures: expression of K-12 keratin is restricted to corneal epithelium. *Curr Eye Res* 1994; 13: 765-778.

CHIANG TS, MOORMAN LR, THOMAS RP.

Ocular hypertensive response following acid and alkali burns in rabbits.

Invest Ophthalmol 1971; 10: 270-273.

CHO BJ, DJALILIAN AR, OBRITSCH WF, MATTESON DM, CHAN CC, HOLLAND EJ.

Conjunctival epithelial cells cultured on human amniotic membrane fail to transdifferentiate into corneal epithelial-type cells.

Cornea 1999; 18: 216-224.

CHOI TH, LEE JY, CHUNG DH.

The effect of amniotic membrane transplantation on limbal and corneal wound healing.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42: S265.

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

Effect of the application of the human amniotic membrane on rabbit corneal wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy.

Cornea 1998; 17: 389-395.

CHOYCE DP.

Keratoprosthesis.

Am J Ophthalmol 1980; 89: 152-153.

CINTRON C, HASSINGER L, KUBLIN C, FRIEND J.

A simple method for the removal of rabbit corneal epithelium utilizing n-heptanol.

Ophthalmic Res 1979; 11: 90-96.

COLOCHO G, GRAHAM WP III, GREEN AE, ET AL.

Human amniotic membrane as a physiologic wound dressing.

Arch Surg 1974; 109: 370-373.

Comité Internacional de Editores de Revistas médicas, Requisitos de Uniformidad para manuscritos presentados para publicación en revistas biomédicas. *Atención Primaria* 1998; 221: 331-339.

CORRENT G, ROUSSEL TJ, TSENG SC, WATSON BD.

Promotion of graft survival by photothrombotic occlusion of corneal neovascularization.

Arch Ophthalmol 1989; 107: 1501-1506.

CORSEN G, HOY JE.

A new parenteral anesthetic C1 581: its effect on intraocular pressure.

J Pediatr Ophthalmol Strabismus 1967; 4: 20-23.

D

DANIELSEN N, MULLER H, PETTMANN B, WILLIAMS LR, DAVIS GE, ENGVALL E, MANTHORPE M, VARON S.

Rat amnion membrane matrix as a substratum for regenerating axons from peripheral and central neurons: effects in a silicone chamber model.

Brain Res 1988; 467(1): 39-50.

DART J.

Impression cytology of the ocular surface—research tool or routine clinical investigation?

Br J Ophthalmol 1997; 81: 930.

DAVANGER M, EVENSEN A.

Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium.

Nature 1971; 229: 560-561.

DAVIS JW.

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

DE RÖTH A.

Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes.
Arch Ophthalmol 1940; 23: 522- 525.

DEKARIS I, GABRIC N, MRAVICIC I, KARAMAN Z, KATUSIC J, LAZIC R, SPOLJARIC N.

Multilayer vs. monolayer amniotic membrane transplantation for deep corneal ulcer treatment.
Coll Antropol 2001; 25 Suppl: 23-28.

DEXEUS S.

Tratado de Obstetricia Dexeus. Tomo I: Fisiología Obstétrica. Capítulo 3: Anatomía macro y microscópica de la placenta. F X Serrat. Editorial Salvat 1982.

DHALL K.

Amnion graft for treatment of congenital absence of the vagina.
Br J Obstet Gynaecol 1984; 91: 279-282.

DONSHIK PC, BERMAN MB, DOHLMAN CH, GAGE J, ROSE J.

Effect of topical corticosteroids on ulceration in alkali-burned corneas.
Arch Ophthalmol 1978; 96: 2117-2120.

DONZIS PB, INSLER MS, GORDON RA.

Corneal curvatures in premature infants.
Am J Ophthalmol 1985; 99: 213-215.

DOWNIE NM, HEATH RW.

Métodos estadísticos aplicados. Ed Ediciones del Castillo, SA. Madrid 1977.

DUA HS.

The conjunctiva in corneal epithelial wound healing.

Br J Ophthalmol 1998; 82: 1407-11.

DUA HS, AZUARA-BLANCO A.

Amniotic membrane transplantation.

Br J Ophthalmol 1999; 83: 748-752.

DUA HS, AZUARA-BLANCO A.

Limbal stem cells of the corneal epithelium.

Surv Ophthalmol 2000; 44: 415-25.

DUA HS, FORRESTER JV.

The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing.

Am J Ophthalmol 1990; 110: 646-65.

DUA HS, FORRESTER JV.

Clinical patterns of corneal epithelial wound healing.

Am J Ophthalmol 1987; 104: 481-9.

DUA HS, GOMES JA, SINGH A.

Corneal epithelial wound healing.

Br J Ophthalmol 1994; 78: 401-8.

DUA HS, KING AJ, JOSEPH A.

A new classification of ocular surface burns.

Br J Ophthalmol 2001; 85: 1379-83.

DUCHESNE B, TAHI H, GALAND A.

Use of human fibrin glue and amniotic membrane transplant in corneal perforation.

Cornea 2001; 20: 230-232.

E

EBATO B, FRIEND J, THOFT RA.

Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1987; 28: 1450-1456.

EBATO B, FRIEND J, THOFT RA.

Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1988; 29: 1533-1557.

ESPANA EM, GRUETERICH M, SANDOVAL H, SOLOMON A, KARP CL, FANTES F, TSENG SCG.

Amniotic membrane transplanation for bullous keratopathy in eyes with poor visual potential.

J Cataract Refract Surg 2003; 29: 279-284.

ESPANA EM, HE H, KAWAKITA T, DI PASCUALE MA, RAJU VK, LIU CY, TSENG SC.

Human keratocytes cultured on amniotic membrane stroma preserve morphology and express keratocan.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44: 5136-41.

ESPINOZA J, CHAIWORAPONGSA T, ROMERO R, EDWIN S, RATHNASABAPATHY C, GOMEZ R, BUJOLD E, CAMACHO N, KIM YM, HASSAN S, BLACKWELL S, WHITTY J, BERMAN S, REDMAN M, YOON BH, SOROKIN Y.

Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes.

J Matern Fetal Neonatal Med 2003; 13: 2-21.

F

FERREIRA DE SOUZA R, HOFMANN-RUMMELT C, KRUSE FE, SEITZ B.
Multilayer amniotic membrane transplantation for corneal ulcers not treatable by conventional therapy - a prospective study of the status of cornea and graft during follow-up.

Klin Monatsbl Augenheilkd 2001; 218: 528-34.

FISHMAN IJ, FLORES FN, SCOTT FB, SPJUT HJ, MORROW B.

Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction.

J Urol 1987; 138: 1291-4.

FOGLE JA, KENYON KR, FOSTER CS.

Tissue adhesive arrests stromal melting in the human cornea.

Am J Ophthalmol 1980; 89: 795-802

FRANCOIS J, FEHER J.

Studies with the polarization microscope of the fibroblastic activity of the regenerating rabbit's cornea under the influence of corticosteroids.

Exp Eye Res 1973; 16: 201.

FRANKLIN RM, KENYON KR, TUTSCHKA PJ, SARAL R, GREEN WR, SANTOS GW.

Ocular manifestations of graft versus host disease.

Ophthalmology 1983; 90: 4 -13

FRIEND J, THOFT RA.

Funcional competence of regenerating ocular surface epithelium.
Invest Ophthalmol Vis Sci 1978; 17: 134-139.

FUJISAWA K, KATAKAMI C, YAMAMOTO M.

Keratocyte activity during wound healing of alkali-burned cornea.
Nippon Ganka Gakkai Zasshi 1991; 95: 59- 66.

FUJISHIMA H, SHIMAZAKI J, SHINOZAKI N, TSUBOTA K.

Trabeculectomy with the use of amniotic membrane for uncontrollable glaucoma.
Ophthalmic Surg Lasers 1998; 29: 428-431.

FUKUDA K, CHIKAMA T, NAKAMUR M, NICHIDA T.

Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva.
Cornea 1999; 18: 73-79.

G

GALVIN S, LOOMIS C, MANABE M, DHOUILLY D, SUN T.

The major pathways of keratinocyte differentiation as defined by keratin expression, an over view.
Adv Dermatol 1989; 4: 277-299.

GEORGY MS, AZIZ NL.

Vaginoplasty using amnion graft: new surgical technique using the laparoscopic transillumination light.
J Obstet Gynaecol 1996; 16: 262-264.

GERARD M, MERLE H, CHIAMBARETTA F, RIGAL D, SCHRAGE N.

An amphoteric rinse used in the emergency treatment of a serious ocular burn.
Burns 2002 ; 28: 670-673.

GHANA VI J, ASHRAFI M, MONTAZERALGHAEM A, MOHSENI FAR J,
DABIRI P, GHANADI F.

Islet cell implantation into the pouched amniotic membrane on the side of the
portal vein in dogs.
Transplant Proc 1995; 27:2644.

GHARIB M, URE BM, KLOSE M.

Use of amniotic grafts in the repair of gastroschisis.
Pediatr Surg Int 1996; 11: 96-99.

GIPSON IK.

Anatomy of the conjunctiva, cornea and limbus. En: The cornea (Ed: G Smolin,
RA Thoft) 3rd ed. Little Brown, Boston. 1977 pp 3-24.

GIPSON IL, ANDERSON RA.

Actin filaments in normal and migrating corneal epithelial cells.
Invest Ophthalmol Vis Sci 1977; 16: 161.

GOLDBERG MF, BRON AJ.

Limbal palisades of Vogt.
Trans Am Ophthalmol Soc 1982; 80: 155-171.

GONUL B, ERDOGAN D, OZOGUL C, KOZ M, BABUL A, CELEBI N.

Effect of EGF dosage forms on alkali burned corneal wound healing of mice.
Burns 1995; 21: 7-10.

GORDON RA, DONZIS PB

Refractive development of the human eye.

Arch Ophthalmol 1985; 103: 785.

GOTO S, SUGATA H, KOZAKAI M.

Transdifferentiation of conjunctival epithelium after ocular surface rehabilitation through deep lamellar sclerokeratoplasty.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi 2002; 106: 714-720.

GRANT WM.

Experimental investigation of paracentesis in the treatment of ocular ammonia burns.

Arch Ophthalmol 1950; 44: 399-404.

GRANT WM, KERN HL.

Action of alkalies on the corneal estroma.

Arch Ophthalmol 1955; 54: 931.

GRAYSON M.

ANATOMÍA. En: Grayson M (ed). Enfermedades de la cornea. Panamericana, Buenos Aires, 1992, 9-23.

GREINER JV, CONVINGTON HI, ALLANSMITH MR.

The human limbus. A scanning electron microscopy study.

Arch Ophthalmol 1979; 97: 1159-1165.

GRIS O, CAMPO Z, WOLLEY-DOD C, GUELL JL, BRUIX A, CALATAYUD M, ADAN A.

Amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens for the treatment of epithelial disorders.

Cornea 2002; 21: 22-27.

GRIS O, WOLLEY-DOD C, GELL JL, TRESSERRA F, LERMA E, CORCÓSTEGUI B, ADAN A.

Histologic findings after amniotic membrane transplantation graft in human cornea.

Ophthalmology 2002; 109: 508-12.

GUO M, GRINNELL F.

Basement membrane and human epidermal differentiation in vitro.

J Invest Dermatol 1989; 93: 372-378.

H

HANADA K, SHIMAZAKI J, SHIMMURA S, TSUBOTA K.

Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera.

Am J Ophthalmol 2001; 13: 324-331.

HANNA C, O'BRIEN JE.

Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea.

Arch Ophthalmol 1961; 64: 536-539.

HASKJOLD E, BJERKNES R, BJERKNES E.

Migration of cells in the rat corneal epithelium.

Acta Ophthalmol 1989; 67: 91-96.

HASKJOLD E, REFSUM SB, BJERKNES R.

Cell renewal of the rat corneal epithelium: a method to compare corresponding corneal areas from individual animals.

Acta Ophthalmol 1988; 66: 523-527.

HASKJOLD E, REFSUM SB, BJERKNES R.

Circadian variations in the DNA synthesis of the rat corneal epithelium. A study

using double labelling with tritiated thymidine.

Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1990; 58: 229-34.

HASKJOLD E, REFSUM H, REFSUM SB, BJERKNES R.

Cell kinetics of the rat corneal epithelium.

APMIS 1992; 100: 1123-8.

HO PC, ELLIOTT JH.

Kinetics of corneal epithelial regeneration. II. Epidermal growth factor and topical corticosteroids.

Invest Ophthalmol 1975; 14: 630-3.

HONAVAR SG, BANSAL AK, SANGWAN VS, RAO GN.

Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson syndrome.

Ophthalmology 2000; 107: 975-9.

HONG JW, KANG SM, KIM HJ .

The effect of phototherapeutic keratectomy (PTK)-amniotic membrane transplantation (AMT) on myopic regression with corneal opacity after PRK in high myopia.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1998; 39: S354.

HOSNI FA.

Repair of trichomatous cicatricial entropion using mucous membrane graft.

Arch Ophthalmol 1974; 91: 49-51.

HUANG AJ, TSENG SCG.

Corneal wound healing in the absence of limbal epithelium.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1988; 29(suppl):190.

HUANG AJ, WATSON BD, HERNANDEZ E, TSENG SCG.

Induction of conjunctival transdifferentiation on vascularized corneas by photothrombotic occlusion of corneal neovascularization.

Ophthalmology 1988; 95: 228-235.

HUGHES WF JR.

Alkali burns of the eye I. Review of the literature and summary of present knowledge.

Arch Ophthalmol 1946; 35: 423-449.

HUGHES WF JR.

Alkali burns of the eye II. Clinical and pathologic course.

Arch Ophthalmol 1946; 36: 189-214.

I

International Comitee of medical Journal Editors, Uniform requisits for manuscripts submitted to biomedical journals.

New Engl J Med 1997, 336: 309-316.

ITOI M, GNADINGER MC, SLANSKY HH, DOHLMAN CH.

Prevention of ulcers of the corneal stroma with the use of calcium salt of EDTA.

Arch Ophtalmol Rev Gen Ophtalmol 1969; 29: 389-92.

IUMASHEVA AA, BELOUS VI, LISHCHENKO BM.

Scleroplasty results in progressive myopathy with the use of allogeneic amnion

Oftalmol Zh 1989; 6: 352-354.

J

JOSEPH A, DUA HS, KING AJ.

Failure of amniotic membrane transplantation in the treatment of acute ocular burns.

Br J Ophthalmol 2001; 85: 1065-1069.

K

KAO WW, ZHU G, BENZA R, KAO CW, ISHIZAKI M, WANDER AH.

Appearance of immune cells and expression of MHC II DQ molecule by fibroblasts in alkali-burned corneas.

Cornea 1996; 15: 397-408.

KASPAROV AA, TRUFANOV SV.

Use of preserved amniotic membrane for reconstruction of the surface of the anterior eye segment

Vestn Oftalmol 2001; 117: 45-47.

KATZ M.

The human eye as an optical system. In Tasman W and Jaeger EA, editors: Duane`s clinical ophthalmology, vol 1, Philadelphia, 1989, JB Lippincott Co.

KAWASAKI S, UNO T, SHIMAMURA I, OHASHI Y.

Outcome of surgery for recurrent pterygium using intraoperative application of mitomycin C and amniotic membrane transplantation.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi 2003; 107: 316-321.

KAYE DB.

Epithelial response in penetrating keratoplasty.

Am J Ophthalmol 1980; 89: 381-387.

KEE C, HWANG JM.

Amniotic membrane graft for late-onset glaucoma filtering leaks.

Am J Ophthalmol 2002; 133: 834-835.

KELAMI A.

Alloplasty in urology Z

Urol Nephrol 1972; 65: 161-73.

KENNEKAMPT H-U, UOHRMAN P, RORY K, ET AL.

Evaluation of amniotic membrane as adhesion prophylaxis in a novel surgical gastroschisis model.

Invest Surg 1994; 7: 187-193.

KENNEY C, ET AL.

Analyses of collagens from ultrastructurally pure Decemet's membrane and cultured endothelial cells.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1978; 17(suppl): 253.

KENYON KR.

Decision-making in the therapy of external eye disease: noninfected corneal ulcers.

Ophthalmology 1982; 89: 44-51.

KENYON KR, BERMAN M, ROSE J, GAGE J.

Prevention of stromal ulceration in the alkali-burned rabbit cornea by glued-on contact lens. Evidence for the role of polymorphonuclear leukocytes in collagen degradation.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1979; 18: 570-587.

KENYON KR, TSENG SCG.

Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders.

Ophthalmology 1989; 96: 709-722.

KHAN B, DUDENHOEFER EJ, DOHLMAN CH.

Keratoprosthesis: an update.

Curr Opin Ophthalmol 2001; 12: 282-287.

KHODADOUST AA, SIVERSTEIN AM, KENYON KR, ET AL.

Adhesion of regenerating corneal epithelium. The role of basement membrane.

Am J Ophthalmol 1968; 65: 339-348.

KIM JC, TSENG SC.

Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas.

Cornea 1995; 14: 473-484.

KIM MJ, JUN RM, KIM WK, HANN HJ, CHONG YH, PARK HY, CHUNG JH.

Optimal concentration of human epidermal growth factor (hEGF) for epithelial healing in experimental corneal alkali wounds.

Curr Eye Res 2001; 22: 272-279.

KINOSHITA S, FRIEND J, THOFT RA.

Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1981; 21: 434-441.

KINOSHITA S, KIROPES TC, FRIEND J, THOFT RA.

Limbal epithelium in ocular surface wound healing.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1982; 23: 73-80.

KINOSHITA S, KIROPES TC, FRIEND J, THOFT RA.

Keratin-like proteins in corneal and conjunctival epithelium are different.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1983; 24: 577-581.

KOIZUMI N, INATOMI T, QUANTOCK AJ, FULLWOOD NJ, DOTA A, KINOSHITA S.

Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits.

Cornea 2000; 19: 65-71.

KOIZUMI N, INATOMI T, SUZUKI T, SOTOZONO C, KINOSHITA S.

Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders.

Ophthalmology 2001; 108: 1569-1574.

KORB DR, GREINER JV, GLONEK T, WHALEN AC, ESWAY JE, HEARN SL, LEAHY CD.

Human and rabbit tear film lipid layer thickness and blink rate: Abstracts II Int' L Conference on the Lacrimal Gland, Tear film ad Drye eye Syndromes. Bermuda 1996, p 51.

KRAMER SG.

Late numerical grading of alkali burns to determinate keratoplasty prognosis, Trans Am Ophthalmol Soc 1983; 81: 97-101.

KRIZEK TJ, ROBSON MC.

Evolution of quantitative bacteriology in wound management.

Am J Surg 1975 Nov; 130(5): 579-84.

KRUSE FE

Stemm cells and the corneal epithelial regeneration.

Eye 1994; 8: 170-183.

KRUSE FE, CHEN JJY, TSAI RJ, TSENG SC.

Conjunctival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1990; 31: 1903-13.

KRUSE FE, MELLER D.

Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the ocular surface.

Ophthalmologe 2001; 98: 801-810.

KRUSE FE, ROHRSCHEIDER K, VÖLKER HE.

Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers.

Ophthalmology 1999; 106: 1504-11.

KUCKELKORN R, WENZEL M, LAMPRECHT J, BOCKING B, REIM M.

Autologous transplantation of nasal mucosa after severe chemical and thermal eye burns

Klin Monatsbl Augenheilkd 1994; 204: 155-161.

KURPAKUS MA, STOCK EL, JONES JCR.

The role of basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells.

Dev Biol 1992; 150: 243-255.

KUWABARA T, PERKINS DG, COGAN DG.

Sliding of the epithelium in experimental corneal wounds.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1976; 15: 4-14.

L

LAIBSON PR.

Current concepts and techniques in corneal transplantation.

Curr Opin Ophthalmol 2002; 13: 220-223

LAVKER RM, DONG G, CHENG SZ, KUDOH K, COTSARELIS G, SUN TT.

Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia. Implications of corneal

epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1991; 32: 1864-1875.

LEE SH, TSENG SCG.

Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration.

Am J Ophthalmol 1997; 123: 303-312.

LEE JH, WEE WR, CHUNG ES, KIM HY, PARK SH, KIM YH.

Development of a newly designed double-fixed Seoul-type keratoprosthesis.

Arch Ophthalmol 2000; 118: 1673-1678.

LELE PP, WEDDELL G.

Sensory nerves of the cornea and cutaneous sensibility.

Exp Neurol 1959; 1: 334-359.

LETKO E, STECHSCHULTE SU, KENYON KR, SADEQ N, ROMERO TR, SAMSON CM, NGUYEN QD, HARPER SL, PRIMACK JD, AZAR DT, GRUTERICH M, DOHLMAN CH, BALATZIS S, FOSTER CS.

Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers.

Arch Ophthalmol 2001; 119: 659-663.

LONGAKER MT, PELED ZM, CHANG J, KRUMMEL TM.

Fetal wound healing: progress report and future directions.

Surgery 2001; 130: 785-787.

M

MAHGOUB MA, MONAYERI ME, MAHFOUZ H.

Moghazy capsule as a bioartificial pancreas in xenotransplantation.

Transplant Proc 1992; 24: 659-660.

MALDONADO B, FURCHT LT.

Involvement of integrins with adhesion-promoting, heparin-binding peptides of type IV collagen in cultured human corneal epithelial cells.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1995; 36: 364-372.

MARKUSZEWSKA J, KRZYZANOWSKA P.

Amniotic membrane transplantation (AMT) for ocular surface reconstruction

Klin Oczna 1999; 101: 311-316.

MATSUDA M, UBELS JL, EDELHAUSER HF.

A larger corneal epithelial wound closes at a faster rate.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1985; 26: 897-900.

MATTAX JB, McCULLEY JP.

Corneal Surgery following alkali burns.

Int Ophthalmol Clin 1988; 28: 76-82.

McCLELLAN KA.

Mucosal defense of the outer eye.

Surv Ophthalmol 1997; 42: 233-246.

McCULLEY JP.

Chemical injuries. En: Smolin G. Thoft RA(eds). The cornea. Scientific Foundations and clinical Practice. Little, Brown & Co. 1987: 527-542.

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

Amniotic membrane transplantation for symptomatic conjunctivochalasis refractory to medical treatments.

Cornea 2000; 19: 796-03.

MELLER D, PIRES RT, MACK RJ, FIGUEIREDO F, HEILIGENHAUS A, PARK WC, PRABHASAWAT P, JOHN T, MCLEOD SD, STEUHL KP, TSENG SC.

Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000; 107: 980-989; discussion 990.

MELLER D, TSENG SCG.

Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 878-886.

MELLER D, TSENG SCG.

Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 1360-1367.

MENDICUTE J, ALDAZABAL P, SAORNIL MA, EMPARANZA J, OSTOLAZA JI, DURÁN J.

Diseño de un modelo experimental de causticación corneal con compromiso límbico (grado III, THOFT)
Arch Soc Esp Oftalmol 1997; 72: 49-58.

MENDICUTE J.

El trasplante límbico en la regeneración de la superficie ocular tras causticación experimental en ojo de conejo.
Thesis Doctoralis. Bilbao 1995.

MENDICUTE J, ALDAZABAL P, SAORNIL MA, EMPARANZA J, OSTOLAZA JI, DURÁN J.

Diseño de un modelo experimental de causticación corneal con compromiso límbico (grado III, THOFT)

Comunicación en Investigación presentada en el Congreso de la Sociedad española de Oftalmología, Salamanca 1995.

MESSMER EM.

Hypopyon after amniotic membrane transplantation.
Ophthalmology 2001; 108: 1714-5.

MESSMER EM, HINTSCHICH CR, PARTSCHT K, MESSER G, KAMPIK A.

Ocular cicatricial pemphigoid. Retrospective analysis of risk factors and complications
Ophthalmologie 2000; 97: 113-120.

MOLL R, FRANKE WW, SCHILLER DL, GEIGER B, KREPLER R.

The catalog of human cytokeratins, Patterns of expression in normal epithelia, tumors and culture cells.
Cell 1982; 31: 11-24.

MORTON KE, DEWHURST CJ.

Human amnion in the treatment of vaginal malformations.
Br J Obstet Gynaecol 1986; 93: 50-4.

MOYER PD, KAUFMAN AH, ZHANG Z, KAO CW, SPAULDING AG, KAO WW.

Conjunctival epithelial cells can resurface denuded cornea, but do not transdifferentiate to express cornea-specific keratin 12 following removal of limbal epithelium in mouse.
Differentiation 1996; 60: 31-8.

MRUKWA-KOMINEK E, GIEREK-CIACIURA S, ROKITA-WALA I, SZYMKOWIAK M.

Use of amniotic membrane transplantation for treating bullous keratopathy

Klin Oczna 2002; 104: 41-6.

N

NEWSOME DA, ET AL.

Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1981; 20: 738.

NEWSOME DA, GROSS J.

Prevention by medroxyprogesterone of perforation in the alkali-burned rabbit cornea: inhibition of collagenolytic activity.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1977; 16: 21.

NGUYEN-DINH-MAC.

A technic of vaginoplasty by inferior approach in the treatment of Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. Mac's method.

Rev Fr Gynecol Obstet 1988 Feb; 83(2): 91-6.

NIRANKARI VS, VARMA SD, LAKHANPAL V, RICHARDS RD.

Superoxide radical scavenging agents in treatment of alkali burns. An experimental study.

Arch Ophthalmol 1981; 99: 886-887.

NORRIS MA, COHEN MS, WARREN MM, BECKER SN, BAUR PS JR, SEYBOLD HM.

Bladder reconstruction in rabbits with glutaraldehyde-stabilized amniotic membranes.

Urology 1982; 19: 631-635.

O

OBENBERGER J.

Paper strips and rings as simple tools standardization of experimental eye injuries
Ophthalmic Res 1975; 7: 363-370.

OHJI M, OHMI G, KIRITOSHI A, KINOSHITA S.

Goblet cell density in thermal and chemical injuries.
Arch Ophthalmol 1987; 105: 1686-1688.

ORMEROD LD, ABELSON MB. KEYTON KR.

Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter discs.
Invest Ophthalmol Vis Sci 1989; 30: 2148-2153.

OZTURK F, KURT E, CERCI M, EMIROGLU L, INAN U, TURKER M,
ILKER S.

The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury.
Ophthalmic Research 2000; 32: 13-8.

P

PAN Z, ZHANG W, WU Y, SUN B.

Transplantation of corneal stem cells cultured on amniotic membrane for corneal
burn: experimental and clinical study.
Chin Med J Engl 2002; 115: 767-9.

PATERSON CA, PFISTER RR.

Intraocular pressure changes after alkali burns.
Arch Ophthalmol 1974; 91: 211-218.

PATERSON CA, PFISTER RR, LEVINSON RA.

Aqueous humor PH changes after experimental alkali burns.
Am J Ophthalmol 1975; 79: 414-419.

PATERSON CA, WILLIAMS RN, PARKER AV.

Characteristics of polymorphonuclear leukocyte infiltration into the alkali burned eye and the influence of sodium citrate.

Exp Eye Res 1984; 39: 701-708.

PELLEGRINI G, TRAVERSO CE, FRANZI AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium.

Lancet 1997; 349: 990-993.

PERIS MARTÍNEZ C, DÍAZ LLOPIS M, ESPAÑA E.

Trasplante mixto de membrana amniótica y conjuntiva para el tratamiento del simbléfaron.

Presentado en la IX Reunión de la Sociedad Española de Cirugía Plástica Ocular y Orbitaria, celebrada en Torremolinos el 25-26 de Septiembre 1999.

PERIS MARTÍNEZ C, DÍAZ-LLOPIS M, ESPAÑA E.

Resultados preliminares del trasplante de membrana amniótica en la Cirugía del pterigion de evolución tórpida, presentado en la VIII Reunión de la Sociedad Española de Cirugía Plástica Ocular y Orbitaria, celebrada en Alicante del 30 de Septiembre al 4 de Octubre de 1998.

PERIS MARTÍNEZ, C; DÍAZ-LLOPIS M; MENEZO JL.

Trasplante de membrana amniótica tras causticación experimental en ojo de conejo presentado en el 78º Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología celebrado en Murcia del 25 al 29 de Octubre de 2002.

PERIS MARTÍNEZ C, DÍAZ-LLOPIS M.

Recubrimiento con membrana amniótica de úlcera disciforme microseidel positivo. IX Reunión de la Sociedad Española de Cirugía Plástica Ocular y Orbitaria. Torremolinos (Málaga), Septiembre 1999.

PERIS-MARTINEZ C, MENEZO JL, DIAZ-LLOPIS M, AVINO-MARTINEZ JA, NAVEA TEJERINA A. RISUEÑO P.

Multilayer amniotic transplantation in severe ocular graft versus host disease. Eur J Ophthalmol 2001; 11: 183-186.

PERIS-MARTÍNEZ C, MENEZO JL, AVINO JA, DÍAZ-LLOPIS M. NAVEA A.

Amniotic membrane transplantation after experimental alkali-induced corneal injury in rabbit eyes

Ophthalmic Res 2002; 34/S1/02 . Pag 38.

PERIS MARTÍNEZ C, MENEZO JL.

Amniotic membrane transplantation. Usefulness in the Management of complicated cases. Presentado en el Congreso de la Sociedad Europea de Oftalmología en Estambul. Septiembre 2001.

PERIS MARTÍNEZ C, MENEZO JL.

Amniotic membrane transplantation in haze treatment of rabbit eyes. Presentado en el Congreso de la Sociedad Europea de Oftalmología en Madrid. Junio 2003.

PETRIC I, IVEKOVIC R, TEDESCHI REINER E, NOVAK-LAUS K, LACMANOVIC-LONCARV, BRADIC HAMMOUD M.

Coll Antropol 2002; 26: 621-626.

PETROUTSOS G, POULIQUEN Y.

Effect of ascorbic acid on ulceration in alkali-burned corneas.

Ophthalmic Res 1984; 16: 185-189.

PFISTER RR.

The effects of chemical injury on the ocular surface.

Ophthalmology 1983; 90: 601-609.

PFISTER RR.

Chemical injuries of the eye.

Ophthalmology 1983; 90: 1246-1253.

PFISTER RR, BURNSTEIN N.

The alkali burned cornea: 1. Epithelial and stromal repair

Exp Eye Res 1976; 23: 519-535.

PFISTER RR, FRIEND J, DOHLMAN CH.

The anterior segments of rabbits after alkali burns. Metabolic and histologic alterations.

Arch Ophthalmol 1971; 86: 189-193.

PFISTER RR, HADDOX JL, DODSON RW, HARKINS LE.

Alkali-burned collagen produces a locomotory and metabolic stimulant to neutrophils.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1987; 28: 295-304.

PFISTER RR, HADDOX JL, LANK KM.

Citrate or ascorbate/citrate treatment of established corneal ulcers in the alkali-injured rabbit eye.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1988; 29: 1110-1115.

PFISTER RR, HADDOX JL, YUILLE-BARR D.

The combined effect of citrate/ascorbate treatment in alkali-injured rabbit eyes.

Cornea 1991; 10: 100-104.

PFISTER RR, HAYES SA, PATERSON CA.

The influence of parenteral ascorbate on the strength of corneal wounds.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1981; 21: 80-86.

PFISTER RR, MCCULLEY JP, FRIEND J, DOHLMAN CH.

Collagenase activity of intact corneal epithelium in peripheral alkali burns.

Arch Ophthalmol. 1971; 86: 308-313.

PFISTER RR, NICOLARO ML, PATERSON CA.

Sodium citrate reduces the incidence of corneal ulcerations and perforations in extreme alkali-burned eyes acetylcysteine and ascorbate have no favorable effect.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1981; 21: 486-490.

PFISTER RR, PATERSON CA.

Ascorbic acid in the treatment of alkali burns of the eye.

Ophthalmology 1980; 87: 1050-1057.

PFISTER RR, PATERSON CA.

Additional clinical and morphological observations on the favorable effect of ascorbate in experimental ocular alkali burns.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1977; 16: 478-487.

PFISTER RR, PATERSON CA, HAYES S.

Topical ascorbate decreases the incidence of corneal ulceration after experimental alkali burns.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1978; 17: 1019-1024.

PFISTER RR, PATERSON CA, HAYES S.

Effects of topical 10% ascorbate solution on established corneal ulcers after severe alkali burns.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1982; 22: 382-385.

PFISTER RR, PATERSON CA, SPIERS JW, HAYES SA.

The efficacy of ascorbate treatment after severe experimental alkali burns depends upon the route of administration.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1980; 19: 1526-1529.

PHAN TM, FOSTER CS, SHAW CD, ZAGACHIN LM, COLVIN RB. R

Topical fibronectin in an alkali burn model of corneal ulceration in rabbits.

Arch Ophthalmol 1991; 109: 414-419.

PHILIPS K, ARFFA R, CITRON C, ET AL.

Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization.

Arch ophthalmol 1983; 101: 640.

PIRES RT, CHOKSHI A, TSENG SC.

Amniotic membrane transplantaion or conjunctival limbal autograft for limbal stem cell deficiency induced by 5-fluorouracil in glaucoma surgeries.

Cornea 2000; 19: 284-287.

POLLARD SM, AYE NN, SIMMONDS EM.

Scaning electron microscopic appearance of normal human amnion and umbilical cord at term.

Br J Obstet Gynaecol 1976; 83: 470-477.

PORTNOY SL, INSLER MS, KAUFMAN HE.

Surgical management of corneal ulceration and perforation.

Surv Ophthalmol 1989; 34: 47-58.

PRABHASAWAT P, BARTON K, BURKETT G, ET AL.

Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterigium excision.

Ophthalmology 1997; 104: 974 -985.

PRABHASAWAT P, TESAIVIBUL N, KOMOLSURADEJ W.

Single and multilayer amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect with and without stromal thinning and perforation.

Br J Ophthalmol 2001; 85: 1455-1463.

PRABHASAWAT P, TSENG SC.

Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane.

Arch Ophthalmol 1997; 115: 1360-1367.

PRASAD JK, FELLER I, THOMPSON PD.

Use of amnion for the treatment of Stevens-Johnsons syndrome.

J Trauma 1986; 26: 945-946.

PRINCE JH.

The rabbit in eye research. Springfield IL, Charles C Thomas, 1964, p: 386-88.

PUANGSRICHARERN V, TSENG SCG.

Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency.

Ophthalmology 1995; 102: 1476-1485.

Q

R

RADA JA, FINI ME, HASSELL JR.

Regionalized growth patterns of young chicken corneas.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1996; 37: 2060-2067.

RAO MV, CHANDRASEKHARA N, SRINIVASAN M.

The influence of sulfaguanidine on the biogenesis of ascorbic acid in the rat.

Proc Soc Exp Biol Med 1968; 128: 402-407.

RAY S, KHAN BF, DOHLMAN CH, D'AMICO DJ.

Management of vitreoretinal complications in eyes with permanent keratoprosthesis.

Arch Ophthalmol 2002; 120: 559-566.

REINHARD T, SUNDMACHER R, SPELSBERG H, ALTHAUS C.

Homologous penetrating central limbo-keratoplasty (HPCLK) in bilateral limbal stem cell insufficiency.

Acta Ophthalmol Scand 1999; 77: 663-667.

REIM M.

A new treatment concept for severe caustic and thermal burns of the eyes.

Klin Monatsbl Augenheilkd 1990; 196: 1-5.

REIM M.

A new treatment concept in severe caustic injuries and burns of the eye.

Fortschr Ophthalmol 1989; 86: 722-726.

REIM M, BEIL KH, KAMMERER G, KREHWINKEL S.

Influence of systemic ascorbic acid treatment on metabolite levels after regeneration of the corneal epithelium following mild alkali burns.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1982; 218: 99-102.

REIM M, BUSSE S, LEBER M, SCHULZ C.

Effect of epidermal growth factor in severe experimental alkali burns

Ophthalmic Res 1988; 20: 327-331.

REN G, SONG C, LIANG P, ZHANG Z.

The effect of fibronectin on re-epithelialization of rabbits cornea after alkali burn.

Yan Ke Xue Bao 1994; 10: 138-143.

RIGAL-SASTOURNE JC, TIXIER JM, RENARD JP, MAURIN JF,
POULIQUEN Y, LEGEAIS JM.

Corneal burns and matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9): the effects of human amniotic membrane transplantation

J Fr Ophtalmol 2002; 25: 685-693.

RISA O, SAETHER O, MIDELFART A, KRANE J, CEJKOVA J.

Analysis of immediate changes of water-soluble metabolites in alkali-burned rabbit cornea, aqueous humor and lens by high-resolution ¹H-NMR spectroscopy.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2002; 240: 49-55.

ROBB RM, KUWARA T.

Corneal wound healing I. The movement of polymorphonuclear leukocytes into corneal wounds.

Arch Ophthalmol 1962,68: 632.

ROBSON MC, KRIZEK TJ.

Clinical experiences with amniotic membranes as a temporary biologic dressing.

Conn Med 1974; 38: 449-451.

RODRIGUEZ-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: 485-487.

ROPPER-HALL MJ.

Thermal and chemical burns.

Trans Ophthalmol Soc UK 1965; 85: 631.

ROSENTHAL P, COTTER JM, BAUM J.

Treatment of persistent epithelial defects with extended wear of a fluid-ventilated gas-permeable scleral contact lens.

Am J Ophthalmol 2000; 130: 33-41.

ROZSA A, BEUERMAN RW.

Density and organization of free nerve endings of rabbit corneal epithelium.

Pain 1982; 14: 105-120.

S

SABELLA N.

Use of fetal membranes in skin grafting.

Med Rec NY 1913; 83: 478-480.

SAIKA S, UENOYAMA K, HIROI K, TANIOKA H, TAKASE K, HIKITA M.

Ascorbic acid phosphate ester and wound healing in rabbit corneal alkali burns: epithelial basement membrane and stroma.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1993; 231: 221-227.

SALINAS-MARTÍNEZ E.

Estudio experimental de lentes intraoculares blandas precristalinianas.

Thesis doctoralis 1997. Universidad de Valencia.

SÁNCHEZ –SALORIO M.

Sobre el redescubrimiento de la placenta humana como agente terapéutico ocular.

Studium Ophthalmologicum 1999; Editorial. Págs 95-98.

SATO H, SCHIMAZI J, SHINOKZAKI N. R

Role of growth factors for ocular surface reconstruction after amniotic membrane transplantation.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1998; 39: S428.

SCHERMER A, GALVIN S, SUN T.

Differentiation -related expression of a major 64 K corneal keratin in vivo and in culture suggest limbal location of corneal epithelium stem cells.

J Cell Biol 1986; 103: 49-62.

SCHIRMER O.

Studien zur Physiologie und Pathologie der Tränenabsorption und Tränenabfuhr. Graefe's.

Arch Ophthalmol 1903; 56: 197-291.

SCHRAGE NF, KOMPA S, HALLER W, LANGEFELD S.

Use of an amphoteric lavage solution for emergency treatment of eye burns. First animal type experimental clinical considerations.

Burns 2002; 28: 782-786.

SCHUEL H, BURKMAN LJ, LIPPES J, CRICKARD K, FORESTER E, PIOMELLI D, GIUFFRIDA A.

N-Acylethanolamines in human reproductive fluids.

Chem Phys Lipids 2002; 121: 211-227.

SCHULTZ G, CHEGINI N, GRANT M, KHAW P, MACKAY S.

Effects of growth factors on corneal wound healing.

Acta Ophthalmol Suppl 1992; 202: 60-66.

SCHULTZ GS, STRELOW S, STERN GA, CHEGINI N, GRANT MB, GALARDY RE, GROBELNY D, ROWSEY JJ, STONECIPHER K, PARMLEY V, ET AL.

Treatment of alkali induced rabbit corneas with a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1992; 33: 3325-3331.

SCHWAB IR.

Cultured corneal epithelia for ocular surface disease.

Trans Am Ophthalmol Soc 1999; 97: 891-986.

SEKUNDO W, AUGUSTIN AJ, STREMPER I.

Topical allopurinol or corticosteroids and acetylcysteine in the early treatment of experimental corneal alkali burns: a pilot study.

Eur J Ophthalmol 2002; 12: 366-372.

SHAPIRO MS, FRIEND J, THOFT RA.

Corneal re-epithelization from the conjunctiva.

Invest Ophthalmol 1981; 21: 135-142.

SHIMAZAKI J, AIBA M, GOTO E, KATO N, SHIMMURA S, TSUBOTA K.

Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders.

Ophthalmology 2002; 109: 1285-1290.

SHIMAZAKI J, KOSAKA K, SHIMMURA S, TSUBOTA K.

Amniotic membrane transplantation with conjunctival autograft for recurrent pterygium.

Ophthalmology 2003; 110: 119-124.

SHIMAZAKI J, SHIMMURA S, FUJISHIMA H, TSUBOTA K.

Association of preoperative tear function with surgical outcome in severe Stevens-Johnson syndrome.

Ophthalmology 2000;107:1518-1523.

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.

SHIMAZAKI N, YANG HY, TSUBOTA K.

Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns.

Ophthalmology 1997; 104: 2068-2076.

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

Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders.

Cornea 2001; 20: 408-413.

SHORE JW, FOSTER S, WESTFALL CT, ET AL.

Results of buccal mucosal grafting for patients with medically controlled ocular cicatricial pemphigoid.

Ophthalmology 1992; 99: 383-395.

SHULMAN HM, SULLIVAN KM, WEIDEN PL.

Chronic graft versus host syndrome in man. A long term clinicopathologic study of 20 Seattle patients.

Am J Med 1980; 69: 204-217.

SIENNICKA A, PECOLD-STEPPEIEWSKA H, CZAJKA M.

Transplantation of amniotic membrane for patient with bullous keratopathy and chemical burns.

Klin Oczna 2003; 105: 41-45.

SINGH G, FOSTER CS.

Epidermal growth factor in alkali-burned corneal epithelial wound healing.

Am J Ophthalmol 1987; 103: 802-807

SMELER GK, OZANICS V, TOWNSEND W. Córnea y esclera. En: Smeler GK (ed). La morfología del ojo: Histología y estructura microscópica. Editorial Universitaria, Puerto Rico, 1980, 3-69.

SOLOMON A, ELLIES P, ANDERSON DF, TOUHAMI A, GRUETERICH M, ESPANA EM, TI SE, GOTO E, FEUER WJ, TSENG SC.

Long-term outcome of keratolimbic allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency.

Ophthalmology 2002; 109: 1159-1166.

SOLOMON A, ESPANA EM, TSENG SC.

Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the conjunctival fornices.

Ophthalmology 2003; 110: 93-100.

SOLOMON A, MELLER D, PRABHASAWAT P, JOHN T, ESPANA EM, STEUHL KP, TSENG SC.

Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocelles, and deep ulcers.

Ophthalmology 2002; 109: 694-703.

SORSBY A, HAYTHOME J, REED H.

Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye.

Br J Ophthalmol 1947; 31:409-418.

SORSBY A, SYMMONS HM.

Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns of second degree).

Br J Ophthalmol 1946; 30: 337-345.

SPIGELMAN AV, VERNOT JA, DEUTSCH TA, PEYMAN GA, MOLNAR J.

Fibronectin in alkali burns of the rabbit cornea.

Cornea 1985-86; 4: 169-72.

SRIDHAR MS, BANSAL AK, SANGWAN VS, RAO GN.

Amniotic membrane transplantation in acute chemical and thermal injury.

Am J Ophthalmol 2000; 130: 134-7.

SRIRIVASAN BD, EAKINS KE.

The reepithelialization of rabbit cornea following single and multiple denudation.

Exp Eye Res 1979; 29: 596-600.

STEIN MR, NAIDOFF MA AND DAWSON CR.

Intraocular pressure response to experimental alkali burns.

Am J Ophthalmol 1973; 75: 99.

STERN W.

The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated skin surfaces substituting skin grafts.

JAMA 1913; 13: 973-974.

STEUHL KP, SELBACH JM, BUSCHNASCK S.

Corneal substance P-ergic innervation in HSV-1 induced ulcerative keratitis before and after amniotic membrane transplantation in mice.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42: S90.

SU CY, LIN CP.

Combined use of an amniotic membrane and tissue adhesive in treating corneal perforation: a case report.

Ophthalmic Surg Lasers 2000; 31: 151-154.

SUBRAHMANYAM M.

Amniotic membrane as a cover for microskin grafts.

Br J Plastic Surg 1995; 48: 477-478.

T

TALMI YP, SIGLER L, INGE E.

Antibacterial properties of human amniotic membranes.

Placenta 1991; 12: 285-288.

TANELIAN DL.

Neurobiology of the rabbit cornea: an inquiry into the anatomy, electrophysiology, pharmacology and neurochemistry of a pain model.

Neurosciences Doctorate, 1983.

TENN PF, ET AL.

Fibronectin in alkali -burned rabbit corneas: enhancement of epithelial wound healing

Invest Ophthalmol Vis Sci 1985; 26 sup: 92.

TEPING C, REIM M.

Tenonplasty as a new surgical principle in the early treatment of the most severe chemical eye burns.

Klin Monatsbl Augenheilkd 1989; 194: 1-5.

THOFT RA.

Indications for conjunctival transplantation.

Ophthalmology 1982; 89: 335-339.

THOFT RA.

Conjunctival transplantation as an alternative to keratoplasty.

Ophthalmology 1979; 86: 1084-1092.

THOFT RA.

Keratoepithelioplasty.

Am J Ophthalmol 1984; 97: 1-6.

THOFT RA, FRIEND J.

Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1977; 16: 14-20.

THOFT RA, FRIEND J.

The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelium maintenance.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1983; 24: 1442-1443.

THOFT RA, FRIEND J, MURPHY HS.

Ocular surface epithelium and corneal vascularization in rabbits: I. The role of wounding.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1979; 18: 85-92.

THOFT RA, WILEY LA, SUNDARRAJ N.

The Multipotencial cells of the limbus.

Eye 1989; 3: 109-113.

TOLHURST DE, VAN DER HELM TW.

The treatment of vaginal atresia.

Surg Gynecol Obstet 1991; 172: 407-414.

TOUHAMI A, GRUETERICH M, TSENG SCG

The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2002; 43: 987-994.

TOWNSEND WM.

The limbal palisades of Vogt.

Trans Am Ophthalmol Soc 1991; 89: 721-756.

TRELFORD JD, TRELFORD-SAUDER M.

The amnion in surgery, past and present.

Am J Obstet Gynecol 1979; 134: 833-845.

TROENSAGAARD-HANSEN E.

Amniotic grafts in chronic skin ulceration.

Lancet 1950; 1: 859-860.

TSAI RJ, LI LM, CHEN JK.

Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells.

N Engl J Med. 2000; 343: 86-93.

TSAI RFJ, SUN TT, TSENG SCG.

Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits.

Ophthalmology 1990; 97: 446-455.

TSAI RFJ, TSENG SCG.

Effect of stromal inflammation on the outcome of limbal transplantation for corneal surface reconstruction.

Cornea 1995; 14: 439-449.

TSENG SCG.

Concept and application of limbal Stem cells.

Eye 1989; 3: 141-157.

TSENG SCG.

Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells

Mol Biol Rep 1996; 23: 47-58.

TSENG SC, FARAZDAGHI M, RIDER AA.

Conjunctival transdifferentiation induced by systemic vitamin A deficiency in vascularized rabbit corneas.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1987; 28: 1497-1504.

TSENG SC, PRABHASAWAT P, LEE S-H, ET AL.

Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction.

Am J Ophthalmol 1997; 124: 765-774.

TSENG SC, 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.

TSUBOTA K, SATAKE Y, KAIDO M, SHINOZAKI N, SHIMMURA S, BISSEN-MIYAJIMA H, SHIMAZAKI J.

Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation.

N Engl J Med 1999; 340: 1697-1703.

TSENG SCG, TSUBOTA K.

Important concepts for treating ocular surface and tear disorders.

Am J Ophthalmol 1997; 124: 825-835.

TSUBOTA K, SATAKE Y, OHYAMA M, TODA I, TAKANO Y, ONO M,
SHINOZAKI N, SHIMAZAKI J.

Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial
pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome.

Am J Ophthalmol 1996; 122: 38-52.

TSUBOTA K, SHIMAZAKI J.

Surgical treatment of children blinded by Stevens-Johnson syndrome.

Am J Ophthalmol 1999; 128: 573-581.

U

UCHIDA S, INANAGA Y, KOBAYASHI M.

Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial
cells.

J Neurosci Res 2000; 62: 585-590.

UCHIDA S, SUZUKI Y, ARAIE M.

Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of
purified rat ganglion cells.

Invest Ophthalmol Vi Sci 2001; 42:S750.

V

VAN HERENDAEL 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.

VASTINE DW, STEWART WB, SCHWAB IR.

Reconstruction of periocular mucous membrane by autologous conjunctival transplantation.

Ophthalmology 1982; 89: 1072-81.

W

WAGONER MD.

Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy.

Surv Ophthalmol 1997; 41: 275-313.

WAGONER MD, KENYON KR, GIPSON IK.

Polymorphonuclear neutrophils delay corneal epithelial wound healing in vitro.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1984; 25: 1257.

WANG MX, GRAY TB, PARK WC, PRABHASAWAST P, CULBERTSON W, FOSTER R, HANNA K; TSENG SC.

Reduction in corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits.

J Cataract Surg 2001; 27: 310-9.

WARD DJ, BENNETT JP.

The long-term results of the use of human amnion in the treatment of leg ulcers.

Br J Plastic Surg 1984; 37: 191-193.

WARING GO, BOURNE BM, EDELHAUSER HF ET AL.

The corneal endothelium: normal and pathologic structure and function.

Ophthalmology 1982; 89: 531-590.

WARING GO, LAIBSON PR, AND RODRIGUES M.

Clinical and pathologic alterations of Descemet's membrane, with emphasis on endothelial metaplasia.

Surv Ophthalmol 1974; 18: 325.

WATANABE K, NAKAGAWA S, NISHIDA T.

Stimulatory effects of fibronectin and EGF on migration of corneal epithelial cells.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1987; 28: 205.

WATSON AL, BURTON GJ.

A microscopical study of wound repair in the human placenta.

Micros Res Tech 1998; 42: 351-368.

WEIZG, WU RL, LAVKER RM, SUN TT.

In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34: 1814-1828.

WILEY L, SUNDARRAJ N, SUN T, THOFT RA.

Regional heterogeneity in human corneal and limbal apithelia: an immunohistochemical evaluation.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1991; 32: 594-602.

WILLIAMS PB, CROUCHER JR, CROUCHER, MAZAHERI M.

Topical aminocaproic acid facilitates reepithelialization of persistent epithelial defects.

Curr Eye Res 1999; 18: 150-157.

WOLFF E.

Mucocutaneous function of lid margin and distribution of tear fluid.

Trans Ophthalmol Soc UK 1946; 66: 291-308.

WOLFF E.

Anatomy of the eye and orbit. Blakiston. New York 1954, p 207-209.

WOO HM, KIM MS, KWEON OK, KIM DY, NAM TC, KIM JH.

Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodelling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea.

Br J Ophthalmol 2001; 85: 345-349.

X

Y

YAGHOUTIF, DOHLMAN CH.

Innovations in keratoprosthesis: proved and unproved.

Int Ophthalmol Clin 1999; 39: 27-36.

YAO YF, ZHANG B, ZHOU P, JIANG JK.

Autologous limbal grafting combined with deep lamellar keratoplasty in unilateral eye with severe chemical or thermal burn at late stage.

Ophthalmology 2002; 109: 2011-2017.

Z

ZAIKOVA MV, LIALIN AN.

Use of alloamniotic membrane in high progressive myopia

Vestn Oftalmol 1983; (1): 32-35.

ZAIKOVA MV, MOLOKOVA NF.

Umbilical tissue transplantation in progressive myopia

Vestn Oftalmol 1991; 107: 18-21.

ZITO E, BORDERIE V, TOUZEAU O, BOURCIER T, ALLOUCH C,
LAROCHE L.

Amniotic membrane transplantation in severe corneal epithelial diseases.
Preliminary results.

J Fr Ophthalmol 2002; 25: 879-888.

ZOHAR Y, TALMI YP, FINKELSTEIN Y, ET AL.

Use of human amniotic membrane in Otolaryngologie practice.

Laryngoscope 1987; 121: 215-225.