

# TRASPLANTE DE MEMBRANA AMNIÓTICA

Autores: Claudio Moreno García. Ramón Lorente Moore

Complejo Hospitalario Universitario de Ourense (CHUO)

## **INTRODUCCIÓN:**

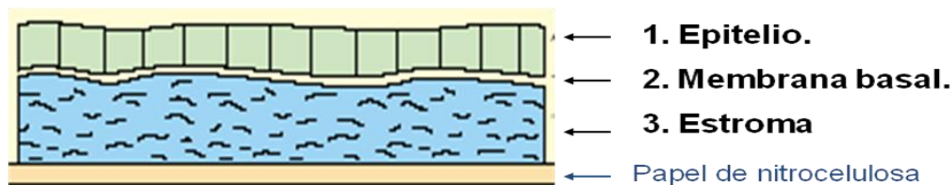
El uso de la membrana amniótica humana conservada ha sido uno de los grandes avances en la cirugía de la superficie ocular, debido a sus características: baja antigenicidad<sup>1</sup>, capacidad para frenar la destrucción tisular<sup>2</sup> y favorecer la epitelización a partir de las células sanas próximas conservando su fenotipo<sup>3</sup>, disminuir la inflamación y la neovascularización<sup>4</sup>, así como la formación de tejido cicatricial<sup>5,6</sup>, potencial antimicrobiano<sup>7</sup> y fácil conservación a escaso coste.

## **ANTECEDENTES HISTÓRICOS:**

A pesar de que su uso en la reparación quirúrgica de defectos cutáneos, data de comienzos del siglo XX, (Davis<sup>8</sup> 1910), no se describe su uso en oftalmología hasta 1940, cuando Roth<sup>9</sup> la utiliza para reparar defectos conjuntivales, pero la tasa de éxitos era baja, probablemente debido a la inclusión de corión. Sorsby<sup>10</sup> en 1946 la utilizó químicamente procesada "amnioplastina", como parche temporal para tratar las quemaduras oculares agudas, mostrando que cuanto más temprana era la intervención, más corta era la hospitalización. A pesar de su gran potencial terapéutico (agente inmunoregulador y tectónico biocompatible) debido a problemas con su conservación adecuada, su utilización no se generalizó hasta finales de los 90, cuando Kim, Tseng y Tsubota, Prabhasawat<sup>11-14</sup> extienden su uso y en España Gris<sup>15</sup>.

## **HISTOLOGÍA:**

La membrana amniótica es la capa más interna de la placenta de 0.2-0.5mm de espesor, es una membrana fuerte, pero muy flexible, y avascular, está formada por tres capas de dentro a fuera.



El epitelio contiene factores de crecimiento y citoquinas que favorecen un microambiente para la proliferación de células germinales.

La membrana basal de la córnea, la conjuntiva y la membrana amniótica contiene colágeno tipo IV, V y VII, fibronectina y laminina<sup>16</sup>. Esta estructura favorece la adhesión de las células epiteliales. El colágeno tipo V ayuda al anclaje de las células epiteliales al estroma<sup>17</sup>.

La matriz estromal sería la responsable del poder antifibrótico, así como del atrapamiento de las células inflamatorias y su rápida apoptosis. También contiene proteínas antiinflamatorias y antiangiogénicas y sustancias inhibitoras de proteasas.

#### **INMUNOLOGIA:**

1. Baja antigenicidad (baja expresión de antígenos de histocompatibilidad A, B, C y DR). Explicaría que la membrana amniótica no produzca respuestas inmunitarias significativas en el lugar del implante, ni anticuerpos HLA en el suero del receptor<sup>1</sup>.
2. Expresión de ARMs de un gran número de factores de crecimiento: EGF, KGF, HGF y bFGF<sup>3</sup> en su cara epitelial.
3. Potente efecto antiinflamatorio mediado por la interleukina 10 (IL10), la cual suprime a citoquinas proinflamatorias como la IL6, TNF- $\alpha$ , e IL8<sup>18-20</sup>.
4. Es un potente inhibidor de la IL1, mediante el bloqueo del receptor de la IL1<sup>21,22</sup>.
5. Aumento del índice de apoptosis de células inflamatorias<sup>23-27</sup>.
6. Inhibición de proteinasas<sup>28,29</sup>.
7. Disminución de factores de diferenciación de miofibroblastos<sup>5,6,30-32</sup>.
8. Inhibidores tisulares de metaloproteinasas<sup>33</sup>.

#### **EFFECTOS CLÍNICOS:**

1. Efecto tectónico en defectos estructurales extensos<sup>34-39</sup>.
2. Efecto promotor de epitelización (migración y adhesión)<sup>3,11,40-42</sup>.
3. Aporte e integración de sustrato estromal.
4. Disminución de inflamación<sup>18-27</sup> y neovascularización<sup>4,43,44</sup>.
5. Disminución de tejido cicatricial<sup>5,6,30-32</sup>.
6. Efecto neuroprotector<sup>45,46</sup>.
7. Barrera antimicrobiana<sup>7,47</sup>.
8. Efecto antiálgico.
9. Medio para cultivo celular in vivo e in vitro (células epiteliales y limbares)<sup>48-54</sup>.

En resumen, en general la membrana amniótica tiene un efecto “**tranquilizador**” en situaciones catastróficas.

## INDICACIONES:

### A nivel conjuntival:

1. Lesiones conjuntivales neoplásicas extensas con muy buen resultado estético<sup>34-39</sup>.
2. Pterigiom de gran tamaño, o pacientes susceptibles de cirugía de glaucoma, ya que sus resultados son peores que el autotransplante conjuntival<sup>55-59</sup> (Fig.1).

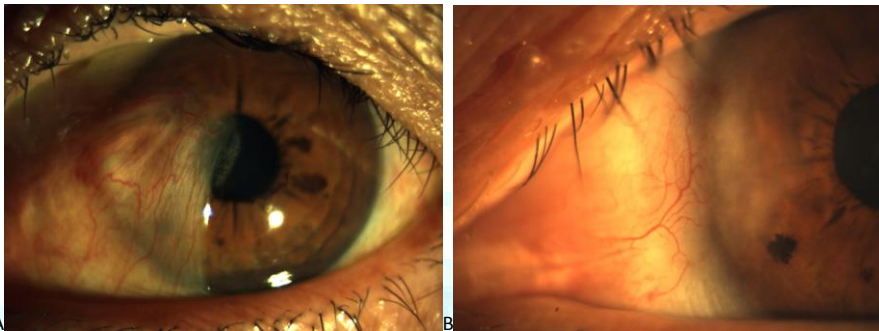


Fig.1: A. Pterigiom de gran tamaño. B. Imagen final sin recidiva, habiendo utilizado membrana amniótica para cubrir la esclera.

3. Conjuntivochalasia<sup>60-62</sup>.
4. Simblefarón u otro tipo de cicatrices conjuntivales<sup>63-67</sup>.
5. En casos de seidel de la ampolla de filtración en la trabeculectomía, asociada a injerto escleral, si es necesario, recordar que sobre lechos isquémicos (mitomicina) sus resultados no son buenos<sup>68-70</sup>.

### A nivel corneal.

1. Defecto epitelial persistente con o sin ulceración estromal, desmatocoele y perforación corneal<sup>71-80</sup> (Fig. 2).



Fig. 2: A. Perforación corneal herpética. B. Cámara anterior formada, pérdida del parche de membrana amniótica. C. Integración de las capas en el estroma corneal.

2. Lisis corneal generalizada: la utilizaríamos con el fin de frenar la lisis corneal, rellenar mediante trasplante multicapa la zona destruida y favorecer la regeneración corneal<sup>81-85</sup> (Fig. 3).

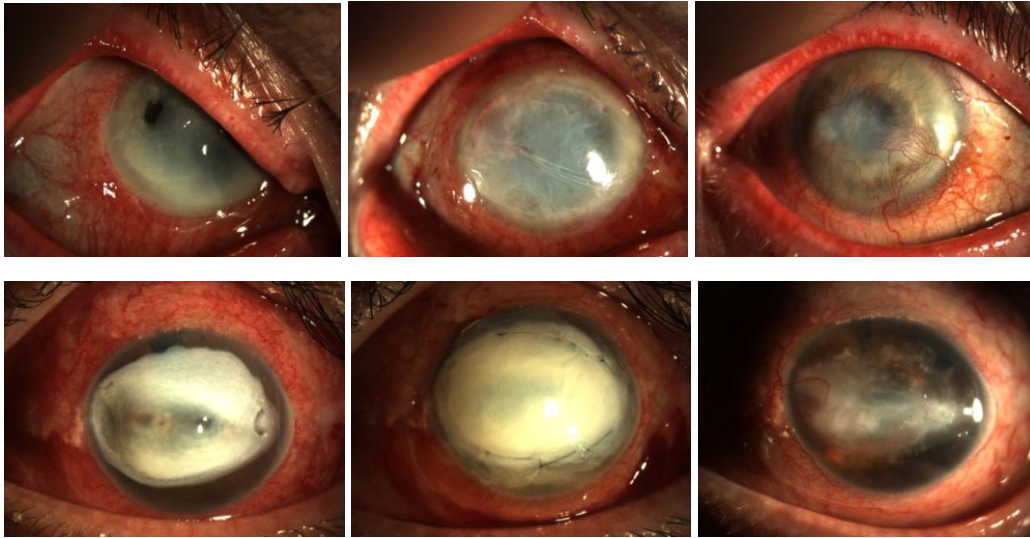


Fig. 3: Dos casos de lisis corneal generalizada por AINEs tópicos, controlados con cirugía de implante multicapa y parche de membrana amniótica. El caso inferior precisó dos intervenciones para controlar la lisis corneal.

3. Queratopatía en banda: tras la eliminación de los depósitos de calcio con raspado corneal con EDTA, la utilización de membrana amniótica como recubrimiento, favorece la epitelización corneal, disminuye la inflamación y la fibrosis corneal<sup>86-88</sup> (Fig. 4).



Fig. 4: Queratopatía en banda eliminada mediante raspado mecánico con EDTA, y utilización de membrana amniótica, para favorecer la epitelización corneal, disminuyendo la inflamación y la fibrosis.

4. Queratopatía bullosa, con el implante monocapa de membrana amniótica el resultado a largo plazo no es bueno, o no mejor que si realizamos solamente micropunciones estromales corneales. Mejor que la técnica clásica monocapa, es realizar una queratectomía corneal lamelar e injerto multicapa de membrana amniótica, o asociarla a micropunciones estromales corneales<sup>89-92</sup>(Fig. 5).

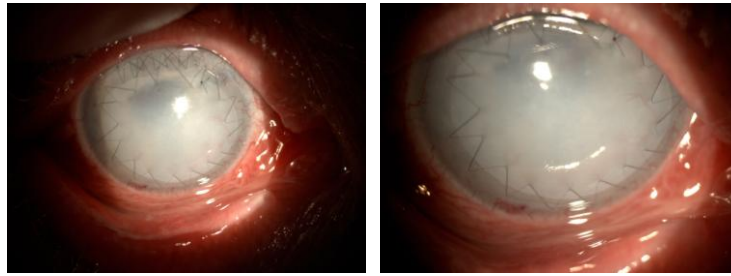


Fig. 5: Extracción de lente de cámara anterior en ojo en escaso potencial visual y colocación de implante monocapa y parche de membrana amniótica.

### 5. Insuficiencia limbar parcial<sup>93-97</sup> (Fig. 6).

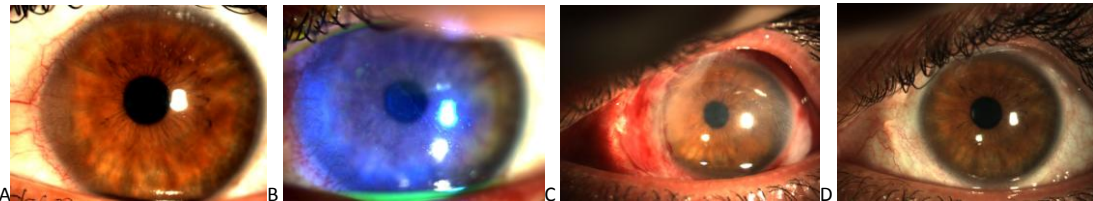


Fig. 6: A,B. Insuficiencia limbar de 180° con conjuntivización corneal, C. Implante de membrana amniótica en limbo, eliminación de epitelio conjuntival sobre cornea. D. A los 3 meses de la cirugía.

Otras indicaciones:

1. En la fase aguda de agresiones oculares para disminuir las complicaciones agudas y tardías:
  - a. Quemaduras químicas o térmicas<sup>98-104</sup>.
  - b. Necrosis epidérmica y síndrome de Stevens- Johnson<sup>105-109</sup>.
  - c. Láser Excimer<sup>110-111</sup>.
2. Trasplante de cornea: prevención, especialmente cuando sospechemos problemas de epitelización o alto riesgo de rechazo así como tratamiento del mismo<sup>112-113</sup> (Fig. 7).

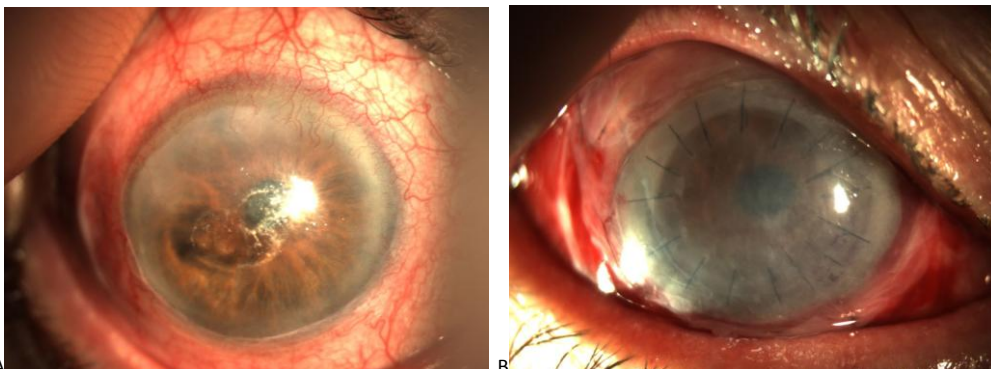


Fig. 7: A. Paciente con insuficiencia limbar por uso crónico de lentes de contacto. B. Se le realiza queratoplastia e injerto limbar de 180°, con recubrimiento de membrana amniótica.

3. Queratoconjuntivitis vernal<sup>114</sup>.
4. Medio para cultivo celular in vitro (células epiteliales y limbares)<sup>48-54</sup>

## TÉCNICA QUIRÚRGICA:

Se han descrito dos formas de implantarla, como **injerto**: con el estroma hacia abajo. O como **recubrimiento**: con el estroma hacia arriba. La cara estromal podemos diferenciarla de la epitelial, porque al tocarla con la hemosteta se queda adherida a la misma "efecto vítreo".

## UTILIZACIÓN COMO INJERTO.

El objetivo es el efecto físico de la propia membrana y el microambiente de los diferentes factores que aporta, para que se produzca el crecimiento del tejido epitelial por encima de la membrana amniótica restableciendo la superficie ocular. Además, proporciona una *reducción de la inflamación, de la vascularización y de la formación de cicatrices*. Limpiamos con hemostetas el lecho receptor y eliminamos el tejido epitelial próximo en mal estado y procedemos a suturar el fragmento de membrana amniótica, previamente recortado según el tamaño del defecto, al borde del tejido sano adyacente, sin sobrepasar los márgenes del defecto epitelial, con el fin de que este lo cubra y quede englobado en la superficie ocular. Con el uso de pegamentos biológicos, como el Tissucol, es más fácil y más rápido conseguir ajustar el tamaño de la membrana amniótica al borde del defecto, que usando suturas.

Basándose en estos efectos terapéuticos el injerto de membrana amniótica puede usarse en la **reconstrucción de la superficie conjuntival**. Los resultados demuestran que el área a reconstruir puede ser extensa siempre que el lecho no esté isquémico y el epitelio de los márgenes sea normal, así como el estroma subconjuntival, el resultado además al inhibir la formación de cicatrices es estéticamente muy bueno.

**A nivel de la córnea** se usa en el tratamiento de defectos epiteliales persistentes que no responden al tratamiento médico, cuando existe afectación estromal la utilizamos como injerto multilaminado, varias capas de membrana amniótica, para rellenar el defecto y conseguir una cicatrización estable (Fig. 9). También se usa en el tratamiento del desmatocoele y perforaciones corneales, en estos casos realizo sutura intraestromal continua y puntos sueltos si son necesarios, en tejido corneal sano, para sellar la perforación y recuperar el tono ocular<sup>115</sup> (Fig. 8).

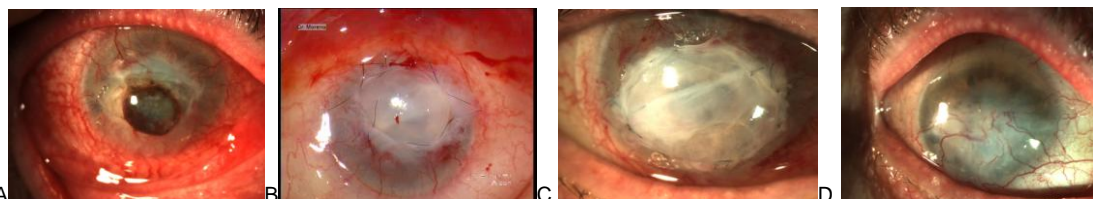


Fig. 8: A. Perforación corneal gigante herpética. B. Implante multicapas de membrana amniótica, las suturas continuas intraestromales y los puntos sueltos nos permiten conseguir el sellado de la perforación corneal ("huevo frito"). C. Recuperación del tono ocular por sellado de la perforación corneal. D. Integración de la membrana amniótica en el estroma corneal.

En la córnea, que normalmente es avascular, el injerto puede permanecer meses limitando la transparencia en mayor o menor grado. Razón por la que no es un procedimiento indicado en los casos en que únicamente existe un defecto epitelial con afectación del eje visual, ya que su integración en la cornea disminuiría la visión.

## UTILIZACIÓN COMO RECUBRIMIENTO

A nivel de la cornea el fragmento de la membrana amniótica sobrepasaría los márgenes del defecto epitelial, de manera que el objetivo es conseguir reducir el proceso inflamatorio, favorecer la epitelización y disminuir el proceso de cicatrización y vascularización bajo la membrana. Buscaríamos su utilidad como microambiente más que como sustrato. Como muestra la figura 9 sobrepasamos los bordes del defecto estromal y la fijamos con una sutura continua de nylon 10-0. Podemos usarla cubriendo toda la cornea comportándose como una lentilla terapéutica biológica. Se fija mediante una sutura continua con nylon 10-0 a epiesclera perilimbrica (Fig. 9). Suele durar entre 7 o 15 días, después se desprende en su totalidad sin que queden restos en la superficie ocular que pudiesen comprometer la transparencia.

Utilizo al final de la cirugía cornea una lente de contacto terapéutica, el éxito de la cirugía esta en íntima relación con el centrado de la lente, ya que si esta queda descentrada con el parpadeo las membranas se caerán por cizallamiento, en 2 o 3 días. Existen lentes de contacto de gran diámetro para evitar este problema, pero su precio es mucho mayor que las convencionales.

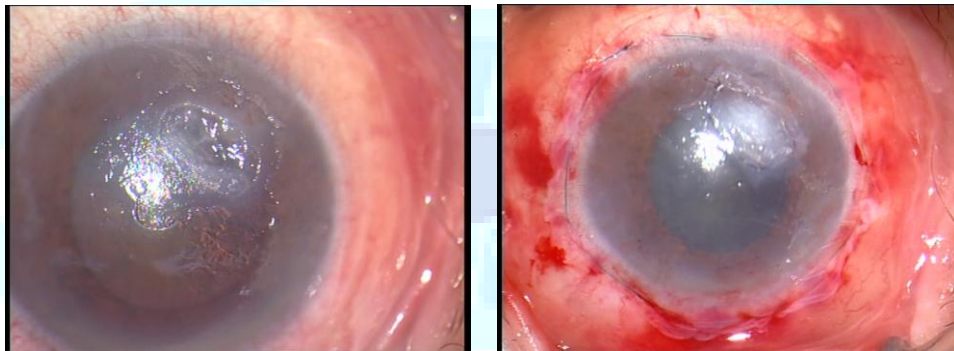


Fig. 9: A. Úlcera corneal crónica. B. injerto multicapa sobre el lecho de la úlcera, y recubrimiento de membrana amniótica suturado a epiesclera con nylon de 10-0.

## QUEMADURAS, SÍNDROME DE STEVEN JOHNSON Y NECROLISIS EPIDÉRMICA TOXICA

En agresiones oculares agudas muy severas (quemaduras químicas, térmicas, síndrome de Steven Johnson y necrolisis epidérmica tóxica), se utilizaría membrana amniótica en la fase aguda cubriendo toda la superficie ocular y de esta manera disminuir las secuelas, siendo necesario en cuadros muy severos repetir varias veces el uso de membrana amniótica para controlar la inflamación ocular. En los casos en que podamos dudar en utilizar membrana amniótica pensar que el periodo para prevenir secuelas muy graves es de 2-3 semanas desde el comienzo de la agresión.

**Descripción de la técnica:** la superficie ocular se cubre con membrana amniótica con el estroma hacia abajo, utilizamos 3 fragmentos de membrana amniótica, ya que las piezas que disponemos son de 4x4cm. Primero recubrimos la conjuntiva tarsal y el borde palpebral sobrepasando las pestañas 2 mm, las cuales previamente hemos cortado, se elimina todo el material necrótico y adherencias presentes, se fija en el borde palpebral con nylon 8-0, y desde los fondos de saco con prolene de 6-0 de doble aguja atravesamos todo el espesor palpebral y anudamos en piel interponiendo

catéteres intravenosos de 1 cm de anchura, de esta forma con 2 puntos en cada párpado fijaríamos las piezas de membrana amniótica. La tercera pieza se colocaría cubriendo cornea y conjuntiva bulbar, se fija a 2 mm de limbo con una sutura continua de nylon 10-0 y con puntos sueltos en cada cuadrante de la conjuntiva bulbar. Valorar el uso de anillos de simbléfaron según el tamaño ocular. Es conveniente usar suturas no absorbibles porque producen menor inflamación<sup>107</sup> (Fig. 10-11).

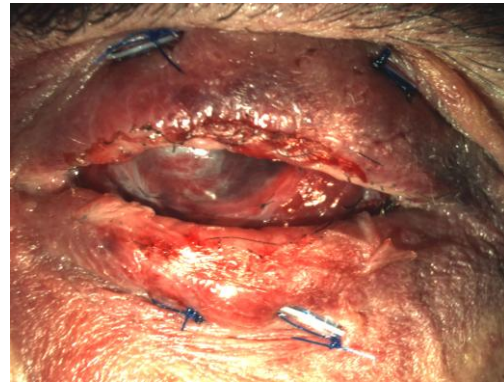
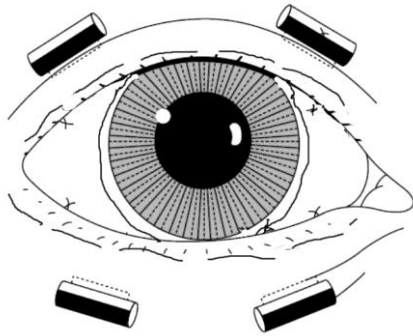


Fig. 10: A. Dibujo de técnica quirúrgica. B. Fotografía de la técnica quirúrgica para la fijación de la membrana amniótica a la superficie ocular y borde palpebral ante lesiones agudas muy graves: Quemaduras químicas y térmicas, síndrome de Steven Johnson y necrosis epidérmica tóxica.



## BIBLIOGRAFÍA:

1. Adinolfi M, McColl I, Fensom AH, et al. Expression of HLA antigens, beta-2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 1982;295:325.
2. Boudreau N, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3500-13.
3. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20:173
4. Hao Y, Ma DH, Hwang DG. Identification of antiangiogenic and anti-inflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000;19:348.
5. Lee SB, Li DQ, Tan DT, et al. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20:325.
6. Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999;179:325.
7. Robson M, Krizek TJ. The effect of the human amniotic membranes on the bacterial population of infected rat burns. *Ann Surg* 1973;177:144.
8. Davis JS. Skin transplantation. With a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *JHH Report* 1910;15:307.
9. De Rotth A: Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 1940; 23: 522-5.
10. Sorsby A, Symons HM: Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye: (Burns of the second degree). *Br J Ophthalmol* 1946;30: 337-45.
11. Kim JC, Tseng SC: Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14: 473-84.
12. Batlle JP, Perdomo FJ. Placental membranes as a conjunctival substitute. *Ophthalmology* 1993; 100:107.
13. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997;124:765-74.
14. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996 Jul; 122(1):38-52.
15. Gris O , Güell JL , López-Navidad A , et al. Application of the amniotic membrane in ocular surface pathology . *Ann Transplant.* 1999;4:82-84.
16. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida T. Differential distribution of sub-chains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conunctiva. *Cornea* 1999;18:73-9.
17. Modesti A, Kalebic T, Scarpa S, Togo S, Grotendorst G, Liotta LA, et al . Type V collagen in human amnion is a 12 nm fibrillar component of the pericellular interstitium. *Eur J Cell Biol* 1984;35:246-55.
18. Fortunato SJ, Menon R, Swan KF, Lombardi SJ. Interleukin-10 inhibition of interleukin-6 in human amniochorionic membrane: transcriptional regulation. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1057-65.
19. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta inhibit amniochorion tumor necrosis factor-alpha production by contrasting mechanisms of action: therapeutic implication in prematurity. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:803-9.
20. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. The effect of transforming growth factor and interleukin-10 on interleukin-8 release by human amniochorion may regulate histologic chorioamnionitis. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:794-9.
21. Romero R, Gomez R, Galasso M, et al. The natural interleukin-1 receptor antagonist in the fetal, maternal, and amniotic fluid compartments: the effect of gestational age, fetal gender, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:912-21.
22. Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, et al. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001;85:444-9.
23. Park WC, Tseng SC. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2906-14.
24. Wang MX, Gray TB, Parks WC, et al. Reduction in corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in Excimer laser photoablation in rabbits. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:310-9

25. Heiligenhaus A, Meller D, Meller D, et al. Improvement of HSV-1 necrotizing keratitis with amniotic membrane transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1969-74.
26. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001;20:408-13.
27. Savill J, Haslett C. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol* 1995;6:385-93.
28. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001;20:408-13.
29. Na BK, Hwang JH, Shin, et al. Analysis of human amniotic membrane components as proteinase inhibitors for development of therapeutic agent of recalcitrant keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:S90.
30. Tseng SC, Li D, Ma X: Down-regulation of TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3 and TGG $\beta$  receptor II statement in human corneal fibroblasts by amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:428 S.
31. Kim TH, Lee DY, Rho JH, Rho SH, Yoo KW, Ahn HB, Yoo YH, Park WC. Application of newly developed amniotic membrane ointment for photorefractive keratectomy in rabbits. *Ophthalmic Res* 2006;38:58-61.
32. Li DQ, Tseng SCG. Three patterns of cytoquine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interaction of human ocular surface. *J Cell Physiol* 1995;163:61-79.
33. Riley SC, Leask R, Denison FC, et al. Secretion of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase by human fetal membrane, decidua, and placenta at parturition. *J Endocrinol* 1999;162:351-9.
34. Paridaens D, Beekhuis H, van Den Bosch W et al. Amniotic membrane transplantation in the managements of conjunctival malignant melanoma and primary acquired melanosis with atypia. *Br J Ophthalmol* 2001;85:658-661.
35. Shields CL, Shields JA, Armstrong T. Management of conjunctival and corneal melanoma with surgical excision, amniotic membrane allograft and topical chemotherapy. *Am J Ophthalmol* 2001;132:576-8.
36. Espana EM, Prabhasawat P, Grueterich M, Solomon A, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for reconstruction after excision of large ocular surface neoplasias. *Br J Ophthalmol* 2002; 86:640-5.
37. Sangwan VS, Sridhar MS, Vemuganti GK. Treatment of complex choristoma by excision and amniotic membrane transplantation. *Arch Ophthalmol* 2003;121:278-80.
38. Gris O, Del Campo Z, Wolley-Doc C. Conjunctival healing after amniotic membrane graft over ischemic sclera. *Cornea* 2003; 22:657-678.
39. Rodríguez C, Gris O, Soler N. Trasplante membrana amniotica tras resección quirúrgica en sarcoma de kaposi conjuntival. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2005;80:525-528.
40. Terranova VP, Lyall RM. Chemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin : a mechanism for epithelial cell apical migration. *J Periodontol* 1986;57:311.
41. Koizumi N, Fullwood NK, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ: Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2506-13.
42. Yeh L, Chen W, Li W, Espana EM, Ouyang J, Kawakita T, Kao WW, Tseng SCG, Liu C: Soluble Lumican glycoprotein purified from human amniotic membrane promotes corneal epithelial wound healing. *IOVS* 2005;46:479-486.
43. Kim JC, Tseng S.C.G. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol* 1995;9:32.
44. Kobayashi N, Kabuyama Y, sasaki S, Sato K, Homma Y. Suppression of corneal neovascularisation by culture supernatant of human amniotic cells. *Cornea* 2002;21:62-67.
45. Schroeder A, Theiss C, Steuhl KP, Meller K, Meller D: Effects of the human amniotic membrane on axonal outgrowth of dorsal root ganglia neurons in culture. *Curr Eye Res* 2007; 32: 731-8.
46. Touhami A, Grueterich M, Tseng SC: The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 987-94.
47. Gicquel JJ, Vejan RA, Ellies P, et al: Amniotic membrane transplantation in severe bacterial keratitis. *Cornea* 2007;26:27-33.
48. Selvam S, Thomas PB, Yiu SC: Tissue engineering: Current and future approaches to ocular surface reconstruction. *Ocul Surf* 2006;4(3):120-136.
49. Tseng SCG, et al. How does amniotic membrane work? *Ocul Surf* 2004;2(3):177-187.

50. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol* 2003;48(6):631-46.
51. Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000;19(4):421-26.
52. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343(2):86-93.
53. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, et al. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998;116(4):431-41.
54. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, et al. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 1999;340(22):1697-703.
55. Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SC. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997; 104: 974-985.
56. Fernandes M, Sangwan VS, Bansal AK, Gangopadhyay N, Sridhar MS, Garg P, et al. Outcome of pterygium surgery: Analysis over 14 years. *Eye* 2005;19:1182-90.
57. Solomon A, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation after extensive removal of primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology* 2001;108:449-60.
58. Ma DH, See LC, Hwang YS, Wang SF. Comparison of amniotic membrane graft alone or combined with intraoperative mitomycin C to prevent recurrence after excision of recurrent pterygia. *Cornea* 2005;24:141-5.
59. Sangwan VS, Murthy SI, Bansal AK, Rao GN. Surgical treatment of chronically recurring pterygium. *Cornea* 2003;22:63-5.
60. Fernández-Hortelano A, Moreno-Montañés J, Heras-Mulero H. Injerto de membrana amniótica con adhesivo tisular en el tratamiento de la conjuntivocalasia refractiva. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007; 82: 571-574.
61. Meller D, Maskin SL, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for symptomatic conjunctivochalasis refractory to medical treatments. *Cornea* 2000;19:796-803.
62. Georgiadis NS, Terzidou CD. Epiphora caused by conjunctivochalasis: treatment with transplantation of preserved human amniotic membrane. *Cornea* 2001;20:619-21.
63. Barabino S, Rolando M, M Bentivoglio G, Mingari C. Role of Amniotic Membrane Transplantation for Conjunctival Reconstruction in Ocular-Cicatricial Pemphigoid. *Ophthalmology* 2003;110:474-480.
64. Solomon A, Edgar M, Espana E, Scheffer C. G. Tseng. Amniotic Membrane Transplantation for Reconstruction of the Conjunctival Fornices. *Ophthalmology* 2003;110:93-100.
65. Honavar SG, Bansal AK, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in Stevens Johnson syndrome. *Ophthalmology* 2000;107:975-9.
66. Jain S, Rastogi A. Evaluation of the outcome of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in symblepharon. *Eye* 2004;18(12):1251-7.
67. Tseng SC, Di Pasquale MA, Liu DT, et al. Intraoperative mitomycin C and amniotic membrane transplantation for fornix reconstruction in severe cicatricial ocular surface diseases. *Ophthalmology* 2005;112(5):896-903.
68. Fujishima H, Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K, et al. Trabeculectomy with the use of amniotic membrane for uncontrollable glaucoma. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998;29:428-31.
69. Budenz DL, Barton K, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs. *Am J Ophthalmol* 2000;130:580-8.
70. Barton K, Budenz D, Khaw et al. Amniotic membrane transplantation in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38, S473.
71. Chen HJ, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol* 2000 Aug; 84(8): 826-833.
72. Khokar S, Natung T, Sony P, et al. Amniotic membrane transplantation in refractory neurotrophic corneal ulcers: a randomised controlled clinical trial. *Cornea* 2005;24(6):654-60.
73. Lee SH, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997;123:303-12.
74. Gris O, Campo Z, Wolley-Dod, et al. Amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens for the treatment of epithelial disorders. *Cornea* 2002;21:22-7.
75. Solomon A, Meller D, Prabhasawat P. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocoeles, and deep ulcers. *Ophthalmology* 2002;109:694-703.

76. Hick S, Demers PE, Brunette I, et al. Amniotic membrane transplantation and fibrin glue in the management of corneal ulcers and perforations: a review of 33 cases. *Cornea* 2005;24(4):369–77.
77. Letko E, Stechschulte SU, Kenyon KR, et al. Amniotic membrane inlay and overlay grafting for corneal epithelial defects and stromal ulcers. *Arch Ophthalmol* 2001;119(5):659–63.
78. Heiligenhaus A, Li H, Hernandez Galindo EE, Koch JM, Steuhl KP, Meller D. Management of acute ulcerative and necrotising herpes simplex and zoster keratitis with amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1215-9.
79. Rodriguez-Ares MT, Tourino R, Lopez-Valladares MJ, Gude F. Multilayer amniotic membrane transplantation in the treatment of corneal perforations. *Cornea* 2004;23:577-83.
80. Kruse FE, Rohrschneider K, Volcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999;106:1504-11.
81. Chen JH, Ma DH, Tsai RJ. Amniotic membrane transplantation for pseudomonal keratitis with impending perforation. *Chang Gung Med J* 2002;25:144-52.
82. Gicquel JJ, Bejjani RA, Ellies P, Mercie M, Dighiero P. Amniotic membrane transplantation in severe bacterial keratitis. *Cornea* 2007;26:27-33.
83. Bourcier T, Patteau F, Borderie V, Baudrimont M. Amniotic membrane transplantation for the treatment severe acanthamoeba keratitis. *Can J Ophthalmol*. 2004 Oct;39(6):621-31.
84. Kim JS, Kim JC, Hahn TW, Park WC. Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcer. *Cornea*. 2001 Oct;20(7):720-6.
85. Altinok AA, Balikoglu M, Sen E, Serdar K. Nonpreserved amniotic membrane transplantation for bilateral toxic keratopathy caused by topical anesthetic abuse: a case report. *J Med Case Rep*. 2010 Aug 10;4:262. doi: 10.1186/1752-1947-4-262.
86. Anderson DF, Prabhasawat P, Alfonso E, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation after the primary surgical management of band keratopathy. *Cornea* 2001;20:354-61.
87. Im SK, Lee KH, Yoon KC. Combined ethylenediaminetetraacetic acid chelation, phototherapeutic keratectomy and amniotic membrane transplantation for treatment of band keratopathy. *Korean J Ophthalmol*. 2010 Apr;24(2):73-7.
88. Kwon YS, Song YS, Kim JC. New treatment for band keratopathy: superficial lamellar keratectomy, EDTA chelation and amniotic membrane transplantation. *J Korean Med Sci*. 2004 Aug;19(4):611-5.
89. Ferrando N, Sánchez J, Del Valle F. Injerto de membrana amniótica monocapa como tratamiento paliativo de la queratopatía bullosa. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2004; 79: 27-32
90. Espana EM, Grueterich M, Sandoval H. Amniotic membrane transplantation for bullous keratopathy in eyes with poor visual potential. *J Cataract Refract Surg*. 2003 Feb;29(2):279-84.
91. Paris Fdos S, Gonçalves ED, Campos MS, Sato EH, Dua HS, Gomes JÁ. Amniotic membrane transplantation versus anterior stromal puncture in bullous keratopathy: a comparative study. *Br J Ophthalmol*. 2013 Aug;97(8):980-4.
92. Gregory ME, Spiteri-Cornish K, Hegarty B, Mantry S, Ramaesh K. Combined amniotic membrane transplant and anterior stromal puncture in painful bullous keratopathy: clinical outcome and confocal microscopy. *Can J Ophthalmol*. 2011 Apr;46(2):169-74.
93. Scheffer C, Tseng G, Prabhasawat P. 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.
94. Shahdadfar A, Haug K, Pathak M. Ex vivo expanded autologous limbal epithelial cells on amniotic membrane using a culture medium with human serum as single supplement. *Exp Eye Res*. 2012 Apr;97(1):1-9.
95. Kheirkhah A, Casas V, Raju VK. Sutureless amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol*. 2008 May;145(5):787-94.
96. Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, Rao GN. Amniotic Membrane transplantation for reconstruction of corneal epithelial surface in cases of partial limbal stem cell deficiency. *Indian J Ophthalmol*. 2004 Dec;52(4):281-5.
97. Anderson DF, Ellies P, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2001;85:567-75.
98. Meller D, Pires RTF, Mack RJS, et al. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology*. 2000;107(5):980-990.
99. Bouchard CS, John T. Amniotic membrane transplantation in the management of severe ocular surface disease: indications and outcomes. *Ocul Surf*. 2004;2(3):201-211.

100. Sridhar MS, Bansal AK, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation in acute chemical and thermal injury. *Am J Ophthalmol.* 2000;130(1):134-137.
101. Ucakhan OO, Koçlu G, Firat E. Nonpreserved human amniotic membrane transplantation in acute and chronic chemical eye injuries. *Cornea.* 2002;21(2):169-172.
102. Tejwani S, Kolari RS, Sangwan VS, Rao GN. Role of amniotic membrane graft for ocular chemical and thermal injuries. *Cornea.* 2007;26(1):21-26.
103. Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000; 70: 329-337.
104. Tamhane A, Vajpayee RB, Biswas NR, et al. Evaluation of amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical therapy as compared with medical therapy alone in acute ocular burns. *Ophthalmology.* 2005;112(11):1963-1969.
105. Kobayashi A, Yoshita T, Sugiyama K, Miyashita K, Niida Y, Koizumi S, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation in acute phase of toxic epidermal necrolysis with severe corneal involvement. *Ophthalmology.* 2006 Jan;113(1):126-3.
106. Gregory DG. The ophthalmologic management of acute Stevens-Johnson syndrome. *Ocul Surf* 2008;6(2):87-95.
107. Gregory DG. Treatment of acute Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis using amniotic membrane: a review of 10 consecutive cases. *Ophthalmology* 2011;118:908-914.
108. Hamas MC, Lai EC, Sarkar JS, et al. Management of acute Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis utilizing amniotic membrane and topical corticosteroids. *Am J Ophthalmol* 2010;149:203-213.
109. Shay E, Kheirkhah A, Liang L, et al. Amniotic membrane transplantation as a new therapy for the acute ocular manifestations of Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Surv Ophthalmol* 2009;54:686-696.
110. Park WC, Tseng SC. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Sep;41(10):2906-14.
111. Wang MX, Gray TB, Park WC, Prabhawat P, Culbertson W, Forster R, et al. Reduction in corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. *J Cataract Refract Surg* 2001;27:310-19.
112. Ueta M, Kweon MN, Sano Y, et al. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clinical and Experimental Immunology* 2002; 129: 464-70.
113. Seitz B, Das S, Sauer R, Mena D. Amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defects in eyes after penetrating keratoplasty. *Eye (Lond).* 2009 Apr;23(4):840-8.
114. Sridhar MS, Sangwan VS, Bansal AK, Rao GN. Amniotic Membrane Transplantation in the Management of Shield Ulcers of Vernal Keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 2001;108:1218-1222.
115. Del Campo Z, Gris O. Aplicaciones de la membrana amniótica en patología ocular. *Annals d'Oftalmología* 2002; 10(3):128-141.