

Tesis Doctoral Internacional / International Doctoral Thesis

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL USO DE MEMBRANA AMNIÓTICA  
EN PATOLOGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR.**

**Evaluation of the effects of the use of amniotic membrane in ocular surface  
pathology**



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA

**JAVIER LACORZANA RODRÍGUEZ**

2022

Directores: Antonio Campos Muñoz  
José Luis García Serrano

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Javier Lacorzana Rodríguez  
ISBN: 978-84-1117-632-3  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/79157>



*“Caminante, son tus huellas el camino y nada más.  
Caminante, no hay camino: se hace camino al andar.  
Al andar, se hace camino, y al volver la vista atrás  
se ve la senda que nunca se ha de volver a pisar.  
Caminante, no hay camino, sino estelas en la mar”.*

*Antonio Machado*



## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de esta tesis ha sido un camino provechoso que no hubiese sido posible sin la ayuda de muchas personas que, de manera profesional o personal, han participado en su desarrollo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis dos directores de tesis:

- Al Profesor José Luis García Serrano, quien me ayudó cuando mis habilidades y conocimientos eran básicos, era cuando más ayuda necesitaba. Ahora, cuando echo la vista atrás, me doy cuenta de todo el tiempo que me dedicó.
- Al Catedrático Antonio Campos Muñoz, uno de mis primeros profesores y quién me mostró que, con trabajo y esfuerzo, todo se consigue. Ojalá llegue a tener siempre esa energía vital que usted tiene.
- La tesis es el principio de una etapa investigadora, que espero que sea la mitad de prolífera que la de ustedes. Muchas gracias.

En segundo lugar, también querría agradecer su colaboración al Catedrático Miguel Alaminos Mingorance. Con él empezó este proyecto como trabajo fin de master. Sin su ayuda esto no hubiese sido posible. Gracias.

También quería agradecer su influencia a todas las personas que pasaron por mi infancia dejando grandes recuerdos, especialmente a Sor Concepción Vallejo, de mi colegio Santo Rosario de Motril.

A todo el departamento de oftalmología del Hospital Virgen de las Nieves (Granada, España), residentes, adjuntos, ópticos, enfermeras y auxiliares de enfermería que tanto me ayudaron durante mi residencia. Especialmente a las tres personas que tanto hicieron por facilitar mi faceta investigadora, mis jefes de Servicio, Dra. Marina Rubio y Prof. Santiago Ortiz, y a mi tutor, Dr. Carlos Gálvez, sin cuya ayuda y comprensión no hubiese sido posible este proyecto.

A todos los compañeros de promoción que participaron en este proyecto, Andrés, Miguel, Juanes, Marina, José Luis, Oswaldo y Álvaro. Espero que todos hayamos crecido en nuestra profesión con este proyecto.

To all my colleagues at the Sydney Eye Hospital (Sydney, Australia), especially Professor Stephanie Watson and Dr. Constantinos Petsoglou. Thank you very much for allowing me to learn from you, my stay in Australia is and has been unique. Day by day you show me what it means to be a good clinician and a true teacher. I will be eternally grateful to your team and I hope I can be half as good as you in the not too distant future. Thank you.

Al Banco de tejidos por su colaboración y su trabajo que no tiene precio. A la Sociedad Andaluza de Oftalmología por su apoyo en este proyecto y a la Sociedad Española de Oftalmología por su apoyo en mi estancia en Australia. Gracias.

A todas esas personas que son inenaburables y que forman o formaron parte de mi felicidad, gracias. El camino a veces está lleno de obstáculos y con vuestra ayuda todo fue mucho más fácil. A Alicia, que tantos años ha estado con nosotros, gracias por ayudarnos tanto a mí como a mi familia. A mis abuelos, que allá donde estén sé que estarán orgullosos. A mi padre, José Javier, quien me enseñó que uno en la vida debe trabajar para ser él quien decida donde quiere ir y que no sean otros quienes decidan por ti. A pesar de haber sido el único hijo que no ha seguido tu senda como ingeniero, puedo afirmar con orgullo que siempre fuiste un ejemplo a seguir. Ese entusiasmo tuyo y esa energía de hacer tantas cosas siempre, por suerte, la hemos heredado. A mi hermano José Luis, porque siempre estuvo pendiente de nosotros, aunque no lo quiera admitir y de quien espero que consiga todas sus metas. Aunque posiblemente no pueda tenerte cerca físicamente en mi vida, siempre serás parte de ella. Muchas gracias.

Por último, a los dos pilares de mi vida:

- Mi hermano Julio, mi gran ejemplo a seguir, gracias por dar siempre el 100% de ti y por permitirme verlo. Desde el colegio hasta la universidad fuiste mi eterno compañero de estudio. Gracias por tantas horas juntos y tanto sacrificio que finalmente dieron resultado. Todavía no existe nada que no puedas conseguir. Sin tu apoyo, todos estos años mi vida hubiese sido mucho más difícil. Ojalá en un futuro no muy lejano podamos estar juntos de nuevo. Gracias.
- A mi madre, Lydia, por haber criado tres hijos felices, por haber sacrificado su felicidad en muchos momentos por nosotros y por habernos criado en una casa donde el trabajo y el amor era una religión. Por aquellos viajes a la playa, sin importarte cuanta arena entrase en tu coche, por aquellos viajes en coche hacia la biblioteca a las 8 am, por todos los desayunos juntos y por aquellas tardes eternas leyendo sobre la cama. En resumen, por estar siempre disponible

cuando más lo necesitaba y sobre todo por haber estado conmigo durante los periodos más difíciles de mi vida. Gracias a toda mi familia por haber estado siempre ahí.



# ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN .....	21
1.1	Membrana amniótica .....	22
1.1.1	Histología .....	22
1.1.2	Propiedades .....	24
1.1.3	Tipos de membrana amniótica según proceso de preparación .....	27
1.2	Técnicas quirúrgicas en la aplicación de la membrana amniótica .....	28
1.2.1	Injerto o <i>inlay</i> .....	29
1.2.2	Parche o <i>onlay</i> .....	30
1.3	Aplicaciones de la membrana amniótica en patología ocular .....	31
2	JUSTIFICACIÓN.....	33
3	OBJETIVOS .....	35
3.1	General.....	35
3.2	Específicos .....	35
4	MATERIALS AND METHODS .....	37
4.1	Patients .....	37
4.2	Surgery and Follow-Up .....	39
4.3	Statistical Analysis .....	40
5	RESULTS.....	43
5.1	Sex and Age .....	43
5.2	Success and Failure .....	44
5.3	Corneal Opacification .....	44
5.4	Visual Acuity .....	45
5.5	Efficacy of Monolayer Versus Multilayer AMT .....	46
5.6	Correlation of Monolayer/Multilayer AMT and VA Gain .....	47
6	DISCUSIÓN.....	49
7	CONCLUSIONES .....	59
8	CONCLUSIONS .....	61
9	REFERENCES .....	63
10	ANNEX.....	73
10.1	Annex 1. Roper-Hall Classification for the severity of ocular surface burns... 73	
10.2	Annex 2. Comparison among scales of visual acuity measurements. ....	75



## **APORTACIONES CIENTÍFICAS**

La presente tesis internacional ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- **Lacorzana J**, Campos A, Brocal-Sánchez M, et al. Visual Acuity and Number of Amniotic Membrane Layers as Indicators of Efficacy in Amniotic Membrane Transplantation for Corneal Ulcers: A Multicenter Study. *J Clin Med*. 2021 Jul 22;10(15):3234. doi: 10.3390/jcm10153234. PMID: 34362018; PMCID: PMC8348886. (Artículo tesis publicado en “Journal of Clinical Medicine”, categoría JCR Q1: Medicine, General & Internal).
- **Lacorzana J**. Amniotic membrane, clinical applications and tissue engineering. Review of its ophthalmic use. *Arch Soc Esp Oftalmol (Engl Ed)*. 2020 Jan;95(1):15-23. English, Spanish. doi: 10.1016/j.oftal.2019.09.010. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31784120.
- **Lacorzana J**, Protsyk O, Morales P, et al. Corneal perforation triggered by the use of urine therapy drops: Management with scleral and amniotic membrane grafts. *J Fr Ophtalmol*. 2021 May;44(5):e299-e301. doi: 10.1016/j.jfo.2020.07.012. Epub 2021 Jan 22. PMID: 33494972.
- Durán-Carrasco O.; Fernández Núñez C.; **Lacorzana J**. et al. Aplicación de la membrana amniótica en el manejo de las úlceras corneales asociadas a queratitis por acanthamoeba. *Arch. Soc. Canar. Oftal*. 2021; 32: 107-112.
- **Lacorzana-Rodríguez J**, García-Serrano JL, Gálvez Prieto-Moreno C, et al. Amniotic membrane, review of its ophthalmic use and results in the last five years (2013-2017) in Granada. Preliminary study. *Actual. Med.* [Internet] 2018; 103 : (804): 82-86 DOI: 10.15568/am.2018.804.or05



# **ABREVIATURAS**

## TEXTO EN ESPAÑOL

ACE – Extracto de citosina amniótica

AIC – Autoinjerto de conjuntiva

AV – Agudeza visual

BFGF – Factor de crecimiento básicos de fibroblastos

DPP-IV – Dipeptidil peptidasa IV

EGF – Factor de crecimiento epidérmicos

FDA – Food and Drug Administration

HLA – Antígeno leucocitario humano

KGF – Factor de crecimiento queratinocíticos

LASEK - Laser-assisted subepithelial keratomileusis

MA – Membrana amniótica

NET – Necrólisis epidérmica tóxica

UCRT – Úlceras corneales refractarias a tratamiento médico

SSJ – Síndrome de Stevens-Johnson

SO – Superficie ocular

TGF-B – Factor de crecimiento tumoral beta

TIMP – Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas

TMA – Trasplante de membrana amniótica

VHB – Virus hepatitis B

VHC – Virus hepatitis C

VIH – Virus inmunodeficiencia humana

## TEXTO EN INGLES

AM – Amniotic membrane

AMT – Amniotic membrane transplantation

ID – Identity document

NHCU – Non-healing corneal ulcer

VA – Visual acuity

## **RESUMEN**

La utilización de la membrana amniótica como recurso terapéutico ha despertado un gran interés en la medicina actual debido a sus múltiples propiedades biológicas, a la mejora en el proceso de obtención, a su facilidad de uso y al avance y desarrollo de la ingeniería tisular. La membrana amniótica se ha convertido asimismo en uno de los principales tratamientos coadyuvantes, tanto en la cirugía oftalmológica como en otras especialidades médico-quirúrgicas. El desarrollo de la ingeniería tisular ha permitido, en tal sentido, su utilización no solo en su forma clásica sino también mediante gotas y otras presentaciones. En este contexto la presente tesis tiene como objetivo investigar los efectos del trasplante de membrana amniótica sobre úlceras refractarias al tratamiento médico, con especial interés en la relación entre dos parámetros poco estudiados anteriormente, la ganancia de agudeza visual y el número de capas utilizadas; un enfoque innovador que puede aportar una información relevante para la práctica clínica y el desarrollo de proyectos futuros relacionados con la patología de la superficie ocular.

Tras revisar las características histológicas y las propiedades de la membrana amniótica y su relación con la patología ocular, se expone la metodología utilizada y los datos relativos al estudio retrospectivo multicéntrico, llevado a cabo en 17 hospitales, en el cual se evaluaron 223 trasplantes de membrana amniótica en 191 pacientes, donde se valoró la tasa de éxito del trasplante de membrana amniótica (reepitelización completa), la ganancia de agudeza visual postoperatoria y el número de capas de membrana amniótica trasplantadas.

Los resultados avalan el uso del trasplante de membrana amniótica en esta patología. La tasa global de éxito fue del 74,4%. En el 92% de los pacientes la agudeza visual se mantuvo o mejoró. La agudeza visual media postoperatoria fue significativamente mayor que la preoperatoria en toda la cohorte ( $p < 0,001$ ) y en todos los grupos etiológicos de úlceras (posbacterianas,  $p \leq 0,001$ ; posherpéticas,  $p \leq 0,0038$ ; úlceras neurotróficas,  $p \leq 0,014$ ; periféricas no reumáticas,  $p \leq 0,001$ ; y úlceras secundarias a lagofthalmos y malposición de párpados o traumatismos,  $p \leq 0,004$ ). La mayoría de los participantes (56,5%) presentaban una agudeza visual preoperatoria igual o inferior a la de contar dedos ( $\leq 0,01$ ). De todos ellos, el 13,5% alcanzó una agudeza visual postoperatoria igual o mejor que la ceguera legal ( $\geq 0,05$ , según criterios de la Organización Mundial de la Salud) después del trasplante de membrana amniótica. Se observó una mayor tasa de

éxito en el trasplante de membrana amniótica monocapa que en el multicapa (79,5% y 64,9%, respectivamente;  $p = 0,018$ ). No se encontraron valores estadísticamente significativos entre el número de capas trasplantadas y la ganancia de agudeza visual ( $p = 0,509$ ).

En conclusión, el trasplante de membrana amniótica no sólo es beneficioso para lograr la reepitelización completa en las úlceras refractarias al tratamiento médico sino también para mejorar la agudeza visual postoperatoria; estas mejoras son independientes de las etiologías de las úlceras. Además, el uso de trasplante de membrana amniótica monocapa parece ser una opción más adecuada que el trasplante de membrana amniótica multicapa para las úlceras refractarias al tratamiento médico, ya que el trasplante de membrana amniótica multicapa no presentó mejores resultados (tasa de éxito y ganancia de AV) en comparación con el trasplante de membrana amniótica monocapa en los diferentes tipos de úlceras estudiados. La investigación realizada ofrece, en una amplia serie de casos, resultados muy significativos sobre el uso de membrana amniótica en las úlceras refractarias al tratamiento médico. Estos resultados pueden contribuir a establecer protocolos terapéuticos en relación con las úlceras refractarias al tratamiento médico originadas a partir de distintas etiologías y a contemplar asimismo la utilización de la membrana amniótica en otras patologías de la superficie ocular que compartan con las úlceras refractarias al tratamiento médico patrones estructurales y pautas fisiopatológicas semejantes.

## **ABSTRACT**

The use of amniotic membrane as a therapeutic tool has aroused great interest in current medicine due to its multiple biological properties, the improvement in the process of obtaining it, its ease of use and the progress and development of tissue engineering. Amniotic membrane has also become one of the main adjuvant treatments, both in ophthalmic surgery and in other medical-surgical specialities. The development of tissue engineering has allowed its use not only in its classical form but also in the form of drops and other presentations. In this context, the present thesis aims to investigate the effects of amniotic membrane transplantation on non-healing corneal ulcers. Also, it focus on the relationship between two parameters that have hardly been studied before, the gain in visual acuity and the number of layers used; an innovative approach that may provide relevant information for clinical practice and development of future projects related to ocular surface pathology.

After reviewing the histological characteristics and properties of the amniotic membrane and its relationship with ocular pathology, we present the methodology used and data from our multicentre retrospective study. The study was conducted in 17 hospitals in which 223 amniotic membrane transplantations in 191 patients were evaluated, assessing the success rate of amniotic membrane transplantation (complete re-epithelialisation), the postoperative visual acuity gains and the number of amniotic membrane layers transplanted.

The results support the use of amniotic membrane transplantation in this setting. The overall success rate was 74.4%. Visual acuity was maintained or improved in 92% of patients. Mean postoperative visual acuity was significantly higher than preoperative visual acuity in the entire cohort ( $p < 0.001$ ) and in all ulcer aetiological groups (post-bacterial,  $p \leq 0.001$ ; post-herpetic,  $p \leq 0.0038$ ; neurotrophic ulcers,  $p \leq 0.014$ ; non-rheumatic peripheral ulcers,  $p \leq 0.001$ ; and ulcers secondary to lagophthalmos and eyelid malposition or trauma,  $p \leq 0.004$ ). The majority of participants (56.5%) had preoperative visual acuity equal to or less than finger-counting ( $\leq 0.01$ ). Of these, 13.5% achieved postoperative visual acuity equal to or better than legal blindness ( $\geq 0.05$ , according to criteria of World Health Organization) after amniotic membrane transplantation. A higher success rate was observed for monolayer than for multilayer amniotic membrane transplantation (79.5% and 64.9%, respectively;  $p = 0.018$ ). No

statistically significant association was found between the number of layers transplanted and visual acuity gain ( $p = 0.509$ ).

In conclusion, amniotic membrane transplantation is not only beneficial in achieving complete re-epithelialisation in non-healing corneal ulcers but also in improving postoperative visual acuity; these improvements are independent of ulcer aetiologies. Furthermore, the use of monolayer amniotic membrane transplantation seems to be a more suitable option than multilayer amniotic membrane transplantation for non-healing corneal ulcers, as multilayer amniotic membrane transplantation did not show better results (success rate and VA gain) compared to monolayer amniotic membrane transplantation in the different types of ulcers studied. The research carried out offers, in a large series of cases, very significant results on the use of amniotic membrane in non-healing corneal ulcers that can contribute to establish therapeutic protocols in relation to non-healing corneal ulcers originating from different aetiologies. Likewise, this research also encourages the use of amniotic membrane in other ocular surface pathologies that share similar structural patterns and pathophysiological patterns with non-healing corneal ulcers.

# 1 INTRODUCCIÓN

La córnea es una superficie corporal avascular, expuesta al medio ambiente, que forma parte del sistema visual. La córnea está constituida por 5 capas histológicas: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (desde exterior a interior) <sup>1</sup>. La agudeza visual (AV) es la capacidad del sistema visual para distinguir detalles de forma nítida a una distancia determinada; la presencia de una buena AV depende principalmente del estado de la córnea, del cristalino y de la retina. La córnea, debido a su contacto con el exterior, está sometida a numerosos agentes agresores, lo que origina multitud de patologías en ella, tales como las úlceras corneales, que pueden afectar a la AV.

Las úlceras corneales consisten en una pérdida de sustancia de la superficie corneal que suelen implicar epitelio y estroma anterior, aunque puede afectar, en ocasiones a más capas corneales. La etiología de las úlceras es muy variada. Entre los distintos tipos de úlceras corneales existentes, una de las de mayor dificultad en su manejo clínico son las úlceras corneales refractarias al tratamiento médico (UCRTs) o *non-healing corneal ulcers* (NHCUs) como se denominan en inglés.

Las UCRTs se definen como unas úlceras que no muestra ningún indicio de epitelización corneal completa en el plazo de dos semanas a pesar de la administración de un tratamiento médico correcto <sup>2</sup>; pueden ser causadas por múltiples condiciones como queratitis neurotrófica, infección, enfermedad reumática, malposición de párpados, trauma o distrofia corneal <sup>2,3</sup>. Las UCRTs pueden evolucionar a descemetoceloes o perforaciones, por lo que su rápido tratamiento es muy recomendable. En este sentido, el trasplante de membrana amniótica (TMA) se ha sugerido como una excelente opción terapéutica <sup>2,3</sup>.

El TMA fue descrito por primera vez en 1910 por Davis <sup>1,4</sup> para su aplicación en enfermedades de la piel. Su uso se extendió a otras especialidades como traumatología, cirugía plástica, medicina deportiva, urología, ginecología u odontología <sup>5</sup>. En 1940, fue utilizada por primera vez con fin oftalmológico por De Rotth <sup>6</sup>, sin mucho éxito, para la reconstrucción de la superficie conjuntival tras el tratamiento de un simbléfaron, debido a las similares características físicas (transparencia, grosor y consistencia) <sup>7</sup> que presentan la conjuntiva y la MA. En 1946, Sorsby utilizó la MA para el recubrimiento de quemaduras químicas oculares con éxito, pero cayó en desuso a pesar de los buenos resultados. Este autor fue el primero en sospechar que la MA no solo poseía propiedades mecánicas favorables, sino también biológicas. Pasaron unos años hasta

que Battle <sup>8</sup> usó la MA en defectos de conjuntiva y Kim y Tseng la utilizaron en el tratamiento de la patología de la superficie ocular (SO), ambos en 1992 <sup>7,9-12</sup>.

En la presente introducción, una vez expuestos los antecedentes que acabamos de reseñar, indicaremos brevemente en primer lugar, las características de la MA, que constituye el material a utilizar en nuestro estudio; en segundo lugar, nos ocuparemos de las distintas técnicas quirúrgicas que se emplean para implantar dichas MA en el tratamiento de la patología de la superficie ocular (SO) y, en tercer lugar, nos ocuparemos de las aplicaciones más frecuentes de la MA en la práctica oftalmológica.

Una vez descrito todo lo anterior expondremos, en la presente tesis doctoral, los objetivos de la misma y describiremos el material y los métodos utilizados para la evaluación de los pacientes que participan en el estudio multicéntrico que se lleva a cabo en la misma, tras la utilización del TMA en los pacientes con UCRTs. Una vez expuestos asimismo los resultados de la investigación realizada, los discutiremos en el contexto de la bibliografía existente sobre la UCRT y sobre las distintas patologías de la SO (úlceras infecciosas activas, úlceras asociadas a enfermedad reumatoidea y posqueratoplastia, perforaciones corneales, queratopatía bullosa, quemaduras químicas, pterigium, enfermedades mucosinequiantes). Todo ello con el objeto de establecer a partir de nuestros hallazgos el modelo de respuesta al TMA tanto en la UCRT como en aquellas patologías que comparten patrones fisiopatológicos similares.

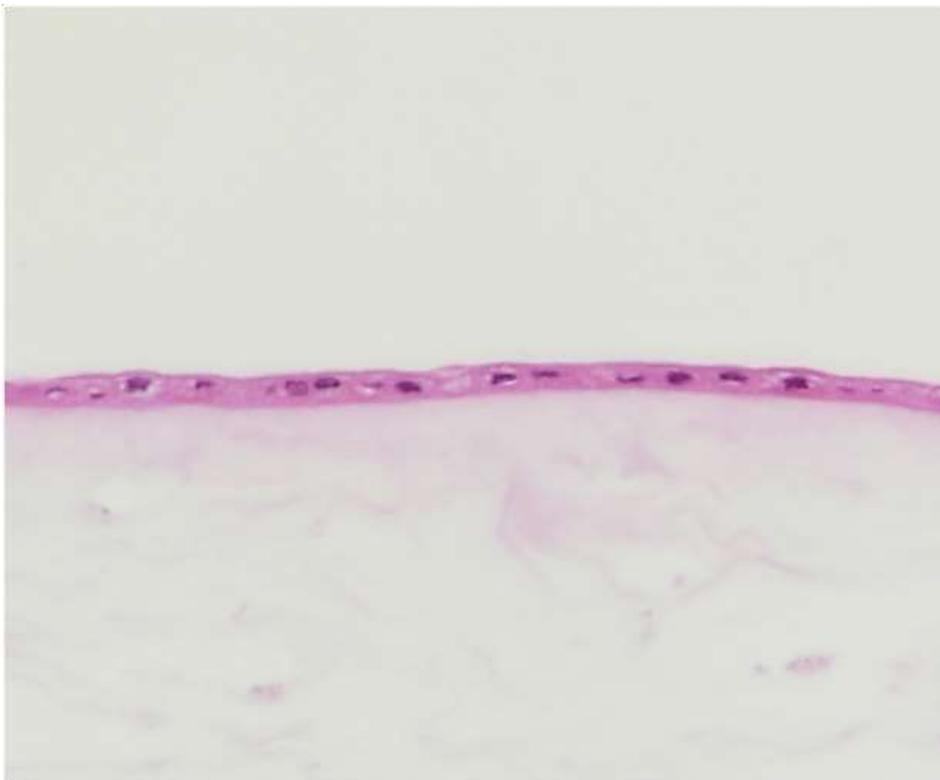
## 1.1 Membrana amniótica

### 1.1.1 Histología

La MA deriva de la capa más interna de la membrana fetal y su grosor varía entre 20-500  $\mu\text{m}$  <sup>9,10</sup> aunque diversos autores han demostrado que el grosor en humanos varía entre individuos <sup>13-15</sup>. Su estructura histológica consiste en una capa epitelial, una gruesa membrana basal y un estroma avascular (Figura 1 y 2) <sup>16,17</sup>.



**Figura 1.** Membrana amniótica (x40) teñida con el tricrómico de Masson. Epitelio y estroma avascular.



**Figura 2.** Membrana amniótica (x20) teñida con hematoxilina y eosina. Epitelio y estroma avascular.

Las características microscópicas son las siguientes:

- Capa epitelial: monocapa de células cuboideas con microvellosidades en su superficie apical <sup>18</sup>, que están en contacto directo con los fluidos amnióticos y anclada a la membrana basal mediante hemidesmosomas <sup>17</sup>. Estas células secretan numerosas sustancias vinculadas al funcionamiento de la MA.
- Membrana basal: consiste en un material extracelular que separa la capa epitelial del estroma y tiene un espesor entre 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ . Entre sus componentes destaca la presencia de colágeno tipo IV y laminina.
- Estroma avascular: capa más gruesa formada por tejido conjuntivo con fibras de colágena, fibroblastos y abundante sustancia fundamental amorfa, , próxima al corión <sup>9,15</sup>. Dicha capa se divide a su vez en tres: capa compacta (en contacto con membrana basal y que aporta resistencia a la tracción) , capa fibroblástica (en la que existe un mayor número de fibroblastos y células de Hofbauer) y una capa esponjosa (capa más externa) <sup>17,18</sup>.

### 1.1.2 Propiedades

Este tejido posee una serie de características que lo convierten en una herramienta muy útil para el tratamiento de la patología ocular y la ingeniería tisular (Tabla 1): <sup>19</sup>

- Promueve la proliferación tisular mediante factores de crecimiento epidérmicos (EGF), queratinocíticos (KGF) y básicos de fibroblastos (BFGF), mediante los cuales se consigue el cierre de los defectos superficiales en córnea y conjuntiva.
- Favorece la migración celular mediante la glicoproteína específica lumican y el ácido hialurónico [este ácido posee efectos antiinflamatorios e inmunosupresores <sup>15,20</sup>].
- Promueve la migración específica de queratinocitos por medio del inhibidor proteasa serina (Serpin 1) y dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV).
- Inhibe la cicatrización mediante la supresión del factor de crecimiento tumoral beta (TGF-B).

- Regula a la baja la expresión de marcadores de superficie celular como CD80, CD86 y el antígeno de histocompatibilidad de clase 2 (moduladores de la respuesta inmune).
- Inhibe la inflamación y la neovascularización gracias a la secreción de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) y citoquinas tales como: interleucina-10 (Interleucina anti-inflamatoria) y antagonistas del receptor de interleucinas-1.
- Escasa inmunogenicidad al no expresar antígeno leucocitarios humanos (HLA) A, B, C, D y DR aunque sí expresa HLA-G (involucrada en la inducción de tolerancia inmune actuando como ligando de los macrófagos y *natural killer*) y Fas Ligando <sup>4,5,10,11,15,19-23</sup> (Tabla 1).
- Efecto tectónico y biomecánico , (actuando como andamiaje en los defectos estructurales), propiedades antimicrobianas (llegando incluso a actuar como barrera antimicrobiana) y funcionalidad como medio de cultivo <sup>24,25</sup> celular *in vivo* e *in vitro*, por lo que podría tener gran potencialidad en el campo de la ingeniería tisular.

<b>PROPIEDAD</b>	<b>MOLÉCULA</b>
Inducción de la proliferación celular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EGF</li> <li>• KGF</li> <li>• BFGF</li> </ul>
Reducción de la neovascularización	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TIMP</li> <li>• Colágeno XVIII</li> <li>• IL 10</li> </ul>
Acción anticicatrizal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Supresión TGF-B</li> </ul>
Escasa o nula inmunogenicidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No Expresión de HLA A, B, C, D y DR</li> <li>• Expresión HLA G y Fas Ligando</li> </ul>
Migración celular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lumicán</li> <li>• Ácido hialurónico</li> </ul>
Migración específica de queratinocitos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serpin-1</li> <li>• DPP-IV</li> </ul>
<i>Pool</i> regeneración corneal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colágeno tipo I, III, IV y V</li> </ul>

**Tabla 1.** Propiedades más importantes de la membrana amniótica

Recientemente, se está estudiando en detalle el hialuronano de cadena pesada/pentraxina 3 (HC-HA/PTX3), un componente de la matriz de la MA que posiblemente sea un factor clave, responsable de las mencionadas propiedades de la MA <sup>26-28</sup>. La suma de estos mecanismos es lo que permite la correcta cicatrización y regeneración de la herida. Todas estas propiedades recomiendan su uso en patologías oftalmológicas, como las úlceras corneales persistentes (neurotróficas, post-herpéticas) <sup>1,29-35</sup>, los descemetoceltes <sup>36</sup>, las perforaciones <sup>1,4,33,37-40</sup> y las quemaduras químicas <sup>1,4,23,41-46</sup>. Estas propiedades permiten a la MA integrarse de varias formas distintas como ya describieron Resch et al <sup>47,48</sup>. Estos autores observaron que la MA puede integrarse al tejido corneal de cuatro formas distintas: intraepitelial, subepitelial, intraestromal y sobre la superficie corneal. Llevaron a cabo trasplantes de MA en pacientes que necesitaron queratoplastia posteriormente, con lo cual pudieron realizar un análisis histológico pormenorizado. El hecho de integrarse según un patrón u otro, dependía tanto de la técnica quirúrgica como de la enfermedad ocular tratada. Esto hace pensar que el conocimiento de los distintos patrones de integración podría ayudarnos a seleccionar la técnica más adecuada según la patología a tratar.

### 1.1.3 Tipos de membrana amniótica según proceso de preparación

La MA se obtiene a partir de placentas donadas por mujeres sometidas a cesárea electiva seronegativas <sup>1</sup>. La serología del donante debe excluir virus hepatitis B (VHB) y C (VHC), virus inmunodeficiencia humana (VIH), toxoplasma y sífilis durante el embarazo. La serología es repetida 3-6 meses después del parto para descartar cualquier infección que pudiese haber estado en periodo ventana durante el *screening* inicial <sup>23</sup>.

Existen diversos métodos para la conservación de la membrana amniótica: en fresco (almacenamiento hipotérmico), en seco (liofilizado) y criopreservado.

- La MA fresca se separa de la placenta bajo condiciones estériles e irrigación con suero salino estéril <sup>49</sup>. Se guarda en una solución salina con 50.000 UI de penicilina y 1 g de estreptomina por 400 ml de solución salina a 4°C <sup>23,50</sup>. En nuestro medio no suele usarse debido al riesgo de transmisión de enfermedades que se encuentren en periodo ventana (VHB, VIH, etc.) y su escasa disponibilidad (debe ser utilizada en un límite de tiempo)<sup>51</sup>. Sin embargo, es la más aplicada en los países en vías de desarrollo, en los cuales las técnicas de preservación no están totalmente implementadas <sup>22</sup>.
- La MA seca o liofilizada se deseca al vacío a bajas temperaturas y rehidratada antes de su uso. Una de las ventajas de la liofilización con respecto a la criopreservación es su posible almacenamiento a temperatura ambiente (favoreciendo tanto su transporte como su uso en países en desarrollo y en campañas bélicas) y que la radiación a la que se somete asegura su esterilización <sup>10,22,23,52</sup>. Sin embargo, tiene concentraciones más bajas de proteínas/factores de crecimiento <sup>35,53</sup>.
- Criopreservación. El método original fue descrito por Kim y Tseng <sup>12</sup>, consistiendo en lavar la membrana bajo una campana de flujo laminar y luego separar el amnios y el corion. La parte estromal (adhesiva) del amnios se coloca sobre un papel de nitrocelulosa <sup>18</sup> y luego se lava con solución salina tamponante que contiene 1000 U/ml de penicilina, 20 mg/ml de estreptomina y 2.5 mg/ml de anfotericina B y se almacena en glicerina al 100% a 4°C. Estos fragmentos son guardados en una sustancia crioprotectora a -80° C permitiéndonos su uso hasta cinco años después (Figura 3). Actualmente dicho método tiene algunas modificaciones introducidas por Lee et al <sup>23,54</sup>. Una de las desventajas que tiene este método es que debido al proceso de criopreservación se pueden perder

algunas propiedades. Aun así, actualmente es el método de elección para la conservación de MA en los países desarrollados <sup>10,22,23,52</sup>.



**Figura 3.** A. Separación de la membrana amniótica en el biobanco de tejidos. B. Colocación en papel nitrocelulósico. C. Membrana amniótica criopreservada, lista para su envío.

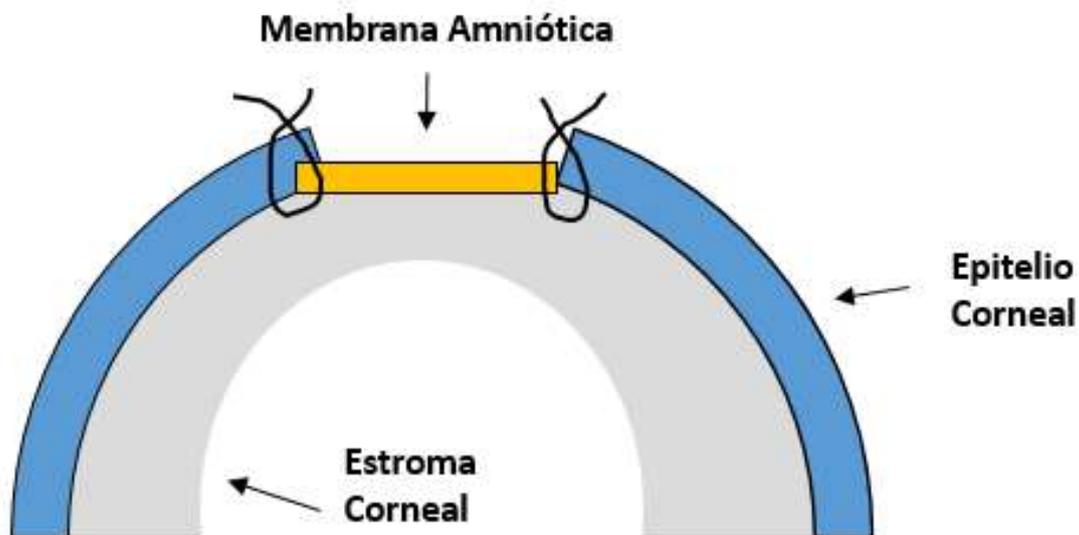
En los últimos años existe en el mercado un dispositivo médico (Prokera®, Bio-Tissue, Inc., Miami, FL, USA) que permite la utilización de la MA sin suturas, con todas las ventajas que ello conlleva (menor inflamación, menores tiempos quirúrgicos, menos revisiones para la retirada de suturas, etc). Es un anillo de 15 mm (pacientes pediátricos) o 16 mm (pacientes adultos) de diámetro que contiene MA criopreservada y que puede colocarse fácilmente con anestesia tópica. Funciona como un “vendaje compresivo biológico” (cara epitelial sobre defecto), tardando aproximadamente unos 3 días en eliminarse. Además, cabe destacar que es muy útil en la prevención de la formación de simbléfaron en casos graves <sup>23,55-57</sup>. Otro dispositivo con un diseño parecido es el AmnioClip® <sup>58</sup>, el cual es una MA entre dos anillos, pudiendo colocarse como una lente de contacto grande (parecido a Prokera®).

## 1.2 Técnicas quirúrgicas en la aplicación de la membrana amniótica

La técnica quirúrgica es un aspecto a reseñar en cuanto al uso de la MA, dado que según la patología ocular puede usarse como Injerto (*inlay*) o como Parche (*onlay*) <sup>10,11,17,35</sup>. Destacar que en el manejo intraoperatorio de la MA, el cirujano es capaz de discernir la capa epitelial de la estromal gracias a que la epitelial no es adhesiva y la estromal si lo es.

### 1.2.1 Injerto o *inlay*

La MA actúa como una membrana basal sobre la que se desarrolla el epitelio corneal, pasando a formar parte de la córnea o conjuntiva afecta. La parte estromal (adhesiva) de la MA se coloca sobre el defecto ocular sin sobrepasar sus bordes. Previamente a la colocación del injerto hay que desbridar los restos necróticos. (Figura 4) <sup>10,11,17</sup>. De este modo, la superficie adhesiva se integrará en el defecto y el epitelio perilesional crecerá sobre la MA. La fijación de la MA puede hacerse tanto con suturas como con pegamento (previo secado de la zona). Para evitar el desprendimiento del injerto se valora el uso de lentilla de contacto terapéutica o tarsorrafia lateral. Según la etiología y gravedad de la lesión, puede utilizarse como monocapa o como multicapa.



**Figura 4.** Membrana amniótica como injerto.

Existen ciertas variaciones dentro de esta misma técnica:

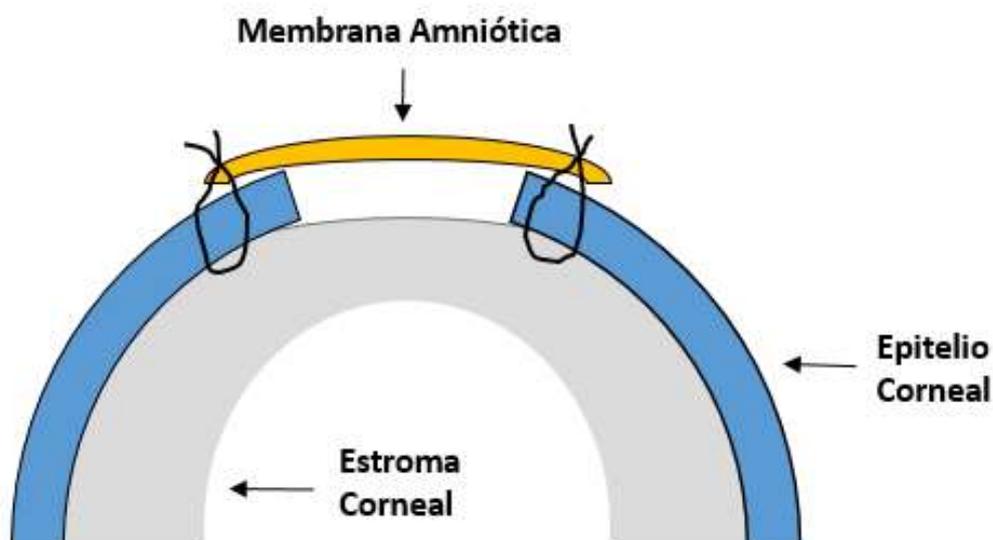
- Creación de una bolsa lamelar, alrededor del defecto, en la cual insertaríamos la membrana amniótica, mediante una cuchilla “crescent” <sup>59</sup>.
- “Técnica de relleno”, útil en la reparación de úlceras profundas, la cual consiste en la introducción de varias capas de MA cortadas con un “*punch*” hasta rellenar dicho defecto y posteriormente colocar una MA superior con el borde epitelial hacia abajo <sup>59</sup>.

- Técnica del rellenado en rollo”<sup>39</sup> en la cual se introduce un rollo de MA en el defecto (concretamente esta descrita para perforaciones), se coloca dos capas de MA con la cara estromal sobre dicho rollo suturándolas a borde defecto. Posteriormente se introduce perfluoropropano en cámara anterior (CA) para evitar el paso del rollo hacia CA, poniéndose posteriormente una MA de mayores dimensiones sobre toda la córnea, situando la cara estromal hacia abajo.

Entre las distintas indicaciones del uso de MA como injerto descritas en la literatura encontramos: defectos epiteliales con úlceras<sup>54</sup>, adelgazamientos corneales<sup>4</sup>, descematoceles y microperforaciones corneales<sup>60</sup>, escisión de tumores y cicatrices<sup>61</sup>, queratopatías en banda<sup>62</sup>, queratopatías bullosas<sup>63</sup> y déficits de células madre limbares corneales<sup>25,64</sup>.

### 1.2.2 Parche o *onlay*

Su uso consiste en la colocación de la parte epitelial (no adhesiva) de la MA en contacto con el defecto ocular sobrepasando sus bordes (Figura 5)<sup>10,17</sup>. Dicha cara de la MA es rica en citoquinas inmunomoduladoras y factores de crecimiento epiteliales, produciendo una disminución de la inflamación y una mejor cicatrización, funcionando como un “vendaje compresivo/ recubrimiento protector” (4, 5,15). Entre las distintas indicaciones de esta técnica descritas destacamos su uso en: defectos epiteliales sin ulceración, síndrome de Stevens Johnson agudo<sup>65-69</sup>, quemaduras químicas agudas<sup>70</sup> y en queratoplastias de alto riesgo<sup>71</sup>.



**Figura 5.** Membrana amniótica como parche.

Hay que resaltar que la aplicación de una técnica u otra no es vinculante con la patología, dado que en la bibliografía analizada encontramos estudios en los cuales se utilizaba la MA como injerto para ciertas patologías y otros en los que para la misma patología se recomendaba el uso como parche. En resumen, no está clara ni la indicación de MA ni la técnica a usar.

### 1.3 Aplicaciones de la membrana amniótica en patología ocular.

El empleo de MA está descrito para muchas patologías oculares tales como: quemaduras corneales <sup>4,23,41-44</sup>, reparación de ampollas filtrantes, trabeculectomías, úlceras persistentes (neurotróficas, herpéticas, etc.), descematoceles, perforaciones <sup>4</sup>, *pterygium* <sup>72</sup>, queratitis numulares, insuficiencias limbares (incluyendo cultivo de células limbares y posterior trasplante) <sup>19</sup>, queratopatías en banda, reconstrucción conjuntival, simbléfaron, etc. <sup>9,10,52,55,73-75</sup> (Tabla 2). Sin embargo, el empleo de la MA no está recomendado como tratamiento único en el ojo seco severo, el lagofthalmos y las quemaduras químicas grado IV (clasificación Roper-Hall, anexo 1 <sup>76</sup>).

---

**Patología corneal**

- Úlceras postinfecciosas bacterianas o por virus herpes zoster
- Úlceras postraumáticas y por quemaduras térmicas o químicas
- Úlceras neurotróficas
- Úlceras corneales postrasplante corneal
- Descematoceles
- Perforaciones corneales
- Queratopatía bullosa
- Queratopatías en banda
- Patologías degenerativas, distrofias, erosiones recurrentes

---

**Patología conjuntival**

- Reconstrucción conjuntival
- Conjuntivocalasia
- Enfermedades mucosinequiantes: penfigoide, Stevens-Johnson
- Simbléfaron
- *Pterigium* recurrente y cirugías asociadas a *pterigium*
- Neoplasias

---

**Patología escleral**

- Limbitis-escleritis necrotizante
- Escleromalacia
- Perforación escleral
- Síndrome de Marfan

---

**Otras indicaciones**

- Defectos de ampollas de filtración de cirugía glaucomatosa
  - Recubrimiento valvular glaucomatoso
  - Xerosis: síndrome de Sjögren primario y secundario
  - Prevención de opacidad postquirúrgica tras fotoqueratectomía (PRK, PTK, en experimentación)
- 

**Tabla 2.** Usos membrana amniótica en patología ocular más frecuentes.

## 2 JUSTIFICACIÓN

La córnea es una superficie corporal expuesta al medio ambiente externo. Los factores de protección de la córnea son, entre otros, los párpados y la película lagrimal. Esta última se encarga de nutrir la córnea avascular y de proporcionar una superficie refractiva estable. Una película lagrimal estable y una superficie corneal íntegra son de gran importancia para una buena AV <sup>77-79</sup>. Diferentes autores <sup>78,80,81</sup> han estudiado con métodos histológicos e inmunohistoquímicos las alteraciones de la película lagrimal y la córnea y su implicación en la AV. Si alguno de estos componentes se altera, es posible la aparición de patologías en la SO como las UCRTs, definidas en la introducción.

La aplicación sistemática de MA en distintas patologías de la SO, a partir de la experiencia terapéutica existente desde hace años, y que se refleja en los protocolos de seguimiento clínico, no evalúan los nuevos efectos atribuidos a la MA en su totalidad, por lo que resulta evidente que los nuevos factores deberían ser objeto de una pormenorizada evaluación. La investigación clínica retrospectiva de los pacientes con TMA en la SO puede poner en evidencia efectos no controlados actualmente y vinculados a las actividades funcionales de dicha membrana en el contexto clínico del paciente.

A día de hoy, el uso de tejidos biológicos para el tratamiento de patología ocular es una herramienta terapéutica más dentro de la variedad de tratamientos posibles, y por tanto, los oftalmólogos deberían tenerlos presentes. Recientemente, la ingeniería tisular está desarrollando sustitutos sintéticos o mixtos con el objetivo de conseguir un tratamiento más rápido y eficiente. No obstante, los tejidos biológicos son los más utilizados actualmente debido a su fácil acceso y a su relativo bajo coste, especialmente la MA. En este sentido, el TMA se ha sugerido como una excelente opción terapéutica para las UCRTs <sup>2,3</sup>.

Aunque se ha investigado previamente la utilidad de la TMA en el tratamiento de la UCRT, quedan varias cuestiones sin responder, especialmente en lo que respecta a la ganancia de la AV y al número de capas utilizadas <sup>3,38,82-84</sup>. Las incertidumbres actuales pueden deberse a las diferencias en la etiología de las úlceras, a un enfoque estadístico insuficiente o a los indicadores evaluados <sup>2,3,38,82,84,85</sup>. Para abordar estas limitaciones, el presente estudio multicéntrico trata de evaluar la eficacia de la TMA en una amplia muestra de pacientes con UCRT, teniendo en cuenta la ganancia de AV y el número de capas utilizadas. Además, se pretende explorar estos parámetros en relación con la bibliografía existente sobre diferentes grupos etiológicos, un enfoque innovador que

puede aportar una información relevante al respecto <sup>3,82</sup>, así como servir como modelo en relación con la terapéutica aplicable al resto de la patología de la SO.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 General

1. Evaluar los efectos del trasplante de membrana amniótica en las úlceras refractarias a tratamiento médico de distintas etiologías, como patología de la superficie ocular.

#### 3.2 Específicos

1. Establecer los patrones generales de evolución clínica de las úlceras refractarias a tratamiento médico, de distintas etiologías, tras el trasplante de membrana amniótica.
2. Establecer los patrones de reepitelización de las úlceras refractarias a tratamiento médico, de las distintas etiologías, tras el trasplante de membrana amniótica, dependiendo del uso de TMA monocapa o multicapa.
3. Establecer los patrones de agudeza visual de las úlceras refractarias a tratamiento médico, de distintas etiologías, tras el trasplante de membrana amniótica (ganancia agudeza visual; mejoría o empeoramiento de agudeza visual; agudeza visual significativa para calidad de vida, agudeza visual mayor que ceguera legal,  $\geq 0.05$ , según criterios de la Organización Mundial de la Salud).
4. Establecer la correlación entre los patrones de agudeza visual y el uso de trasplante de membrana amniótica monocapa y multicapa en las úlceras refractarias a tratamiento médico de distintas etiologías.



## 4 MATERIALS AND METHODS

### 4.1 Patients

This retrospective multicenter study was conducted to evaluate the efficacy of Amniotic membrane transplantation (AMT) in treating NHCUs at Spanish National Healthcare hospitals. Patient records from January 2012 to June 2018 were obtained. Our study covered 17 participating hospitals throughout Spain. The patient population from these hospitals represents 13.78% (6,436,043/46,720,000) of the Spanish population (Figure 6). Written informed consent were obtained from all patients prior to the transplantation. This study was approved by the local Ethics Committee (Study code: 1272-N-18) and adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki.

We analyzed data from 223 AMT cases in 191 patients with NHCUs of different etiologies. In all cases, cryopreserved amniotic membranes (AMs) were used as they contain high concentrations of growth factors <sup>1,53</sup> and lubricin, a boundary lubricant <sup>27,86</sup>. Cryopreserved AMs are most widely used because of their biosafety <sup>85</sup> The protocols of provincial and regional biobanks established by the National Health System were followed, with sterility controls and serological studies of donors and recipients <sup>87</sup>.

Patients with corneal ulcers refractory to medical treatment, surgically treated with cryopreserved AM, were included. Only patients with a minimum follow-up of 18 months post-surgery were included in accordance with the inclusion criteria. The ulcers were categorized as post-bacterial ulcers, post-herpetic ulcers, neurotrophic ulcers, peripheral corneal ulcers not associated with a rheumatic disease, and ulcers caused by lagophthalmos, eyelid malposition, or trauma <sup>3,82,85</sup>.



**Figure 6.** Maps of hospital participating in PhD project

- A. Badajoz y Cáceres
  - i. H. Perpetuo Socorro
  - ii. H. Nuestra Señora de la Montaña
  - iii. H. Virgen del Puerto de Plasencia
- B. Granada
  - i. H. San Cecilio
  - ii. H. Virgen de las Nieves
- C. Huelva
  - i. H. Juan Ramón Jiménez
  - ii. H. Vázquez Díaz
- D. Málaga
  - i. H. Regional de Málaga
  - ii. H. Virgen de la Victoria
  - iii. H. Comarcal Costa del Sol
- E. Islas Baleares
  - i. H. Son Espases
- F. Murcia
  - i. Hospital Reina Sofía
- G. Sevilla
  - i. H. Virgen del Rocio
  - ii. H. Virgen de la Macarena
  - iii. H. Virgen de Valme
- H. Santa Cruz de Tenerife
  - i. Hospital Nuestra Señora de la Candelaria
- I. Valladolid
  - i. Hospital Rio Hortega

The exclusion criteria were as follows: inability to follow-up, incomplete records, and coadjuvant surgery (e.g., conjunctival flap, tarsorrhaphy, or lamellar keratoplasty). Incomplete or unclear records were evaluated by two investigators with expertise (LJ and GSJL). In cases of disparity, the patient was excluded. NHCUs with an active

infection, descemetocoele, or perforation were excluded. Furthermore, patients with ulcers due to bullous keratopathy, post-keratoplasty ulcers, rheumatic corneal ulcers, stem cell deficiencies (requiring different surgical techniques), or chemical burns (requiring AMT within two weeks, thus not qualified as an NHCU) were excluded<sup>2,88</sup>. The measurement of ulcers' width was not standardized at all centers, which is why this parameter was excluded from our study. An identity document (ID) was assigned to each center, and each AMT used for treatments received an individualized ID. The outcome variable was the success or failure of the surgery.

Success was defined as the complete epithelialization of the refractory corneal ulcer eight weeks after surgery (lack of fluorescein staining at the slit lamp examination). Confocal microscopy studies have shown that AM may be present up to six weeks, and it might not be detectable eight weeks after surgery<sup>89</sup>. AMT failure was defined as incomplete corneal epithelialization within eight weeks after intervention. If two or more AMTs were performed, the results were analyzed. If other types of reconstructive surgery were performed post-AMT, the results were censored at this time<sup>82</sup>.

The independent variables collected in each case included the following: sex, age, number of AMTs performed in each patient, number of AM layers used in each AMT, etiology of the ulcers, whether AMT was the primary surgical option or not, visual acuity (VA) before transplantation, VA after the last follow-up, and corneal transparency after AMT. The corneal opacification was based on the Sotozono classification<sup>90</sup>: transparent (grade 0), partially opaque (grades 1 and 2), and opaque (grade 3) corneas.

VA was evaluated in all patients using the Snellen's original test with conversions to decimal and logMAR scales<sup>91,92</sup> for statistical analyses. Lower VAs were calculated as follows: counting fingers, 1/100 (logMAR 2); hand motions, 1/200 (logMAR 2.3); light perception, 1/666 (logMAR 2.8)<sup>93</sup>, and amaurosis, 0 (logMAR 3) (Anexo 2<sup>94</sup>).

## 4.2 Surgery and Follow-Up

All surgeries were performed by consultant ophthalmologists (n = 21). To homogenize their results, the following quality criteria were required: fill in a single and unified questionnaire, clearly defined ulcer type, definition of success or failure of AMT, performed in public hospitals with training program in ophthalmology, and surgery performed by ocular surface specialists with more than five years of experience.

The cryopreserved AMs were prepared according to the Tseng method<sup>87</sup>. The surgeons obtained the AMs from the regional tissue banks maintained by the Spanish government. All patients underwent a thorough preoperative examination. Surgery was performed under topical, peribulbar, or general anesthesia, as determined by the surgeon. Prior to the AMT, necrotic edges of the ulcer were debrided. Depending on the severity, the AMs were applied as a monolayer or as multilayers ( $\geq 2$ ), fixed with interrupted or uninterrupted 10-0 nylon sutures or fibrin sealants. The AMs could be transplanted using different techniques: (1) inlay—it was placed over the ocular defect without extending beyond its edges; (2) overlay—it was used as a patch suturing it beyond the edges of the ocular defect; and (3) a combination of both methods, known as the “sandwich” technique<sup>1,82</sup>.

Postoperatively, the patients received treatment with antibiotics and topical corticosteroids, in addition to the etiological treatment for the ulcer. Follow-up examinations were performed the day after, and approximately one, two, four, and eight weeks after the operation. The patients were treated in the emergency department in case of any complications. Subsequent follow-ups were performed at the discretion of the physician for at least 18 months. When AMT was not the primary surgical option, the alternative options were conjunctival flap, tarsorrhaphy, and lamellar or penetrating keratoplasty<sup>30,95</sup>.

### 4.3 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS Statistics 19 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The numerical variables are expressed as means  $\pm$  standard deviations. The categorical variables are described as absolute (n) and relative (%) frequencies. For nonparametric data distribution, a Mann-Whitney test was used. Odds ratios (ORs) were calculated for variables related to success, along with their 95% confidence intervals (CIs). For differences between the types of ulcers, a Kruskal-Wallis test was applied. VA data were normalized to the logMAR scale, and a Wilcoxon signed-rank test was applied to analyze the relationship between the VAs before and after the intervention. These values were also expressed on the Snellen optotype scale. A *p*-value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

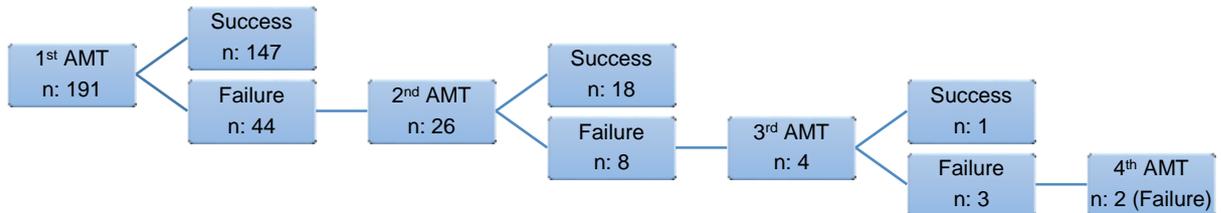
For the determination of the sample size, 34 AMTs would be needed in each of the 5 subgroups ( $n = 170$ ); accepting an alpha risk of 0.005 and beta risk of 0.2 in a two-sided test, and estimating the significant post-AMT VA gain at 0.3 logMAR and the variance at

0.8. Furthermore, an exhaustive review of the literature on this subject was carried out. It was found that the studies with the largest sample size and best design were those of Schuerch et al.<sup>3</sup> and Uhlig et al.<sup>82</sup> (149 and 108 patients, respectively). In our article, we analyzed data from 191 patients (223 AMT cases).



## 5 RESULTS

In our study, we analyzed 223 AMTs that were used in 191 patients (94 male and 97 female patients) with NHCUs of different etiologies (Figure 7).



**Figure 7.** Flowchart of success and failure after amniotic membrane transplantation.

### 5.1 Sex and Age

Sex distribution analysis revealed that 46.6% (n = 104) of the 223 AMTs were performed in male patients and 53.4% (n = 119) in female patients (Table 3). The mean age of patients receiving an AMT was 65 ± 18.3 years (range 11–102 years) (Table 3).

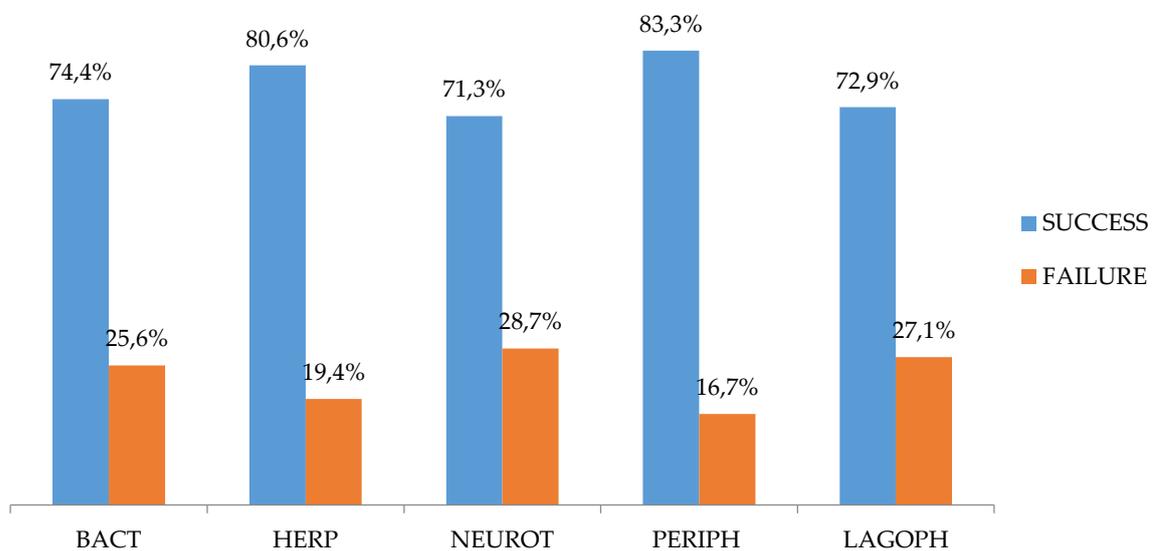
	<b>BACT</b> <b>N = 39</b> <b>(17.5%)</b>	<b>HERP</b> <b>N = 31</b> <b>(13.9%)</b>	<b>NEUROT</b> <b>N = 87</b> <b>(39.0%)</b>	<b>PERIPH</b> <b>N = 18</b> <b>(8.1%)</b>	<b>LAGOPH</b> <b>N = 48</b> <b>(21.5%)</b>
Sex					
Male	21 (53.8%)	16 (51.6%)	36 (41.4%)	9 (50%)	22 (45.8%)
Female	18 (46.2%)	15 (48.4%)	51 (58.6%)	9 (50%)	26 (54.2%)
Age (mean ± SD)	66.4 ± 16.9	63.6 ± 15.5	66.4 ± 17.8	65.4 ± 16.9	61.9 ± 22.4
1 <sup>a</sup> surgical option	32 (82.1%)	24 (77.4%)	73 (83.9%)	14 (77.8%)	42 (87.5%)
Corneal opacification					
Grade 0	9 (23.1%)	1 (3.2%)	17 (19.5%)	12 (66.7%)	12 (25%)
Grade 1-2	6 (15.4%)	1 (3.2%)	24 (27.6%)	2 (11.1%)	9 (18.8%)
Grade 3	24 (61.5%)	29 (93.5%)	46 (52.9%)	4 (22.2%)	27 (56.2%)

**Table 3.** Amniotic membrane transplantation for each type of ulcer.

BACT, post-bacterial ulcers; HERP, post-herpetic ulcers; NEUROT, neurotrophic ulcers; PERIPH, non-rheumatic peripheral ulcers; LAGOPH, ulcers secondary to lagophthalmos and eyelid malposition or trauma; SD, standard deviation; 1<sup>a</sup> surgical option, primary surgical option.

## 5.2 Success and Failure

Of all the AMTs, 74.4% (166/223) were successful, and there were no statistically significant differences among the NHCU cases of various etiologies ( $p = 0.755$ ) (Figure 8).



**Figure 8.** Amniotic membrane transplantation success and failure rates for each group of corneal ulcers.

BACT, post-bacterial ulcers; HERP, post-herpetic ulcers; NEUROT, neurotrophic ulcers; PERIPH, non-rheumatic peripheral ulcers; LAGOPH, ulcers secondary to lagophthalmos and eyelid malposition or trauma.

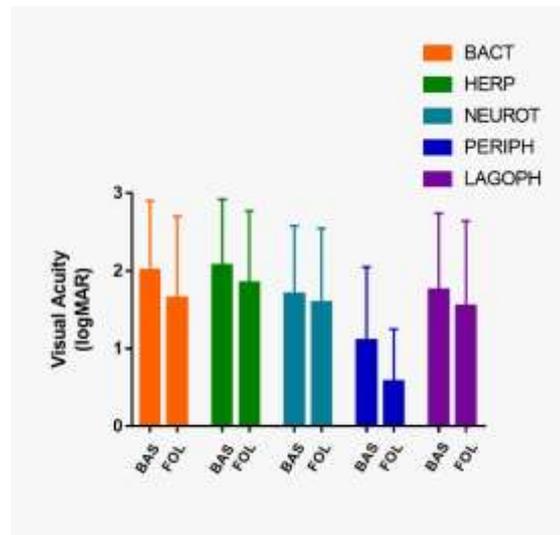
## 5.3 Corneal Opacification

Since these were refractory ulcers secondary to a serious corneal pathology, transparency was reduced at the beginning. The cornea was transparent after AMT

(grade 0 classification Sotozone) in 22.4% (51/223), partially opaque (grades 1 and 2) in 18.8% (42/223), and opaque (grade 3) in 58.3% (130/223) (Table 3).

## 5.4 Visual Acuity

Preoperative VA was significantly different in each type of ulcer ( $p = 0.001$ ). Preoperative VA was significantly worse in post-herpetic ulcers compared to those in neurotrophic ulcers ( $p = 0.03$ ), and non-rheumatic peripheral ulcers ( $p = 0.003$ ) (Figure 9).



**Figure 9.** Bar chart representing visual acuity (VA) in logMAR at baseline and at the last follow-up. VA, visual acuity; BACT, post-bacterial ulcers; HERP, post-herpetic ulcers; NEUROT, neurotrophic ulcers; PERIPH, non-rheumatic peripheral ulcers; LAGOPH, ulcers secondary to lagophthalmos and eyelid malposition or trauma; BAS, at baseline; FOL, at the last follow-up.

In the entire study population, the VA significantly improved from  $1.77 \pm 0.93$  to  $1.54 \pm 1.02$  logMAR ( $p < 0.001$ ). Mean postoperative VA was significantly higher than preoperative VA in all etiological groups of ulcers: post-bacterial ulcers ( $p \leq 0.001$ ), post-herpetic ulcers ( $p \leq 0.0038$ ), neurotrophic ulcers ( $p \leq 0.014$ ), non-rheumatic peripheral corneal ulcers ( $p \leq 0.001$ ) and in ulcers secondary to lagophthalmos and eyelid malposition or trauma ( $p \leq 0.004$ ) (Figure 9).

VA stability or improvement was seen in 92% (205/223) of the cases (Table 4). The participants presented a preoperative VA equal to or less than counting fingers ( $\leq 0.01$ )

in 56.5% of the study population (126/223). Of those, 13.5% (17/126) reached a postoperative VA equal to or better than legal blindness ( $\geq 0.05$ ) due to AMT<sup>96,97</sup>.

	BACT	HERP	NEUROT	PERIPH	LAGOPH
VA at baseline					
- Amaurosis	6 (15.4%)	1 (3.2%)	3 (3.4%)	1 (5.6%)	2 (4.2%)
- LP	7 (17.9%)	12 (38.8%)	13 (14.9%)	2 (11.1%)	16 (33.3%)
- HM	10 (25.6%)	5 (16.1%)	22 (25.3%)	1 (5.6%)	6 (12.5%)
- CF	4 (10.3%)	5 (16.1%)	10 (11.5%)	0 (0%)	0 (0%)
- $\geq 0.05$ a 1 Snellen	12 (30.8%)	8 (25.8%)	39 (44.8%)	14 (77.8%)	24 (50%)
VA at last follow-up					
- Amaurosis	6 (15.4%)	1 (3.2%)	4 (4.6%)	1 (5.5%)	2 (4.2%)
- LP	5 (12.8%)	8 (25.8%)	11 (12.6%)	0 (0%)	14 (29.2%)
- HM	7 (17.9%)	5 (16.1%)	19 (21.9%)	0 (0%)	5 (10.4%)
- CF	1 (2.6%)	7 (22.7%)	13 (14.9%)	0 (0%)	1 (2.1%)
- $\geq 0.05$ a 1	20 (51.3%)	10 (32.3%)	40 (46%)	17 (94.5%)	26 (54.2%)
Changes in VA					
Worsening	1 (2.6%)	5 (16.1%)	8 (9.2%)	1 (5.6%)	3 (6.3%)
Equal	22 (56.4%)	15 (48.4%)	54 (62.1%)	2 (11.1%)	30 (62.5%)
Improvement	16 (41%)	11 (35.5%)	25 (28.7%)	15 (83.3%)	15 (31.3%)

**Table 4.** Functional results (visual acuity) of amniotic membrane transplantation for each type of ulcer. The minimum last follow-up was 18 months.

VA, visual acuity; BACT, post-bacterial ulcers; HERP, post-herpetic ulcers; NEUROT, neurotrophic ulcers; PERIPH, non-rheumatic peripheral ulcers; LAGOPH, ulcers secondary to lagophthalmos and eyelid malposition or trauma; CF, counting fingers; HM, hand motions; LP; light perception.

## 5.5 Efficacy of Monolayer Versus Multilayer AMT

Monolayer and multilayer AMTs were performed in 65.5% (146/223) and 34.5% (77/223) of the cases, respectively. The success rate was higher in the monolayer (79.5%) than in the multilayer AMTs (64.9%) ( $p = 0.018$ ) (Table 5).

	<b>BACT</b>	<b>HERP</b>	<b>NEUROT</b>	<b>PERIPH</b>	<b>LAGOPH</b>
MON	88.9%	90.9%	75.0%	77.8%	75.7%
MUL	61.9%	55.6%	63.0%	88.9%	63.6%
TOTAL	74.4%	80.6%	71.3%	85.3%	72.9%
p	$p = 0.058$	$p = 0.043$	$p = 0.186$	$p = 0.500$	$p = 0.334$

**Table 5.** Relationship between the number of AM layers and success rate according to ulcer etiology.

MON, monolayer; MUL, multilayer; BACT, post-bacterial ulcers; HERP, post-herpetic ulcers; NEUROT, neurotrophic ulcers; PERIPH, non-rheumatic peripheral ulcers; LAGOPH, ulcers secondary to lagophthalmos and eyelid malposition or trauma.

## 5.6 Correlation of Monolayer/Multilayer AMT and VA Gain

In the monolayer and multilayer AMT, the VA improved from  $2.04 \pm 0.88$  to  $1.80 \pm 1.01$  logMAR ( $p = 0.093$ ) and  $1.49 \pm 0.91$  to  $1.28 \pm 0.97$  logMAR ( $p = 0.056$ ), respectively. Table 6 shows the relationship between the number of amniotic membrane layers and VA gain according to ulcer etiology (Table 6).

		<b>BACT</b>	<b>HERP</b>	<b>NEUROT</b>	<b>PERIPH</b>	<b>LAGOPH</b>
<b>MON</b>	logMAR VA at baseline (mean $\pm$ SD)	$2.19 \pm 0.93$	$2.20 \pm 0.79$	$1.89 \pm 0.87$	$1.56 \pm 1.05$	$2.21 \pm 0.86$
	logMAR VA last follow-up (mean $\pm$ SD)	$1.88 \pm 1.14$	$1.84 \pm 0.97$	$1.82 \pm 0.94$	$0.61 \pm 0.33$	$2.11 \pm 0.97$
<b>MUL</b>	logMAR VA at baseline (mean $\pm$ SD)	$1.69 \pm 0.79$	$1.81 \pm 0.94$	$1.48 \pm 0.85$	$0.81 \pm 0.80$	$1.52 \pm 0.98$
	logMAR VA last follow-up (mean $\pm$ SD)	$1.28 \pm 0.79$	$1.84 \pm 0.89$	$1.35 \pm 0.93$	$0.55 \pm 0.85$	$1.25 \pm 1.05$

**Table 6.** Relationship between the number of amniotic membrane layers and visual acuity gain according to ulcer etiology.

VA, visual acuity; MON, monolayer; MUL, multilayer; BACT, post-bacterial ulcers; HERP, post-herpetic ulcers; NEUROT, neurotrophic ulcers; PERIPH, non-rheumatic peripheral ulcers; LAGOPH, ulcers secondary to lagophthalmos and eyelid malposition or trauma; SD, standard deviation.

There were no statistically significant differences in VA gain between the monolayer and multilayer AMT in the entire cohort ( $p = 0.509$ ) or in all etiological groups (post-bacterial ulcers,  $p = 0.208$ ; post-herpetic ulcers,  $p = 0.338$ ; neurotrophic ulcers,  $p = 0.737$ ; non-

rheumatic peripheral ulcers,  $p = 0.054$ ; ulcers secondary to lagophthalmos and eyelid malposition or trauma,  $p = 0.371$ ).

## 6 DISCUSIÓN

La SO está compuesta esencialmente por cornea, limbo y conjuntiva, siendo sus principales factores de protección los párpados y la película lagrimal. Distintos autores han postulado que los agentes externos constituyen la causa fundamental desencadenante de algunas de las lesiones más frecuentes de la SO. <sup>1,40,98-100</sup>.

Las lesiones más frecuentes en la superficie corneal, a este respecto, son las úlceras, que cuando cursan sin respuesta al tratamiento pueden evolucionar hasta situaciones muy graves, conocidas como UCRTs, a las que ya se ha hecho especial mención con anterioridad. Entre los muchos tratamientos estudiados para la patología de la SO destaca el TMA. Este tratamiento ha demostrado ser una herramienta eficaz en el abordaje terapéutico de las distintas patologías de la SO y entre ellas, las UCRTs <sup>1,23,79,101,102</sup>.

En la presente discusión consideraremos, en primer lugar, en el contexto de la bibliografía existente, los usos y efectos del TMA en las distintas patologías de la SO para indagar sobre los mecanismos y características que, en cada una de ellas, presenta la acción terapéutica de dicha membrana y, en segundo lugar, consideraremos nuestros resultados en la presente tesis a la luz de la bibliografía existente en su aplicación a las UCRTs y de la discusión previa realizada en su aplicación a otras patologías. De este modo, podremos determinar si existe un posible modelo de respuesta en patologías similares de la superficie corneal.

El TMA ha sido, en efecto, aplicado entre otras patologías en las úlceras infecciosas activas. Además de sus efectos ya conocidos y descritos, la MA actuaría como un reservorio, permitiendo una mayor duración del antibiótico <sup>103</sup>. En un estudio reciente, Moha et al. <sup>104</sup> obtuvieron un 82'1% de éxito en úlceras corneales bacterianas activas refractarias. En otro trabajo de nuestro grupo <sup>105</sup>, el uso de TMA en úlceras activas secundarias a *acanthamoeba* (patología infecciosa muy grave y de difícil manejo), la reepitelización se consiguió únicamente en un 13'3% (n=2) si bien fue necesaria la reintervención con otras técnicas quirúrgicas en el 60% de los pacientes (n= 9). Aunque con estos resultados no podemos recomendar su uso, tenemos que entender que, en estos casos donde se utilizó el TMA, los pacientes presentaban un adelgazamiento corneal y un melting intenso, y por tanto, cuadros de muy mal pronóstico. Al igual que otros autores <sup>99,106,107</sup>, nosotros proponemos que, en situaciones como estas, el uso del TMA junto con el tratamiento médico correcto debería ser una opción a valorar ya que permite ganar tiempo para futuros tratamientos. En otros trabajos sobre el uso de TMA

en infecciones fúngicas (patología infecciosa severa y difícil de controlar al igual que las infecciones por *acanthamoeba*), solo se consideraba como objetivo la preservación del globo ocular, con lo que podemos entender la gravedad de ambas patologías infecciosas. Estos autores encontraron un 88% de éxito (preservación del globo ocular) tras la cirugía de TMA y flap conjuntival.<sup>108</sup> En estudios sobre el uso de la MA por parte de otras especialidades quirúrgicas, se demostró, asimismo, que permiten un mejor control de la población bacteriana<sup>109</sup>.

Otros tipos de úlceras que en nuestro estudio fueron descartadas debido a que no cumplían los criterios de inclusión requeridos (ver métodos) fueron las asociadas con patología reumatológica y las secundarias a quemaduras químicas y posqueratoplastia penetrante. Schuerch et al.<sup>3</sup> describe un éxito de reepitelización bastante aceptable tras el TMA en estos tipos de úlceras: úlceras asociadas a enfermedad reumatoidea (52%), úlceras secundarias a quemaduras químicas (63%) y post queratoplastia penetrante (57%).

En el caso de las perforaciones corneales, si bien es cierto que el tratamiento definitivo son las queratoplastias<sup>110</sup>, la dificultad para encontrar córneas de forma urgente hace que tengamos que valorar otras herramientas como el TMA. La utilización de TMA en esta patología está avalada por numerosos estudios<sup>37-39</sup> pero no en todos los casos, Rodríguez-Ares et al.<sup>37</sup> describen su uso con seguridad solamente en perforaciones inferiores a 1'5 cm, en las cuales encuentran altas tasas de éxito. Sin embargo, otros estudios<sup>4</sup> observan que la utilización exclusiva de MA en perforaciones corneales fracasa en la mayoría de los casos, y recomiendan la búsqueda de tratamientos coadyuvante al empleo de la MA en el momento quirúrgico (parches corneales, parches de cordón umbilical, pericardio equino, TachoSil®, pegamento de fibrina, fibrina intracamerular, etc) como ya están investigando otros autores<sup>40,111-118</sup>.

La queratopatía bullosa es otra patología que podría beneficiarse del TMA. La continua fricción de los nervios producida por el estroma corneal edematizado y la formación de bullas son la principal causa de dolor en esta patología. La utilización de MA en estos pacientes permite un alivio sintomático, limitado a la duración de la MA<sup>21</sup>. Pires et al.<sup>119</sup> describió en su estudio, cómo el 90% de los pacientes con queratopatía bullosa e intenso dolor respondían al tratamiento, con alivio del dolor<sup>22</sup>. Schuerch et al.<sup>3</sup> indicaron un 79% de éxito en las úlceras secundarias a queratopatía bullosa.

El uso de la MA en quemaduras químicas agudas es controvertido. Esto se debe a que a pesar de sus propiedades beneficiosas, su capacidad para inhibir la vascularización

limita la recuperación de células limbares <sup>45</sup>. Normalmente su uso se reserva para quemaduras graves agudas, aunque no hay acuerdo en la actualidad. El tratamiento de esta patología únicamente con TMA no está recomendado y suele usarse como adyuvante de otros tratamientos tales como tetraciclinas, lágrimas artificiales, vitamina C, lente terapéutica o trasplante de células limbares <sup>23</sup>. Sobre el alivio sintomático y el tiempo de reepitelización, sí se han visto mejorías gracias a ella. Los pacientes con quemaduras grado II-III (clasificación Roper-Hall, anexo 1 <sup>76</sup>) presentan en estas circunstancias mayor recuperación de AV que los grado IV <sup>23</sup>.

Aunque no existe controversia sobre el uso de TMA en quemaduras grado IV, es bastante probable que la MA implantada en el paciente no aporte células madre vivas y funcionales, sino más bien un gran número de moléculas y factores que, sumadas al andamiaje biomecánico, permiten y estimulan la diferenciación de las células locales. Por ello, en grados tan avanzados y a pesar de aportar un microclima favorecedor, no existe posibilidad de mejoría únicamente con este tratamiento <sup>21,23</sup>. Los estudios de Tamhane et al. <sup>120</sup> han demostrado que la MA favorece la epitelización y el alivio del dolor, sin reducir el riesgo de déficit células limbares ni lograr mejoría de la AV en comparación con grupo control. El estudio de Schuerch et al. <sup>3</sup> describe un éxito del 63% tras el uso de TMA en úlceras secundarias a quemaduras químicas. Estudios recientes <sup>45</sup> afirman que el tratamiento médico más TMA *versus* el tratamiento médico únicamente, no acelera la reepitelización ni mejora la AV en quemaduras graves. En el caso de producirse una quemadura muy extensa o una enfermedad crónica, éstas podrían desembocar en una insuficiencia limbal y tendríamos que plantearnos otras cirugías como trasplante de células limbares.

El TMA es una buena alternativa, en la cirugía de pterigiums, al autoinjerto conjuntival (AIC) (*gold-standard*); especialmente en los casos en los que el paciente haya sido sometido a numerosas cirugías conjuntivales previas o cuando se requiera conservar la conjuntiva para posibles cirugías futuras de glaucoma <sup>22</sup>. Un estudio sistemático Cochrane <sup>121</sup> comparó la efectividad y riesgos del AIC *versus* MA, encontrando un porcentaje de recidiva de 3'3-16'7% usando AIC frente a 6'4-42'3% con MA. El meta análisis mostraba que los ojos tratados con AIC tenían un 47% menos de riesgo recidiva a los 6 meses en comparación a los tratados con MA. Otro meta análisis de Li et al. <sup>122</sup> apoya también estos resultados.

El uso de TMA en enfermedades mucosinequiantes, como la necrolisis epidérmica tóxica (NET) y el síndrome de Stevens.Johnson (SJJ), busca prevenir la formación de simbléfaron y evitar otras complicaciones asociadas. La utilización de lubricación

intensa, corticoides tópicos agresivos y el TMA son necesarios para prevenir posibles complicaciones futuras, recomendándose el TMA en NET y SSJ de forma aguda en la primera semana <sup>68,123,124</sup>. Hsu et al <sup>125</sup> realizaron un estudio de casos y controles en NET y SSJ agudo, observando que el uso temprano de MA evitaba la pérdida severa de AV en dichos pacientes con inflamación moderada o severa. Los principales signos que deberían obligar al uso del TMA serían la afectación del borde libre palpebral, la formación de pseudomembranas y membranas, los defectos de conjuntiva y la afectación de fornix tarsal. <sup>68,123</sup>. En estas enfermedades, no existe acuerdo sobre si es preferible el uso de sutura o de fibrina para evitar complicaciones postoperatorias <sup>124,126</sup>.

En muchas ocasiones, el mayor problema para el TMA es que los pacientes se encuentran muy inestables o en la Unidad de Cuidados Intensivos, sin posibilidad de entrar a quirófano. En estas situaciones surgen diversos dispositivos ya descritos como Prokera® (Bio-Tissue, Inc., Miami, FL), AmnioClip® (FORTECH GmbH, Dresden, Germany), etc. cuya colocación puede hacerse bajo anestesia tópica y sin microscopio <sup>68,123</sup>. Recalcar que el uso de estos dispositivos está altamente recomendado en la prevención de simbléfaron <sup>23,55-57</sup>.

Otros usos de MA o de derivados de ésta, de reciente aparición son el extracto de MA (propiedades similares a la MA criopreservada) y extracto de MA en gotas (ésta puede combinarse con la sangre del cordón umbilical y usarse como una variante de la solución derivada de MA). También se está empezando a estudiar el empleo del fluido amniótico, que es un medio dinámico que cambia su composición según la etapa de embarazo, conteniendo en esencia una serie de factores de crecimiento, electrolitos, proteínas, enzimas y hormonas que favorecen la cicatrización <sup>5</sup>. En cuanto a la preparación del extracto de MA, actualmente no hay protocolos estandarizados para su realización, existiendo diferentes métodos, que dotan de propiedades distintas al producto. Este hecho, junto a diversos problemas en la preservación correcta del producto y la corta vida útil, son sus principales desventajas. Es importante destacar que el extracto no aportará las propiedades tectónicas y biomecánicas del TMA. La principal ventaja de su uso es que al ser un colirio puede ser aplicado por el propio paciente, evitándose el quirófano, lo que prevendría en gran medida infecciones postquirúrgicas, incomodidades para el paciente y rebajaría el gasto sanitario.

Distintos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado el efecto beneficioso de dicho producto permitiendo una mejor regeneración del tejido, sin embargo, no hay ningún estudio que compare su uso *versus* suero autólogo (derivado de la sangre), por lo que, desconocemos si estos productos son superiores, iguales o inferiores en relación con

su eficacia <sup>5</sup>. Muchas compañías están comercializando estos productos (a pesar de no estar reguladas aún por la *Food and Drugs Administration* (FDA) de Estados Unidos. Las empresas más destacadas son Regenesol <sup>™</sup> por Biotissue / Tissue Tech Inc. (Miami, FL, EE. UU.), Extracto de citocina amniótica Génesis (ACE) <sup>™</sup> de Ocular Science Inc. (Manhattan Beach, CA, EE. UU.) y Regener-Eyes <sup>™</sup> (Palm Beach, FL, USA). Se recomienda su uso para ojo seco, quemaduras químicas, úlceras corneales, trasplante corneal y tras queratomileusis subepitelial asistida con láser (laser-assisted subepithelial keratomileusis, LASEK)<sup>5</sup>.

En los últimos años, la gran influencia de la ingeniería tisular ha favorecido la aparición de nuevas aplicaciones de la MA, entre las que se encuentra su aprovechamiento para el cultivo de células del limbo esclero-corneal, lo que permite cirugías menos agresivas en el tratamiento del déficit de células limbares; pudiendo usarse en estos casos la MA intacta o desepitelizada. No está demostrado cuál es la mejor, aunque algunos estudios <sup>127</sup> sugieren que es preferible el uso de MA intacta. Sin embargo, otros advierten de la necesidad de más estudios antes de llegar a esta conclusión <sup>19</sup>. Cabe destacar que experimentos *in vitro* indican que el cultivo en MA intacta apoya la expansión de células con un fenotipo limbal parcialmente indiferenciado, mientras que el cultivo en MA desepitelizada podría inducir su diferenciación, aunque la adición de células 3T3 parece disminuir este efecto <sup>19</sup>. Otro factor que se valoró fue la estabilidad de la MA para el cultivo, por lo que se empezó a estudiar el uso de distintos agentes de entrecruzamiento (*crosslinking*) en MA y el uso de distintos geles de colágeno, geles de fibrina y fibronectina-fibrina para cultivo, así como la utilización de lentes de contacto <sup>10</sup>. Todo ello pretende aumentar la estabilidad del injerto de MA para evitar el desprendimiento postquirúrgico <sup>19</sup>.

Una alternativa no quirúrgica muy interesante al TMA en patología de SO y que tiene una gran relación con la MA es el uso de suero de cordón umbilical. Este suero ha demostrado ser superior en algunos parámetros (mayor tiempo de ruptura y valores más altos test Schirmer postratamiento) <sup>70</sup>, sin embargo, no está disponible en la mayoría de los centros.

Una vez discutido sobre los distintos usos y efectos de la TMA en la patología de la SO consideraremos en segundo lugar, como indicamos al comienzo de la presente discusión, los resultados del trabajo de tesis doctoral sobre los efectos de la utilización de la MA en las UCRTs, tanto en el contexto bibliográfico anterior como en el contexto bibliográfico que le es propio. Las UCRTs han sido el epicentro de nuestro trabajo de investigación de tesis doctoral y nuestros resultados, tras la aplicación de la MA, los

expuestos en el capítulo correspondiente. A partir de estos resultados comentaremos sus efectos en relación con la experiencia existente en este campo y con las posibles ventajas e inconvenientes que la aplicación de TMA tiene para el conjunto de las patologías de la SO.

Como se indicó con anterioridad, numerosos estudios han descrito los beneficios de los TMA en las diversas patologías de la SO <sup>4,23,42,55</sup>, incluidas las UCRTs <sup>70,98,128</sup>. Sin embargo, las diversas etiologías de las úlceras, los pequeños tamaños muestrales y los tratamientos adyuvantes utilizados o el análisis de las diferentes variables dificultan las comparaciones entre los distintos trabajos <sup>2,3,38,82,84,85</sup>. Nuestro estudio multicéntrico estudió una serie de indicadores en una muestra de gran tamaño, haciendo especial hincapié en la ganancia de la AV y del número de capas. De este modo, buscamos valorar y confirmar las ideas relacionadas con la eficacia del uso del TMA, a la vez que sugerir otras nuevas para reforzar su uso, si procediese.

La edad media de los participantes en nuestro estudio y en otros estudios fue de 64-68 años <sup>3,82,93,129</sup>. Al igual que en otros trabajos, se demostró que la TMA fue una técnica segura y no agresiva y que, como proponen otros estudios<sup>3,82,129</sup>, puede utilizarse en un amplio rango de edades. Por otra parte, es importante reseñar que, en los hospitales incluidos en nuestro estudio, y en ausencia de respuesta al tratamiento farmacológico, el TMA fue una de las primeras opciones quirúrgicas para las UCRTs. Este hecho fue también respaldado por un artículo publicado recientemente que reveló que las úlceras corneales constituyen la primera indicación de los TMA <sup>101</sup>.

Nuestro porcentaje global de éxito fue del 74,4% (166/223). En la bibliografía, las tasas de éxito del TMA en UCRTs son muy variables <sup>3,82,85,128</sup>. La mayoría de las publicaciones sobre TMA con tasas de éxito superiores a las nuestras son informes de casos o series de casos en pacientes por etiologías seleccionadas <sup>54,130</sup>. Sin embargo, aquellos artículos que empiezan a tener un número más alto de pacientes como los de Kokhar et al. <sup>131</sup> (n=15), Chen et al. <sup>34</sup> (n= 17), Letko et al. <sup>83</sup> (n = 30) presentan tasas de éxito parecidas a las nuestras (73.3%, 11/15, Kokhar et al. <sup>131</sup>; 76.4%, 13/17, Chen et al. <sup>34</sup>; 70%, 21/30, Letko et al. <sup>83</sup>). En los trabajos de mayor número de participantes y mejor diseño en nuestra opinión, las tasas de éxito encontradas fueron relativamente inferiores a las nuestras, el 49% (66/135) y el 70% (105/149), comunicadas por Uhlig et al. <sup>82</sup> y Schuerch et al. <sup>3</sup>, respectivamente. Los resultados presentados por Paolin et al.<sup>128</sup> con un 100% de éxito en 2430 casos constituye un resultado aislado que no ha sido confirmado por ningún otro estudio y que, por tanto, no puede considerarse como valor de referencia.

La tasa de éxito de nuestro estudio es superior a los promedios observados en los trabajos que consideramos de mayor relevancia (Uhlig et al. <sup>82</sup> y Schuerch et al. <sup>3</sup>) y lo es, además, con un tamaño de muestra mayor (n= 135, Uhlig et al. <sup>82</sup>; n= 149, Schuerch et al. <sup>3</sup>; n= 223, Lacorzana et al. <sup>79</sup>). No obstante, al comparar nuestros resultados con los datos de estos trabajos, es importante considerar que la etiología de las UCRTs tratadas en ambos casos no responden exactamente a la misma etiología. En el trabajo de Schuerch et al. <sup>3</sup> se consideran las mismas etiologías que las estudiadas en nuestro estudio pero, además, incluyen otras etiologías, como la posqueratoplastia, asociada a enfermedad reumatoidea, secundarias a queratopatía bullosa y secundarias a quemaduras químicas. En su estudio, Uhlig et al. <sup>82</sup> dividieron los casos de UCRTs en cuatro grupos (neurotróficas, posherpéticas, posbacterianas y asociadas a enfermedad reumatoidea). En dichos grupos, no hubo diferencias significativas en los porcentajes de epitelización. En sus resultados, Liu et al. <sup>85</sup> no encontraron diferencias significativas entre las úlceras infecciosas y las no infecciosas. En consonancia con los resultados obtenidos por los autores anteriormente indicados, no se observaron en nuestros resultados diferencias significativas en los porcentajes de éxito del TMA (71,3% a 83,3%) entre los casos correspondientes a las cinco etiologías de UCRTs investigadas. Con respecto al uso de TMA en otras patologías de SO, parece claro que los buenos resultados avalan su uso <sup>4,23,42,55</sup>.

La AV preoperatoria fue muy baja en toda nuestra cohorte. En su investigación, Schuerch et al. <sup>3</sup> no observaron diferencias en la AV preoperatoria entre los distintos grupos etiológicos. Sin embargo, nuestros resultados ponen de relieve que la AV preoperatoria fue significativamente peor en el grupo con úlceras posherpéticas en comparación con los otros grupos etiológicos de UCRTs. Las úlceras posherpéticas presentan en tal sentido un alto porcentaje de opacificación final a pesar de conseguir un alto porcentaje de reepitelización. Aunque la TMA es una técnica eficaz para el cierre de estas úlceras, en muchos casos, el tratamiento inicial de las úlceras posherpéticas debería ser más rápido, ya que la pérdida de transparencia fue más frecuente que en las otras etiologías. Por lo tanto, a pesar de que la reepitelización se consiguió, la AV en el último seguimiento fue baja en la mayoría de estos casos.

En contraste con nuestros hallazgos con respecto a la AV postoperatoria, Uhlig et al. <sup>82</sup>, Letko et al. <sup>83</sup>, Prabhasawat et al. <sup>38</sup>, y Brocks et al. <sup>132</sup> no encontraron mejoras significativas en la AV postoperatoria en comparación con los valores basales a pesar de informar de altos porcentajes de reepitelización. En su estudio, Schuerch et al. <sup>3</sup> observaron mejoras significativas en la AV en toda la cohorte, pero no en relación con

los grupos etiológicos, probablemente por el menor número de pacientes estudiados. En nuestro estudio, nuestros hallazgos pusieron de relieve mejoras significativas en la AV en toda la cohorte y también en todos los grupos etiológicos. Por tanto, dado que todos los grupos mejoraron, la etiología de las úlceras no parece ser un factor decisivo en la ganancia de AV. Aunque estas mejoras fueron pequeñas en algunos casos, incluso estas pequeñas ganancias de AV son relevantes en la vida diaria de los pacientes con una AV baja. Esta ganancia puede permitir a algunos de ellos dejar de ser ciegos legalmente (13,5%, 17/126), con todo lo que esta mejora visual conlleva clínicamente. Los efectos anti-cicatrización y anti-angiogénicos de la HC-HA/PTX3 de MA podrían ayudar a explicar estas mejoras de la AV <sup>26,28,133</sup>.

Un estudio reciente en el que se utilizaron MAs procesadas criopreservadas (Prokera®; Bio-Tissue, Inc., Miami, FL, EE.UU.) ha demostrado una ganancia de AV significativa en un número limitado de casos (n = 24); sin embargo, este estudio sólo analizó Prokera® en úlceras infecciosas, pero no en UCRTs. Otros estudios sobre Prokera® no encontraron esta ganancia significativa de AV <sup>132</sup>.

En los resultados de la presente tesis, el 92% (205/223) de los pacientes mantuvieron o mejoraron sus AVs. Este resultado nos permite considerar diferentes consecuencias terapéuticas. En primer lugar, hay que señalar que la progresión vascular y la inflamación persistente suelen facilitar el cierre de las úlceras, con la consecuencia secundaria de la pérdida de transparencia corneal y la reducción de la AV. Resulta evidente que los TMA podrían ayudar a evitar esta situación mediante su autointegración en el tejido corneal del huésped en diferentes patrones (subepitelial, intraepitelial o intraestromal) de acuerdo con lo indicado por algunos autores <sup>47,48,134</sup>. Sin embargo, si el TMA se realiza de forma tardía, es posible que ya exista un componente de estroma fibrótico que reduzca la transparencia corneal de forma pronunciada. El tratamiento inicial de estas úlceras crónicas debería ser, en consecuencia, agresivo y rápido para evitar esta pérdida de AV inicial; de lo contrario, sólo un bajo porcentaje de pacientes alcanzaría una visión moderadamente buena. Por lo tanto, de nuestros resultados se desprende la necesidad de que los TMA se puedan llevar a cabo lo antes posible. En segundo lugar, es importante inferir que los TMA pueden mejorar la AV al regularizar la superficie corneal y mejorar la transparencia de la córnea <sup>54,83</sup>, circunstancia que puede retrasar el empleo de opciones quirúrgicas más agresivas. En el futuro, muchos de estos pacientes podrían recibir un trasplante de córnea con mejor pronóstico, dado que su córnea estará epitelizada y menos inflamada <sup>30,33,85</sup>.

Si como se ha indicado previamente, intentamos proyectar nuestros resultados de TMA en UCRTs como modelo a aplicar en otras patologías de la SO, parece claro que, debido a las propiedades descritas con anterioridad, el proceso de curación puede ser más rápido y pueden conseguirse mejores AV de forma generalizada en todas ellas. No obstante, es importante tener en cuenta que cuanto más cerca del eje visual esté la lesión, mayor será la pérdida de AV; por tanto, los resultados de AV de una perforación central, nunca podrán ser comparados con los de una úlcera corneal periférica.

Con respecto al uso de distinto número de capas de MA y la tasa de éxito, hay dos estudios anteriores que incluyeron un número relativamente bajo de casos ( $n = 28$  en cada estudio) e informaron de que la tasa de éxito del TMA monocapa oscilaba entre el 64% y el 80% y la del TMA multicapa entre el 72% y el 84,6% <sup>38,84</sup>. En nuestro estudio multicéntrico, la tasa de éxito fue significativamente mayor con la TMA monocapa que con la multicapa (79,5% y 64,9%, respectivamente). Este resultado debe interpretarse con cautela, dado que se pudo analizar la profundidad de las úlceras (descartándose los descemetocelos), pero no el área superficial de las mismas. Posiblemente, las UCRTs más grandes lleven a los cirujanos a aplicar más capas para intentar conseguir un mayor éxito o esto quizás dependa de las preferencias de los cirujanos. Otra posible hipótesis es que la MA no se integre bien cuando se utiliza como multicapa. Esta hipótesis podría evaluarse a nivel de microscopía óptica en futuros estudios.

Aunque parece lógico pensar que cuanto mayor número de capas, mejores serán los resultados, hay que tener en cuenta que un mayor número de capas, posiblemente dificulte la visión al paciente, así como la adaptación de una posible lente de contacto. Es muy habitual que en ciertas patologías de la SO, se usen lentes de contacto a modo de protección; ejemplos claro de esto son las queratopatías bullosas, las perforaciones, las úlceras neurotróficas y las enfermedades mucosinequiantes que suelen ser muy lente de contacto-dependientes. Por ello, el número de capas a aplicar exige una investigación muy orientada al respecto.

En cuanto a la influencia del número de capas de MA en la ganancia de AV, nuestros resultados mostraron que no había diferencias significativas entre la TMA monocapa y la multicapa en los distintos grupos etiológicos. Por lo tanto, dado que la tasa de éxito y la ganancia de AV no fueron mejores en el TMA multicapa que en el monocapa, el uso del TMA multicapa podría no estar justificada en las UCRTs. No obstante, el uso del TMA multicapa podría estar indicado en casos específicos, como los descemetocelos y las perforaciones como indican algunos autores <sup>29,36,37,135</sup>. Si, nuevamente y de acuerdo con lo indicado en el párrafo anterior, utilizamos nuestros resultados de TMA en UCRTs

como modelo en otras enfermedades de la SO, posiblemente un número elevado de capas no sería recomendable en otras patologías de la SO. Patologías como perforaciones grandes <sup>1,40</sup> o isquemias limbares deberían manejarse con otros tratamientos coadyuvantes (trasplante corneal o trasplante de limbo, respectivamente).

Una limitación de nuestro estudio podría ser su carácter retrospectivo y multicéntrico. En efecto, la disponibilidad de MA, las preferencias terapéuticas de los cirujanos y la prevalencia de las úlceras podrían haber condicionado, de algún modo, la selección de los diferentes casos en nuestros hospitales estudiados. Posiblemente, la valoración del área superficial de las úlceras habría ayudado a explicar mejor nuestros resultados; sin embargo, estos datos no fueron consistentes y, por tanto, se excluyeron de nuestro estudio.

En definitiva, nuestra investigación ofrece, en una amplia serie de casos, resultados muy significativos sobre el uso de MA en las UCRTs que pueden contribuir a establecer protocolos terapéuticos en relación a las UCRTs originadas a partir de distintas etiologías y a contemplar asimismo la utilización de la MA en otras patologías de la SO que compartan con las UCRTs patrones estructurales y pautas fisiopatológicas semejantes.

## 7 CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados de la presente tesis se infieren las siguientes conclusiones:

1. El trasplante de membrana amniótica aplicado como recurso terapéutico en úlceras corneales refractarias a tratamiento con etiología posbacteriana, posherpética, neurotrófica, secundaria a lagofthalmos, malposición palpebral o trauma y periféricas no asociadas a enfermedad reumática, pone de relieve la no existencia de patrones clínicos de respuesta, vinculados a la etiología originaria de las úlceras tratadas con trasplante de membrana amniótica. Ello permite establecer en consecuencia un patrón homogéneo de respuesta al trasplante de alta eficacia y seguridad que puede relacionarse con las propiedades biológicas y biomecánicas que caracterizan a la membrana amniótica como recurso terapéutico.
2. El trasplante de membrana amniótica aplicado como recurso terapéutico en úlceras corneales refractarias a tratamiento con etiología posbacteriana, posherpética, neurotrófica, secundaria a lagofthalmos, malposición palpebral o trauma y periféricas no asociadas a enfermedad reumática, pone de relieve la existencia de patrones diferentes de reepitelización en relación con la etiología originaria de las úlceras tratadas con membrana amniótica, con tasas de reepitelización más significativas en las úlceras corneales, refractarias a tratamiento, originadas a partir de las úlceras periféricas y las úlceras posherpéticas.
3. El trasplante de membrana amniótica aplicado como recurso terapéutico en úlceras corneales refractarias a tratamiento con etiología posbacteriana, posherpética, neurotrófica, secundaria a lagofthalmos, malposición palpebral o trauma y periféricas no asociadas a enfermedad reumática, pone de relieve la ganancia de la agudeza visual media en toda la cohorte con independencia de la etiología originaria de las úlceras corneales refractarias tratadas con trasplante de membrana amniótica, permitiendo que pacientes afectados por úlcera corneal refractaria a tratamiento puedan dejar de ser ciegos legalmente con el incremento potencial de la calidad de vida que ello supone. La ganancia en agudeza visual no siguió, sin embargo, un proceso similar en todas las etiologías estando vinculada a la afectación inicial y por tanto al proceso de reepitelización que ello implica como ocurre específicamente en las úlceras corneales

refractarias al tratamiento de origen postherpético, circunstancia esta última que permite postular la necesidad de una intervención más agresiva y precoz en estos casos.

4. El trasplante de membrana amniótica aplicado como recurso terapéutico en úlceras corneales refractarias a tratamiento con etiología posbacteriana, posherpética, neurotrófica, secundaria a lagofthalmos, malposición palpebral o trauma y periféricas no asociadas a enfermedad reumática, pone de relieve que la utilización del trasplante multicapa de membranas amnióticas no conduce a mejoras significativas, en tasa de éxito y ganancia de agudeza visual, en relación con el trasplante monocapa de membrana amniótica, lo que ha de vincularse más con la incidencia de los efectos mecánicos que genera la utilización de multicapas que con las propiedades biológicas de la membrana amniótica.
  
5. Los resultados derivados de la aplicación del trasplante de membrana amniótica como recurso terapéutico en úlceras corneales refractarias a tratamiento con etiología posbacteriana, posherpética, neurotrófica, secundaria a lagofthalmos, malposición palpebral o trauma y periféricas no asociadas a enfermedad reumática pueden conformar, en lo que a evaluación y efectos se refiere, un modelo de utilización de dicho recurso en futuros estudios sobre la posible aplicación del mismo en otras patologías de la superficie ocular y del organismo humano, que compartan patrones biológicos y clínicos similares con la úlcera corneal ocular refractaria al tratamiento.

## 8 CONCLUSIONS

The following conclusions can be drawn from the analysis of the results of this thesis:

1. Amniotic membrane transplantation applied as a therapeutic tool in non-healing corneal ulcers with aetiologies including post-bacterial, post-herpetic, neurotrophic, secondary to lagophthalmos, palpebral malposition or trauma and non-rheumatic peripheral, highlights the non-existence of clinical patterns of response, linked to the original aetiology of the ulcers treated with amniotic membrane transplantation. This makes it possible to establish a homogeneous pattern of response to transplantation of high efficacy and safety that could be related to the biological and biomechanical properties that characterise amniotic membrane as a therapeutic tool.
2. Amniotic membrane transplantation applied as a therapeutic tool in non-healing corneal ulcers with aetiologies including post-bacterial, post-herpetic, neurotrophic, secondary to lagophthalmos, palpebral malposition or trauma and non-rheumatic peripheral, highlights the existence of different patterns of re-epithelialisation in relation to the originating aetiology of ulcers treated with amniotic membrane, with more significant re-epithelialisation rates in non-healing corneal ulcers originating from non-rheumatic peripheral and post-herpetic aetiology.
3. Amniotic membrane transplantation applied as a therapeutic tool in non-healing corneal ulcers with aetiologies including post-bacterial, post-herpetic, neurotrophic, secondary to lagophthalmos, palpebral malposition or trauma and non-rheumatic peripheral, highlights the gain in mean visual acuity in the entire cohort regardless of the original aetiology of ulcer, allowing patients affected by non-healing corneal ulcers to cease to be legally blind with the potential increase in quality of life that this entails. However, the gain in visual acuity did not follow the same pattern across all aetiologies, being linked to the initial involvement and therefore to the re-epithelialisation process involved. Post-herpetic ulcers were the most affected by this, and therefore, this data allows us to postulate the need for a more aggressive and early intervention, especially in these cases.

4. Amniotic membrane transplantation applied as a therapeutic tool in non-healing corneal ulcers with aetiologies including post-bacterial, post-herpetic, neurotrophic, secondary to lagophthalmos, palpebral malposition or trauma and non-rheumatic peripheral, highlights that the use of multilayer amniotic membrane transplantation does not lead to significant improvements in success rate and gain in visual acuity compared to monolayer amniotic membrane transplantation. It is likely due more to the incidence of mechanical effects generated by the use of multilayers than to the biological properties of the amniotic membrane.
  
5. The results derived from the application of amniotic membrane transplantation as a therapeutic tool in non-healing corneal ulcers with aetiologies including post-bacterial, post-herpetic, neurotrophic, secondary to lagophthalmos, palpebral malposition or trauma and non-rheumatic peripheral may form a model for the use of this tool in future studies on its possible application in other pathologies of the ocular surface and the human organism, which share similar biological and clinical patterns with treatment-refractory ocular corneal ulceration.

## 9 REFERENCES

1. Lacorzana J. Amniotic membrane, clinical applications and tissue engineering. Review of its ophthalmic use. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia* 2020; 95: 15–23.
2. Zhang T, Wang Y, Jia Y, et al. Active pedicle epithelial flap transposition combined with amniotic membrane transplantation for treatment of nonhealing corneal ulcers. *J Ophthalmol* 2016; 2016: 5742346.
3. Schuerch K, Baeriswyl A, Frueh BE, et al. Efficacy of Amniotic Membrane Transplantation for the Treatment of Corneal Ulcers. *Cornea* 2020; 39: 479–483.
4. Lacorzana-Rodríguez J, García-Serrano JL, Gálvez Prieto-Moreno C, et al. Amniotic membrane, review of its ophthalmic use and results in the last five years (2013-2017) in Granada. Preliminary study. *Actual Medica* 2018; 103: 82–86.
5. Murri MS, Moshirfar M, Birdsong OC, et al. Amniotic membrane extract and eye drops: A review of literature and clinical application. *Clinical Ophthalmology* 2018; 12: 1105–1112.
6. De Rotth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol* 1940; 23: 522–525.
7. John T. Human amniotic membrane transplantation: past, present, and future. *Ophthalmol Clin North Am* 2003; 16: 43–65, vi.
8. Batlle JF, Perdomo FJ. Placental membranes as a conjunctival substitute. *Ophthalmol*. 1993;100:A107.
9. Alemañy González J, Camacho Ruaigip F. Usos de la membrana amniótica humana en oftalmología. *Rev Cuba Oftalmol* 2006; 19: 1–7.
10. Ortega-molina JM, Agustin HS, Revisión ADE. La membrana amniótica en oftalmología: del recubrimiento-injerto a la ingeniería tisular. Artículo de revisión. *Rev española Investig oftalmológicas; Rev Esp Inv Oftal* 2014; Vol IV nº2 (117-122).
11. Sabater AL, Perez VL. Amniotic membrane use for management of corneal limbal stem cell deficiency. *Current Opinion in Ophthalmology* 2017; 28: 363–369.
12. Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14: 473–84.
13. Kobayashi M, Yakuwa T, Sasaki K, et al. Multilineage potential of side population cells from human amnion mesenchymal layer. *Cell Transplant* 2008; 17: 291–301.
14. Hasegawa M, Fujisawa H, Hayashi Y, et al. Autologous amnion graft for repair of myelomeningocele: technical note and clinical implication. *J Clin Neurosci* 2004; 11: 408–411.
15. Favaron P, Carvalho R, Borghesi J, et al. The amniotic membrane: Development and potential applications - A review. *Reprod Domest Anim* 2015; 50: 881–892.
16. van Herendael BJ, Oberti C, Brosens I. Microanatomy of the human amniotic

- membranes: A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 131: 872–880.
17. Ginel, Gascon MI. Desarrollo del sistema de cohesión intercelular en el epitelio corneal humano generado por ingeniería tisular. Estudio genético e histológico. Epub ahead of print 2008. DOI: 10.1174/021435502753511268.
  18. Malhotra C, Jain AK. Human amniotic membrane transplantation: Different modalities of its use in ophthalmology. *World J Transplant* 2014; 4: 111.
  19. Utheim TP, Aass Utheim Ø, Salvanos P, et al. Concise review: Altered versus unaltered amniotic membrane as a substrate for limbal epithelial cells. *Stem Cells Transl Med* 2018; 7: 415–427.
  20. Litwiniuk M, Grzela T. Amniotic membrane: New concepts for an old dressing. *Wound Repair Regen* 2014; 22: 451–456.
  21. Chiaradia P TA et al. Uso de membrana amniótica en reconstrucción de superficie ocular: resultados preliminares. *Oftalmol Clin Exp (ISSN 1851-2658)* 2010 4(2) 64-68.
  22. Nouredin GS, Yeung SN. The use of dry amniotic membrane in pterygium surgery. *Clin Ophthalmol* 2016; 10: 705–12.
  23. Sharma N, Kaur M, Agarwal T, et al. Treatment of acute ocular chemical burns. *Surv Ophthalmol* 2018; 63: 214–235.
  24. Akazawa K, Iwasaki K, Nagata M, et al. Cell transfer technology for tissue engineering. *Inflamm Regen* 2017; 37: 21.
  25. Barut Selver Ö, Yağcı A, Eğrilmez S, et al. Limbal Stem Cell Deficiency and Treatment with Stem Cell Transplantation. *Turkish J Ophthalmol* 2017; 47: 285–291.
  26. Tseng SCG. HC-HA/PTX3 purified from amniotic membrane as novel regenerative matrix: Insight into relationship between inflammation and regeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57: ORSFh1–ORSFh8.
  27. Wang J, Chen D, Sullivan DA, et al. Expression of Lubricin in the Human Amniotic Membrane. *Cornea* 2020; 39: 118–121.
  28. Zhu YT, Li F, Zhang Y, et al. HC-HA/PTX3 purified from human amniotic membrane reverts human corneal fibroblasts and myofibroblasts to keratocytes by activating BMP signaling. *Investig Ophthalmol Vis Sci*; 61. Epub ahead of print 1 May 2020. DOI: 10.1167/IOVS.61.5.62.
  29. Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999; 106: 1504–1511.
  30. Sacchetti M, Lambiase A. Diagnosis and management of neurotrophic keratitis. *Clinical Ophthalmology* 2014; 8: 571–579.
  31. Saad S, Abdelmassih Y, Saad R, et al. Neurotrophic keratitis: Frequency, etiologies, clinical management and outcomes. *Ocul Surf* 2020; 18: 231–236.
  32. Di Zazzo A, Coassin M, Varacalli G, et al. Neurotrophic keratopathy: Pros and cons of current treatments. *Ocul Surf* 2019; 17: 619–623.
  33. Singhal D, Nagpal R, Maharana PK, et al. Surgical alternatives to keratoplasty in microbial keratitis. *Survey of Ophthalmology* 2021; 66: 290–307.

34. Chen HJ, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 826–833.
35. Dua HS, Said DG, Messmer EM, et al. Neurotrophic keratopathy. *Prog Retin Eye Res* 2018; 66: 107–131.
36. Agarwal R, Nagpal R, Todi V, et al. Descemetocoele. *Survey of Ophthalmology* 2020; 66: 2–19.
37. Rodríguez-Ares MT, Touriño R, López-Valladares MJ, et al. Multilayer amniotic membrane transplantation in the treatment of corneal perforations. *Cornea* 2004; 23: 577–583.
38. Prabhasawat P. 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.
39. Fan J, Wang M, Zhong F. Improvement of Amniotic Membrane Method for the Treatment of Corneal Perforation. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 1693815.
40. Lacorzana J, Protsyk O, Morales P, et al. Corneal perforation triggered by the use of urine therapy drops: Management with scleral and amniotic membrane grafts. *J Fr Ophthalmol* 2021; 44: e299–e301.
41. 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.
42. Navas A, Magaña-Guerrero FS, Domínguez-López A, et al. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of human amniotic membrane mesenchymal stem cells and their potential in corneal repair. *Stem Cells Transl Med* 2018; 7: 906–917.
43. Sharma N, Singh D, Maharana PK, et al. Comparison of amniotic membrane transplantation and umbilical cord serum in acute ocular chemical burns: A randomized controlled trial. *Am J Ophthalmol* 2016; 168: 157–163.
44. Chen Y, Yan X, Wu H, et al. [An experimental study on the fate of the amniotic membrane after amniotic membrane transplantation for acute alkaline burn of rat cornea]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2012; 48: 27–32.
45. Eslani M, Baradaran-Rafii A, Cheung AY, et al. Amniotic Membrane Transplantation in Acute Severe Ocular Chemical Injury: A Randomized Clinical Trial. *Am J Ophthalmol* 2019; 199: 209–215.
46. Sahay P, Goel S, Maharana PK, et al. Amniotic Membrane Transplantation in Acute Severe Ocular Chemical Injury: A Randomized Clinical Trial. *American Journal of Ophthalmology* 2019; 205: 202–203.
47. Resch MD, Schlötzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, et al. Integration Patterns of Cryopreserved Amniotic Membranes into the Human Cornea. *Ophthalmology* 2006; 113: 1927–1935.
48. Resch MD, Schlötzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, et al. Adhesion Structures of Amniotic Membranes Integrated into Human Corneas. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 2006; 47: 1853.
49. Uçakhan OO, Köklü G, Firat E. Nonpreserved human amniotic membrane transplantation in acute and chronic chemical eye injuries. *Cornea* 2002; 21: 169–72.
50. Arora R, Mehta D, Jain V. Amniotic membrane transplantation in acute chemical burns. *Eye (Lond)* 2005; 19: 273–8.

51. Mejía LF, Acosta C, Santamaría JP. Use of nonpreserved human amniotic membrane for the reconstruction of the ocular surface. *Cornea* 2000; 19: 288–91.
52. Mart G, Redondo DEB, Santana G. Transplante de membrana amniótica en patología de la superficie ocular Amniotic membrane trasplantation in ocular surface pathology. 2001; 1–7.
53. Rodríguez-Ares MT, López-Valladares MJ, Touriño R, et al. Effects of lyophilization on human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol* 2009; 87: 396–403.
54. Lee SH, SCG T, LEE S-H, et al. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997; 123: 303–312.
55. Chirapapaisan C, Prabhasawat P, Srivannaboon S, et al. Ocular injury due to potassium permanganate granules. *Case Rep Ophthalmol* 2018; 9: 132–137.
56. Thomas L, Weng M, Schulze R, et al. Ophthalmic Considerations in Stevens-Johnson Syndrome. *J Pediatr* 2016; 175: 235.
57. Suri K, Kosker M, Raber IM, et al. Sutureless amniotic membrane ProKera for ocular surface disorders: short-term results. *Eye Contact Lens* 2013; 39: 341–7.
58. Kotomin I, Valtink M, Hofmann K, et al. Sutureless Fixation of Amniotic Membrane for Therapy of Ocular Surface Disorders. *PLoS One* 2015; 10: e0125035.
59. Costa E, Murta JN. Amniotic Membrane in Ophthalmology. In: *Amniotic Membrane*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015, pp. 105–122.
60. del Campo Z GO. Aplicaciones de la membrana amniótica en patología ocular. *Annals d'Oftalmologia*. 2002;10(3)128-41.pdf.
61. Palamar M, Kaya E, Egrilmez S, et al. Amniotic membrane transplantation in surgical management of ocular surface squamous neoplasias: long-term results. *Eye (Lond)* 2014; 28: 1131–5.
62. Anderson DF, Prabhasawat P, Alfonso E, et al. Amniotic membrane transplantation after the primary surgical management of band keratopathy. *Cornea* 2001; 20: 354–61.
63. Srinivas S, Mavrikakis E, Jenkins C. Amniotic membrane transplantation for painful bullous keratopathy. *Eur J Ophthalmol*; 17: 7–10.
64. Liu J, Sheha H, Fu Y, et al. Update on amniotic membrane transplantation. *Expert Rev Ophthalmol* 2010; 5: 645–661.
65. Gregory DG. New Grading System and Treatment Guidelines for the Acute Ocular Manifestations of Stevens-Johnson Syndrome. *Ophthalmology* 2016; 123: 1653–1658.
66. 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.
67. Ciralsky JB, Sippel KC, Gregory DG. Current ophthalmologic treatment strategies for acute and chronic Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. DOI: 10.1097/ICU.0b013e3283622718.

68. Kohanim S, Palioura S, Saeed HN, et al. Acute and Chronic Ophthalmic Involvement in Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis – A Comprehensive Review and Guide to Therapy. II. Ophthalmic Disease. *Ocul Surf* 2016; 14: 168–188.
69. 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: 686–96.
70. Westekemper H, Figueiredo FC, Siah WF, et al. Clinical outcomes of amniotic membrane transplantation in the management of acute ocular chemical injury. *Br J Ophthalmol* 2017; 101: 103–107.
71. Seitz B, Das S, Sauer R et al. Simultaneous amniotic membrane patch in high-risk keratoplasty. *Cornea* 2011; 30:269–272.
72. Gris O, Güell JL, del Campo Z. Transplantation for the Treatment of Recurrent Pterygium. *Ophthalmology* 2000; 107: 270–273.
73. Marmalidou A, Kheirkhah A, Dana R. Conjunctivochalasis: a systematic review. *Surv Ophthalmol*. Epub ahead of print 9 November 2017. DOI: 10.1016/J.SURVOPHTHAL.2017.10.010.
74. Gris O, López-Navidad A, Caballero F, et al. Amniotic membrane transplantation for ocular surface pathology: Long-term results. *Transplant Proc* 2003; 35: 2031–2035.
75. Gris O, del Campo Z, Wolley-Dod C, et al. Amniotic membrane implantation as a therapeutic contact lens for the treatment of epithelial disorders. *Cornea* 2002; 21: 22–27.
76. Soleimani M, Naderan M. Management Strategies of Ocular Chemical Burns: Current Perspectives. *Clin Ophthalmol* 2020; 14: 2687–2699.
77. Mead O, Tighe S, Tseng S. Amniotic membrane transplantation for managing dry eye and neurotrophic keratitis. *Taiwan J Ophthalmol* 2020; 10: 13–21.
78. Napoli PE, Nioi M, d’Aloja E, et al. The architecture of corneal stromal striae on optical coherence tomography and histology in an animal model and in humans. *Sci Rep* 2020; 10: 1–8.
79. Lacorzana J, Campos A, Brocal-Sánchez M, et al. Visual acuity and number of amniotic membrane layers as indicators of efficacy in amniotic membrane transplantation for corneal ulcers: A multicenter study. *J Clin Med*; 10. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.3390/jcm10153234.
80. Napoli PE, Nioi M, d’Aloja E, et al. The Bull’s Eye Pattern of the Tear Film in Humans during Visual Fixation on En-Face Optical Coherence Tomography. *Sci Rep* 2019; 9: 1–9.
81. Nioi M, Napoli PE, Demontis R, et al. Morphological analysis of corneal findings modifications after death: A preliminary OCT study on an animal model. *Exp Eye Res* 2018; 169: 20–27.
82. Uhlig CE, Frings C, Rohloff N, et al. Long-term efficacy of glycerine-processed amniotic membrane transplantation in patients with corneal ulcer. *Acta Ophthalmol* 2015; 93: e481–e487.
83. Letko E. Amniotic Membrane Inlay and Overlay Grafting for Corneal Epithelial Defects and Stromal Ulcers. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 659.

84. Dekaris I, Gabrić N, Mravičić I, et al. Multilayer vs. monolayer amniotic membrane transplantation for deep corneal ulcer treatment. *Coll Antropol* 2001; 25: 23–28.
85. Liu J, Li L, Li X. Effectiveness of cryopreserved amniotic membrane transplantation in corneal ulceration: A meta-analysis. *Cornea* 2019; 38: 454–462.
86. Samsom M, Iwabuchi Y, Sheardown H, et al. Proteoglycan 4 and hyaluronan as boundary lubricants for model contact lens hydrogels. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2018; 106: 1329–1338.
87. Tseng SCG, Espana EM, Kawakita T, et al. How does amniotic membrane work? *Ocul Surf* 2004; 2: 177–187.
88. Ghosh S, Salvador-Culla B, Kotagiri A, et al. Acute chemical eye injury and limbal stem cell deficiency - A prospective study in the United Kingdom. *Cornea* 2019; 38: 8–12.
89. Nubile M, Dua HS, Lanzini TE-M, et al. Amniotic membrane transplantation for the management of corneal epithelial defects: an in vivo confocal microscopic study. *Br J Ophthalmol* 2008; 92: 54–60.
90. Sotozono C, Ang LPK, Koizumi N, et al. New grading system for the evaluation of chronic ocular manifestations in patients with Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 2007; 114: 1294–1302.
91. Rabbetts RB: Visual acuity and contrast sensitivity, in: Rabbetts RB (ed.): *Clinical visual optics*. Oxford, Butterworth Heineman. 1998, pp. 19–61.
92. Risse JF: Acuité visuelle, in: Risse JF (ed): *Exploration de la fonction visuelle*. Paris, Masson. 1999, pp. 99–128.
93. Yokogawa H, Kobayashi A, Yamazaki N, et al. Surgical therapies for corneal perforations: 10 years of cases in a tertiary referral hospital. *Clin Ophthalmol* 2014; 8: 2165–2170.
94. Ricci F, Cedrone C, Cerulli L. Standardized measurement of visual acuity. *Ophthalmic Epidemiol* 1998; 5: 41–53.
95. Abdulhalim B-EH, Wagih MM, Gad AAM, et al. Amniotic membrane graft to conjunctival flap in treatment of non-viral resistant infectious keratitis: a randomised clinical study. *Br J Ophthalmol* 2015; 99: 59–63.
96. Rim TH, Kim DW, Chung EJ, et al. Nationwide incidence of blindness in South Korea: a 12-year study from 2002 to 2013. *Clin Exp Ophthalmol* 2017; 45: 773–778.
97. Lee CM, Afshari NA. The global state of cataract blindness. *Current Opinion in Ophthalmology* 2017; 28: 98–103.
98. Bouchard CS, John T. Amniotic membrane transplantation in the management of severe ocular surface disease: Indications and outcomes. *Ocul Surf* 2004; 2: 201–211.
99. Gicquel JJ, Bejjani RA, Ellies P, et al. Amniotic membrane transplantation in severe bacterial keratitis. *Cornea* 2007; 26: 27–33.
100. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 399–402.

101. Sabater-Cruz N, Figueras-Roca M, González Ventosa A, et al. Current clinical application of sclera and amniotic membrane for ocular tissue bio-replacement. *Cell Tissue Bank* 2020; 21: 597–603.
102. Meller D, Pauklin M, Thomasen H, et al. Amniotic membrane transplantation in the human eye. *Dtsch Arztebl Int* 2011; 108: 243–8.
103. Sheha H, Liang L, Li J, et al. Sutureless amniotic membrane transplantation for severe bacterial keratitis. *Cornea* 2009; 28: 1118–23.
104. Mohan S, Budhiraja I, Saxena A, et al. Role of multilayered amniotic membrane transplantation for the treatment of resistant corneal ulcers in North India. *Int Ophthalmol* 2014; 34: 485–491.
105. Durán-Carrasco O.; Fernández Núñez C.; Lacorzana J. et al. Aplicación de la membrana amniótica en el manejo de las úlceras corneales asociadas a queratitis por acanthamoeba. *Arch. Soc. Canar. Oftal.* 2021; 32: 107-112.
106. Hoffmann S, Szentmáry N, Seitz B. Amniotic membrane transplantation for the treatment of infectious ulcerative keratitis before elective penetrating keratoplasty. *Cornea* 2013; 32: 1321–1325.
107. Ting DSJ, Henein C, Said DG, et al. Amniotic membrane transplantation for infectious keratitis: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*; 11. Epub ahead of print 1 December 2021. DOI: 10.1038/S41598-021-92366-X.
108. Zhong J, Wang B, Li S, et al. Full-thickness conjunctival flap covering surgery combined with amniotic membrane transplantation for severe fungal keratitis. *Exp Ther Med* 2018; 15: 2711–2718.
109. Robson MC, Krizek TJ. The effect of human amniotic membranes on the bacteria population of infected rat burns. *Ann Surg* 1973; 177: 144.
110. Jhanji V, Young AL, Mehta JS, et al. Management of corneal perforation. *Surv Ophthalmol* 2011; 56: 522–38.
111. Savino G, Colucci D, Giannico MI, et al. Amniotic membrane transplantation associated with a corneal patch in a paediatric corneal perforation. *Acta Ophthalmol* 2010; 88: e15–e16.
112. Xie H-T, Zhao D, Liu Y, et al. Umbilical Cord Patch Transplantation for Corneal Perforations and Descemetocelles. *J Ophthalmol* 2017; 2017: 1–7.
113. Droutsas K, Papaconstantinou D, Georgalas I, et al. Equine pericardium for tectonic globe repair. *Int Ophthalmol*. Epub ahead of print 19 December 2017. DOI: 10.1007/s10792-017-0788-8.
114. Cañones-Zafra R, Benítez-Herreros J, Kubiak K, et al. Perforación corneal no traumática estéril tratada con Tachosil®. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2011; 86: 264–266.
115. Grau AE, Durán JA. Treatment of a Large Corneal Perforation With a Multilayer of Amniotic Membrane and TachoSil. *Cornea* 2012; 31: 98–100.
116. Abd Elaziz MS, Zaky AG, El SaebaySarhan AR. Stromal lenticule transplantation for management of corneal perforations; one year results. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2017; 255: 1179–1184.
117. Hick S, Demers PE, Brunette I, et al. Amniotic Membrane Transplantation and Fibrin Glue in the Management of Corneal Ulcers and Perforations. *Cornea* 2005; 24: 369–377.

118. Celis J, Mesa D, Avendaño E, et al. Adhesivo de fibrina intracameral como tratamiento de perforación corneal espontánea. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2014; 89: 124–126.
119. Liu ZR, Zhang Y, Chen H, et al. Inlay amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *Int J Ophthalmol* 2005; 5: 1064–1065.
120. 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: 1963–1969.
121. Clearfield E, Hawkins BS, Kuo IC. Conjunctival autograft versus amniotic membrane transplantation for treatment of pterygium: Findings from a Cochrane systematic review. *Am J Ophthalmol* 2017; 182: 8–17.
122. Li M, Zhu M, Yu Y, et al. Comparison of conjunctival autograft transplantation and amniotic membrane transplantation for pterygium: a meta-analysis. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012; 250: 375–381.
123. Saeed HN, Chodosh J. Ocular manifestations of Stevens–Johnson syndrome and their management. DOI: 10.1097/ICU.0000000000000312.
124. Jain R, Sharma N, Basu S, et al. Stevens-Johnson syndrome: The role of an ophthalmologist. *Surv Ophthalmol* 2016; 61: 369–399.
125. Hsu M, Jayaram A, Verner R, et al. Indications and Outcomes of Amniotic Membrane Transplantation in the Management of Acute Stevens–Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis. *Cornea* 2012; 31: 1394–1402.
126. Gregory DG. The ophthalmologic Management of Acute Stevens-Johnson Syndrome. *Ocul Surf* 2008; 6: 87–95.
127. Rama P, Matuska S, Paganoni G, et al. Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration. *N Engl J Med* 2010; 363: 147–155.
128. Paolin A, Cogliati E, Trojan D, et al. Amniotic membranes in ophthalmology: long term data on transplantation outcomes. *Cell Tissue Bank* 2016; 17: 51–8.
129. Röck T, Bartz-Schmidt KU, Landenberger J, et al. Amniotic membrane transplantation in reconstructive and regenerative ophthalmology. *Ann Transplant* 2018; 23: 160–165.
130. Solomon A, Meller D, Prabhasawat P, et al. Amniotic membrane grafts for nontraumatic corneal perforations, descemetocelles, and deep ulcers. *Ophthalmology* 2002; 109: 694–703.
131. Khokhar S, Natung T, Sony P, et al. Amniotic membrane transplantation in refractory neurotrophic corneal ulcers: a randomized, controlled clinical trial. *Cornea* 2005; 24: 654–660.
132. Brocks D, Mead OG, Tighe S, et al. Self-retained cryopreserved amniotic membrane for the management of corneal ulcers. *Clin Ophthalmol* 2020; 14: 1437–1443.
133. Yin HY, Cheng AMS, Tighe S, et al. Self-retained cryopreserved amniotic membrane for treating severe corneal ulcers: a comparative, retrospective control study. *Sci Rep* 2020; 10: 1–5.
134. Gris O, Wolley-Dod C, Güell JL, et al. Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea. *Ophthalmology* 2002; 109: 508–12.

135. Müller M, Meltendorf C, Mirshahi A, et al. Use of multilayer amniotic membrane as first therapy for penetrating corneal ulcers. *Klin Monbl Augenheilkd* 2009; 226: 640–644.



## 10 ANNEX

### 10.1 Annex 1. Roper-Hall Classification for the severity of ocular surface burns.

Soleimani M, Naderan M. Management Strategies of Ocular Chemical Burns: Current Perspectives. *Clin Ophthalmol* 2020; 14: 2687–2699).

Grade	Clinical Findings	Conjunctiva	Prognosis
	Cornea		
I	Corneal epithelial damage	No limbal ischemia	Good
II	Corneal haze with visible iris details	<1/3 limbal ischemia	Good
III	Total epithelial loss, stromal haze, with obscured iris details	1/3 to 1/2 limbal ischemia	Guarded
IV	Opaque cornea, with obscured iris and pupil	>1/2 limbal ischemia	Poor



## 10.2 Annex 2. Comparison among scales of visual acuity measurements.

Ricci F, Cedrone C, Cerulli L. Standardized measurement of visual acuity. *Ophthalmic Epidemiol* 1998; 5: 41–53

<i>Snellen Ratio</i>			<i>Decimal Acuity</i>	<i>M.A.R.</i>	<i>logM.A.R.</i>	<i>Stroke Size</i>	<i>Optotype Size</i>	<i>Relative Size</i>
<i>4 m.</i>	<i>20 ft.</i>	<i>Decimal ratio</i>		<i>min. of arc</i>	<i>log Unit</i>	<i>mm.</i>	<i>mm.</i>	<i>×</i>
4/40	20/200	1/10	0.10	10	1.0	11.64	58.20	40
4/32	20/160	1.2/10	0.12	7.94	0.9	9.24	46.23	32
4/25	20/125	1.6/10	0.16	6.31	0.8	7.34	36.72	25
4/20	20/100	2/10	0.20	5.01	0.7	5.83	29.17	20
4/16	20/80	2.5/10	0.25	3.98	0.6	4.63	23.17	16
4/12.6	20/63	3.2/10	0.32	3.16	0.5	3.68	18.40	12.6
4/10	20/50	4/10	0.40	2.51	0.4	2.92	14.62	10
4/8	20/40	5/10	0.50	1.99	0.3	2.32	11.61	8
4/6.3	20/32	6.5/10	0.65	1.58	0.2	1.84	9.22	6.3
4/5	20/25	8/10	0.80	1.25	0.1	1.47	7.33	5
4/4	20/20	10/10	1.00	1	0.0	1.16	5.82	4
4/3.2	20/16	12/10	1.20	0.79	-0.1	0.92	4.62	3.2