



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO  
SECRETARIA DE SALUD

**“HALLAZGOS HISTOLÓGICOS EN CÓRNEAS  
DESEPITELIZADAS DE CONEJO CON  
INJERTO DE MEMBRANA AMNIÓTICA  
RADIOESTERILIZADA”**

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
LA ESPECIALIDAD EN OFTALMOLOGÍA

P R E S E N T A :

**DRA. LAURA ELENA VALENCIA FONSECA**



ASESOR: DRA LETICIA VÁZQUEZ MAYA

MÉXICO D.F

ENERO 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**RESPONSABLE**

**Dra. Laura Elena Valencia Fonseca**  
Médico Residente  
Servicio de Oftalmología Hospital General de México

---

Firma

**TUTOR DE TESIS**

**Dra. Leticia Vázquez Maya**  
Jefe del Servicio de Córnea del Hospital General de México

---

Firma

## COLABORADORES

### **Dra. María Esther Martínez Pardo**

Responsable de la Dirección Administrativa del Banco de Tejidos Radioesterilizados (BTR) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

### **Dra. María Virgilia Soto Abraham**

Médico Adscrito al Servicio de Patología HGM  
Médico Adscrito al Servicio de Patología del Instituto Nacional de Cardiología  
"Ignacio Chávez"

**Dra. Guadalupe Tenorio Guajardo**  
Jefe del Servicio de Oftalmología del Hospital General de México

---

Firma

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MIS PADRES Y HERMANOS**

Por su amor y apoyo incondicional desde el inicio de mi carrera y que gracias a ellos he logrado mis metas.

### **A LA DRA LETICIA VAZQUEZ MAYA**

Por su apoyo y confianza para la realización de este estudio.

### **A MIS MAESTROS**

Por transmitirme sus conocimientos y experiencias.

## **RECONOCIMIENTO**

Se hace un reconocimiento especial al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares a través del Banco de Tejidos Radioesterilizados, por el apoyo brindado para la realización de este estudio.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ANTECEDENTES.....	5
ESTUDIO CLINICO	
Planteamiento del problema.....	11
Hipótesis.....	11
Objetivo.....	11
Diseño y duración.....	12
Material y método.....	12
Población y muestra.....	17
Criterios de inclusión.....	18
Criterios de exclusión.....	18
Criterios de eliminación.....	18
Análisis estadístico.....	19
Aspectos éticos y de bioseguridad .....	19
Instalaciones.....	19
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	34
ANEXOS.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	42



## RESUMEN

La membrana amniótica se ha utilizado con éxito en el tratamiento y la reconstrucción de diversas alteraciones de la superficie ocular. De Rotth en 1940 fue el primer autor en utilizarla para reconstrucción de la superficie ocular. De algunos años a la fecha se ha procesado la membrana amniótica con técnica de Radioesterilización para diferentes usos clínicos incluyendo el uso oftalmológico. La Membrana Amniótica aplicada como injerto promueve la curación de úlceras corneales persistentes de distinta etiología. Aporta un estroma y una membrana basal sobre la que se favorece la epitelización. Puede usarse para recubrimiento, de manera temporal o prolongada, reduce la inflamación, facilita la epitelización y previene la formación de cicatrices en lesiones estromales y epiteliales de la córnea.

Sin embargo, a pesar de los resultados clínicos favorables, la relación histopatológica entre la córnea del huésped y la membrana amniótica transplantada aún no se conoce completamente y son pocos los artículos publicados al respecto. Hasta el 2007 no existen aún estudios histopatológicos en córneas con Membrana Amniótica Radioesterilizada (MAR).

**Objetivo:** conocer desde el punto de vista histológico, el grado de epitelización corneal tras el injerto de MAR en córneas de conejo desepitelizadas; además sí la MAR se integra o no a la córnea, y de ser así, de que manera lo hace desde el punto de vista histológico.

**Diseño:** es un estudio prospectivo, experimental, comparativo y longitudinal.

**Metodología:** el estudio se realizó en el Hospital General de México en las instalaciones del Servicio Cirugía Experimental con el apoyo del Servicio de Patología en combinación con el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

(ININ) en donde se llevó a cabo el procesamiento y radioesterilización de la Membrana Amniótica.

Se utilizaron conejos de raza Nueva Zelanda, se estudiaron 18 córneas. Se realizó la desepitelización a la córnea, así como el recubrimiento quirúrgico con Membrana Amniótica Radioesterilizada a una córnea de cada conejo. Se realizó el estudio histopatológico a los 7 días, 2 y 4 semanas, por un patólogo quien no conocerá el grupo ni a que período de tiempo pertenece la córnea.

Se realizaron técnicas de microscopía de luz (campo claro), inmunoperoxidasa indirecta y microscopía electrónica. Para lo que cada córnea se fragmentó en dos partes, de los cuales uno se fijó en formalina/buffer de fosfatos al 10% para ser incluidos en parafina y el segundo se fijó en glutaraldehído para microscopía electrónica. Del tejido incluido en parafina se realizaron cortes histológicos de 2 micras para ser teñidos con: hematoxilina y eosina, ácido peryódico de Schiff (PAS), tricrómico de Mallory, tricrómico de Masson y metenamina de plata.

Se excluyeron conejos con patología corneal o sistémica, se eliminaron corneas con datos clínicos de infección y córneas que no cumplieron con el tiempo predeterminado para su estudio.

El estudio se realizó de acuerdo al protocolo de Helsinski 1999.

**Resultados:** Los resultados obtenidos servirán para identificar y publicar los hallazgos histológicos tras el injerto de membrana amniótica en la córnea desepitelizada y los posibles mecanismos de reabsorción.

## **Conclusiones:**

El patrón de integración más frecuentemente encontrado fue la integración intraestromal.

Los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas 2,4 y 9 se encontraron en la membrana amniótica radioesterilizada, los cuales son factores antiangiogénicos y antiinflamatorios.

La inflamación crónica que se presentó en las córneas, quizá fue ocasionada por la ruptura parcial de la membrana no pudiéndose limitar el proceso inflamatorio.

Palabras Clave: Membrana Amniótica Radioesterilizada, Córnea, Deseptelizada, Conejo, histología.

## **ANTECEDENTES:**

La membrana amniótica se ha utilizado con éxito en el tratamiento y la reconstrucción de diversas alteraciones de la superficie ocular.

En la literatura De Rotth en 1940 (1) fue el primer autor que utilizó las membranas fetales para reconstrucción de la superficie ocular. En 1941, Brown (2) propone el uso del peritoneo como recubrimiento temporal para promover el proceso de la cicatrización de superficies oculares con quemaduras agudas. En 1946 y 1947, Sorsby y colaboradores (3,4) emplearon la membrana amniótica “seca” preservada denominada “amnioplastia”, como recubrimiento temporal en el tratamiento de las quemaduras oculares agudas. También demostraron que existía una relación directa entre la aplicación de la membrana amniótica y el tiempo de recuperación. Por razones que aún no son claras, el uso de la membrana amniótica desapareció de la literatura oftalmológica durante un extenso periodo de tiempo.

En 1995 Kim y Tseng (5) reintroducen el uso de la membrana amniótica en oftalmología, demuestran en un modelo experimental animal (conejo) que el 40% de córneas con insuficiencia límbica severa podían ser reconstruidas al reemplazar la superficie conjuntivalizada por membrana amniótica humana preservada. A partir de los trabajos de estos autores, aparecen numerosos trabajos por diferentes investigadores cada vez más alentadores sobre su eficacia en distintas patologías de la superficie ocular, debido tal vez a la mejoría en los métodos de procesamiento y preservación.

De algunos años a la fecha, en el Banco de Tejidos Radioesterilizados del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares se ha procesado la membrana amniótica y se esteriliza con radiación gamma de cobalto-60 para diferentes usos clínicos (6,7,8) incluyendo el uso oftalmológico.

En el Servicio de Oftalmología del Hospital General de México se han tenido buenos resultados utilizando la membrana amniótica radioesterilizada para recubrimiento de la córnea. En el Hospital General de México se realizó el año pasado un estudio en 17 ojos de 15 pacientes con diferente patología ocular a los que se les realizó recubrimiento con Membrana Amniótica Radioesterilizada, obteniendo buenos resultados, con transparencia de la membrana amniótica aproximadamente a la tercera o cuarta semana posterior al recubrimiento corneal(9).

El amnios, la capa más interna de la cavidad amniótica, está formado por una monocapa de células epiteliales que se asientan sobre una membrana basal, a su vez; adherida a una fina capa de tejido conectivo subyacente (10).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia se ha observado que las células epiteliales amnióticas humanas no expresan en su superficie los antígenos HLA-A, B, C y DR (11). Esto puede explicar por qué en distintos trabajos se ha observado que el implante de membrana amniótica no produce respuestas inmunológicas significativas locales en el lugar del implante, ni se han detectado anticuerpos HLA en el suero de los receptores (12).

El papel del epitelio de la Membrana Amniótica aún no se conoce completamente; se ha observado que cuando la Membrana Amniótica tiene el epitelio intacto hay una mayor cantidad de factores de crecimiento que cuando se encuentra desnuda del mismo (13); además se sugiere que podría proporcionar citoquinas que jueguen un papel importante en el mantenimiento del microambiente de las células germinales del epitelio corneal (14).

La membrana basal de la Membrana Amniótica contiene colágeno tipo IV, laminina 1, laminina 5, fibronectina, y colágeno VII, es muy similar a la de la conjuntiva (15) y las lamininas son efectivas en mejorar la adhesión de las células epiteliales de la córnea (16), facilita la migración de las células epiteliales, refuerza las adhesiones de las células epiteliales basales, promueve la diferenciación epitelial y previene la apoptosis. También, es un sustrato ideal para el crecimiento de las células epiteliales germinales; por ésto el trasplante de Membrana Amniótica puede ser usado para estimular las células germinales residuales del limbo y las células amplificadoras transitorias de la córnea periférica en el tratamiento de las insuficiencias parciales del limbo (17) y para facilitar la epitelización en los defectos epiteliales corneales persistentes con úlcera estromal (18,19). Se ha observado que en cultivos de tejido es buen sustrato para el crecimiento de células epiteliales (13,20), además mantiene la diferenciación y morfología epitelial normal (21).

El estroma de la Membrana Amniótica tiene un componente que suprime la señalización mediante el TGF-B, así como la proliferación y diferenciación de los miofibroblastos de la córnea humana normal y de los fibroblastos del limbo (22); esto puede explicar porqué reduce la formación de cicatrices cuando se utiliza en la reconstrucción de la superficie ocular (23,24).

La matriz estromal de la membrana amniótica puede atrapar las células inflamatorias (25) llevándolas a la apoptosis de manera más rápida (26). Además contiene proteínas antiinflamatorias, antiangiogénicas (27) . Por ello se reduce la inflamación del estroma corneal (18,23) y la neovascularización corneal (6) después del trasplante de Membrana Amniótica.

Es bien conocido que las metaloproteinasas degradan las proteínas de la matriz extracelular como laminina, fibronectina y colágeno, éstas participan tanto en procesos fisiológicos como patológicos. Las metaloproteinasas se expresan en

distintos tejidos, y en diferentes patologías, se conocen cuatro tipos de metaloproteinasas las cuales se pueden clasificar por la especificidad del sustrato: colagenasas, gelatinasas, estromelinas y matrilisinas. En el epitelio corneal se expresan principalmente el tipo de las gelatinasas como son las metaloproteinasas 2 y 9, responsables de la degradación de la colágena tipo IV y V, además regulan la migración celular de la córnea y epitelio cristalino. Estas metaloproteinasas se pueden elevar en procesos patológicos como úlceras corneales, por lo que es primordial la inhibición de las mismas para disminuir inflamación y así mismo evitar la angiogénesis (28 y 29), en estudios anteriores realizados por Rowe y Fortunato en 1997 descubrieron que la membrana amniótica presentaba inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) 1 y 2 en las células epiteliales y mesenquimales, pero también se han encontrado otros TIMP como 3,4 y 9.

Distintos factores de crecimiento han sido identificados en la membrana amniótica (30) que también contribuyen a facilitar la epitelización de los tejidos.

La membrana amniótica tiene las siguientes propiedades:

- ❖ Prolonga la supervivencia y la capacidad de clonación de las células progenitoras epiteliales.
- ❖ Promueve la diferenciación de las células epiteliales no calciformes.
- ❖ Promueve la diferenciación de las células epiteliales calciformes en presencia de fibroblastos conjuntivales.
- ❖ Excluye células inflamatorias con propiedades anti-proteasa.
- ❖ Suprime el sistema de señalización mediante TGF- $\beta$  y la diferenciación miofibroblástica de los fibroblastos normales (31).

De los efectos clínicos oculares se puede resumir que:

1) Facilita la epitelización de los tejidos (córnea y/o conjuntiva), manteniendo siempre el fenotipo epitelial presente en la zona.

2) Reduce la inflamación en los tejidos (bajo el implante y en la vecindad), la neovascularización en el estroma corneal, las cicatrices residuales tras la regeneración tisular de la córnea.

Por lo ya mencionado la membrana amniótica aplicada como injerto es útil en el tratamiento de patologías de la superficie corneal, promoviendo la curación de úlceras corneales persistentes de distinta etiología (18,19,32). En estos casos la técnica con injerto de membrana amniótica aporta un estroma y una membrana basal sobre la que se favorece la epitelización, consiguiendo el cierre de la úlcera.

También puede usarse para recubrimiento, de manera temporal o prolongada, reduciendo la inflamación, facilitando la epitelización y previniendo la formación de cicatrices causadas por quemaduras químicas agudas, tanto en animales (33) como en humanos (34).

Sin embargo y a pesar de los resultados clínicos favorables, la relación histopatológica entre la córnea del huésped y la membrana amniótica transplantada aún no se conoce completamente y son pocos los artículos publicados al respecto en corneas de humano (35) y en corneas de conejo (36).

Hasta el 2007 no existe aún en la literatura reportes histopatológicos en corneas con Membrana Amniótica Radioesterilizada (MAR).



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION**

La Membrana Amniótica puede utilizarse en un gran número de indicaciones oftalmológicas , ya sea como injerto, como recubrimiento corneal, o como una combinación de ambos debido a que facilita la epitelización de los tejidos (córnea y/o conjuntiva) a partir del epitelio sano circundante, manteniendo siempre el fenotipo epitelial presente en la zona, reduce la inflamación en los tejidos, bajo el implante y en la vecindad, reduce la neovascularización en el estroma corneal, reduce las cicatrices residuales tras la regeneración tisular, tanto en la conjuntiva como en la córnea.

Sin embargo aún cuando se han reportado los resultados clínicos favorables, la relación histopatológica entre la córnea del huésped y la membrana amniótica transplantada aún no se conoce totalmente; y son pocos los artículos publicados al respecto, aún no existen estudios histopatológicos en córneas con Membrana Amniótica Radioesterilizada (MAR); es por ello que se decide realizar el presente estudio, con la intención de identificar la manera en que la membrana amniótica se integra al estroma corneal y/o se reabsorbe para permitir el crecimiento de las células epiteliales de la córnea

## **HIPÓTESIS**

La membrana amniótica radioesterilizada se integra a la córnea y tiene propiedades antiinflamatorias y antiangiogénicas.

## **OBJETIVO**

Establecer si la Membrana Amniótica Radioesterilizada se integra a la córnea desepitelizada de conejo.

Identificar a nivel histológico el grado de epitelización corneal en córneas desepitelizadas de conejo cubiertas con Membrana Amniótica Radioesterilizada en diferentes tiempos.

## **DISEÑO Y DURACIÓN**

Estudio prospectivo, longitudinal, experimental y comparativo

Duración 1 año

## **MATERIAL Y MÉTODO**

El estudio se realizó en el Hospital General de México en las instalaciones del Servicio Cirugía Experimental, con el apoyo del Servicio de Patología en combinación con el Banco de Tejidos Radioesterilizados (BTR) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) en donde se realiza el procesamiento y radioesterilización de la membrana amniótica, bajo un control de calidad riguroso en todas las etapas (7). Es importante señalar que el Sistema de Gestión de la Calidad del BTR cuenta con la certificación ISO 9001:2000 desde el 1 de agosto de 2003 (37).

Se operaron 43 córneas de 43 conejos sanos a los cuales se les operó solo una córnea, 19 córneas se dieron de baja por ruptura y desprendimiento total de la membrana. Seis conejos fallecieron en el postoperatorio eliminándose las respectivas córneas, quedando un total de 18 córneas para su estudio, mismas que se dividieron en tres grupos:

**Grupo A:** 6 conejos con un tiempo postoperatorio de recubrimiento corneal con Membrana Amniótica Radioesterilizada de 7 días; que es lo que tarda en producirse la epitelización corneal completa.

**Grupo B:** 6 conejos con un tiempo postoperatorio de recubrimiento corneal con Membrana Amniótica Radioesterilizada de 2 semanas; para tener el

seguimiento del grado de epitelización corneal y además identificar si los componentes de la Membrana Amniótica Radioesterilizada se han integrado a la córnea en este tiempo.

**Grupo C:** 6 conejos con un tiempo postoperatorio de recubrimiento corneal con Membrana Amniótica Radioesterilizada de 4 semanas; para saber el grado de epitelización y además identificar si los componentes de la la Membrana Amniótica Radioesterilizada se han integrado a la córnea en este período de tiempo así como saber el patrón de integración y si han existido cambios en las demás estructuras de la córnea y comparar con los otros grupos de conejos.

El procedimiento se realizó bajo anestesia con Ketamina intravenosa 10 mg/kg a dosis efecto y Clorhidrato de Xilazina intravenoso a 0.5 mg/kg dosis efecto, se canalizó la vena marginal de la oreja. Una vez sedado el conejo se procedió a realizar el aseo quirúrgico de la región periorbitaria con iodopovidona al 10%, se colocaron campos estériles y se infiltró 1 ml de xilocaína con epinefrina 2% subconjuntival. Se utilizó un microscopio quirúrgico Zeis para el procedimiento. La cirugía consistió en corte y disección de la conjuntiva alrededor del limbo corneal en 360 grados (peritomía perilímbica), utilizando pinzas de disección y tijeras de Wescott; se colocó sobre la córnea la Membrana Amniótica Radioesterilizada, previa hidratación en solución salina balanceada, durante 10 minutos. Se suturó a la conjuntiva con Nylon 10-0 con surgete continuo en 360 grados, siempre quedando el borde de la Membrana Amniótica Radioesterilizada debajo del borde de la conjuntiva en los 360 grados, al término del procedimiento se aplicó una gota de tobramicina con dexametasona, posteriormente pasó al área de recuperación y después a la jaula respectiva.

A los conejos del grupo A se dio un seguimiento de 7 días, se revisaron los conejos diariamente y se les aplicó una gota de solución de tobramicina con dexametasona cada 8 h por 7 días; al grupo B un seguimiento de 2 semanas y se les aplicó una gota de tobramicina con dexametasona cada 8 horas por 10 días; al

grupo C un seguimiento de 4 semanas, se les aplicó una gota de tobramicina con dexametasona cada 8hrs por 15 días.

A los conejos del grupo A, B y C se realizó al los 7 días , 2 y 4 semanas posquirúrgico correspondiente a cada grupo, la extracción de la córnea operada bajo anestesia con Ketamina intravenosa 10 mg/kg a dosis efecto y Clorhidrato de Xilazina Intravenoso a 0.5 mg/kg dosis efecto, se canalizó la vena marginal de la oreja, una vez sedado el conejo se procedió a realizar con un corte a 360 grados a nivel de limbo esclerocorneal del ojo operado, posteriormente fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital intravenoso (80 mg/kg de peso).

Las córneas fueron estudiadas microscópicamente a través de las técnicas de microscopía de luz (campo claro) y microscopía electrónica. Para lo cual cada córnea se fragmentó en dos partes, una se fijó en formalina/buffer de fosfatos al 10% para ser incluidos en parafina, que se utilizó para el estudio de microscopía de campo claro y para la técnica de inmunoperoxidasa indirecta. El segundo se fijó en glutaraldehído para microscopía electrónica.

Del tejido incluido en parafina se realizaron cortes histológicos a 2  $\mu$ m para ser teñidos con: hematoxilina y eosina, ácido peryódico de Schiff (PAS), tricrómico de Mallory, tricrómico de Masson, hierro coloidal y metenamina de plata.

## **TECNICA DE INMUNOPEROXIDASAS INDIRECTA**

De este mismo tejido incluido en parafina, se obtuvieron cortes a 2  $\mu$ m para realizar inmunohistoquímica por la técnica de inmunoperoxidasa indirecta convencional utilizando el complejo streptavidina-biotina-peroxidasa (ABC) con los siguientes anticuerpos primarios: TIMP-2, TIMP-4, TIMP-9, (Bioselec, Santa Cruz

Biotechnology, Inc). La interpretación de los resultados de la técnica de inmunoperoxidasa indirecta realizada con todos los anticuerpos se llevó a cabo con un analizador de imágenes para obtener un resultado cuantitativo, para lo que se digitalizó toda la muestra examinada a 400 aumentos, utilizando un microscopio de campo claro (Olimpus BX51, objetivo 40X y oculares 10X) y cada campo se capturó con una cámara de vídeo digital (CoolSnap-Plus). Cada imagen fue procesada en una computadora usando Image-Pro-Plus versión 5.0, un software procesador de imagen (Image-Pro INC, Media Cybernetics), utilizando la capacidad de reconocimiento de color en este software se tomó como positivo el color café de la técnica de inmunoperoxidasa indirecta. Las mediciones del tejido se cuantificaron con unidades pixel.

Finalmente el tejido fijado en glutaraldehído se procesó para estudio de microscopía electrónica, para evaluar los cambios ultraestructurales de las córneas.

## **VARIABLES HISTOLÓGICAS**

### **DESCRIPCIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES HISTOLÓGICAS**

Las corneas operadas de los diferentes tiempos de evolución (1, 2 y 4 semanas) fueron evaluadas por un patólogo, quien no conocerá a que grupo ni a que tiempo pertenecen.

Las variables que se estudiaron fueron las siguientes:

#### **1. PATRONES DE INTEGRACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIOTICA A LA CÓRNEA:**

Se identificaron cuatro patrones de integración, las cuales fueron intraepitelial, subepitelial, intraestromal y superficial. Se clasificó de esta manera

de acuerdo a un estudio realizado por Resch y colaboradores en el 2006 en el cual se determina por primera vez cuatro patrones de integración de la membrana amniótica a la córnea, los cuales fueron descritos de la siguiente manera (38):

**INTRAEPITELIAL:**

Fue clasificado así, si ambas superficies de la membrana amniótica, la basal y superficial fueron cubiertas por epitelio corneal.

**SUBEPITELIAL:**

En este tipo de integración el epitelio corneal cubría sólo la parte superficial de la membrana amniótica.

**INTRAESTROMAL:**

El término integración estromal fue usado en los casos en que el estroma de la membrana amniótica fue rodeado por estroma corneal sin ningún contacto con el epitelio corneal.

**SUPERFICIAL:**

La localización superficial significa la ausencia de una integración real, es decir, la membrana amniótica estaba pegada a la superficie corneal, pero no fue cubierta por ningún tejido corneal.

**2. INFILTRADO INFLAMATORIO**

Se evaluó la presencia o ausencia de infiltrado inflamatorio crónico y agudo en el estroma, este dato también fué evaluado cuantitativamente.

**3. INHIBIDOR TISULAR DE METALOPROTEINASAS**

Fueron evaluados a través de la técnica de inmunoperoxidasa utilizando los siguientes anticuerpos primarios: TIMP-2, TIMP-4, TIMP-9.

En cada muestra se digitalizó todo el tejido uniendo campos tomados a 400 aumentos (40 X) a través de una platina automática. Se digitalizó con un analizador de imágenes que consta de un microscopio de campo claro (Olimpus BX51) con una cámara de vídeo digital (CoolSnap-Plus) y que utiliza un software Image-Pro-Plus versión 5.0. Aprovechando la capacidad de reconocimiento de color de este software, se cuantificó en unidades píxel la cantidad de positividad para cada anticuerpo primario. El resultado de esta evaluación será informado en valores numéricos absolutos.

### **POBLACIÓN:**

Conejos de Raza Nueva Zelanda

### **TAMAÑO DE LA MUESTRA:**

18 Conejos divididos en 3 grupos de acuerdo al tiempo, el tamaño de la muestra fue elegido por conveniencia de acuerdo a la accesibilidad de la población en la Unidad de Cirugía Experimental, sin embargo; consideramos que 6 conejos en cada grupo es un número adecuado para tener una buena estadística, además que en los antecedentes el número de animales utilizados es de 4-6 conejos.

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Conejos de:

Raza Nueva Zelanda

Sanos

Con córneas sanas

De 2.5 a 3 kg

De 3 a 5 meses de edad

Machos

No haber sido sometidos a ninguna manipulación quirúrgica previa

Se ha elegido este modelo por facilidad de manejo, accesibilidad de manejo y disponibilidad y la experiencia que otros autores han tenido en publicaciones internacionales (5,26).

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Conejos:

Con patología corneal o sistémica

Obesos

Bajos de peso

Menores a 3 meses o mayores a 5 meses

Hembras

Que hayan sido sometidos a alguna otra cirugía previamente

## **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

Conejos con corneas que presenten datos clínicos de infección

Conejos con corneas que no cumplan con el tiempo predeterminado para su estudio por ruptura total y desprendimiento de la membrana.

Conejos que durante el estudio presenten enfermedad sistémica.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para variables no paramétricas se utilizó la prueba ANOVA.

## **ASPECTOS ETICOS Y DE BIOSEGURIDAD**

El estudio se realizó de acuerdo al protocolo de Helsinki 1999

## **RELEVANCIA Y EXPECTATIVAS**

Los resultados obtenidos servirán para establecer si la Membrana Amniótica Radioesterilizada se integra a la córnea desepitelizada de conejo, el



grado de epitelización y el patrón de integración de la membrana, tras este procedimiento quirúrgico.

### **RECURSOS DISPONIBLES E INSTALACIONES**

Instalaciones del Servicio de Cirugía experimental del Hospital General de México

Instalaciones del Banco de Tejidos Radioesterilizados (BTR) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ).

Instalaciones del Servicio de Patología del HGM

## **RESULTADOS**

Se estudiaron un total de 18 córneas las cuales cumplieron con los criterios de inclusión, se operaron 7 ojos izquierdos y 11 ojos derechos, se dividieron para su estudio en 3 grupos, el grupo A de 7 días, grupo B de 2 semanas y el grupo C de 4 semanas. Una vez cumplido el tiempo requerido de cada grupo, se sacrificaron a los conejos y se les extrajo la córnea para enviarlo a estudio histológico.

**Grupo A:** en este grupo de estudio se estudiaron las córneas 1,3,5, 5a, 6 y 8 .

**Grupo B:** en este grupo se estudiaron las córneas 4, 4a, 10, 12, 16 y 19.

**Grupo C:** en este grupo se estudiaron las córneas 13a, 15a, 11206, 13204, 13206, 14403

### **CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS:**

En las características clínicas se estudiaron el grado de hiperemia conjuntival, secreción, el estado de la membrana amniótica y si se desarrollo leucoma y/o vascularización corneal.

#### **Grupo A**

En los conejos 1, 5a y 8 la membrana se mantuvo íntegra con secreción escasa, mientras que los conejos 3, 5 y 6 presentaron ruptura parcial de la membrana, en el sector nasal. Ninguno desarrollo leucoma ni vascularización.

#### **Grupo B**

En los conejos 4, 10, 12, 16, 19 la membrana se mantuvo íntegra, se desarrollo leucoma poco denso y vascularización superficial en las corneas de los conejos 10

y 12, la córnea 16 solo desarrolló vascularización superficial, cabe mencionar que esta vascularización se presentó en el limbo donde se encontraban las suturas. La córnea 4a, presentó ruptura parcial a los 12 días posterior al injerto de la membrana. La secreción fue de escasa a moderada.

### **Grupo C**

En este grupo se presentó ruptura parcial de la membrana amniótica en todas las córneas; en la córneas 15a y 11706, se presentó ruptura de la membrana de manera parcial al inicio de la 3era semana, hacia la cuarta semana era poco distinguible macroscópicamente. La córnea 15a, desarrollo vascularización y leucoma y en la córnea 11706 solo se desarrollo vascularización corneal superficial limbal (cercano a las suturas). Las córneas 13a, 13204 y 13206 desarrollaron leucoma y vascularización corneal superficial (limbal), hacia la 4ta semana la membrana casi no se distinguía. La córnea 14403 presentó ruptura parcial en la 2da semana, y posteriormente desarrollo leucoma poco denso y vascularización. Superficial. Todas con secreción de moderada a abundante.

### **PATRONES DE INTEGRACIÓN**

Las 18 córneas se enviaron para su estudio histológico, encontrándose los siguientes patrones de integración en la tinción de PAS: intraepitelial, subepitelial, intraestromal y superficial. Se encontró la siguiente distribución por cada grupo de córneas.

<i>Grupo de córneas</i>	<i>Intraepitelial No. Casos</i>	<i>Subepitelial No. Casos</i>	<i>Intraestromal No. Casos</i>	<i>Superficial No. Casos</i>
A	1	1	3	1
B	1	1	3	1
C	0	2	4	0
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>2</b>

El patrón intraepitelial representó el 11.1%, el subepitelial el 22.2% , el intraestromal el 55.5% y el superficial el 11.1%.

En la microscopía electrónica se corrobora la integración de la membrana a la córnea, lo que se observa son desorganización de las fibras de colágena en la córnea y mechones de colágena.

### **INFILTRADO INFLAMATORIO**

Se analizó el infiltrado inflamatorio agudo compuesto por neutrófilos y el infiltrado inflamatorio crónico compuesto por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.

#### **Grupo A:**

Infiltrado agudo: se encontró un valor promedio de 134.83 células con un rango de 3 a 387 células

Infiltrado crónico: se encontró un valor promedio de 2554.66 células con un rango de 14 a 12734 células.

#### **Grupo B:**

Infiltrado agudo: se encontró un valor promedio de 182.83 células con un rango de 12 a 612 células.

Infiltrado crónico: se encontró un valor promedio de 1258.66 células con un rango de 75 a 3994 células.

#### **Grupo C:**

Infiltrado agudo: se encontró un valor promedio de 2482.33 células con un rango de 9 a 11982 células.

Infiltrado crónico: se encontró un valor promedio de 3226.50 células con un rango de 13 a 13421 células.

Se realizó un análisis del infiltrado crónico y agudo y su comportamiento de manera independiente con respecto a cada grupo, para esto se utilizó la prueba ANOVA, encontrándose un  $p=0.26$ , lo cual no fue estadísticamente significativo, por lo tanto el infiltrado crónico y agudo se comporto de igual manera en los 3 grupos. En las gráficas 2 y 3 se muestran los valores promedio del infiltrado crónico y agudo con respecto a cada grupo y aunque en la muestra se observa que en el grupo C hay una tendencia al incremento con respecto al grupo A y B, estadísticamente no es significativo.

### **INHIBIDOR TISULAR DE METALOPROTEINASAS (TIMP)**

Por cada grupo de córneas se determinó el inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP), encontrándose en todos los grupos elevadas mayor en el grupo A de 1 semana y posteriormente fue disminuyendo, se encontraron los siguientes valores promedio, misma que se reportaron en unidades pixel.

<b>Grupo de córneas</b>	<b>TIMP 2</b>	<b>TIMP 4</b>	<b>TIMP 9</b>
A	8173.83	9397.83	8861.16
B	6132.50	6658.50	8381.83
C	4464.33	4649.66	4705

Se realizó un análisis de cada inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) por cada grupo de córnea, para determinar el comportamiento de cada TIMP con respecto al tiempo, para esto se realizó un análisis estadístico mediante 3 métodos estadísticos: ANOVA, chi cuadrado de Barlett y Kruskal-Wallis.

## **TIMP 2**

Por el método ANOVA se encontró una  $p= 0.51$ , chi cuadrado de Barlett's se encontró un valor de  $p= 0.95$  con y por último Kruskal-Wallis con un valor de  $p=0.52$ , ninguno tuvo un valor estadísticamente significativo.

## **TIMP 4**

Por el método ANOVA se encontró una  $p= 0.24$ , chi cuadrado de Barlett's se encontró un valor de  $p= 0.69$  con y por último Kruskal-Wallis con un valor de  $p=0.23$ , ninguno tuvo un valor estadísticamente significativo.

## **TIMP 9**

Por el método ANOVA se encontró una  $p= 0.27$ , chi cuadrado de Barlett's se encontró un valor de  $p= 0.77$  con y por último Kruskal-Wallis con un valor de  $p=0.18$ , ninguno tuvo un valor estadísticamente significativo.

En las gráficas 4,5 y 6 se observa el comportamiento de cada TIMP con respecto al tiempo.

A continuación, se muestra una tabla con los resultados del infiltrado inflamatorio agudo y crónico, así como la cuantificación de las TIMP 2, 4 y 9, y los patrones de integración de la membrana amniótica de cada córnea, así como una gráfica que muestra la distribución de la integración de la membrana.

# córnea	<i>Crónico</i>	<i>Agudo</i>	<i>MPI</i> <b>2</b>	<i>MPI 4</i>	<i>MPI</i> <b>9</b>	<i>Intraepitelial</i>	<i>Subepitelial</i>	<i>Intraestromal</i>	<i>Superficial</i>
11706	92	91	719	1191	1309	0	1	0	0
13206	13	9	723	602	101	0	0	1	0
13204	462	650	1403	1798	3662	0	0	1	0
14403	827	922	1091	827	2354	0	0	1	0
15 <sup>a</sup>	4544	1240	11929	12138	10922	0	1	0	0
10	75	12	312	109	563	1	0	0	0
1	14	3	812	3487	1692	0	1	0	0
13 <sup>a</sup>	13421	11982	10921	11342	9882	0	0	1	0
19	126	113	10119	9110	11122	0	1	0	0
3	688	107	11816	11736	11627	0	0	1	0
5	12734	387	14982	9810	11561	1	0	0	0
6	487	145	11609	11892	11112	0	0	1	0
8	853	144	1342	6521	2289	0	0	1	0
4	145	39	9828	8841	8718	0	0	1	0
12	2521	309	1145	2871	9477	0	0	1	0
16	691	612	3298	6009	9488	0	0	1	0
4 <sup>a</sup>	3994	12	12093	13011	10923	0	0	0	1
5 <sup>a</sup>	552	23	8482	129411	14886	0	0	0	1
						<b>2</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>2</b>

Fig. 1 Tabla de resultados general

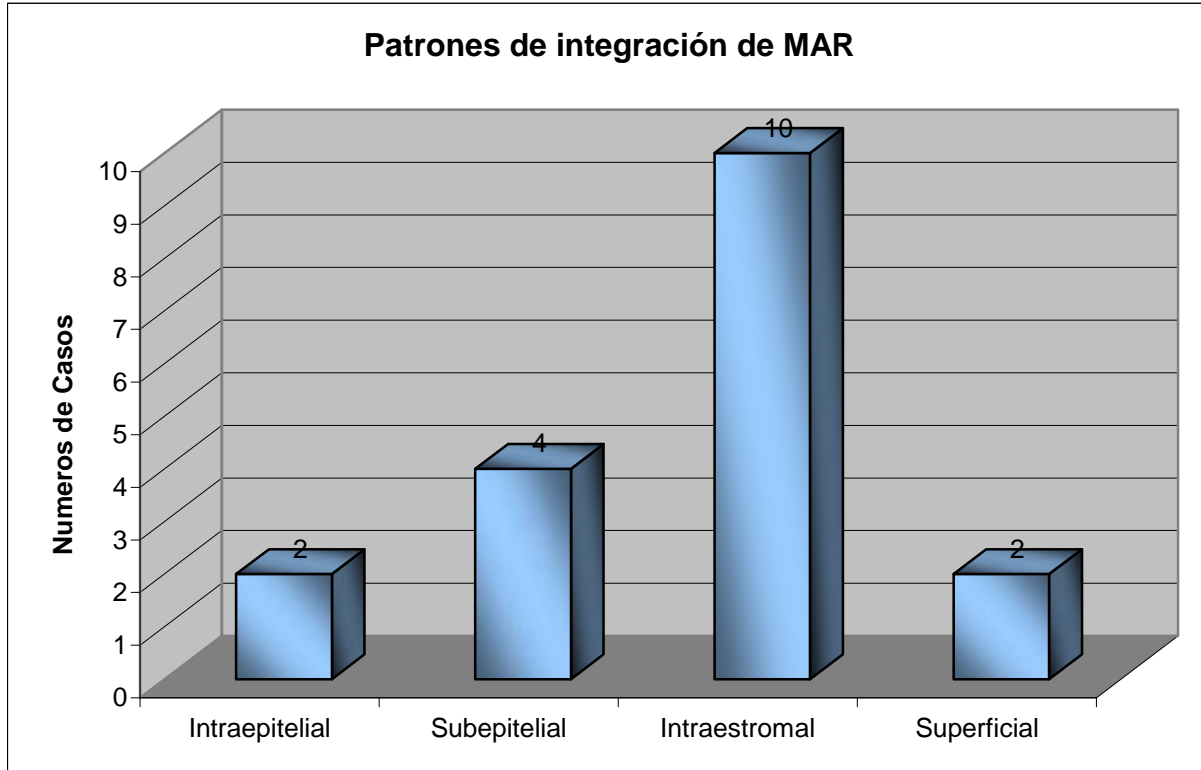
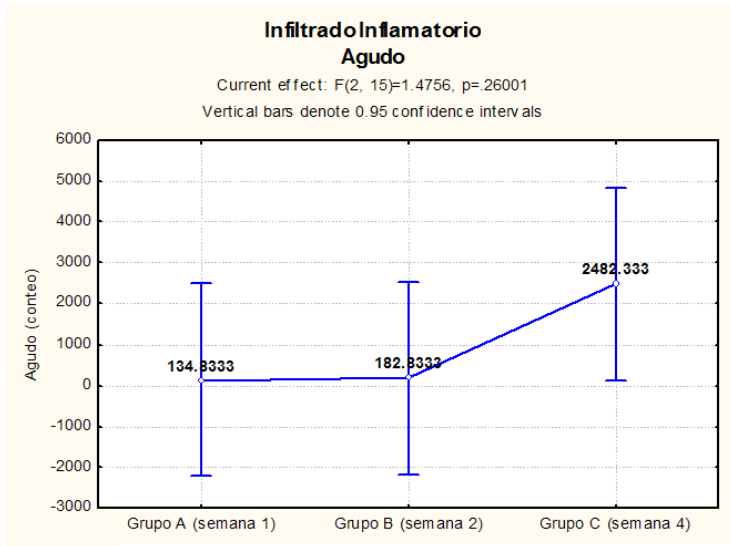
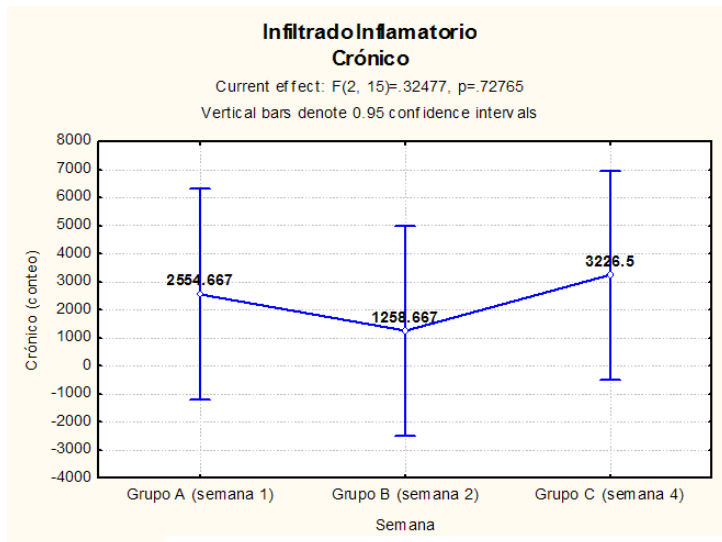


Fig 2 Distribución de patrones de integración





ANOVA  $P= 0.26$   
Las barras verticales denotan 95% de confiabilidad



ANOVA  $P= 0.72$   
Las barras verticales denotan 95% de confiabilidad

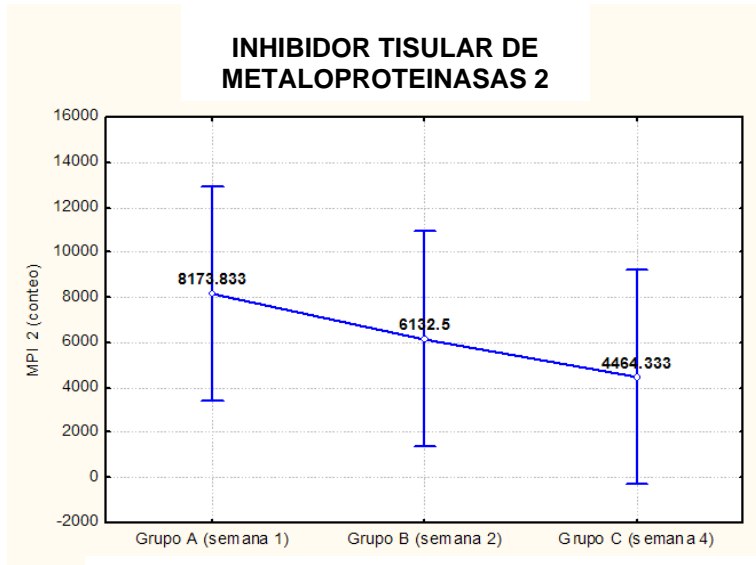


Fig. 5 Valores promedio y rangos de TIMP 2 se observa un patrón decreciente  
ANOVA P= 0.51

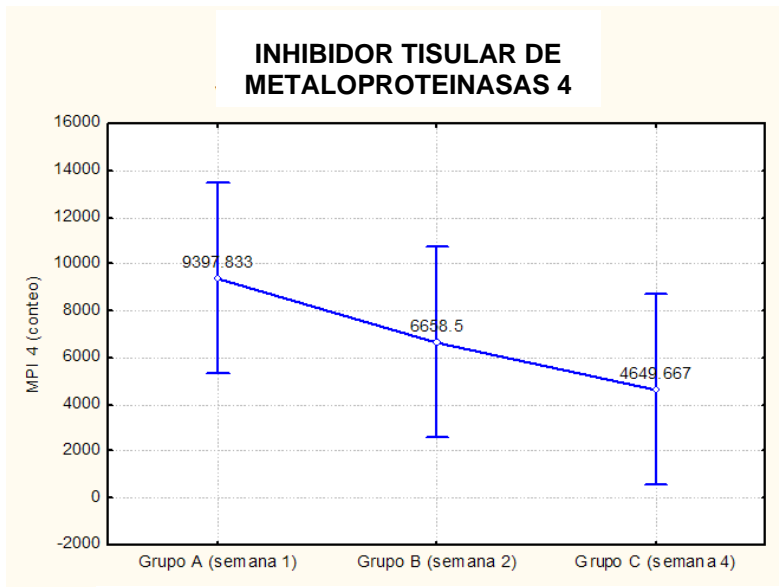


Fig. 6 Valores promedio y rangos de TIMP 4 se observa un patrón decreciente sin ser estadísticamente significativo  
ANOVA P= 0.24

## INHIBIDOR TISULAR DE METALOPROTEINASAS 9

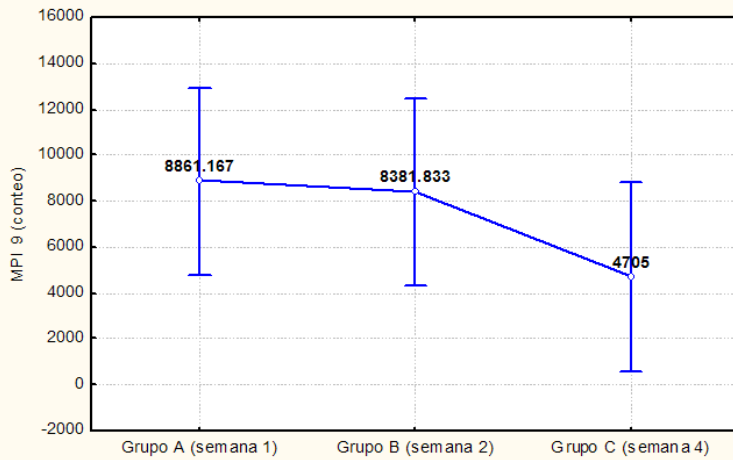


Fig. 7 Valores promedio y rangos de TIMP 9 se observa un patrón decreciente sin ser estadísticamente significativo ANOVA P= 0.27

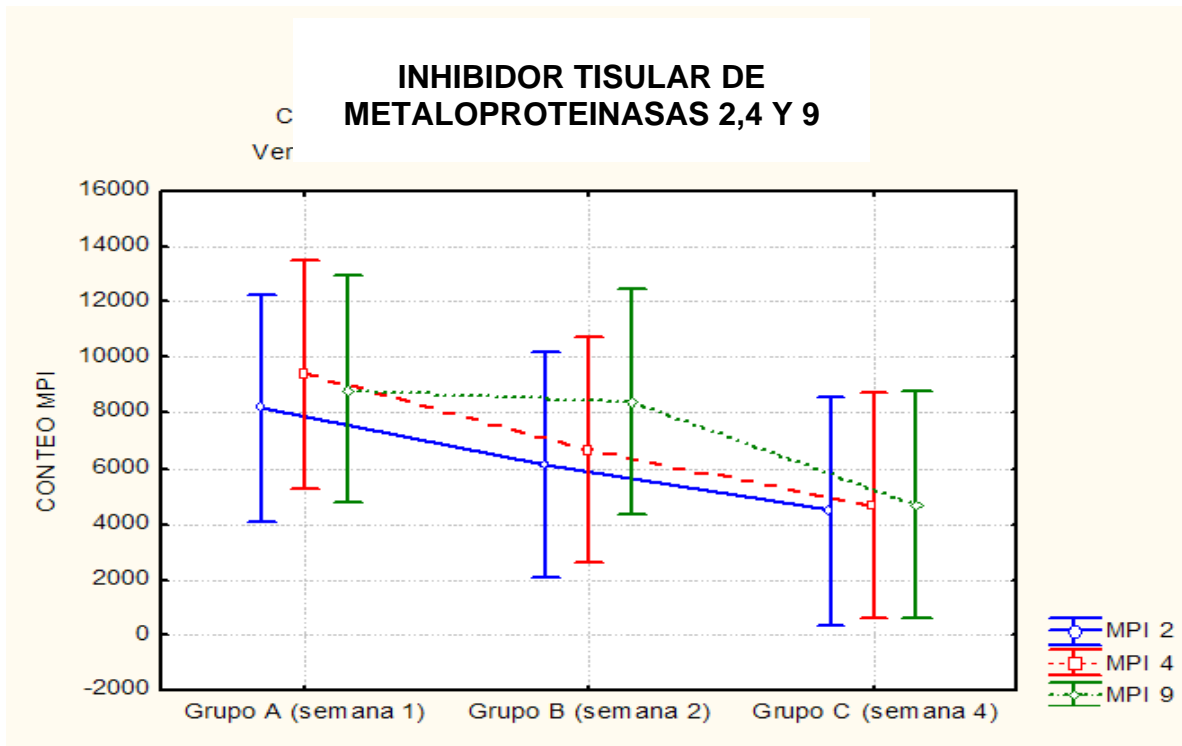


Fig. 8 Contraste de la respuesta en promedio de las tres Metaloproteinasas en los tres grupos de estudio

## DISCUSION

La membrana amniótica, fue utilizada en un inicio para el manejo de quemaduras químicas oculares y a través de los años se ha ido popularizado cada vez más en el uso de afecciones de la superficie ocular con muy buenos resultados.

En la actualidad hay varios tipos de membrana, en nuestro estudio se utilizó la membrana amniótica radioesterilizada, como se ha reportado en la literatura, el éxito del injerto de membrana amniótica, se debe a las propiedades antiinflamatorias y antiangiogénicas. En nuestro estudio el objetivo principal fue determinar la integración de la membrana amniótica radioesterilizada, así como determinar si conservaba sus propiedades antiinflamatorias y antiangiogénicas con la determinación del inhibidor tisular de metaloproteinasas 2, 4 y 9. En nuestro estudio se encontraron elevadas en los 3 grupos aunque con un patrón decreciente, sin embargo no hubo diferencia estadísticamente significativa por lo que podemos decir que se comportaron de igual manera en los 3 grupos de estudio, manteniéndose elevadas tal vez por el proceso inflamatorio.

En el 2006 Resch y colaboradores (38) realizaron por primera vez una clasificación de los patrones de integración de la membrana amniótica a la córnea, ellos encontraron que la integración subepitelial fue la más frecuente a diferencia de nuestro estudio, en el cual el patrón mayor observado en los 3 grupos de córneas fue el intraestromal, con un 55.5% de frecuencia independientemente del tiempo posquirúrgico.

Se encontró en la mayoría de las muestras un gran infiltrado inflamatorio crónico, mismo que se encontró más elevado en el grupo C. Clínicamente este grupo presentó mayor secreción por lisis de la membrana, ya que no se observaba datos de infección ocular, también se observó que algunas córneas presentaron leucoma corneal, quizás por esta misma reacción inflamatoria.

Después de un injerto de membrana amniótica en humanos, a la cuarta semana ya no se observan remanentes, en conejos aún los podemos observar, muy difíciles de distinguir por el leucoma corneal, aunque no esperábamos un infiltrado inflamatorio tan importante, es posible que por la ruptura parcial de la membrana que se presentó en varias córneas haya favorecido la inflamación y la vascularización corneal. Otra posibilidad es que se hubiera desarrollado alguna reacción en el conejo a la membrana amniótica por tratarse de diferente especie, ya que se encontró infiltrado mononuclear, aunque es solo una posibilidad ya que la membrana amniótica no presenta antígenos de superficie, aunque en un estudio publicado por Adinolfi en 1982, se reportó que en estudios radiobiológicos de células amnióticas cultivadas in vitro han sintetizado pequeñas cantidades de HLA A, B, C o antígenos DR (37) por lo que sería importante realizar más estudios con este tipo de membrana.

## CONCLUSIONES

En nuestro estudio se encontró que la membrana amniótica se integra a la córnea y el patrón de integración más frecuente fue el intraestromal con un 55.5% de frecuencia a diferencia de lo reportado por Resch y colaboradores quienes encontraron como patrón más frecuente el subepitelial.

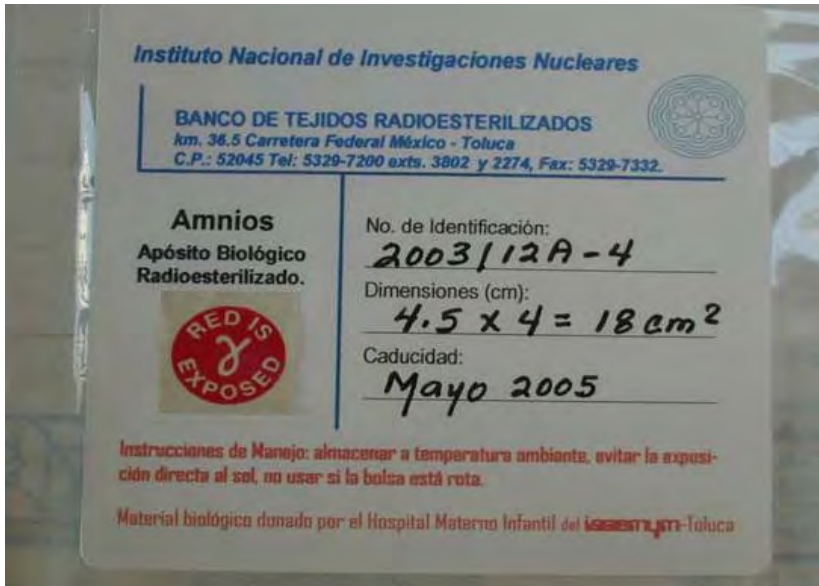
Los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) 2 , 4 y 9, los cuales son los reguladores de las metaloproteinasas, se expresan en la membrana amniótica y son una cualidad buscada en la membrana por sus efectos antiinflamatorios y antiangiogénicos.

En este estudio los TIMP se encontraron en los 3 grupos, por lo que podemos concluir que en nuestra membrana se siguen expresando los TIMP, pero es posible que por la ruptura parcial de la membrana amniótica que se presentó, no se pudo limitar el proceso inflamatorio.

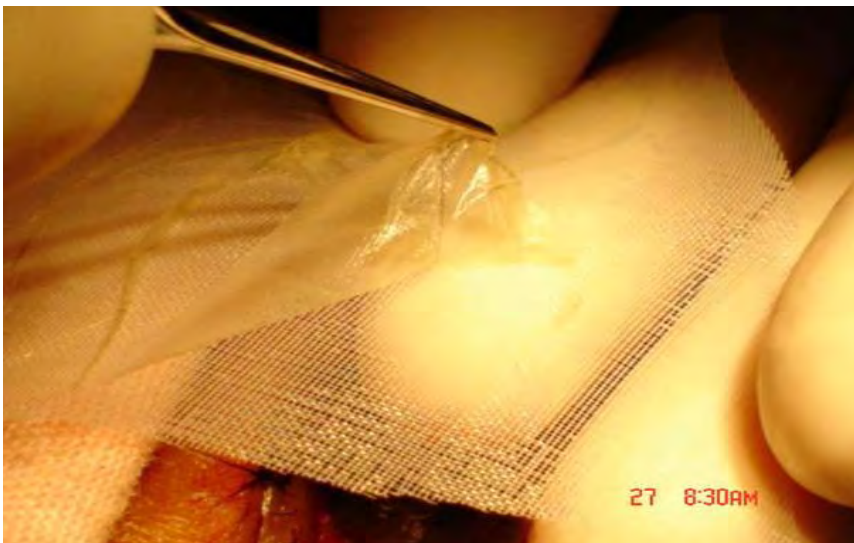
Este estudio sería importante realizarlo en humanos con córneas patológicas, para esclarecer mejor los cambios histológicos.

# **ANEXOS**

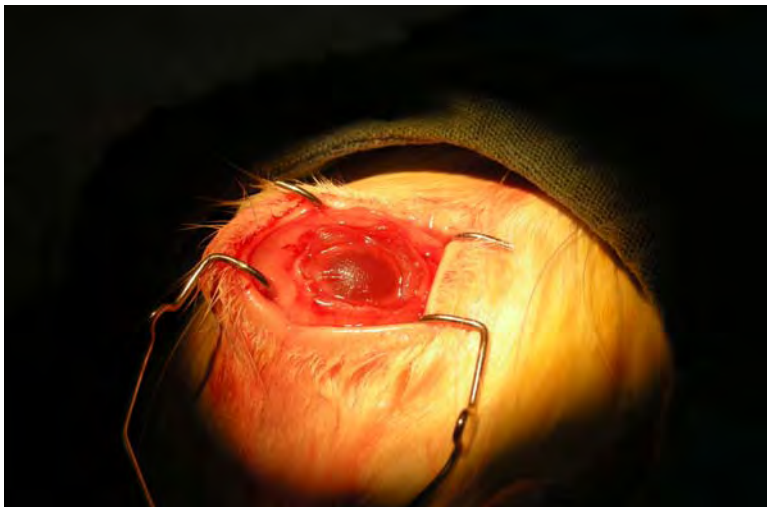




Presentación de Membrana Amniótica Radioesterilizada



Membrana Amniótica Radioesterilizada



Injerto de membrana amniótica  
radioesterilizada

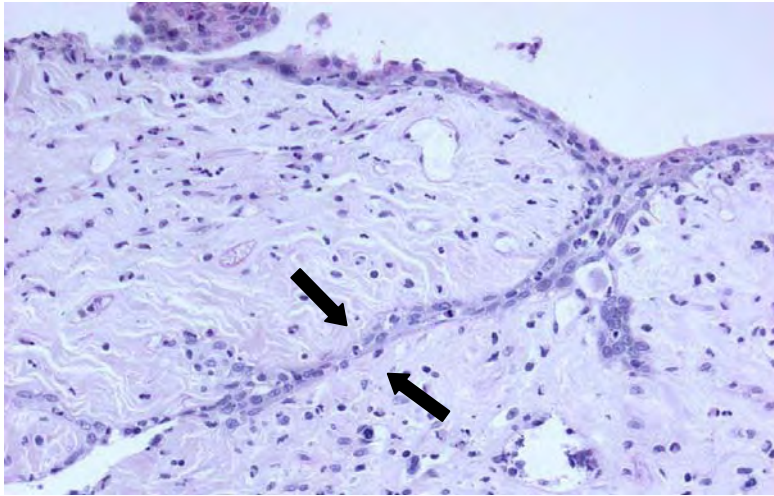


Posquirúrgico de injerto de  
membrana



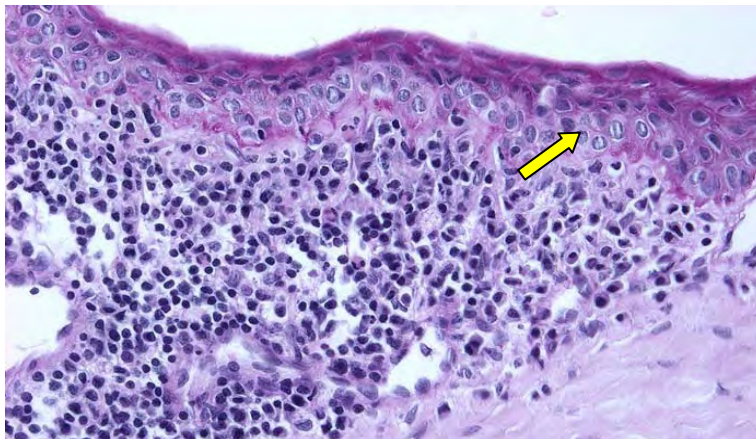
Tinción con hematoxilina eosina de membrana amniótica radioesterilizada.

## PATRONES DE INTEGRACIÓN



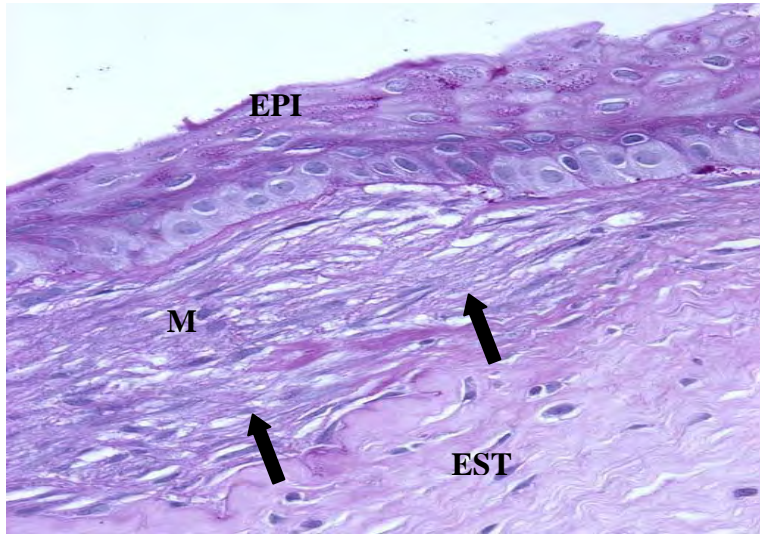
### INTRAESTROMAL

Las flechas señalan la membrana integrándose dentro del estroma.



### INTRAEPITELIAL

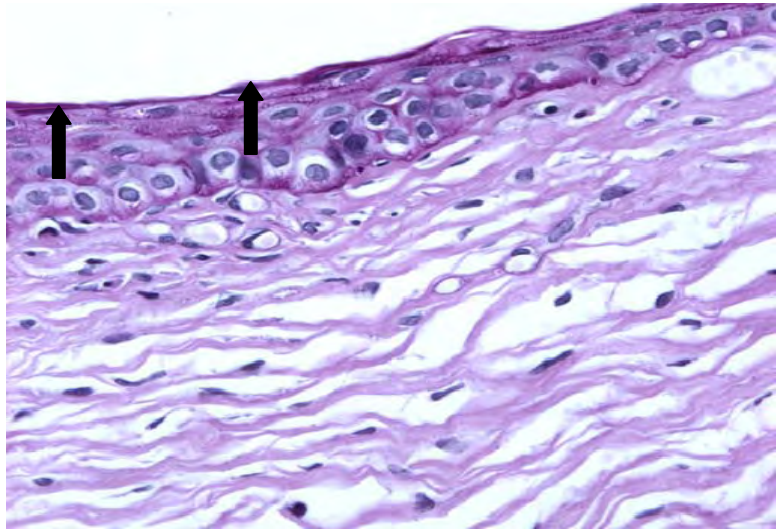
La flecha señala como la membrana se integra al epitelio corneal



**SUBEPITELIAL**

Se observa la membrana por debajo del epitelio corneal y por encima del estroma.

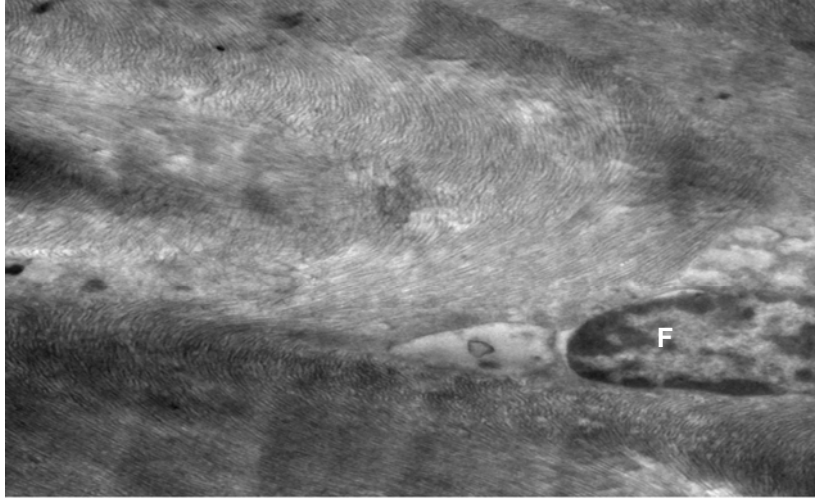
EPI= epitelio, EST= estroma M= membrana aminotica



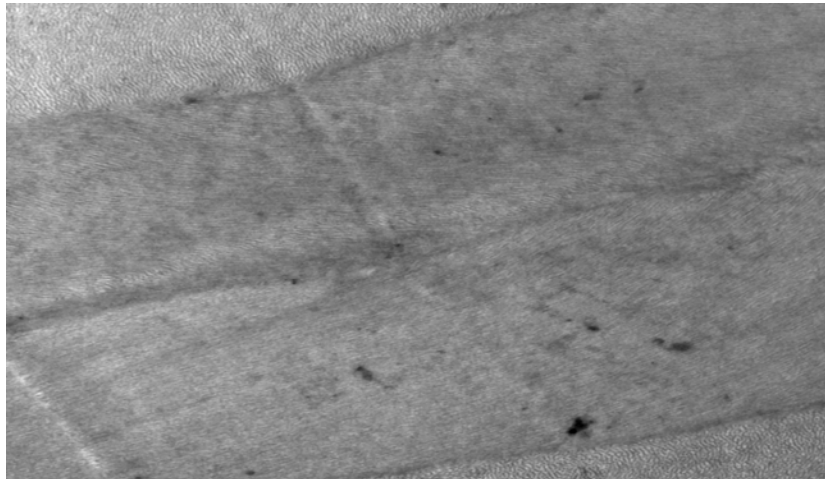
**SUPERFICIAL.**

La flecha señala como la membrana se adosa al epitelio corneal sin integrarse a él.

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA



Se observa desorganización de fibras de colágena y un núcleo de fibroblasto (F).  
Integración intraestromal



Se observa desorganización de fibras de colágena.  
Integración intraepitelial

## **Bibliografía**

- 1.- De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrana. Arch Ophthalmol 1940; 23: 522 – 5.
- 2.- Brown A. Lime burns of the eye use of rabbit peritoneum to prevent severe delayed effects. Arch Ophthalmol 1941; 26:754 – 69.
- 3.- Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. Br J Ophthalmol 1946; 30: 337 – 45.
- 4.- Sorsby A, Haythorne J, Reeo H. Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. Br J Ophthalmol 1947; 31: 409 – 18.
- 5.- Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damage rabbit corneas. Cornea 1995; 14: 473 – 84.
- 6.- Reyes M.L., Martínez M.E., Luna D., Sveshtarova B., González O., Zárata A., Ramos L.E. The clinical application of a fetal membrane on a diabetic patient's injury. Ann of Transp. 1999; 4 (3-4): 78 -81.
- 7.- Martínez M.E., Reyes M.L. The tissue bank at the National Nuclear Research Institute in Mexico. Cell a Tissue Banking 2003 4: 163-168.
- 8.- Ley E., Martínez M.E., Román R., Oliveros F., Canchola E., Application of biological dressing from radiosterilized amnios with Cobalt 60 and serologic studies on the handling of burns in pediatrics patients. Ann of transp. 2003; 8(4) 28-31 pp.
- 9.- Martínez M. E., Ley E., Reyes M.L., Rodríguez P., Vázquez L., Salazar M.A., "Biological Wound Dressings Sterilized with Gamma Radiation: Mexican Clinical Experience", *Radiat. Phys. Chem.* 2007; 76: 1771-1774 pp.

- 10.- Danforth DM, Hull RW The microscopic anatomy of the fetal membranes with particular reference to the detailed structure of the amnion. *Am J Obstet Gynecol* 1958; 75: 536-50.
- 11.- Adinolfi M, Akle C, Mecoll. et al. Expression of HLA antigens, beta 2-microglobulin and enzymes by human amniotic epithelial cells. *Nature* 1982; 295: 325 – 7.
- 12.- Akle C, Adinolfi M, Welsh KI, et al . Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981; 2: 1003 – 5.
- 13.- Koizumi N, Fullwood N, Bairakt ArisG, et al, Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2506 – 13.
- 14.- Grueterlch M, Espana E, Tseng SCG. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophtalmol* 2003; 48: 631 – 46.
- 15.- Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, Nishida, T differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea* 1999; 18: 73 – 9.
- 16.- Kurpakus MA, Daneshvar C, Oavenport J, Kim A. Human corneal epithelial cell adhesion to laminin. *Curr eye Res* 1999; 19: 106 -14.
- 17.- Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, et al. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patient with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 431 -41.



- 18.- Lee S-H, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 1997; 123: 303 -12.
- 19.- Chen H. J, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 826 – 33.
- 20.- Schwab I. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1999; 97: 891 – 896.
- 21.- Meller D, Tseng SCG. Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 878 -86.
- 22.- Tseng SCG, Li O-Q. Suppression of TGF –B1, B2, B3, TGF-B receptor II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblast by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999: 179: 325 -35.
- 23.- Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee S. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997; 124: 765 – 74.
- 24.- Azuara Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 399 -402.
- 25.- Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K . Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorder. *Cornea* 2001; 20: 408 -13.
- 26.- Wang MX, Gray TB, Park WC, et al. Reduction in corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. *J Cat Refract Surg* 2001; 27: 310 -319.

27.- Hao Y, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19:348 -52.

28.- De Quan, Zuo Chen, Xiu Jun y cols. Stimulation of Matrix by Hiperosmolarity via JNK pathway in human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology and visual Science*. 2004; 45: 4302 -11 pp.

29.- Chi Chin, Ching Yi, Chin Sung y cols. "Role of matrix metalloproteinase-9 in ex vivo expansion of human limbal epithelial.

30.- Koizuml. N, Inatomi T, Sotozono C, et al Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000; 20: 173 – 177.

cells cultured on human amniotic membrane". *Investigative Ophthalmology and visual Science* 2005, 46: 808 -15

31.- Tseng SCG, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. Holland EJ, Mannis MJ, ed. *Ocular Surface Disease. Medical and surgical management*. New York: Springer – Verlag 2002; cap 20.

32.- Anderson DF, Prabhasawat P, Alfonso E, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation after the primary surgical management of band keratopathy. *Cornea* 2001; 20: 354 -361.

33.- Kim JS, Kim JC et al. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits protease activity on wound healing following acute corneal alkali burns. *Exp Eye Res* 1998; 70: 329 – 37.

34.- Meller D. Pires RT, Mack R, et al. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology* 2000; 107: 980 -990.

- 35.- Gris O, Wolley D, Tresserra F, et al. Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea. *Ophthalmology*; 2002; 109: 508 -12.
- 36.- Che J, Takahiro N, Andrew J, Shigeru K. The persistence of transplanted amniotic membrane in corneal stroma. *Am J Ophthalmol* 2006; 14: 190 – 192.
- 37.- Martínez M.E., Mariano D. The tissue bank at the Instituto Nacional de .Investigaciones Nucleares: ISO 9001:2000 certification of its quality management system, *Cell and Tissue Banking* (2007) 8, 221-231
- 38.- Resch, Scholtzer,Hofman y cols. Integration patterns of cryopreserved amniotic membranes into the human cornea. *Ophthalmology* 2006 113: 1927 – 35.
- 39.- Haminder S. Dúa, Gómez, J. King. “The amniotic membrane in ophthalmology” *Surv Ophthalmol* 2004 49 :(1) 51- 77 pp.