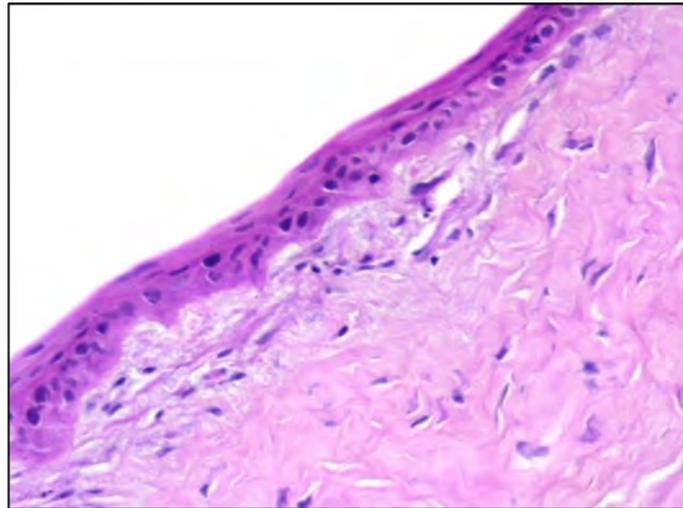






Facultad de Ciencias de la Salud  
Escuela de doctorado de la ULPGC  
Programa de doctorado  
Investigación aplicada a las Ciencias Sanitarias

## **TESIS DOCTORAL**



# **ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO Y ESTADÍSTICO DE LA REPARACIÓN DE LA CÓRNEA EN CONEJOS**

**PATRICIA RAMÍREZ PERDOMO**

Las Palmas de Gran Canaria

-abril de 2025-







A Julia y Juan, mi pequeña gran familia, por su paciencia y amor incondicional.

A mis padres, por su apoyo y confianza.



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, debo darle las gracias a mi director, el Dr. Juan Andrés Ramírez González, no todos los doctorandos tienen la suerte que yo he tenido con un director que apoya, respeta y cree en la capacidad de la elaboración de este y de cualquier proyecto desde antes incluso de que diera mis primeros pasos. He intentado en todo momento estar a la altura aplicando los conocimientos no sólo académicos sino vitales que he escuchado, y visto aplicar en su día a día, como el respeto al trabajo, la responsabilidad y la satisfacción por un “trabajo bien hecho”.

Al Dr. Juan José Cabrera Galván, codirector de esta tesis, por hacer este trabajo suyo también y dedicar interminables horas de microscopio y conseguir que esos “puntos lilas y azules” para mí tuvieran un sentido y conseguir que hasta les cogiera cariño. Por su capacidad de transmitir su sabiduría y experiencia no sólo académica sino investigadora, gracias a la cual estamos hoy aquí.

Al Dr. Pedro Saavedra Santana por su inestimable ayuda y su capacidad de organizar y dar sentido a los innumerables datos con los que me sentaba en su mesa y así conseguir que la estadística sea tan importante en este trabajo.

Al Dr. Juan Daniel Hernández Marrero, por sus amplios conocimientos y experiencia y por supuesto por su participación activa con los sujetos de estudio en la elaboración de la fase experimental, consiguiendo que este trabajo se pudiera realizar. Además de su implicación moral y su apoyo incondicional en todos y cada uno de los pasos de esta tesis, en los que ha sido un ejemplo a seguir y un hombro en el que apoyarme durante todos estos años. Gracias Juan.

Al Dr. Santiago Guillén Molina, por su implicación en este proyecto, sus conocimientos en OCT y por abrirnos las puertas de su “casa” sin dudarlo ni un segundo.

A todo el personal de la ULPGC en especial a Eduardo Araujo Ruano, con su arduo trabajo de laboratorio y siempre con una sonrisa y optimismo nos impulsaba a que esto “tirara pa’lante”.

A Mercedes Perdomo de León, por su incalculable apoyo, su aliento constante y por ser la personificación de la ayuda incondicional, desde la parte moral y afectiva hasta la parte tangible, ayudando en la realización de las OCT. Gracias mamá.

A mi hermana Silvia y el resto de mi familia natural y política, por estar siempre ahí, y ayudarme a seguir adelante, a elegir el color de la portada, poner los márgenes en orden... (Laura, sabes que no le doy "imprimir" a nada sin preguntarte, ¡gracias!).

A la Dra. Tara Niño González por su ayuda y conocimientos en la elaboración y presentación de este manuscrito. Además, por supuesto de su apoyo, cariño y ser familia. Gracias comadre.

A mis amigas de siempre, Eva, Scherezade y Jessica, un grupo de mujeres profesionales, trabajadoras e inspiradoras que me acompañan desde la infancia y hacen que la vida sea más fácil. Gracias, chicas... ¡tenemos que quedar!

No me puedo olvidar de los compañeros, profesionales, tutores y pacientes que durante estos 20 años de profesión me he cruzado por el camino, ellos han hecho que sea la persona y la profesional que soy hoy en día, y los que me hacen evolucionar y ser una mejor oftalmóloga veterinaria.

Y por supuesto a Julia, quiero agradecerte que consigas que cada día quiera ser mejor persona, y que me recuerdes lo verdaderamente importante de la vida.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	3
1.1. INTRODUCCIÓN .....	4
1.2. OBJETIVOS .....	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	9
2.1. EMBRIOLOGÍA .....	9
2.2. ANATOMÍA .....	11
2.2.1. EPITELIO CORNEAL .....	13
2.2.2. ESTROMA CORNEAL .....	17
2.2.3. MEMBRANA DE DESCEMET .....	21
2.2.4. ENDOTELIO CORNEAL .....	21
2.3. FUNCIÓN .....	23
2.4. ESTÁTICA Y DINÁMICA DE LA CÓRNEA .....	24
2.5. CICATRIZACIÓN CORNEAL .....	25
2.5.1. EPITELIO CORNEAL .....	25
2.5.2. ESTROMA CORNEAL .....	26
2.5.3. MEMBRANA DE DESCEMET Y ENDOTELIO .....	27
2.6. REACCIONES CORNEALES ANÓMALAS .....	28
2.6.1. EDEMA .....	28
2.6.2. VASCULARIZACIÓN .....	29
2.6.3. FIBROSIS .....	30
2.6.4. MELANOSIS .....	31
2.6.5. INFILTRACIÓN DE LEUCOCITOS .....	32
2.6.6. ACUMULACIÓN DE SUSTANCIAS ANÓMALAS .....	34
2.7. ALTERACIONES QUE AFECTAN A LA BIOMECÁNICA DE LA .....	
CÓRNEA .....	35
2.7.1. ENFERMEDADES CORNEALES PROPIAS .....	36
2.7.2. ENFERMEDADES SISTÉMICAS .....	37
2.7.3. ALTERACIONES HORMONALES .....	37
2.7.4. CORRECCIÓN DE LA REFRACCIÓN CORNEAL .....	37
2.8. ÚLCERAS CORNEALES .....	38
2.8.1. ETIOLOGÍA .....	38
2.8.2. DIAGNÓSTICO .....	40
2.8.3. CLASIFICACIÓN .....	40
2.8.4. TRATAMIENTO .....	42
2.9. MEMBRANA AMNIÓTICA .....	45
2.9.1. ESTRUCTURA PLACENTARIA .....	46
2.9.2. ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA .....	46
2.9.3. CARACTERÍSTICAS DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA .....	46
2.9.4. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA .....	
AMNIÓTICA .....	47
2.9.5. CONSERVACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA .....	48
2.9.6. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS .....	49
2.9.7. USOS EN ENFERMEDADES OCULARES .....	50

2.10. TÉCNICAS AVANZADAS DEL DIAGNÓSTICO POR IMAGEN...	
CORNEAL .....	51
2.10.1. TOPOGRAFÍA .....	52
2.10.2. MICROSCOPIA ESPECULAR .....	55
2.10.3. MICROSCOPIA CONFOCAL .....	56
2.10.4. BIOMICROSCOPIA POR ULTRASONIDO .....	57
2.10.5. TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA .....	58
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	65
3.1. SUJETO DE ESTUDIO .....	65
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	65
3.2.1. OBJETIVO .....	65
3.2.2. DISEÑO .....	66
3.2.3. PREPARACIÓN PREQUIRÚRGICA .....	66
3.2.4. MÉTODO QUIRÚRGICO .....	67
3.2.5. MEMBRANA AMNIÓTICA .....	69
3.2.6. MANEJO POSOPERATORIO .....	71
3.3. EVALUACIÓN DE LOS SIGNOS CLÍNICOS .....	71
3.3.1. OBJETIVO .....	71
3.3.2. METODOLOGÍA DE ESTUDIO .....	72
3.3.3. OBTENCIÓN DE DATOS .....	72
3.3.4. REGISTRO DE LOS SIGNOS CLÍNICOS .....	72
3.4. TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA (OCT) .....	74
3.4.1. OBJETIVO .....	74
3.4.2. METODOLOGÍA DE ESTUDIO .....	74
3.4.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS .....	74
3.4.4. OBTENCIÓN DE LOS DATOS .....	74
3.5. HISTOLOGÍA .....	78
3.5.1. OBJETIVO .....	78
3.5.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....	78
3.5.3. METODOLOGÍA DE ESTUDIO .....	78
3.5.4. ANÁLISIS DE DATOS .....	80
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	82
3.6.1. DE LOS SIGNOS CLÍNICOS .....	82
3.6.2. DE LA OCT .....	83
3.6.3. DE LA HISTOLOGÍA .....	83
4. RESULTADOS .....	87
4.1. SIGNOS CLÍNICOS .....	87
4.1.1. GRUPO 1 .....	87
4.1.2. GRUPO 2 .....	88
4.1.3. GRUPO 3 .....	89
4.1.4. RESULTADOS ESTADÍSTICOS .....	89
4.2. OCT .....	92
4.2.1. GRUPO 1 .....	92
4.2.2. GRUPO 2 .....	93
4.2.3. GRUPO 3 .....	94

4.2.4. RESULTADOS ESTADÍSTICOS .....	95
4.3. HISTOLOGÍA .....	96
4.3.1. EPITELIO CORNEAL .....	96
4.3.2. ESTROMA CORNEAL .....	97
4.3.3. LIMBO CORNEAL .....	98
4.3.4. RESULTADOS ESTADÍSTICOS .....	99
4.4. ANEXOS TABLAS .....	102
4.4.1. SIGNOS CLÍNICOS .....	102
4.4.2. OCT .....	110
4.4.3. HISTOLOGÍA .....	113
4.5. ANEXO IMÁGENES .....	116
4.5.1. SIGNOS CLÍNICOS .....	116
4.5.2. OCT .....	122
4.5.3. HISTOLOGÍA .....	133
5. DISCUSIÓN .....	141
5.1. EL CONEJO COMO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN EN.....	
OFTALMOLOGÍA .....	141
5.2. EXPERIMENTACIÓN Y CÓRNEA .....	141
5.3. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE ÚLCERAS CORNEALES .....	143
5.4. LOS BIOMATERIALES EN EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE.....	
LA CÓRNEA .....	143
5.5. LA MEMBRANA AMNIÓTICA COMO TRATAMIENTO DE LAS...	
ALTERACIONES OCULARES .....	144
5.6. EL USO DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA EN EL OJO DEL CONEJO....	145
5.7. TIPOS DE MEMBRANA AMNIÓTICA .....	146
5.8. TÉCNICA EMPLEADA CON LA MEMBRANA AMNIÓTICA .....	148
5.9. EVALUACIÓN TRAS LA IMPLANTACIÓN DE LA.....	
MEMBRANA AMNIÓTICA .....	150
5.9.1. CONTROL DEL DOLOR .....	150
5.9.2. AGUDEZA VISUAL .....	150
5.9.3. VASCULARIZACIÓN .....	152
5.9.4. REPARACIÓN CORNEAL .....	153
5.9.5. RECUPERACIÓN DEL ESPESOR CORNEAL .....	153
5.9.6. REEPITELIZACIÓN .....	156
5.10. EL USO DE LA HISTOLOGÍA PARA EVALUAR LA RECUPERACIÓN..	
CORNEAL .....	157
5.10.1. EPITELIO .....	157
5.10.2. ESTROMA .....	159
5.10.3. LIMBO .....	161
5.11. FÓRMULA MATEMÁTICA PARA LA EVALUACIÓN DE LA.....	
RECUPERACIÓN CORNEAL .....	161

6. CONCLUSIONES .....	167
7. RESUMEN .....	171
8. BIBLIOGRAFÍA .....	175
9. ANEXOS .....	203

# Introducción y objetivos



# 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

## 1.1. INTRODUCCIÓN

La túnica fibrosa externa del ojo comprende la esclerótica y la córnea. El limbo sirve como zona de transición entre la córnea (anterior) y la esclerótica (posterior). La córnea, situada en la parte anterior del globo ocular y de naturaleza transparente, facilita el paso de la luz al interior del ojo, permitiendo así la visión. En los mamíferos, la córnea comprende el epitelio corneal externo, el estroma corneal e, internamente, la membrana y el endotelio de Descemet (MAGGS, 2009).

La ulceración corneal ocurre cuando se rompe el epitelio corneal, exponiendo el estroma subyacente. Es una de las enfermedades oculares más prevalentes en oftalmología veterinaria y es particularmente común en conejos, como señalan algunos autores (ANDREW, 2002; MAGGS, 2009). La enfermedad se clasifica como una de las queratopatías inflamatorias, que pueden manifestarse como ulcerativas o no ulcerativas. Los signos clínicos, los posibles tratamientos y el pronóstico pueden variar según la profundidad del defecto. Es importante señalar que la profundidad no es el único factor que afecta la curación; la contaminación bacteriana o fúngica también puede afectar negativamente al tratamiento (MAGGS, 2009).

En las úlceras superficiales, la ausencia de infección, la eliminación de la causa original y el tratamiento tópico suelen ser suficientes para resolver la afección (MAGGS, 2009).

En casos de úlceras más profundas complicadas por afectación bacteriana o fúngica, su resolución puede requerir cirugía corneal y la aplicación de biomateriales (XIE, 2018; GOGOVA, 2020). Algunos ejemplos de dichos materiales incluyen el trasplante de células madre, el uso de membranas poliméricas, mucosa oral, membrana amniótica y vejiga porcina, entre otros (SORSBY, 1947; ARORA, 2005; LO, 2013).

Se ha demostrado que la membrana amniótica es un material biológico eficaz para restaurar las superficies conjuntivales y corneales en pacientes humanos y veterinarios cuando se utiliza como material de injerto (TEJWANI, 2007; ROSEN, 2018; COSTA, 2019). En trasplante (CHE, 2019; DRAGÚÑOVÁ, 2019), se puede emplear de forma independiente o en conjunto con otros tejidos, como el cordón umbilical. Además, se

---

aplica en forma de colirio para facilitar la reepitelización corneal arrojando resultados satisfactorios (TIGHE, 2017; MURRIS, 2018).

El amnios posee varias propiedades ventajosas, incluidas sus propiedades antifibróticas, antiangiogénicas, antiproteasas y antiinflamatorias. Estas propiedades contribuyen a la reducción de la infiltración de neutrófilos, la peroxidación lipídica y la muerte de los queratocitos, previniendo así la formación de simbléfaron y disminuyendo la inflamación estromal (TAMHANE, 2005; TANDON, 2011; LO, 2013).

Diversos estudios han empleado pruebas avanzadas de diagnóstico por imagen para adquirir la información más precisa y exacta sobre la condición ocular de un individuo. La tomografía de coherencia óptica (OCT) puede proporcionar imágenes transversales o tomográficas del ojo con resolución micrométrica. La OCT del segmento anterior (AS-OCT) se utiliza para diagnosticar enfermedades o anomalías de la córnea, como distrofias o cuerpos extraños, y su reparación tras cirugías oculares específicas, entre otras aplicaciones (ARMARNIK, 2019; KUO, 2019; WANG, 2019). Además, los estudios han demostrado su eficacia para ayudar en la cirugía corneal e intraocular, particularmente para determinar la dimensión de una biopsia corneal (SCHMIDT, 2019; SHAN, 2019).

Asimismo, la histopatología sirve como una herramienta valiosa para examinar la morfología: analizar sus indicadores puede arrojar luz sobre los mecanismos de curación al proporcionar evidencia morfológica del proceso de reparación en las úlceras corneales, al mismo tiempo que mide el grado de inflamación y fibrosis (RAGHUNATHAN, 2017; JIE, 2018).

### **1.2. OBJETIVOS**

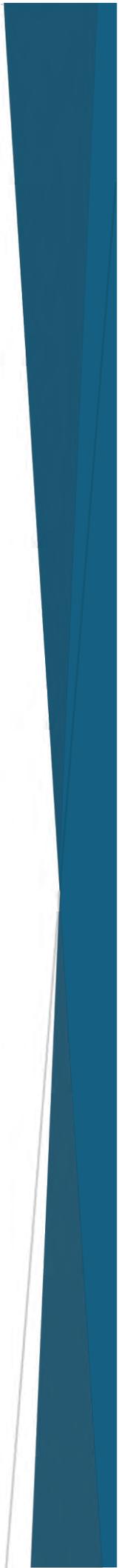
El propósito de este estudio fue examinar el proceso de curación de la córnea mediante la inducción intencionada de un defecto estromal controlado utilizando la membrana amniótica. Esta investigación tiene como objetivo validar la aplicación de la membrana como un tratamiento viable en oftalmología clínica de rutina y encontrar un método fiable para evaluar el proceso reparativo.

Para evaluar el procedimiento se evaluaron signos clínicos, mediciones de OCT e histopatología en diferentes etapas del proceso de recuperación. Se hicieron

comparaciones entre la membrana amniótica colocada sobre el lado estromal o epitelial del defecto y el ojo de control, donde no se aplicó ninguna membrana.



# Revisión bibliográfica





## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La córnea es una porción de la túnica fibrosa externa del ojo. Esta túnica está formada por la córnea anteriormente y la esclera en la porción posterior.

La córnea es una estructura especializada en la visión, es transparente y posee importantes funciones refractivas y de barrera. El epitelio es la principal barrera para fluidos y patógenos; está soportado posteriormente por la membrana basal y la capa de Bowman (capa que no está presente en todas las especies de vertebrados). Contribuye a mantener la deshidratación del estroma.

El estroma ocupa la mayor parte del volumen corneal, proporciona soporte y claridad y ayuda al mantenimiento de la inmunidad ocular.

La córnea posterior está compuesta por la membrana de Descemet y el endotelio. Su función principal es la deshidratación del estroma, lo que consigue gracias a las uniones estrechas entre sus células y las bombas endoteliales (EGHRARI, 2015).

### 2.1. EMBRIOLOGÍA

Aunque el desarrollo embriológico del ojo de los mamíferos, primates y no primates es muy similar, existen variaciones en algunas estructuras, tales como presencia o no de membrana nictitante, y la pérdida de la fovea en las especies no primates (VAN CRUCHTEN, 2017).

Además, existen diferencias referidas al momento de la gestación en la que se produce su desarrollo: En humanos, el desarrollo de las túnicas oculares se completa hacia el final de la primera mitad de la gestación, mientras que, en el conejo, es en este momento cuando se presenta la etapa inicial de las mismas (ABDO, 2017).

Tradicionalmente se ha entendido el origen de la córnea de la siguiente forma: el origen del epitelio corneal, del conjuntival y el de los párpados tiene su origen en el ectodermo superficial, mientras el estroma y el endotelio se originan del mesodermo paraxial (SEVEL, 1988).

Más recientemente, el desarrollo de la córnea en vertebrados puede definirse como un proceso de varios pasos, que involucra interacciones celulares entre tejidos derivados del ectodermo (LWIGALE, 2015). Estas interacciones entre las vesículas ópticas ocurren de manera bilateral y se derivan del ectodermo neural y el ectodermo craneal, para dar lugar al futuro epitelio corneal, así como otros epitelios de la superficie ocular (conjuntival y del limbo esclerocorneal).

Las interacciones entre el tubo neural y el ectodermo adyacente dan lugar a las células de la cresta neural, que posee una población celular altamente migratoria y multipotente. Estas células migran, entre el cristalino y el futuro epitelio corneal, para formar el endotelio y los queratocitos del estroma. Los nervios sensoriales que inervan el estroma y epitelio corneal se originan a partir del ganglio del trigémino, derivado de la cresta neural y el ectodermo (LWIGALE, 2015).

En el estroma, los queratoblastos proliferan y sintetizan altos niveles de hialuronato para formar el estroma corneal embrionario. Los queratoblastos se diferencian de los queratocitos en que sintetizan altos niveles de colágeno y queratín sulfato que reemplazarán esta capa, rica en agua, por un colágeno fibrilar densamente empaquetado observado en córneas adultas transparentes (HASSELL, 2010).

Las células madre corneales se encuentran en el limbo esclerocorneal y en la capa basal del epitelio corneal y se encuentran aún durante la etapa adulta de los individuos. Existen diversos estudios sobre su localización exacta, los métodos de cultivo y sus características estructurales, la mayoría de ellos realizados en la década de los 2000. (SAMOILA, 2012)

Durante el desarrollo temprano de la córnea, la túnica vasculosa lentis desempeña un papel importante: La cámara anterior se mantiene gracias a un trasudado de estos vasos, que llegan desde la copa óptica, rodeando el ecuador del cristalino. Con la regresión de este sistema vascular se desarrolla simultáneamente el humor acuoso: el conjunto de estas fuerzas hidrodinámicas, contribuyen a que se moldee la córnea y a que las fibras del estroma aumenten en longitud y anchura (SEVEL, 1988).

El ojo del conejo de Nueva Zelanda tiene un desarrollo similar al ojo de los humanos y al del resto de los animales domésticos. La principal diferencia se encuentra, como ya se ha comentado, en el momento en el que ocurren determinados eventos, así

como en la ausencia de pigmentación, lo que representa un beneficio destacable en su uso como animal experimental en cirugía ocular. Otras diferencias son una membrana de Bowman notable en el día 25 de la gestación, un pobre desarrollo del estroma ciliar y una retina poco desarrollada hasta el día 9 postnatal (ABDO, 2017).

Hay estudios que demuestran que el crecimiento postnatal del ojo del conejo se produce en dos picos: el primero se produce entre los días 1-7 y el segundo entre los días 14-28. El incremento del eje axial es de un 230% entre los días 1 y 56 postnatales. La apertura de los párpados ocurre entre los días 9-11 postnatales, los resultados de este estudio sugieren que esto precede a un aumento único en la tasa de crecimiento ocular. Además, los procesos visuales pueden jugar un papel importante en la modulación del crecimiento entre los días 14 y 28. (BARATHI, 2002)

## **2.2. ANATOMÍA**

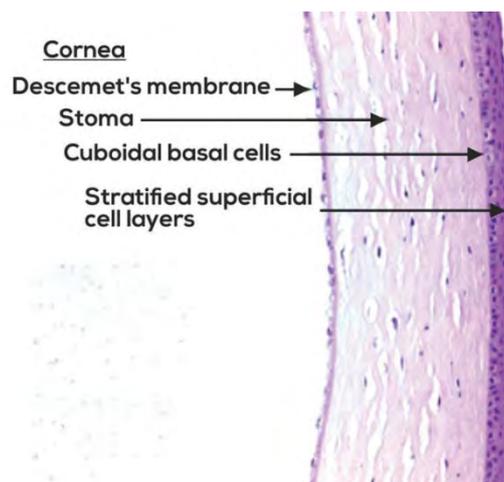
La córnea humana es horizontalmente oval, mide entre 11-12mm en su eje horizontal y entre 9-11mm en el vertical. El diámetro corneal promedio en hombres es de  $11.71 \pm 0.42\text{mm}$  y de  $11.77 \pm 0.47$  en mujeres (RÜFER, 2005).

Según un estudio, realizado por FARES en el 2012 en córneas sanas, la córnea es una estructura convexa y esférica, en la que la curvatura anterior es de 7.8mm y la posterior de 6.5mm. Además, se detectó un aumento gradual en el grosor desde la córnea central hasta la periferia de esta, debido al aumento de la cantidad de colágeno que existe en el estroma periféricamente.

FEIZI en el año 2014 realizó un estudio de paquimetría con diferentes métodos de evaluación, en córneas sanas y con queratocono, y determinó que la medida de la córnea central varía entre 551 y 565 $\mu$  y en la periferia entre 612 y 640  $\mu$ .

La córnea humana está formada, desde el exterior al interior del globo ocular, por diversas capas: externamente, cuenta con un epitelio estratificado que presenta una membrana basal. La membrana de Bowman es una delgada membrana que separa el epitelio de la siguiente capa, que es el estroma, en el que se encuentra una densa población de queratocitos. Más profundamente, se sitúa la membrana de Descemet, que separa el estroma de la capa más interna de la córnea, el endotelio, que es monocelular y que internamente está en contacto con el humor acuoso (LEUENBERGER, 1978).

---



Capas de la córnea. Imagen obtenida en SRIDHAR. 2018. Anatomy of cornea and ocular Surface. Indian J Ophthalmol, 66:190-4.

A pesar de que esta sea la manera clásica de entender la estructura por capas de la córnea humana, en 2013 DUA y colaboradores apuntaron la existencia de una nueva capa predescemética, a la que denominaron como la “capa de Dua”. Esta capa es acelular, firme y bien definida, y separa la última capa de queratocitos en la mayoría de los casos, en los que se realiza la técnica de la “Big Bubble”. Este descubrimiento, puede tener un gran impacto en la cirugía de la porción posterior de la córnea, explicando el mecanismo de patologías como el hidrops agudo y las distrofias desceméticas y predesceméticas (DUA, 2013)

Los animales domésticos, y los que se utilizan como modelo experimental para cirugía y tratamientos corneales, presentan una estructura similar a la córnea humana. A pesar de que algunos autores no encontraran excesivas diferencias (GREENE. 2018), NAUTSCHER (2016), determinó que, en los animales domésticos, no se detecta la capa de Bowman, tras constatar, con el uso de la reacción de PAS, la inexistencia de tinción para esta capa. Además, detectó otras diferencias inmunohistoquímicas entre las diferentes especies estudiadas, como la localización y distribución de citoquinas y aquaponinas en las diferentes capas de la córnea, lo que sugiere la existencia de importantes diferencias en el mantenimiento de la integridad estructural y del balance de los fluidos, según la especie estudiada.

CRESPO-MORAL, en el 2020 lo corroboró con un estudio inmunohistoquímico e histológico en la córnea del cerdo.

La córnea está inervada por la rama nasosociliar del nervio oftálmico, primera división del nervio trigémino, y está considerada uno de los tejidos más inervados y con mayor sensibilidad del cuerpo (SIDHRAR, 2018).

En el año 2001, OLIVEIRA-SOTO y colaboradores, realizaron un estudio sobre la morfología de los nervios de la córnea utilizando la técnica de microscopía confocal, determinando que las ramas nerviosas, que entran en el estroma, son gruesas y rectas y se extienden lateral y anteriormente, para dar lugar a fibras nerviosas más delgadas que se distribuyen en diferentes niveles. Estas fibras perforan la capa de Bowman y forman un plexo nervioso denso, situado inmediatamente debajo de la capa basal de las células epiteliales, formado por fibras nerviosas tortuosas y delgadas interconectadas entre sí. La córnea además posee fibras nerviosas autónomas.

Otra de las características resaltables de la córnea, es que es un tejido avascular: Los nutrientes le llegan fundamentalmente gracias al humor acuoso, aunque la película lacrimal también juega un papel importante en su nutrición.

El suministro sanguíneo que llega a la periferia de la córnea es por pequeños vasos que se localizan en el borde exterior de la misma y por las ramas finales de las arterias faciales y oftálmicas (SIDHRAR, 2018).

Existen numerosos estudios acerca de la anatomía de la córnea del conejo, ésta ocupa aproximadamente el 30% del globo ocular, (DONELLY, 1997), y sus medidas son de 15mm horizontalmente y 14mm verticalmente (PEIFFER, 1994).

Igual que otras especies, en el conejo, la córnea tiene cuatro capas: epitelio, estroma, membrana de Descemet y endotelio (ANDREW, 2002), además, presenta características y funciones muy similares a las del resto de los vertebrados. Diversos estudios demuestran que, a diferencia de otras especies, el endotelio corneal del conejo posee capacidad regenerativa que incluye la de división celular en el margen de la herida (HORN, 1977), capacidad que se ve reducida con la edad (STAATZ, 1980).

### **2.2.1. EPITELIO CORNEAL**

El epitelio corneal es la capa más externa del globo ocular. En condiciones normales, esta capa actúa como una barrera permeable selectiva, que asegura la entrada de nutrientes necesarios para el correcto metabolismo, gracias a una relación simbiótica con la película lacrimal, en especial con la capa de mucina que produce las células

---

caliciformes de la conjuntiva (SIDHRAR, 2018). Además, previene la entrada de cuerpos extraños o microorganismos causantes de enfermedades. Numerosos estudios clínicos y experimentales demuestran que, la disfunción de esta barrera epitelial puede ser la base de muchas enfermedades oculares (LIU, 2016).

El epitelio corneal mide unas 50 $\mu$  de grosor, es homogéneo de tipo “escamoso estratificado no queratinizado”, y está compuesto por 5-7 capas celulares. Las células epiteliales tienen un promedio de vida de 7-10 días, y se renuevan por involución, apoptosis y descamación (SIDHRAR, 2018).

En esta capa de la córnea se encuentran tres tipos de células: las superficiales, las aladas y las basales.

Las **células superficiales** se distribuyen en 2-3 capas. Son células poligonales planas, con un tamaño 60 $\mu$  aproximadamente y con un núcleo de unas 12 $\mu$ ; el área celular es de aproximadamente 2.5  $\mu^2$  y el del núcleo de 1.31 $\mu^2$ . La ratio núcleo-citoplasma es relativamente baja. Estas células están unidas gracias a los desmosomas. Estos resultados, hallados en un estudio con microscopio electrónico, fueron muy similares en diversas zonas de la córnea. Además, indican que, el fenotipo escamoso de las células epiteliales corneales superficiales, muestran una semejanza notable con los datos obtenidos de estudios citológicos de impresión en células epiteliales conjuntivales humanas, que muestran metaplasia escamosa severa (DOUGHTY, 2015).

Las **células aladas** reciben este nombre por la forma que presentan, ocupan 2-3 capas y presentan queratina, tonofilamentos bien evidentes y pequeñas vesículas periféricas o grandes vesículas paranucleares. (PASQUALE, 2014)

Las **células basales** están localizadas en una única capa en el epitelio. Su altura es de 20 $\mu$  aproximadamente, son de morfología cuboidal o columnar y se encuentran situadas en la parte inferior de las células epiteliales. Su citoplasma contiene queratina, que es muy importante para la formación y mantenimiento de la membrana basal. Algunas enfermedades, como la diabetes, o la cirugía ocular pueden estar relacionadas con la anomalía de las células basales (QU, 2016).

Los desmosomas se encuentran a lo largo de las membranas laterales de las células epiteliales, para adherirlas unas a otras. Las células basales están unidas a la membrana

basal que se encuentra situada debajo de ellas, mediante hemidesmosomas: este sistema evita que el epitelio se separe de las capas subyacentes. Si este proceso falla, se producen erosiones corneales y defectos de cicatrización (GIPSON, 1992).

Las uniones estrechas se presentan exclusivamente en la pared lateral de las células apicales del epitelio, lo que proporciona una barrera de permeabilidad entre las células más superficiales (FARES, 2012), lo que permite la difusión de pequeñas moléculas a través de canales permeables (TANAKA, 1983).

Inmediatamente debajo de las células basales, se encuentra la **membrana basal**. Esta lámina tiene un espesor de unos 40-60 nm, está compuesta por colágeno tipo IV, y en ella se distinguen una lámina lúcida y una lámina densa. Desde el epitelio, se desprenden las fibrillas de anclaje, que atraviesan la membrana basal y acaban como placas de anclaje, estructuras compuestas por distintos tipos de colágeno (SRIDHAR, 2018) que desempeñan un papel extremadamente importante en la renovación y restauración epitelial. Se ha descrito que muchas anomalías y enfermedades oculares están relacionadas con alteraciones de esta membrana, como la erosión corneal recurrente traumática, la distrofia corneal y el queratocono (QU, 2016).

En toda la superficie de la córnea, no se encuentran los mismos tipos celulares, distribuidos de la misma forma: mientras que, en la zona central el epitelio tiene entre 5 y 7 capas, en la periferia se encuentran entre 7 y 10. En el centro, las células basales son columnares mientras que en la periferia son cuboidales. En la zona central no hay melanocitos ni células de Langerhans, lo que sí ocurre en la periferia, donde son extensiones de la capa basal. Además, la membrana basal en la zona central es lisa, con queratán sulfato y no hay linfáticos, mientras que en la periferia esta capa no presenta queratán sulfato (SIDHAR, 2018).

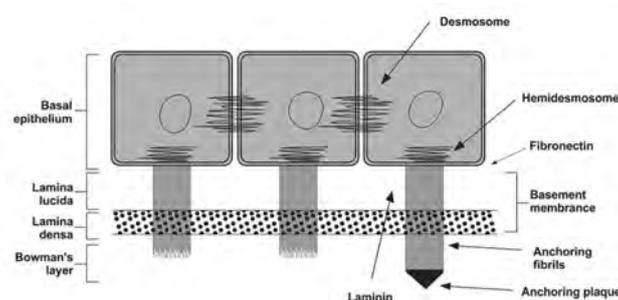


Diagrama que representa los complejos de unión del epitelio corneal. Imagen obtenida en SRIDHAR. 2018. Anatomy of cornea and ocular Surface. Indian J Ophthalmol, 66:190-4.

AZAR en un estudio de 1989 sobre la ultraestructura de la membrana basal, demostró que, en el limbo humano, el porcentaje de membrana basal ocupada por hemidesmosomas era significativamente menor que en la zona central de la misma. Esto también ocurre en conejos. En los que, además, se puso en evidencia que el área de la membrana basal fue menor en la región limbal. Así mismo, este estudio demostró que, la localización del colágeno de las fibrillas de anclaje de la membrana basal presentaba un patrón más complicado que en el limbo. Tras analizar, con microscopía electrónica de barrido la topografía de la superficie de la membrana basal de la córnea central y limbal humana, encontraron que esta última presentaba una superficie ondulada muy rugosa con papilas o clavijas de estroma que se extienden hacia la superficie corneal, característica que no se encuentran en la córnea central; comparativamente, la córnea del conejo, esta especie no mostró tales papilas, pero sí hendiduras ocasionales en el estroma (GIPSON, 1989).

Como última capa del epitelio corneal, encontramos la **membrana de Bowman**, que, como resaltamos previamente, no está presente en todas las especies de vertebrados (NAUTSCHER, 2016). Esta membrana mide aproximadamente  $12\mu$  y está formada por la condensación de colágeno, tipo I y V, y proteoglicanos. Se encuentra justo anterior al estroma y no es una verdadera membrana, es un condensado acelular (de la porción inmediatamente anterior al estroma). Esta capa lisa y ayuda a la córnea a mantener su forma. Cuando se lesiona, al no ser capaz de regenerarse, puede provocar una cicatriz (SRIDHAR, 2018).

Aunque no tiene una función crítica en la fisiología corneal, la membrana de Bowman puede ser considerada un indicador visible de interacciones entre el estroma y el epitelio. Enfermedades como la queratopatía bullosa avanzada, pueden llegar a producción su destrucción (WILSON, 2000).

#### **2.2.1.1. Biomecánica**

En cuanto a la contribución del epitelio a la biomecánica corneal, ELSHEIKH y colaboradores (2008) determinaron que la rigidez del epitelio era considerablemente más baja que la del estroma; mientras que YOO (2011) utilizando en este caso ojos bovinos, demostró que la rigidez del epitelio era mayor que la del estroma. Esta diferencia entre los resultados de los dos estudios puede deberse a la diferencia del modelo animal utilizado (MA, 2018).

La membrana de Bowman no contribuye significativamente a la estabilidad mecánica dentro de la córnea; sin embargo, la interrupción de esta membrana se ha asociado con ectasia corneal (KAAS-HANSEN, 1993; KREMER, 1995).

### 2.2.2. ESTROMA CORNEAL

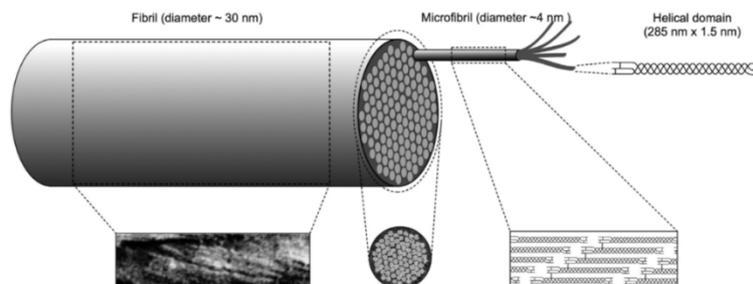
El estroma corneal, forma la mayor parte de la estructura de la misma, ocupa aproximadamente el 80-85% de su espesor. Esta porción de la córnea tiene la característica de ser transparente, y como resultado de la organización de sus fibras y de la matriz extracelular (SRIDHAR, 2018).

El estroma corneal tiene tres constituyentes no acuosos primarios: el colágeno, los proteoglicanos y las células. Además, contiene glicoproteínas especializadas. (LABAT-ROBERT, 2012; WALL, 1988; COOPER, 2006) Otro de los componentes del estroma son los iones, que cumplen un papel importante en la organización de las fibrillas necesarias para el mantenimiento de la transparencia (KOSTYUK, 2002; REGINI, 2004)

El tipo de **colágeno** encontrado, predominantemente en el estroma es el tipo I, que forma parte de la composición de las fibrillas, aunque también se encuentra Colágeno tipo VI y tipo XII (MEEK, 2004).

Las fibras de colágeno forman paquetes paralelos llamados fibrillas dispuestos en capas o laminas. El estroma del ojo humano contiene 200-250 láminas distintas, así mismo es posible observar que las fibras de cada capa están dispuestas en ángulo recto, con respecto a las fibras de las láminas adyacentes.

La disposición de las láminas dentro de la córnea contribuye a mantener la forma general del tejido y a su transparencia (HART, 1969). También es responsable de algunas propiedades ópticas como la birrefringencia corneal (MEEK, 2003).



Estructura de las fibras de colágeno. Imagen obtenida de 2015. Corneal structure and transparency. Progress in Retinal and Eye Research 49:1-16.

El tamaño medio de una microfibrilla es de 4-8 nm (BALDOCK, 2002). Las fibrillas son los principales componentes de carga de las láminas y tienen que resistir las fuerzas de tracción de la presión intraocular, así como proteger los tejidos oculares internos mientras que deben permanecer acortadas para permitir la transparencia del tejido. Esto es debido a la ultraestructura del colágeno, que presenta cadenas de polipéptidos helicoidales levógiros, en una superhélice dextrógira. Dependiendo de la especie (MEEK, 1993; HOLMES, 2005), se ha determinado que hay alrededor de entre 300 y 400 moléculas triples helicoidales dentro de la sección transversal de una fibra.

Las láminas, poseen espesor variable: en humanos miden hasta 0.2mm de ancho y  $2\mu$  de espesor. La densidad de empaquetamiento es mayor en las láminas anteriores, que en las posteriores (BERGMANSON, 2005).

Las láminas anteriores están altamente entretejidas (RADNER, 1998) y la mayoría parece insertarse en la capa de Bowman (MORISHIGE, 2006). Lo que también se detecta en el estroma medio (RADNER-MALLINGER, 2002). Por el contrario, en el estroma posterior las láminas están más hidratadas y, se cree, menos entrelazadas: de esta manera el estroma posterior puede hincharse con mayor facilidad que el anterior (MÜLLER, 2001).

Las capas más profundas presentan una mayor organización que las superficiales. (MÜLLER, 2001)

En el estroma profundo, estas láminas de colágeno tienen direcciones preferentemente inferior-superior y nasal-temporal (MEEK, 1987; ABAHUSSIN, 2009; KAMMA-LORGER, 2010). AGHAMOHAMMADZADEH en el 2004 en un estudio de dispersión de Rayos X, sugirió la presencia de una red de láminas de colágeno que entran en la córnea cerca de las posiciones inferior, superior, nasal y temporal, originadas probablemente en la esclerótica adyacente. Esta red es simétrica en ambos ojos (BOOTE, 2011).

Las fibras de colágeno en la zona central, o prepupilar, parecen estar más próximas entre sí que en la periferia corneal (BOOTE, 2003). Esta alta densidad del empaquetamiento de colágeno, que soporta una elevada tensión parece ser necesaria para mantener la resistencia y por tanto la curvatura en una región corneal de espesor reducido (SRIDHAR, 2018).

En la periferia de la córnea, el entrelazado de colágeno, en combinación con la presencia de fibras elásticas puede explicar por qué esta región es más flexible y absorbe las fluctuaciones de la presión intraocular, evitando así la deformación de la córnea central, que es la ópticamente más importante (BOYCE, 2008).

DUA y colaboradores (2013) propusieron la existencia de una capa predescemética (PDL), la capa de Dua, que no había sido definida anteriormente. Estos autores demostraron que esta capa está íntimamente relacionada con la malla trabecular y que es rica en colágeno tipo VI. Este hallazgo se obtuvo tras un estudio con diferentes tipos de burbujas en el estroma corneal: aunque todavía no está clara su diferenciación real, no se puede negar que, el aire inyectado en esta porción del estroma se desplaza con cierta facilidad a través de las láminas de esta región de la córnea. Esto puede tener importantes implicaciones en las técnicas quirúrgicas en las que se utilizan las grandes burbujas, o “Big Bubble” (MEEK, 2015).

Los **queratocitos**, son las células que están presente en el estroma corneal: la mayoría de ellas se encuentran en el estroma anterior y están involucradas en el mantenimiento del entorno de la matriz extracelular, compuesta de colágeno y **glicosaminoglicanos**. Los queratocitos son capaces de sintetizar moléculas de colágeno y glicosaminoglicanos, creando también metaloproteinasas de matriz (MMP), todas ellas importantes en el mantenimiento de la homeostasis del estroma (SRIDHAR, 2018).

VIRCHOW (1905) fue el primero en darse cuenta de que este gel interfibrilar era de importancia capital para la transparencia corneal. MEYER (1948, 1953) avanzó que este gel, que ya era conocido por contener mucopolisacáridos, mantiene la transparencia al regular su contenido de agua y descubrió que contiene dermatán sulfato, queratán sulfato y condroitín sulfato.

A finales de la década de 1980, se dieron nombres específicos a los proteoglicanos dependiendo de sus cadenas de glicosaminoglicanos y de la naturaleza de sus núcleos de proteínas. El estroma humano adulto, contiene cuatro pequeños proteoglicanos ricos en leucina: decorina, lumicán, queratocán y mimecán. El primero contiene sulfato de dermatán y condroitín sulfato, mientras que los tres últimos contienen queratán sulfato. Otros dos proteoglicanos asociados con la córnea son el biglycan que contiene dermatán sulfato y fibromodulina que contiene queratán sulfato. (MEEK, 2015).

---

En la parte posterior del estroma predomina el queratán sulfato, que es un proteoglicano hidrofílico, mientras que, en la parte anterior el más frecuente es el dermatán sulfato, que es mucho menos hidrofílico (SRIDHAR, 2018).

### **2.2.2.1. Biomecánica**

El estroma es la capa corneal que más contribuye al comportamiento mecánico de la misma. La razón mayoritaria es porque constituye aproximadamente el 90% del espesor corneal (GUARNIERI, 2015). La cantidad relativa de fibras de colágeno y matriz extracelular están relacionadas con las propiedades biomecánicas del estroma, incluida la fuerza física, la forma y la transparencia. (BOOTE, 2003-2005; MAURICE, 1970).

Diversos estudios han demostrado que la porción anterior de la córnea es 2.2-3 veces más elástica que la porción posterior (WINKLER, 2011; THOMASY, 2014).

MIKULA y colaboradores (2016) determinaron una distribución única de la elasticidad axial y radial de la córnea: el estroma anterior posee una estructura de colágeno altamente entrecruzada, en comparación con la relativa homogeneidad del estroma posterior; asimismo, determinaron que el módulo elástico anterior es menor que el posterior en las regiones periféricas. Esto tiene una importancia notable en alteraciones corneales como el queratocono, en el que se modifica la organización de las láminas del estroma corneal (MEEK, 2005).

Diversos estudios han analizado la importancia de los proteoglicanos en las interacciones con el colágeno, el diámetro de fibrillas y la adhesión de las mismas. La disminución de la proporción de fibrillas, así como su ausencia puede estar presente en determinadas enfermedades corneales, como la degeneración marginal pelúcida y la distrofia corneal macular, así como en la facilitación del desarrollo de trastornos ectásicos, por lo que se puede determinar que los proteoglicanos actúan como un pegamento interfibrilar, o interlamelar, crucial para la disposición de las fibras de colágeno y el mantenimiento de una fuerza cohesiva entre las láminas (QUANTOCK, 2010; PRAUS, 1971; FUNDERBURGH, 1990)

Con respecto a la nueva capa predescemética, o capa de Dua, aunque a priori se planteaba la hipótesis de que su función principal es la de aportar rigidez a la córnea, LOMBARDO (2017) no encontró un plano de separación anatómico distinto entre los haces de fibrillas de colágeno del estroma predescemético y las láminas de colágeno

---

suprayacentes por lo que se consideran necesarios realizar más estudios para cuantificar la rigidez real de la misma.

### **2.2.3. MEMBRANA DE DESCOMET**

La membrana de Descemet es la membrana basal del endotelio y se localiza entre el estroma posterior y el endotelio (MAGGS, 2009). Su componente principal es el colágeno tipo IV y su grosor medio es de  $7\mu$ , aunque puede llegar a las  $10\mu$  con el paso de los años (SRIDHAR, 2018), ya que es secretada de modo continuo por las células endoteliales a lo largo de toda la vida (LEUENBERGER, 1978).

Una de las características principales de esta membrana es su elasticidad (SRIDHAR, 2018), aunque puede romperse cuando el globo ocular sufre un estiramiento severo tras una buftalmia continuada en casos de glaucoma crónico o en lesiones penetrantes (MAGGS, 2009).

Asimismo, se ha constatado que una gran cantidad de distrofias endoteliales corneales presentan irregularidades en la membrana de Descemet, lo que sugiere que las células crean respuestas a las señales biofísicas que ocurren en su matriz subyacente (ALI, 2016).

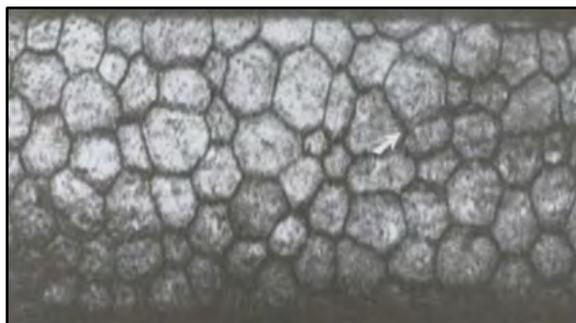
#### **2.2.3.1. Biomecánica**

Se ha demostrado que la capa de Bowman y la membrana de Descemet representan el 20% de la rigidez a la flexión de la córnea (SHIH, 2017).

Aunque las fibras de colágeno del estroma no se continúan con las de la membrana de Descemet, FITCH (1990) determinó que se adhieren firmemente a la superficie posterior del estroma corneal, reflejando cualquier cambio en la forma del estroma.

### **2.2.4. ENDOTELIO CORNEAL**

Las células que componen esta capa corneal son hexagonales y metabólicamente activas, aunque no se regeneran en los individuos adultos (RIO-CRISTOBAL, 2014). Componen una monocapa, con apariencia de mosaico en forma de panal. Estas células forman una capa impermeable al aire, en la que no se encuentran queratocitos.



Capa de células endoteliales en microscopio especular. Imagen obtenida en SRIDHAR. 2018. Anatomy of cornea and ocular Surface. Indian J Ophthalmol, 66:190-4.

Las células endoteliales alcanzan un grosor aproximado de  $4\mu$  en la edad adulta. Debido a su forma, las células adyacentes comparten una extensa zona que posee interdigitaciones y uniones estrechas a lo largo de las mismas (SRIDHAR, 2018).

En los bordes laterales, estas células contienen una alta densidad de bombas  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$  ATPasa que, junto a la vía intracelular de la anhidrasa carbónica, conforman el sistema de iones más importante de la córnea (SRIDHAR, 2018).

Estas bombas mantienen el flujo de agua hacia el interior del globo ocular, el lado del humor acuoso, contra un gradiente de presión y regula el movimiento de los metabolitos. En el caso de que no funcionen correctamente, el estroma corneal se engrosa debido a la hidratación de los mucopolisacáridos (LEUENBERGER, 1978).

La superficie basal del endotelio contiene numerosos hemidesmosomas que promueven la adhesión a la membrana de Descemet (SRIDHAR, 2018).

La densidad y las características de las células endoteliales cambian a lo largo de la vida. En la especie humana, entre la segunda y octava década la densidad celular disminuye desde 3500 células/ $\text{mm}^2$  a alrededor de 2600 células/ $\text{mm}^2$ , las células hexagonales disminuyen su tamaño entre un 75-60% (SRIDHAR, 2018).

En la zona central de la córnea normal, la densidad de las células endoteliales disminuye un promedio aproximado de un 0.6% por año, induciendo un aumento gradual del polimegatismo y pleomorfismo (BOURNE, 1997).

Existen tres métodos disponibles para el estudio clínico de esta capa: el primero es la medida del grosor corneal, ya que la difusión endotelial produce una inflamación de la córnea. Además, podemos evaluarla por la determinación de la permeabilidad

endotelial a la fluoresceína. Por último, el endotelio puede fotografiarse, mediante microscopía especular para realizar análisis morfométricos de la densidad y el tamaño celular (MISHIMA, 1982).

Se ha demostrado que el endotelio corneal humano muestra muy poca actividad proliferativa, y que un área dañada del mismo es cubierta por la migración de células de áreas circundantes. Asimismo, se ha demostrado que el endotelio dañado pierde células a un ritmo mayor que el normal de envejecimiento. Por otro lado, debe considerarse que la disfunción endotelial puede desarrollarse mucho años después de la lesión inicial (MISHIMA, 1982).

#### **2.2.4.1. Biomecánica**

Existen estudios realizados en ojos de animales, con resultados contradictorios: YOO (2011) determinó que, en ojos bovinos el endotelio, incluida la membrana de Descemet poseía la elasticidad más alta de la córnea; por el contrario, THOMASY (2014), en ojos de conejo, determinó que la elasticidad del endotelio era menor que la del estroma. De lo anterior se deriva la necesidad de considerar la existencia de diferencias anatómicas, en las diferentes especies, así como la fortaleza y limitaciones de cada uno de los métodos de estudio utilizados, para poder interpretar correctamente los datos (MA, 2018).

### **2.3. FUNCIÓN**

La córnea tiene dos funciones principales: la primera es la de servir de barrera contra agentes externos, como virus o bacterias, que podían alterar su estructura y características; la segunda es su función óptica o de refracción de la luz en el interior del globo ocular (LEUEMBERGER, 1978). De hecho, la córnea es la superficie refractiva de mayor potencia óptica del ojo: aproximadamente abarca el 70% de la refracción total, con un poder refractivo de 40-44D y un índice refractivo de 1.376 (FARES, 2012).

El epitelio corneal juega un papel activo en la determinación del poder refractivo de la córnea, siendo de 1.03D su media en la zona central, este valor no se mantiene en toda la circunferencia, SIMON (1993) refiere que el epitelio no presenta un grosor homogéneo sobre la capa de Bowman, y sugiere que es el propio epitelio el que intenta minimizar estos cambios en la superficie. Los autores recomiendan que esto se tenga en cuenta en cirugías refractivas, para predecir sus resultados.

El rendimiento óptico de la córnea se rige por las leyes de la refracción, específicamente la ley de Snell, esta ley dicta que cuando la luz incide en una superficie curva, el ángulo de la refracción es proporcional a la diferencia en los índices de refracción (WINKLER, 2015).

$$\text{Ley de Snell} \quad \frac{n_1}{n_2} = \frac{\text{sen } \theta_2}{\text{sen } \theta_1}$$

La capacidad refractiva de la córnea ocurre gracias a su transparencia y a su curvatura, pero, sobre todo gracias a la organización del colágeno en su estroma.

La transparencia corneal es una capacidad especializada que se mantiene gracias a la presencia de diferentes factores: ausencia de vasos sanguíneos, densidad celular relativamente baja, ausencia de pigmentos, distribución característica de las fibras de colágeno y ausencia de queratinización, entre otros (MAGGS, 2009).

No todos los vertebrados poseen la misma capacidad refractiva corneal: en un estudio en el que comparaba la córnea de distintos tipos de animales, WINKLER (2015) encontró que los vertebrados no mamíferos comparten una organización estructural ortogonal del colágeno similar, con una mayor ramificación lamelar en las especies de vertebrados superiores.

## 2.4. ESTÁTICA Y DINÁMICA DE LA CÓRNEA

A pesar de que la córnea aparenta ser una estructura relativamente estática, NISHIDA (2008) en una amplia revisión acerca de los mecanismos estáticos y dinámicos de la misma, puso de manifiesto los mecanismos responsables del mantenimiento de la homeostasis corneal, así como el desarrollo de nuevos modelos de tratamientos para diversas enfermedades corneales. Este autor discute las relaciones que establece la córnea con los tejidos oculares adyacentes, con la película lagrimal, que la recubre y que actúa tanto como lubricante como conductor de moléculas reguladoras, y con el humor acuoso internamente que le aporta oxígeno y varios nutrientes.

De la misma manera, las células que conforman las diferentes capas de la córnea también interactúan entre ellas: esto, junto a las relaciones con células infiltradas y la

---

regulación nerviosa, contribuyen al mantenimiento de la estructura y las funciones normales de la córnea, así como a la reparación de las lesiones corneales.

Para este autor, el aspecto dinámico de la córnea engloba las interacciones de las células y las fibras de colágeno, que pueden ser célula-célula y célula-matriz extracelular en un sistema de redes dinámicas; asimismo están incluidas las citoquinas y los factores neuronales que contribuyen al mantenimiento de la transparencia y la forma de la córnea.

## **2.5. CICATRIZACIÓN CORNEAL**

La cicatrización de la córnea se puede definir como un proceso continuo que tiene varias fases, en las que están involucradas no solo las capas de la misma, sino los nervios corneales, las células inflamatorias y las glándulas lagrimales.

Las capas de la córnea interactúan por la modulación autocrina y paracrina, mediada por citoquinas, factores de crecimiento y enzimas proteolíticas.

Múltiples factores influyen en la curación corneal, como el tamaño y profundidad de la herida, el agente causal, la edad, medicación o enfermedades preexistentes entre otros (SIMION, 2011).

A continuación, se detallan los mecanismos que ocurren en cada una de las capas de la córnea durante el proceso de cicatrización normal.

### **2.5.1. EPITELIO CORNEAL**

El epitelio de la córnea es una capa esencial para la transparencia corneal. Se ha demostrado que se encuentra en un estado de renovación constante a lo largo de la vida, dependiendo de la población de las células madre limbocorneales: la localización de estas células parece estar en las capas basales del epitelio limbocorneal, y son de vital importancia para mantener el microambiente de estas células madre, que dependen de varios factores intrínsecos y extrínsecos (FERNÁNDEZ, 2008)

SHAPIRO (1981) determinó cinco etapas en la transformación del epitelio tras un daño en esta capa corneal. Inmediatamente después de la curación, el epitelio se compone de una o dos capas de células escamosas, sin células caliciformes aparentes. En una segunda etapa, lo que ocurre en las siguientes semanas, las células caliciformes aparecen

en el borde limbal de la córnea. En la tercera etapa, las células alcanzan una distribución uniforme, posteriormente en la cuarta etapa, retroceden hacia el limbo y ya en la quinta etapa aparece un epitelio de apariencia morfológica normal.

Esta transformación en el epitelio se alarga 4-5 semanas durante el cierre del defecto corneal. Además, los autores determinan que existe un movimiento continuo de células centrípetas incluso después de que se logra el cierre definitivo del defecto y que las células caliciformes no migran inicialmente como células reconocibles (SHAPIRO, 1981).

En documentos más actuales, el proceso de reepitelización se define de la siguiente manera: el proceso comienza con un deslizamiento de las células epiteliales que rodean los bordes del defecto; estas células, se encuentran entre la porción superficial y las células basales. A continuación, ocurre una mitosis celular que repondrá el epitelio poliestratificado. En una última fase, se restablecen las uniones a la membrana basal por medio de los hemidesmosomas. Inicialmente, la capa epitelial es más delgada y tras la mitosis celular se recupera paulatinamente el grosor normal. La reepitelización completa de la córnea se produce en dos semanas aproximadamente (WHITLEY, 1998; CENEDELLA, 1990).

SUZUKI (2000), en un estudio sobre la remodelación corneal en el ojo de la rata, señaló que el restablecimiento de la membrana basal es determinante para la completa reforma de la misma, ya que en zonas donde esta membrana no está reestablecida, no encontró desmosomas ni uniones intercelulares estables.

### **2.5.2. ESTROMA CORNEAL**

El estroma en los casos de heridas no complicadas se repara mediante cicatrización avascular, en la cual los queratocitos estromales sintetizan colágeno, glucosaminoglicanos y mucoproteínas y se transforman en miofibroblastos hiper celulares. Estos miofibroblastos pueden convertirse en fibroblastos, lo que proporcionarían transparencia continua, o, por el contrario, convertirse en miofibroblastos maduros produciendo una matriz extracelular desorganizada, lo que se traduciría en opacidad corneal (MAGGS, 2009).

Los responsables de que la matriz extracelular esté bien organizada, y que por lo tanto exista cierta transparencia durante la reparación, son los factores de crecimiento IGF-I/II, por su parte el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- $\beta$ ) estimularía la formación de miofibroblastos lo que se traduciría en cicatriz corneal.

HASSELL (1983) señaló que los proteoglicanos del estroma corneal pueden desempeñar un papel fundamental en la regulación del espacio de fibrillas de colágeno corneal y, por lo tanto, en el tipo de cicatriz que queda tras el proceso de cicatrización. Encontró que, en cicatrices opacas los espacios interfibrilares eran grandes y contenían condroitín sulfato de cadenas grandes, además de cadenas laterales de glucosaminoglicano de tamaño normal. Estas cicatrices opacas carecían de queratán sulfato, pero tenían ácido hialurónico. Por el contrario, en procesos de cicatrización con transparencia cercana a la normalidad, para los que había transcurrido alrededor de un año, observó que la restauración del espaciamiento interfibrilar volvía a ser normal, así como el retorno de los proteoglicanos en tamaño y composición normal.

CINTRON (1982) estudió, con microscopio electrónico, el proceso de cicatrización en la córnea del conejo y concluyó que, durante la formación de la cicatriz las fibrillas de colágeno se depositan paralelas a la superficie plana de los fibroblastos cuya orientación, a su vez, está determinada por la organización del epitelio recién formado. Una posterior reorganización de esta matriz de colágeno la acercaría a una apariencia lamelar normal; aunque la regeneración de la matriz podría fracasar incluso hasta dos años después de su inicio.

Estudios del proceso de remodelación estromal han determinado que en las capas más superficiales (capa de Bowman y estroma adyacente) se produce una transición abrupta entre el tejido conectivo nuevo y el viejo, mientras que, en las capas más profundas aparece una interdigitación entre ellos. (DAVISON, 1986).

### **2.5.3. MEMBRANA DE DESCOMET Y ENDOTELIO**

Estas dos capas corneales son las que tienen menor capacidad de regeneración en caso de verse dañadas. La membrana de Descemet se retrae cuando se ve lesionada gracias a su elasticidad, dejando expuesto el estroma posterior subyacente; las células endoteliales vecinas se extienden para cubrir el defecto (MAGGS, 2009).

La capacidad regenerativa del endotelio varía según la especie y edad del animal, pero suele ser mínima en animales adultos de las especies domésticas. Como se ha comentado anteriormente, el conejo es un ejemplo de especie en la que se presenta la capacidad regenerativa en esta capa que incluye la división celular en el margen de la herida (HORN, 1977).

YEE (1985) estudió la recuperación endotelial después de haber realizado una congelación transcorneal, y la definió como un proceso en tres etapas. En la primera, se produce una reparación inicial de la herida con la aparición de células pleomórficas en forma de huso y escasa densidad, que forman una barrera funcional incompleta. En la segunda etapa, las células asumen una configuración aplanada con aspecto de polígonos irregulares y con una capacidad de bombeo casi normal. En la tercera etapa, la remodelación celular continúa a pesar de la recuperación fisiológica temprana.

A pesar de esto, en lesiones extensas, el endotelio no es capaz de cubrir el defecto, lo que puede dar lugar a la aparición de edema y tumefacción estromal (MAGGS, 2009).

## **2.6. REACCIONES CORNEALES ANÓMALAS**

Debido a su avascularidad y a su construcción compacta, las reacciones corneales patológicas varían mucho en cuanto a su cronología de inicio y curación; en ocasiones, son intratables. Algunos cambios que serían leves o pasarían desapercibidos en otros tejidos, como el edema o la formación de cicatrices, en la córnea puede alterar la transparencia, por lo que tienen una mayor repercusión funcional (MAGGS, 2009).

Entre las reacciones que se pueden encontrar destacan el edema, la vascularización, la fibrosis, la melanosis, la infiltración de leucocitos y la acumulación de sustancias anómalas.

### **2.6.1. EDEMA**

El edema corneal se produce cuando existe una disfunción del endotelio, del estroma o del epitelio que permite la entrada de agua desde el exterior o del interior del globo ocular a la córnea, acumulándose un exceso de fluidos en el estroma, que separan las lamelas de colágeno, dando lugar a la pérdida de la transparencia corneal (MAGGS, 2009).

Independientemente de su etiología, el edema se presenta como una opacidad de color azul nebuloso; puede ser localizado o difuso; y recuperable si la etiología es revertida y si todavía existe una correcta función de las células endoteliales (MAGGS, 2009).

A menudo, el endotelio corneal muestra cambios degenerativos que pueden conducir a una descompensación de la función de la córnea y a que ésta se edematice (BLODI, 1980).

El edema corneal se puede encontrar en enfermedades oculares como el glaucoma, donde el edema se debe a la perturbación de la función endotelial, causada por la PIO elevada, con alteración de la nutrición de la córnea (IMRE, 1981).

Por otro lado, después de una herida, el módulo elástico del estroma anterior se altera dramáticamente y se correlaciona inicialmente con el desarrollo de edema e inflamación con la formación de turbidez del estroma y posteriormente con la invasión del espacio de la herida con miofibroblastos (RAGHUNATHAN, 2017).

El edema también puede tener origen epitelial. Aunque no es la única causa, puede estar ocasionado por una úlcera corneal epitelial: a este respecto, MANDELL (1980) encontró edema corneal en pacientes que usaban lentes de contacto permeables al oxígeno, en ausencia de un bombeo lagrimal adecuado.

### **2.6.2. VASCULARIZACIÓN**

La córnea normal carece de vasos sanguíneos, aunque éstos pueden invadir el estroma corneal como respuesta a la presencia de diversos procesos patológicos y, especialmente, durante la cicatrización estromal. Esta vascularización puede ser superficial o profunda: la situación de estos vasos indica la profundidad de la lesión causante (MAGGS, 2009).

Con la idea de demostrar que las prostaglandinas E1 y E2 poseían capacidad angiogénica, ROCHELS (1984) enfrentó un posible papel angiogénico atribuible al edema estromal con la posibilidad de que la neovascularización corneal fuera inducida por mediadores neovasculares. La histología demostró que la neovascularización corneal siempre iba acompañada de la invasión de leucocitos polimorfonucleares: por lo tanto, estas células inflamatorias resultaron ser la principal fuente de actividad angiogénica. Así

---

mismo, determinó que los inhibidores de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa pueden inhibir esta actividad, lo que lleva a un enfoque de terapia exitosa en enfermedades corneales que inducen la neovascularización como las queratitis inmunomediadas o el ojo seco.

La neovascularización puede conducir a que la córnea se edematice y opacifique, eventos que producirían pérdida de visión. Se ha encontrado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que desempeña un papel clave en la formación, proliferación y migración de nuevos vasos, está regulado al alza en estas condiciones. Hoy en día, es posible controlar este proceso angiogénico mediante el uso de agentes anti-VEGF administrados a través de diferentes rutas (GIANNACCARE, 2020).

La vascularización corneal es atribuible a la hinchazón y al aumento de la concentración de lactato en la córnea, que son causadas por daños en el metabolismo oxidante. La invasión de leucocitos estimulados por prostaglandinas también promueve el aumento de la concentración de lactato (IMRE, 1980).

### **2.6.3. FIBROSIS**

La fibrosis corneal se desarrolla en respuesta entre otras a una lesión, a una infección, a complicaciones posquirúrgicas o a una enfermedad sistémica subyacente que interrumpen la homeostasis del tejido y conducen a un depósito irregular de la matriz extracelular en el estroma (McKAY, 2020).

Como se ha comentado con anterioridad, los responsables de que la matriz extracelular esté bien organizada durante la reparación son los factores de crecimiento IGF-I/II, mientras que el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- $\beta$ ) causaría la formación de miofibroblastos, lo que se traduciría en cicatriz corneal (HASSELL, 2010).

Las membranas basales son matrices extracelulares altamente especializadas. La evidencia creciente sugiere que, además de proporcionar soporte estructural a las células adyacentes, las membranas basales sirven como reservorios y moduladores de los factores de crecimiento que dirigen y ajustan las funciones celulares.

Diversos estudios ultraestructurales han demostrado que después de una lesión en la córnea, si la regeneración de la membrana basal epitelial (MBE) es defectuosa, se estimula el desarrollo de miofibroblastos. Esto ocurre por la penetración en el estroma a

niveles sostenidos y necesarios de diversos moduladores como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) que viene derivado del epitelio y del defecto; y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) entre otros. (WILSON, 2020).

En un modelo de fibrosis corneal humana in vitro, se ha demostrado que la acetilcolina posee efecto antifibrótico ya que afecta negativamente la transición de los fibroblastos corneales a miofibroblastos. Por lo tanto, la acetilcolina podría desempeñar un papel en la aparición de fibrosis en el estroma corneal (SLONIECKA, 2020).

En un estudio sobre el proceso de cicatrización corneal tras la realización de una técnica quirúrgica (PTK), RAGHUNATHAN (2017) observó que el mayor número de células inflamatorias aparecía a los 3 días de realizar la herida; que la matriz asociada con el espacio de la herida fue más rígida a los 7 días; y que el mayor número de miofibroblastos y el mayor grado de fibrosis correspondían a los 21 días después de la herida. Demostrando además que la remodelación dinámica del estroma ocurre entre los días 10 y 42. 400 días después del evento, todos los parámetros clínicos volvieron a los valores normales.

Uno de los factores más importantes en el proceso de remodelación corneal es la restauración de la sensibilidad: tanto la regeneración de los nervios corneales como la reinervación son esenciales para mantener la homeostasis corneal después de cualquier lesión

La fibrosis plantea un impedimento importante para la reinervación. Esta fue la razón que llevó a GOSH (2020) a realizar un estudio dirigido a la evaluación de la influencia de factores de crecimiento nervioso y la fibrosis en la regeneración y reinervación corneal, después de la cirugía de colgajo lamelar (LFS) y su modulación usando pirfenidona antifibrótico.

#### **2.6.4. MELANOSIS**

La melanosis corneal o queratitis pigmentaria es un signo de irritación corneal crónica. El pigmento se origina a partir de la proliferación y migración de los melanocitos limbales normales durante la inflamación corneal y se deposita en el epitelio corneal y, en ocasiones, en el estroma anterior, (MAGGS, 2009).

En humanos, se encuentran informes de melanosis corneal asociada a tumores como el melanoma, que incluso puede ser primario (PANAGIOTOU, 2020); al uso de drogas psicotrópicas (KAUR, 2020); a la presentación atípica del síndrome de dispersión pigmentaria (ANGMO, 2018) e incluso a la existencia de infecciones fúngicas (YANGZES, 2019; CHAIDAROON, 2019).

En animales, esta reacción corneal puede estar asociada a casos de cicatrización corneal tras complicaciones postquirúrgicas (COSTA, 2019) aunque, sobre todo, a problemas asociados con la superficie ocular: los relacionados con el déficit cuantitativo de la película lagrimal (LEONARD, 2019), así como los derivados de la posición y función palpebral (MAINI, 2019).

A priori, a menos que progrese con rapidez o afecte a la visión, la melanosis no suele precisar tratamiento: aun así, la causa subyacente debe tratarse siempre que sea posible (MAGGS, 2009).

#### **2.6.5. INFILTRACIÓN DE LEUCOCITOS**

La infiltración de leucocitos en el estroma corneal puede estar asociada a la presencia de un cuerpo extraño, puede ocurrir como respuesta a una infección, e incluso puede ser aséptica. En muchas ocasiones este acúmulo celular puede ser relativamente rápido y es crucial determinar la causa inicial (MAGGS, 2009).

Las infecciones corneales son enfermedades frecuentes y potencialmente fatales para la visión. La importancia de la respuesta inmunológica ha sido demostrada en modelos animales en casos de queratitis microbiana, aunque aún no está claro su potencial importancia en humanos (SANTACRUZ, 2015).

Se cree que el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) está involucrada en los trastornos corneales y regula la cicatrización de las heridas corneales. La uPA es una proteasa sintetizada por varias células, como las células epiteliales corneales y fibroblastos corneales, las células endoteliales vasculares, las células musculares lisas, los monocitos, los macrófagos y las células tumorales malignas de diferentes orígenes.

SUGIOKA (2016) revisa el papel de la uPA en la cicatrización de heridas en el estroma corneal. La uPA se expresa con la presencia de leucocitos y fibroblastos en las

---

córneas de pacientes con ulceraciones corneales, lo que sugiere que es un regulador clave de la cicatrización de la herida del estroma corneal. La uPA está directamente involucrada en la degradación del colágeno mediada por plasmina inducida por IL-1. Además, la uPA participa de manera crítica en la promoción de la infiltración de leucocitos en la inflamación corneal mediante la activación de MMP-9. Esta activación está presumiblemente mediada, directa e indirectamente, por la cascada de plasminógeno-plasmina. Además, la uPA media en la liberación de citoquinas inflamatorias de los fibroblastos de la córnea para promover la infiltración de leucocitos.

Se ha demostrado que, a menudo, la inflamación crónica causa el desarrollo de hipoxia: como es el caso de la queratitis estromal del herpes (HSK), afección inflamatoria crónica corneal que se desarrolla en respuesta al HSV-1 recurrente: RAO, 2019 correlacionó la magnitud de la hipoxia con el grado de infiltración de neutrófilos en córneas infectadas, concluyendo que el agotamiento de los neutrófilos reducía el desarrollo de hipoxia en ellas.

Cuando la invasión de leucocitos en el estroma produce colagenolisis se denomina melting o lisis corneal. Esta afección oftalmológica, en la que se pierde el epitelio corneal, viene acompañada del adelgazamiento del estroma, puede provocar perforación corneal y causar pérdida de visión (RIGAS, 2020).

El melting es debido a la liberación de colagenasas de los leucocitos invasores, en especial los neutrófilos, que se encuentran en las células del estroma corneal, las células epiteliales o los queratocitos corneales (MAGGS, 2009).

No solo las bacterias vivas, sino también sus componentes, como el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas, contribuyen al desarrollo de la inflamación y al daño corneal posterior en la queratitis infecciosa (FUKUDA, 2017).

Esta alteración corneal es el efecto secundario más grave de los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tópicos, uno de los tratamientos tópicos para la inflamación ocular. La fusión corneal inducida por AINE (NICM), inicialmente puesta en duda, es real (RIGAS, 2020).

Múltiples estudios tienen como objetivo encontrar un tratamiento efectivo para este tipo de reacción corneal anómala, entre ellas el uso de lentes de contacto especiales

(LÓPEZ, 2019), trasplante de células madre (NAVAS, 2018) y trasplantes de membrana amniótica (COSTA, 2019) entre otros.

#### 2.6.6. ACUMULACIÓN DE SUSTANCIAS ANÓMALAS

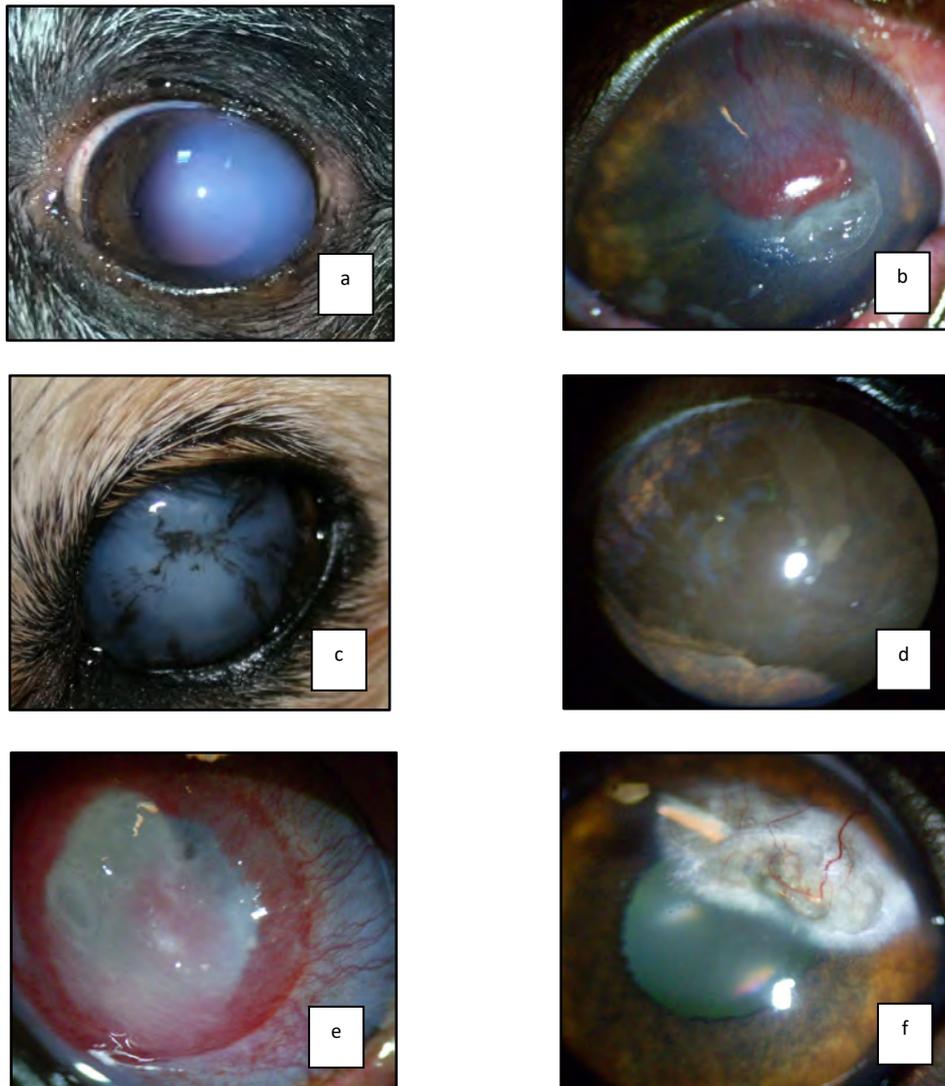
Las principales sustancias que se acumulan en la córnea son los lípidos y los minerales: estas sustancias, se presentan como áreas brillantes, blanquecinas o cristalinas. Las acumulaciones con frecuencia contienen colesterol y calcio en combinaciones variables.

Podemos encontrar dos tipos diferenciados de alteraciones: los depósitos y las degeneraciones.

Aunque se pueden ver afectadas todas las capas de la córnea, en los animales, los depósitos de lípidos y minerales suelen ser subepiteliales, típicamente bilaterales e indoloros; mientras que **la degeneración lipídica**, trastorno inflamatorio adquirido típico de perros y caballos, suele ser unilateral y puede presentarse acompañado de edema, vascularización, fibrosis y melanosis corneal (MAGGS, 2009). Esto no siempre ocurre así, MOORE (2019) informó un caso de una distrofia lipídica en una rana arbórea de ojos dorados (*Trachycephalus resinifictrix*), que presentaba hemorragia intraestromal concurrente. En general, la evidencia sugiere que la causa de la queratopatía lipídica es probablemente multifactorial.

En humanos, esta acumulación de sustancias está relacionada con **la hipercolesterolemia familiar**, que es la enfermedad hereditaria autosómica dominante más común causada por un catabolismo defectuoso de partículas de LDL. Entre sus signos clínicos oculares encontramos los xantomas o arco corneal lipóide (SATNÝ, 2020). En animales también está descrito que el depósito de lípidos en la córnea se puede deber a la presencia de concentraciones elevadas de lípidos plasmáticos (MAGGS, 2009).

Otra enfermedad por depósito de sustancias anómalas descrita en humanos es **la distrofia corneal de Schnyder (SCD)**, que es una rara enfermedad genética de los ojos caracterizada por la opacificación corneal resultante del depósito del exceso de colesterol libre (JIANG, 2019).



Reacciones corneales anómalas: (a): edema. (b): vascularización, (c): fibrosis, (d): melanosis, (e): infiltración de leucocitos, (f): acúmulo de sustancias anómalas.

## 2.7. ALTERACIONES QUE AFECTAN A LA BIOMECÁNICA DE LA CÓRNEA

Un elevado número de alteraciones pueden afectar a la biomecánica de la córnea, pueden ser derivadas de enfermedades corneales propias, de enfermedades sistémicas, de alteraciones hormonales e incluso pueden relacionadas con la corrección de la refracción corneal (MA, 2018).

### 2.7.1. ENFERMEDADES CORNEALES PROPIAS

El trastorno corneal más común asociado con las alteraciones en la biomecánica es **el queratocono**, que se caracteriza por la presencia adelgazamiento del estroma corneal y roturas en la capa de Bowman (RABINOWITZ, 1998). Se ha descrito que la elasticidad de las fibras de colágeno disminuye hasta un 36% en pacientes con queratocono (ANDREASSEN, 1980).

Otro trastorno que implica adelgazamiento progresivo del estroma es **la degeneración marginal pelúcida** (KRACHMER, 1984; RODRIGUEZ, 1981), que se caracteriza por un adelgazamiento del estroma periférico inferior, acompañado de interrupción de la capa de Bowman y cicatrización del estroma (RODRIGUEZ, 1981).

### 2.7.2. ENFERMEDADES SISTÉMICAS

Varias enfermedades sistémicas alteran las propiedades biomecánicas de la córnea, **la diabetes** en una de ellas. Varios autores han estudiados los efectos de esta enfermedad metabólica crónica en la córnea, que pueden incluir el engrosamiento de la membrana basal epitelial (AZAR, 1989; FRIEND, 1982; TAYLOR, 1981); así como cambios morfológicos y alteraciones en la función del epitelio y endotelio. (HOSOTANI, 1995; SHULTZ, 1984; BAO, 2017; GEKKA, 2004).

Enfermedades que afectan a la síntesis de colágeno, como **el síndrome hereditario Ehlers-Danlos** (BOWEN, 2017) y **la osteogénesis imperfecta** (KANG, 2017), pueden desencadenar una ectasia corneal debido a que producen una red de colágeno inestable.

Pacientes con **trisomía 21** o con **amaurosis congénita de Leber** son susceptibles a sufrir queratocono, aunque en estos casos, el origen de la degradación corneal sigue sin estar claro (KENNEY, 2003).

Además, habría que añadir **el síndrome de Morquio**, que se caracteriza por la presencia de opacidad progresiva de la córnea secundaria a la alteración lamelar producida por un almacenamiento excesivo de glicosaminoglicanos (MATALON, 1974).

### 2.7.3. ALTERACIONES HORMONALES

Las fluctuaciones hormonales pueden alterar la biomecánica corneal. Diversos estudios han demostrado que el aumento de los niveles de **estrógenos** disminuye la rigidez corneal (O'DOHERTY, 2006; SPOERL, 2007).

Otra hormona que modula las propiedades de la biomecánica corneal es la **hidrocortisona** (SPOERL, 2009). El cortisol puede estimular la producción o activación de enzimas colagenolíticas (HILLEGASS, 2008), que aceleran la degradación de la matriz debilitando la red de colágeno (CURY, 2007). El nivel de cortisol puede desempeñar un papel a considerar en el desarrollo de la queratectasia en el queratocono o después de la cirugía refractiva. Además, los esteroides y la **insulina** aumentan la actividad ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en las células del endotelio corneal, lo que contribuye a la estabilidad de la rigidez corneal (HATOU, 2011).

Se ha señalado que las **hormonas tiroideas** podrían afectar al mecanismo del transporte endotelial modificando la longitud del espacio extracelular total, afectando así a la rigidez corneal (MASTERSON, 1977).

### 2.7.4. CORRECCIÓN DE LA REFRACCIÓN CORNEAL

La corrección del error refractivo se puede lograr por diferentes métodos. Su objetivo es remodelar la curvatura corneal con el uso de lentes de contacto o con procedimientos quirúrgicos que extraen parte del tejido corneal, situaciones que pueden provocar modificaciones en las propiedades biomecánicas de la córnea (MA, 2018).

**Las lentes de contacto** producen disminución de la oxigenación de la córnea lo que puede provocar un aumento en el grosor corneal, o la aparición de edema (GARCÍA-PORTA, 2014). Su uso está asociado con aumento en la capacidad de absorber y disipar energía de la córnea (CANKAYA, 2012, LAU, 2011; LU, 2007).

**La ortoqueratología** es una técnica que induce un cambio en la forma de la córnea por presión. Su efecto es temporal y se basa en las propiedades viscoelásticas del tejido corneal: lo que se consigue es aplanar la córnea significativamente, cambiando el perfil de su grosor (ALHARBI, 2003; VILLA-COLLAR, 2009), por lo que desencadena cambios en la córnea, como el adelgazamiento del epitelio central, el engrosamiento del epitelio periférico y cambios en el estroma (SWARBRICK, 1998). Además, la presión

---

podría inducir la existencia de un gradiente osmótico que elimine líquido del epitelio central (BINDER, 1980). Son necesarios más estudios del uso de esta técnica para evaluar los posibles cambios en las propiedades de la biomecánica corneal (MA, 2018)

**La cirugía refractiva** puede tener implicaciones en las propiedades biomecánicas de la córnea. Su efecto se ha correlacionado con la profundidad de la ablación (ORTIZ, 2007) y con el grosor del flap realizado (AMBROSIO, 2011).

Por último, cabría citar **el Crosslinking (CXL)**. Este es un procedimiento utilizado para aumentar la resistencia biomecánica corneal que induce la formación de nuevos enlaces moleculares entre las fibrillas y las láminas de colágeno, usando la riboflavina y la luz UV-A (RAISKUP-WOLF, 2008; SPOREL, 1998; WOLLWNSAK, 2003). Estudios experimentales han demostrado que la rigidez corneal aumenta significativamente después de la realización de esta técnica (TOBOUL, 2014; ALDAHLAWI, 2016).

## 2.8. ÚLCERAS CORNEALES

La úlcera corneal se define como la ruptura del epitelio corneal provocando la exposición del estroma. Está encuadrada dentro de las enfermedades corneales adquiridas.

Podemos clasificar las úlceras corneales atendiendo a su etiología, profundidad, y localización, así como a la presencia o no de infección en ellas. (MAGGS, 2009; LIU, 2019).

### 2.8.1. ETIOLOGÍA

Se han encontrado múltiples causas que desencadenan las úlceras corneales.

En humanos, la enfermedad que afecta más frecuentemente a la córnea es **la diabetes**. Esta afección desencadena **la queratopatía diabética** con producción de erosión corneal persistente, queratopatía punctata superficial, retraso en la regeneración epitelial y disminución en la sensibilidad de la córnea; todo esto puede comprometer la agudeza visual de los pacientes que la padecen (PRIYADARSINI, 2020).

Enfermedades degenerativas como **la queratitis neurotrófica**, en las que se produce disminución o ausencia de la sensibilidad corneal, cursan en su mayoría con úlceras corneales (TIAN, 2020).

Gran parte de la protección de la córnea depende de la película lagrimal. El fallo, o déficit de la misma, puede desencadenar la aparición de úlceras corneales. Hay dos tipos principales de alteraciones de la función lagrimal: los relacionados con la incapacidad del sistema de drenaje al existir una obstrucción o una agenesia, o por el aumento en la producción de lágrimas; y los relacionados con una producción insuficiente de uno o varios componentes de la película lagrimal, entre los que podemos encontrar una alteración cuantitativa, donde el componente que falla es el acuoso, o una alteración cualitativa, en la que están alterados los componentes de la capa lipídica o la mucoide.

Tanto las alteraciones cuantitativas como las cualitativas pueden comprometer la función de la película lagrimal, produciendo efectos graves en la salud ocular, como son la hipoxia del epitelio corneal y del estroma, la falta de lubricación e irritación de la superficie ocular, aumento de la cantidad de microorganismos y moco sobre la superficie ocular, erosiones o úlcera corneales, entre otros (MILLER, 2009).

El estado y la posición de los párpados juegan un papel importante en la salud de la superficie corneal. Tanto en humanos como en animales están descritas múltiples alteraciones palpebrales de los mismos que desencadenan la aparición de úlceras corneales: como ejemplo, se encuentran problemas dermatológicos (VOLLMER, 2019), el entropión, el ectropión (KRECNY, 2015; DE LINDE HENRIKSEN, 2013), y los cilios ectópicos (KRECNY, 2015), entre otras.

Los traumatismos oculares y las úlceras corneales son responsables de 1.5 a 2 millones de nuevos casos de ceguera monocular cada año (WITCHER, 2001). Entre el 11.5% y el 22.1% de los traumatismos oculares son causados por quemaduras químicas (CLARE, 2012): la mayoría de estos casos ocurren en hombres jóvenes por la exposición a productos alcalinos o ácidos en accidentes laborales.

Las características propias de cada individuo, así como el entorno en el que se encuentra pueden influir en el riesgo de padecer problemas en la superficie ocular; en este caso, úlceras corneales. Este es el caso de los mamíferos marinos, en los que se ha

demostrado que la exposición excesiva a la luz del sol y la falta de sombra son factores de riesgo significativos para padecer este tipo de queratopatía (COLITZ, 2019).

### **2.8.2. DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de las úlceras corneales depende de los signos clínicos y del examen oftalmológico.

Los signos clínicos más comunes son irritación aparente, edema y/o hiperemia conjuntival, opacidad corneal, exfoliación o necrosis corneal y visión borrosa, entre otros (LIU, 2019).

El examen oftalmológico puede incluir la lámpara de hendidura, el raspado corneal y el microscopio confocal. (LIU, 2019).

El uso de colorantes vitales es una herramienta fundamental para la identificación de úlceras corneales: el más utilizado es la **fluoresceína**. Este colorante es hidrosoluble y es retenido por todas las estructuras hidrofílicas, pero no por las hidrofóbicas, por lo que teñirá el estroma hidrofílico que queda expuesto tras la pérdida del epitelio hidrofóbico.

Cada tipo de úlcera presenta un patrón de tinción diferente y característico, su conocimiento contribuye mucho a diferenciar los tipos de úlceras.

Para una mejor visualización de este colorante durante la exploración, está recomendado el uso de un filtro de luz azul cobalto, además de una fuente de magnificación como la lámpara de hendidura. De esta manera, se puede diferenciar correctamente el tipo de tinción y si se trata realmente de una úlcera o, por el contrario, de una fijación leve en tejidos como el fibrovascular, presente en casos de vascularización corneal o en defectos estromales epitelizados; (MAGGS, 2009)

### **2.8.3. CLASIFICACIÓN**

Una manera útil de clasificar las úlceras corneales es en úlceras simples o complicadas.

Una úlcera simple debe cumplir las siguientes condiciones: ser superficial, es decir, afectar solo al epitelio corneal; ser de carácter agudo y curar en un plazo de 7 días.

Por el contrario, las úlceras clasificadas como complicadas aquellas que afectan a capas más profundas (el estroma está comprometido) y/o que no han cicatrizado tras 7 días tras el diagnóstico y el tratamiento inicial (MAGGS, 2009).

Existen tres grandes bloques de posibles causas que no permiten la curación de una úlcera:

1.- La causa subyacente no ha sido diagnosticada o tratada y sigue presente. La indicación es reexaminar el ojo para buscar posibles cuerpos extraños y/o para descartar problemas palpebrales como el lagofthalmos, el entropión, el ectropión; problemas relacionados con la película lagrimal como la queratoconjuntivitis seca o el déficit cualitativo de la lágrima; y la presencia de distiquiasis, triquiasis, cilios ectópicos, además de descartar la existencia de parálisis faciales totales o parciales (MAGGS, 2009).

2.- La úlcera se ha contaminado por bacterias u hongos. Estas úlceras no son exclusivamente superficiales: en estos casos, el estroma está implicado, su apariencia es gelatinosa y adquiere un tono amarillo verdoso debido a la infiltración neutrofílica. El diagnóstico y el tratamiento deben realizarse utilizando la citología y el cultivo de la superficie corneal (MAGGS, 2009).

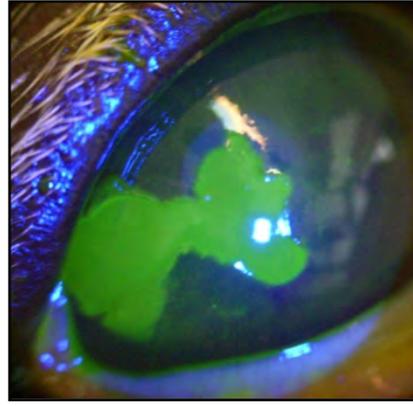
En humanos, el factor de riesgo más común para las úlceras infectadas difiere en función de la localización y el estilo de vida del paciente. Encontramos estudios realizados en el sur de Texas (EEUU), en los que el agente etiológico más frecuente son las bacterias coagulasa negativo como el *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, y como factor de riesgo más común el uso de lentes de contacto (PUIG, 2020); mientras que, en países en vías de desarrollo, aunque los agentes infecciosos coinciden, la causa mayoritaria corresponde a los traumatismos oculares (ALMAHMOUD, 2019).

3.- La úlcera se ha convertido en indolente. Estas úlceras se pueden definir como úlceras superficiales no infectadas, con una porción del epitelio corneal no adherido. Responden al tratamiento con desbridamiento del mismo y/o del estroma subyacente. Este síndrome, así como su tratamiento, está muy bien descrito en perros, pero no en gatos (MAGGS, 2009).

Las úlceras corneales indolentes en humanos se describen como defectos epiteliales corneales persistentes (PEDs o PCEDs), que son el resultado del fallo en la reepitelización tras 10-14 de una lesión corneal. Es un trastorno bastante frecuente, que

---

causa dolor. Sus signos clínicos más comunes son el lagrimeo, la fotofobia y la discapacidad visual. Varios factores como los traumatismos, la cirugía ocular, la distrofia corneal, el uso de lentes de contacto y la diabetes mellitus, pueden ser incluidas entre sus causas (NANBA, 2019). Suelen ser tratadas con lentes de contacto protectoras y lágrimas artificiales (VAIDYANATHAN, 2019).



**Ejemplos de úlceras corneales superficiales en pacientes caninos**



**Ejemplos de úlceras corneales profundas en pacientes caninos**

#### **2.8.4. TRATAMIENTO**

El propósito del tratamiento de las úlceras corneales es eliminar la causa subyacente y restaurar la superficie corneal. Las terapias convencionales para la enfermedad son la farmacoterapia y el tratamiento sintomático, sin embargo, si la condición del paciente es crítica se deben barajar tratamientos quirúrgicos para resolver la situación (LIU, 2019).

#### 2.8.4.1. Tratamiento médico

El tratamiento médico representa el primer enfoque terapéutico y es un paso decisivo en el manejo posterior de un paciente con ulceración corneal (STAMATE, 2019).

Se puede generalizar que el tratamiento médico de las úlceras corneales consiste en la aplicación de antibióticos y midriáticos tópicos. En determinadas circunstancias, algunos pacientes podrían beneficiarse del uso de otros fármacos, como los antiinflamatorios y los analgésicos (MAGGS, 2009).

1.- **Antibióticos:** la aplicación tópica de este grupo de fármacos está indicada en todos los tipos de úlceras corneales, ya que, aunque no se piense en la infección como la causa primaria de la úlcera, puede verse afectado secundariamente el estroma y complicarse (MAGGS, 2009).

El diagnóstico adecuado del microorganismo causal es fundamental. El cultivo sigue siendo la herramienta de diagnóstico predominante, aunque nuevas técnicas como la microscopía confocal in vivo entre otras ayudarían a realizar un diagnóstico temprano y preciso, incluso para microorganismos que son difíciles de cultivar por métodos convencionales (AUSTIN, 2017).

2.- **Midriáticos:** la razón por la que se indica el uso de midriáticos en las úlceras corneales es la de contrarrestar el cuadro de uveítis anterior refleja secundaria a la estimulación de los nervios corneales, que empeoran el dolor asociado a la misma. Los más usados de manera tópica son la Atropina y la Tropicamida (MAGGS, 2009).

3.- **Otros.** Los **corticoides tópicos** están completamente contraindicados en los casos de úlceras corneales ya que predisponen a la infección, retrasan la cicatrización corneal y potencian la lisis (MAGGS, 2009). El uso de los **AINEs** es más controvertido: aunque mayoritariamente no está desaconsejado, estudios recientes relacionan estos fármacos con la presentación de lisis corneal, como efecto secundario más grave tras su uso (RIGAS, 2020).

La **vitamina A tópica** estimula la producción de los componentes de la matriz celular, como el colágeno tipo I y la fibronectina, incrementando la proliferación de queratinocitos y fibroblastos (POLCZ, 2019). Hay estudios que demuestran que, además disminuye el factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF-A, las metaloproteinasas

---

de la matriz MMP 9 y el factor de crecimiento transformador TGF-B, por lo que la recuperación de la cicatrización de heridas corneales mejora tras su aplicación (KIM, 2012).

Las úlceras que presentan hongos tienen peores resultados clínicos que las bacterianas. No hay nuevos tratamientos desde la década de 1960 cuando se introdujo la Natamicina (AUSTIN, 2017). El tratamiento **antifúngico** solo debe ser instaurado tras la identificación del hongo causal (GUPTA, 2018).

Las queratitis víricas se diferencian de las bacterianas y fúngicas en que, a menudo, son recurrentes. En humanos, son muy comunes en los países desarrollados (AUSTIN, 2017) así mismo, suelen afectar a los gatos y, ocasionalmente pueden presentarse en los caballos. Los fármacos **antivíricos tópicos** disponibles en la actualidad son viroestáticos. La mayoría penetra mal en la córnea, por lo que su aplicación debe ser muy frecuente. (MAGGS, 2009).

#### **2.8.4.2. Tratamiento quirúrgico**

Las úlceras corneales son una emergencia médica y, en casos complicados, que conducen a la perforación, una emergencia quirúrgica oftalmológica. La urgencia del tratamiento quirúrgico viene dictada por la necesidad de prevenir complicaciones que puedan conducir a graves morbilidades oculares. Existen múltiples estrategias quirúrgicas, pero la opción depende de la etiología y los parámetros de la ulceración: tamaño, profundidad y ubicación (STAMATE, 2019).

1.- **Injertos conjuntivales:** esta técnica consiste en la rotación de una porción de la conjuntiva bulbar sobre el defecto corneal, suturándola sobre tejido corneal sano. Existen diversas versiones dependiendo de la cantidad de conjuntiva utilizada y/o de la forma en la que se sutura sobre la córnea (injertos libres, completos, de avance, pediculado rotacional o en puente). El injerto no sólo es un soporte mecánico, sino que al estar unido a la conjuntiva del mismo paciente (salvo en el injerto libre), mantiene un aporte continuo de suero, fibroblastos, factores de crecimiento e incluso de antibióticos suministrados de manera sistémica, lo que constituye una importante ventaja a tener en cuenta (MAGGS, 2009).

2.- **Trasposición corneoconjuntival o corneoescleral:** como su propio nombre indica, consiste en trasponer o mover tejido corneal sano acompañado por el limbo y una

porción de conjuntiva o de la esclera respectivamente, sobre el defecto corneal existente. En oftalmología veterinaria, esta técnica presenta buenos resultados para el tratamiento de úlceras estromales profundas, los descemetoceloses y los defectos de espesor completo, obteniéndose un grado de transparencia satisfactorio y, de esta manera un buen mantenimiento de la visión (GOGOVA, 2020).

3.- **Trasplantes de córnea:** los trasplantes de córnea o queratoplastias pueden ser de córnea congelada o fresca, y de espesor parcial o total. Una de las versiones de esta técnica, la queratoplastia lamelar anterior profunda (DALK), está reconocida como la primera opción quirúrgica para la ectasia corneal (YU, 2020). En la actualidad, se están realizando múltiples estudios para mejorar estas técnicas con el fin de que sean cada vez sean menos invasivas (DAPENA, 2020) y de esta manera, obtener menos defectos refractivos tras su realización (FEIZI, 2020).

4.- **Biomateriales:** el papel de los biomateriales en la ingeniería de tejidos y las estrategias de medicina regenerativa, para el tratamiento de la pérdida de visión asociada con el daño a los tejidos del segmento anterior del ojo, ha constituido el objetivo de numerosos estudios en los últimos años centrados principalmente en el reemplazo y el apoyo de la córnea, así como de otras porciones del segmento anterior del ojo, como la malla trabecular (WILLIAMS, 2018). Ejemplos de estos materiales, son el trasplante de células madre, el uso de las membranas de polímeros, la mucosa oral, la membrana amniótica y la vejiga porcina, entre otros (SACCHETTI, 2018; ZHAO, 2018; RÖCK, 2018; BALLAND, 2016).

## 2.9. MEMBRANA AMNIÓTICA

La membrana amniótica es un biomaterial que es utilizado por cirujanos de diversas disciplinas como la dermatología, la cirugía plástica, la cirugía genitourinaria y la oftalmológica, entre otros, con un fin innovador: el trasplante (JIRSOVA, 2017).

La abundancia de placentas disponibles permite seleccionar el tejido sin compromiso. Las placentas se recuperan de los partos por cesárea electiva, proporcionando un medio más estéril y controlado, a la vez que se elimina el riesgo de que el tejido placentario se haya contaminado o dañado durante el proceso de parto (HILL, 2008).

### 2.9.1. ESTRUCTURA PLACENTARIA

La placenta es un órgano típico de los mamíferos derivado de los espermatozoides y los óvulos que forman el feto. En las primeras etapas del desarrollo fetal, la placenta consta de dos capas diferentes: la capa coriónica, más externa, y la capa amniótica, más interna. El corion permite la transferencia de nutrientes entre la madre y el feto mientras que la membrana amniótica es una capa de células protectoras que rodean al feto. A medida que avanza el embarazo, la producción de líquido amniótico aumenta hasta aproximadamente 1 litro, lo que hace que la cavidad amniótica se fusione con la superficie interna del corion, por lo que la apariencia es de una sola capa de tejido placentario (THIBODEAU, 2006).

### 2.9.2. ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA

Las cinco capas avasculares de la membrana amniótica que recubren la cavidad interna de la placenta constituyen tejido trasplantable. La capa externa se adhiere al corion. La capa individual más interna está formada por células epiteliales cúbicas y columnares, se encuentra situada sobre la superficie placentaria y permite el flujo de sustancias a través de los pedículos podocíticos que se extienden hacia la membrana basal. Las otras dos capas están compuestas por tejido conectivo y contienen colágeno y macrófagos (VON VERSRN-HOYNCK, 2004).



Estructura de la membrana amniótica. Imagen obtenida de MiMedx.com.

### 2.9.3. CARACTERÍSTICAS DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA

La membrana amniótica ha sido propuesta para su uso como biomaterial en oftalmología por su viabilidad biológica, ya que es un tejido con características

antiinflamatorias, antibacterianas, antivirales, con baja inmunogenicidad, antiangiogénico y proapoptótico (LIU, 2019).

La membrana amniótica basal admite la migración de células epiteliales: de esta manera, las proteínas amnióticas facilitan la adhesión celular y el crecimiento de nuevo tejido estromal (VON VERSRN-HOYNCK, 2004; TSENG, 2001; LEE, 1997), actuando como sustrato para facilitar la epitelización (TAMHANE, 2005).

La matriz amniótica es rica en ácido hialurónico, que suprime el factor de crecimiento transformante beta, así como la señalización, proliferación y diferenciación de los miofibroblastos de la córnea humana normal. Así mismo, suprime la producción de citoquinas proinflamatorias, lo que inhibe la producción de matriz extracelular y la cicatrización no deseada (DUA, 2004; MELLER, 2011).

En las capas de tejido conectivo, los macrófagos, que se encuentran en esta localización, ejercen un efecto antiinflamatorio a través de la fagocitosis de bacterias patógenas (RAMA, 2001).

Diversos estudios realizados en animales sugieren que la membrana amniótica puede promover una curación más rápida de la herida, una disminución de la opacidad corneal y una disminución de la neovascularización corneal (SHAHRIARI, 2008; GU, 2011).

#### **2.9.4. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA**

Como ya se ha comentado, las membranas amnióticas se obtienen exclusivamente de cesáreas programadas. En función de las necesidades de tejido, los obstetras y los coordinadores del banco de tejidos organizan la recogida de la placenta, incluyendo los consentimientos informados y la educación del paciente (HILL, 2008).

Antes de la admisión como donante, se deben realizar test serológicos, siguiendo la recomendación de diversos autores (VON VERSEN-HOYNCK, 2004; RAMA, 2001) y de la administración de diversos países (HILL, 2008). Se recomienda realizar los siguientes test: HIV-1, HIV-2, Hepatitis B, Hepatitis C, HTLV I, HTLV II, Citomegalovirus y Sífilis. Además, se recomienda realizar un test de ADN.

Cuando los coordinadores reciben la confirmación de que no existe impedimento para la donación, se procede a la recogida del tejido. El equipo que obtiene la membrana lo realiza de manera estéril y tras realizar una inspección macroscópica, se coloca dentro de una bolsa de recuperación de órganos estéril. Las membranas son almacenadas durante seis meses para repetir nuevamente los análisis serológicos: solo se permitirá realizar un trasplante, tras la confirmación de que continúa siendo un tejido apto (HILL, 2008).

### **2.9.5. CONSERVACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA**

Una vez se obtiene la membrana, se preparan los futuros injertos colocando papel de nitrocelulosa sobre la capa amniótica de la placenta, para darle estabilidad tras ser separada de las otras capas de la placenta. Además, este papel sirve para identificar cuál es la capa estromal de la misma. Los métodos de preservación posterior del tejido afectan a cómo se prepara el tejido inmediatamente antes de la implantación quirúrgica (HILL, 2008). Las técnicas que se utilizan actualmente son:

**1.-Congelación en seco:** se utiliza una combinación de glicerol, que tiene un efecto antiviral y solución antibiótica, pudiendo ser glicerina y penicilina, estreptomina y anfotericina con neomicina entre otros (TSENG, 1998; VON VERSEN-HOYNCK, 2004). La conservación debe realizarse a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para garantizar una flexibilidad adecuada, el tejido se debe descongelar entre 30-60 minutos antes del trasplante a temperatura ambiente; alternativamente se puede colocar la bolsa contenedora, sin abrir totalmente, en un recipiente estéril con agua tibia durante 15-30 minutos (BURMAN, 2004).

**2.-Esterilización:** es una técnica de preservación más moderna, en la que se usa ácido peracético con etanol. La ventaja de usar el ácido peracético es que es efectivo contra bacterias, virus y hongos (VON VERSEN-HOYNCK, 2004). En este caso, el tejido es sometido a aire seco bajo un flujo laminar preservando las propiedades del tejido y permitiendo el almacenamiento a temperatura ambiente (VON VERSEN-HOYNCK, 2004). La conservación en estos casos se puede realizar a temperatura ambiente, no precisa de preparación previa al trasplante (RAMA, 2001).

**3.-Criopreservación:** en este caso, la conservación se realiza en nitrógeno líquido a  $-140^{\circ}\text{C}$ . La membrana que va a ser trasplantada llega al lugar de la intervención

descongelada y enjuagada. Debe conservarse a 4°C y debe ser utilizada en las siguientes 72 horas (RAMA, 2001).

**4.-Conservación en fresco:** el tejido viene lavado y bañado en una solución antibiótica. La conservación debe ser a 4°C y no necesita otro tipo de preparación previa a la cirugía (VON VERSEN-HOYNCK, 2004; RAMA, 2001).

**5.- Inonización:** en este caso, el tejido se ha esterilizado con aire seco. Se recibe listo para su uso (VON VERSEN-HOYNCK, 2004; RAMA, 2001).

### 2.9.6. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS

Los cirujanos eligen la técnica a utilizar principalmente en función de la profundidad de la úlcera. Las técnicas se pueden dividir entre las que coloca una única capa de membrana amniótica y las que colocan múltiples capas (LIU, 2019).

El procedimiento quirúrgico comienza en condiciones estériles tras la aplicación de anestesia tópica o peribulbar y la eliminación de tejido necrótico de la córnea. En este momento, la membrana amniótica se coloca con la capa de la membrana basal dirigida hacia arriba y se sutura al área de la córnea afectada. Existen cuatro estilos con los que se puede cubrir o rellenar la úlcera (UHLIG, 2015):

1. **Capa única:** la membrana se recorta un poco más grande que el tamaño del defecto y se ancla en su lugar con el lado de la membrana basal hacia arriba.

2. **Técnica de superposición:** en este caso, la membrana se extiende sobre toda la córnea y el área perilimbal. Se ancla con sutura monofilamento 10/0 en el limbo y, ocasionalmente, en la periferia de la córnea con un patrón de sutura continua.

3. **Técnica multicapa:** en esta técnica, la orientación de las piezas de membrana no importa, salvo la porción más superficial que se coloca con la membrana basal dirigida hacia arriba. Se sutura como un injerto incrustado, lo que permite que el epitelio corneal crezca sobre ella.

4. **Técnica de sándwich:** es una combinación de los dos métodos anteriores en la misma córnea.

### 2.9.7. USOS EN ENFERMEDADES OCULARES

El uso de la membrana amniótica en oftalmología fue descrito por primera vez en 1940 (DE ROTTH, 1940). La membrana se utilizó para la reconstrucción conjuntival en un simbléfaron. En la misma década se describieron casos de su uso como parche temporal en quemaduras oculares agudas (SORSBY, 1946, 1947). Ya en la década de 1960, se mencionó como un material potencialmente adecuado para el uso inmediato tras una quemadura ocular (ROPER-HALL, 1965).

En la década de los 90 su uso fue reintroducido (BATLLE, 1993; KIM, 1995) y a partir de esta fecha se han realizado múltiples estudios para diversas situaciones que incluyen problemas conjuntivales, corneales y otras localizaciones oculares y perioculares tales como:

**1.- Quemaduras oculares:** el trasplante de membrana amniótica se ha propuesto para el tratamiento de quemaduras oculares en el restablecimiento de la superficie conjuntival y corneal, ya por sus propiedades antiinflamatorias y anticicatrizantes disminuye la inflamación estromal y previene la formación de simbléfaron (TAMHANE, 2005; LO, 2013). Se determinó que es más efectiva para las quemaduras de grado moderado que para las graves: esto se explica porque las quemaduras graves están asociadas con isquemia limbal extensa y con deficiencia de células madre TANDON (2011).

**2.- Úlceras superficiales no infectadas refractarias:** en este grupo se incluye la mayoría de las úlceras neurotróficas. Aunque la recuperación visual no es perfecta, ya que, cuando se reabsorbe, la membrana, es sustituida por tejido fibroso (GRIS, 2002), el uso del trasplante de membrana amniótica se ha reconocido como un tratamiento efectivo para controlar el dolor en este tipo de úlceras (MORKIN, 2018),

**3.- Úlceras profundas:** en este tipo de úlceras, las técnicas que más se utilizan son la multicapa o la sándwich. El objetivo es el de cubrir y ayudar a la epitelización sobre la úlcera. En el caso de la técnica sándwich cubrir el área del limbo promueve la proliferación de las células madre (LIU, 2019). Se han descrito usos en úlceras de diferente profundidad, incluida la perforación (FAN, 2016; COSTA, 2019).

**4.-Úlceras infecciosas:** estudios realizados en úlceras estromales, con presencia de bacterias o herpes han demostrado que el uso de la membrana amniótica mejora la

agudeza visual en los casos en lo que la infección es bacteriana, no así en la herpética. Aún así, se recomienda el uso de este tratamiento ya que, por sus características antiinflamatorias, brinda a los pacientes con cicatrices corneales una oportunidad para una posible queratoplastia futura (ALTAY, 2016).

**5.-Deficiencia de células madre limbales:** diversas situaciones o enfermedades oculares provocan un déficit de células madre limbales, el uso de la membrana amniótica está indicado para apoyar la regeneración de la lesión en combinación con otras técnicas quirúrgicas o incluso para apoyar la expansión in vivo o ex vivo de estas células. Aunque la membrana amniótica no las posee por sí misma, se ha demostrado que ayuda a la regeneración de las células madre (SABATER, 2017; LIU, 2019).

**6.- Excision de tumores:** la membrana amniótica se ha utilizado de una manera efectiva para la reconstrucción de defectos tras la eliminación de tumores de diferentes tipos y en diferentes localizaciones del globo ocular, como nevus conjuntivales, y carcinomas de células escamosas corneales, entre otros (GOKTAS, 2017; XIE, 2018).

**7.- Pterigium:** en este caso, se recomienda el uso de la membrana amniótica para la reconstrucción tras su eliminación, ya que es una técnica instrumentalmente menos tediosa que las empleadas tradicionalmente; reduce la recurrencia y no se utiliza conjuntiva del paciente, conjuntiva que pudiera necesitarse para posibles futuras intervenciones (ROSEN, 2018).

**8.- Otras enfermedades de la superficie ocular:** entre otras, destacamos el uso del trasplante de la membrana amniótica en pacientes que presentaban el síndrome de Sjögren, donde esta técnica consiguió la reducción del dolor y de la sensación de cuerpo extraño (SHAFER, 2019). La reducción en el dolor fue el mismo resultado positivo que se obtuvo tras aplicar esta técnica en casos de queratopatía bullosa (SIU, 2019).

## **2.10. TÉCNICAS AVANZADAS DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEN CORNEAL**

En la exploración oftalmológica básica, están incluidos los instrumentos que posibilitan una correcta observación del globo ocular y sus anexos sirviendo de soporte para el diagnóstico de posibles alteraciones. El **biomicroscopio con lámpara de hendidura** es el instrumento óptico por excelencia utilizado para la exploración de la

---

córnea. Combina un sistema de magnificación e iluminación que puede ser utilizado para explorar una gran variedad de características ópticas y microscópicas del ojo del paciente, como las distintas capas de la córnea, así como de otras estructuras como los párpados, la conjuntiva y el cristalino (MAGGS, 2009).

Los avances recientes en la obtención de imágenes corneales han permitido un diagnóstico más objetivo y un mejor control de la enfermedad, además de proporcionar una valiosa orientación para el progreso del tratamiento (SHIH, 2019).

Estos avances muestran un inmenso potencial para proporcionar una visualización objetiva, de alta resolución e integral, de las estructuras y patologías corneales. La aplicación a diferentes campos, en el futuro, es altamente probable, pero antes deben superarse las limitaciones técnicas y económicas de los instrumentos, así como las basadas en las habilidades del explorador. Cualquier intento de reemplazar las técnicas de imagen tradicionales con estas técnicas más nuevas debería estar respaldado por la evidencia de estudios clínicos sólidos (SHIH, 2019).

Entre estas nuevas técnicas destacan: la topografía, la microscopía confocal, el microscopio especular, la biomicroscopía por ultrasonido y la tomografía de coherencia óptica (MARTIN, 2018).

### 2.10.1. TOPOGRAFÍA

La topografía corneal se utiliza para caracterizar la forma de la córnea, específicamente, su superficie anterior. La mayoría de los sistemas topográficos corneales se basan en un **disco de Plácido** que analiza los anillos que se reflejan en la superficie corneal. La superficie corneal posterior no se puede explorar con esta tecnología (FAN, 2018).



Topógrafo corneal. Imagen obtenida en [www.topcon-medical.es](http://www.topcon-medical.es)

En este grupo se encuentra la topografía basada en el disco de Plácido, topografía de evaluación de escaneo en hendidura y la topografía de barrido

#### **2.10.1.1. Topografía basada en el disco de Plácido**

Aunque este tipo de tecnología se comenzó a desarrollar siglos antes, en 1880, Antonio Plácido desarrolló un queratoscopio, el llamado “disco de Plácido”, utilizando un objetivo circular de anillos concéntricos alternos de luz y oscuridad con una abertura central, para observar y fotografiar los reflejos corneales de estas bandas claras y oscuras, por lo que es universalmente reconocido como el inventor del queratoscopio de mano y el fotoqueratoscopio. (LEVINE, 1965; SEITZ, 1997; COURVILLE, 2004).

El desarrollo del análisis computarizado a fines del siglo XX permitió el análisis cualitativo de las imágenes fotoqueratoscópicas: gracias al análisis informático de la información recibida de miles de puntos de la córnea anterior, este dispositivo es capaz de describir la curvatura corneal anterior y realizar un mapa topográfico codificado por colores de la córnea, en el que los poderes dióptricos bajos están representados por azules y verdes, colores fríos; y los poderes dióptricos altos están representados por amarillo, naranja y rojo ,colores cálidos (MARTIN, 2018).

La **videoqueratoscopia** basada en disco de Plácido es una tecnología revolucionaria, que ha evolucionado y ha desarrollado dispositivos de disco de Plácido más sofisticados. Desde su introducción se ha convertido en una técnica primordial en la evaluación de la superficie corneal anterior con una amplia gama de aplicaciones para ampliar la comprensión de la forma de la córnea (ORTIZ-TOQUERO, 2016, 2017).

Es de suma importancia en el diagnóstico de enfermedades ectásicas corneales como el queratocono, en el seguimiento de casos con lentes de contacto permeables a gases, la ortoqueratología, el cálculo de lentes intraoculares, el seguimiento postqueratoplastia, la evaluación de aberraciones refractivas y la evaluación del ojo seco entre otras (BRODY, 1994).

La tecnología de disco de Plácido se puede combinar con otras tecnologías como el aberrómetro de trazado de rayos, para construir un sistema multifunción que combine la topografía y las aberraciones oculares completas: Este dispositivo captura la imagen de los anillos de disco de Plácido reflejados de la superficie anterior de la córnea y

proporciona refractometría, queratometría y pupilometría, para medir la calidad de visión de los pacientes (GATINEL, 2006; GUALDI, 2009).

Las principales desventajas de los topógrafos basados en Plácido incluyen la ausencia de información sobre la superficie corneal posterior y la cobertura limitada de la superficie corneal (aproximadamente al 60%), obviando datos importantes de la superficie corneal paracentral y periférica (BELIN, 2009).

#### **2.10.1.2. Topografía de barrido**

Esta tecnología de imagen del segmento anterior se desarrolló a fines de la década de 1990 y es la primera en medir las superficies corneales anterior y posterior. Es capaz de reconstruir una imagen tridimensional de la córnea proporcionando un mapa topográfico de sus superficies.

Este método diagnóstico combina el principio de un biomicroscopio con lámpara de hendidura con un disco de Plácido (CAIRNS, 2005).

El análisis matemático de la rendija de la luz reflejada y refractada de las dos superficies corneales permite su reconstrucción por triangulación de trazado de rayos: dado que las superficies anterior y posterior se miden al mismo tiempo manteniendo su relación entre sí, la paquimetría global de la córnea se proporciona sin contacto (MARTIN, 2018).

#### **2.10.1.3. Topografía tipo Scheimpflug**

El principio de Scheimpflug describe la condición de imagen óptica cuando el plano de un objeto no es paralelo a la película de la cámara: esto obtiene una ventaja, que es la de lograr una gran profundidad de enfoque. DREWS (1964) introdujo este principio en el examen del segmento anterior del ojo. Posteriormente, estas imágenes se utilizaron para evaluar la transparencia óptica del ojo anterior (córnea y cristalino), la medición del radio corneal (DUBBELMAN, 2002), el grosor corneal (O'DONELL, 2005) entre otros.

Los dispositivos de imagen Scheimpflug son especialmente útiles para la evaluación de la porción anterior del ojo ya que describe diferentes parámetros corneales y aumenta el rango de aplicación clínica en el diagnóstico de la enfermedad ectásica, como el queratocono, el seguimiento de pacientes antes y después de una cirugía refractiva, el cálculo de potencia de LIO y el ajuste de lentes de contacto entre otros (HASHEMI, 2010, DE JONG, 2017, 2013).

Se han desarrollado dispositivos combinados Plácido y Scheimpflug para obtener simultáneamente, datos de topografía corneal anterior y posterior, paquimetría corneal completa, densitometría del cristalino y otros (MILLER, 1994; MENASSA, 2008; MARTIN, 2018).

### 2.10.2. MICROSCOPIA ESPECULAR

El microscopio especular permite el análisis cuantitativo cualitativo y morfométrico del endotelio corneal de forma no invasiva utilizando la reflexión especular (MANEA, 2011).

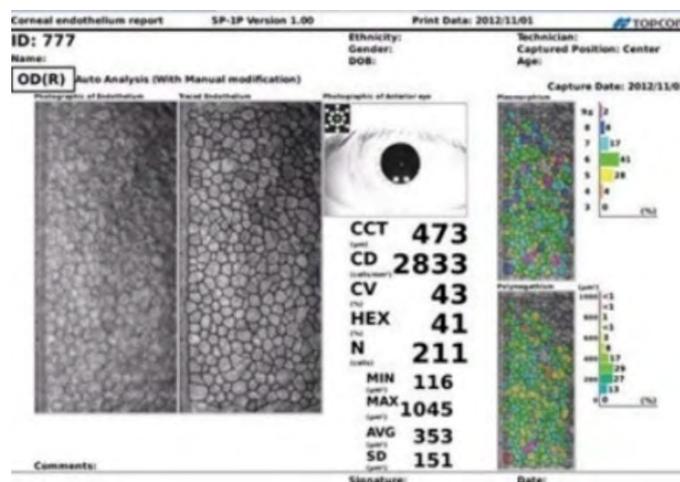


Imagen de córnea humana obtenida con microscopía especular. Imagen obtenida en [www.topcon-medical.es](http://www.topcon-medical.es).

Los primeros estudios, que datan de principios del siglo XX, describen el uso de la luz refleja especular con la lámpara de hendidura para observar el endotelio corneal (VOLT, 1920).

Los microscopios clínicos especulares se basan en el microscopio de laboratorio diseñado por MAURICE (1968) para proporcionar una vista de gran aumento de la luz reflejada especular desde el endotelio corneal.

El reflejo especular ocurre en una interfaz en la que los índices de refracción del sujeto de estudio y el observador presentan el mismo ángulo de incidencia (McCAREY, 2008).

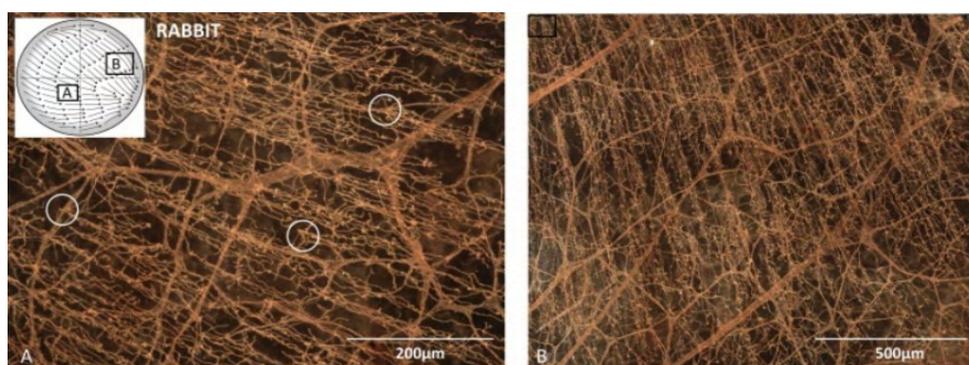
Existen diversos estudios en los que se justifica el uso de esta técnica para el diagnóstico o seguimiento de diversas alteraciones corneales tales como las queratitis en archipiélago (ORUCOGLU, 2017), las queratopatías diabéticas (LIABOE, 2017), las distrofias corneales y el queratocono (MYLONA, 2019), así como en el preoperatorio de la cirugía de cataratas (SHARMA, 2017).

### 2.10.3. MICROSCOPIA CONFOCAL

El **microscopio confocal** es una categoría de microscopio especular en el que el objetivo y la lente del condensador tienen el mismo punto focal. A diferencia del microscopio convencional, tiene una resolución más alta y puede escanear todas las capas corneales (MANEA, 2011).

Este tipo de microscopio se comenzó a idear en la década de 1950 pero no fue utilizado hasta al menos 2 décadas después, gracias al uso de los ordenadores, el láser y el procesamiento digital de las imágenes (SHEPPARD, 1997). A partir de ese momento se ha usado en investigación, incorporándose a técnicas como la inmunofluorescencia y la construcción de imágenes tridimensionales (JAVALOY, 2005).

Las aplicaciones en oftalmología se pueden encontrar tanto en la determinación de la morfología corneal normal, como en la evaluación pre y postoperatoria de la cirugía corneal: en los últimos años, este dispositivo se ha convertido en una herramienta imprescindible en la cirugía refractiva corneal (JAVALOY, 2005).



Plexo subbasal en una córnea de conejo analizada con microscopia confocal.

Imagen obtenida de Marfut et al, 2019. Invest Ophthalmol Vis Sci 2;60(15):4972-84.

La ventaja principal que tiene con respecto a la microscopía óptica convencional es que las imágenes obtenidas no presentan emborronamiento fuera de foco por lo que se pueden obtener cortes ópticos seriados de manera no invasiva, en muestras e incluso en organismos vivos, eliminando la necesidad de realizar procedimientos de corte y procesamiento de muestras. Otras ventajas incluyen el aumento significativo en la resolución lateral y la posibilidad de procesar las imágenes, gracias a la informática, para obtener imágenes de alta resolución y lograr una reconstrucción tridimensional o topográfica de las superficies (BOYDE, 1983, 1986).

#### **2.10.4. BIOMICROSCOPIA POR ULTRASONIDO**

El ultrasonido proporciona imágenes en sección transversal en tiempo real, incluso en presencia de estructuras intermedias ópticamente opacas.

Desde la década de los años 50, se comienza a investigar en el uso del ultrasonido para el diagnóstico ocular (MUNDT, 1956). Desde casi el inicio de uso de este instrumento, la frecuencia de ultrasonido más utilizada rondaba los 10MHz, que, aunque aún es útil para el diagnóstico de muchas alteraciones oculares, se ha visto superada por otras técnicas, como la biomicroscopía por ultrasonido y la OCT que ofrecen mayores ventajas (SILVERMAN, 2009).

A principios de la década de 1990, se desarrolló la biomicroscopía por ultrasonido (UBM). Su tecnología implica el uso de frecuencias mucho más altas (35-50 MHz) que las utilizadas en los escáneres oftálmicos convencionales. La mejora resultante en la resolución acerca al UBM a cumplir con los criterios de dispositivo de imagen ideal (PAVLIN, 1990, 1991).

Los sistemas de biomicroscopía por ultrasonido son adecuados para obtener imágenes de prácticamente toda la anatomía y la patología del segmento anterior, incluida la córnea, el ángulo iridocorneal, la cámara anterior, el iris, el cuerpo ciliar y el cristalino. Los exámenes se pueden realizar directamente sobre la córnea y la esclera tras la aplicación de anestesia tópica. Incluso se puede realizar a través de los párpados cerrados, especialmente en casos de traumatismos, aunque a costa de una reducción en la sensibilidad instrumental (SILVERMAN, 2009).



Imágenes de biomicroscopía por ultrasonido de córneas humanas. Imágenes obtenidas de [www.opticare.com](http://www.opticare.com)

### **2.10.5. TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA**

La tomografía de coherencia óptica, conocida también como OCT, es una técnica de imagen no invasiva que no precisa contacto y que proporciona imágenes in vivo de estructuras anatómicas (IZATT, 1994). En el ojo, está ampliamente demostrado su utilidad para la exploración de la córnea, el cristalino, el iris la retina y el nervio óptico (SHAN, 2019).

Esta técnica permite obtener imágenes transversales y/o en tres dimensiones de tejidos biológicos. El rango de resolución es de 1-15 $\mu$ m y puede lograrse una profundidad de penetración de 2 a 7 mm, (normalmente está limitada por la atenuación de la señal). La OCT tiene una resolución más fina, pero con menor penetración de profundidad que la ecografía; y una resolución más baja pero una penetración más profunda que la microscopía confocal. Lo que hace que la OCT pueda ser catalogada como una herramienta útil para la obtención de imágenes oculares (FUJIMOTO, 2000).

El principio en el que se basa la OCT es la interferometría de baja coherencia. Esta técnica consiste en la retrodispersión de la luz infrarroja a medida que viaja a través las diferentes estructuras oculares: la luz emitida por una fuente es reflejada por el tejido a través del cual viaja. La luz reflejada es detectada por un sensor, que luego lo combina con una luz procedente de un haz de referencia (SHAN, 2019). La resolución de la OCT depende de la longitud de onda central y del ancho espectral de la fuente de luz. A medida que aumenta la longitud de onda de la fuente de luz, disminuye la resolución axial, por lo que, a medida que aumenta la apertura numérica en el dispositivo, disminuye la profundidad de enfoque (ANG, 2018).

### **2.10.5.1. Tipos de dispositivos de OCT**

Actualmente, se encuentran en el mercado tres tipos de dispositivos de OCT: de dominio temporal, de dominio espectral y de fuente barrida.

1. OCT de dominio temporal (Time-domain): este tipo consiste en una fuente de luz de baja coherencia, que emite una luz que se divide en un haz de referencia y uno de muestra gracias a un divisor de haz. Los dos brazos se combinan y se conducen a un detector de puntos: cuando la longitud de referencia y la de reflexión procedente de la muestra son similares en longitud, la intensidad del haz combinada es alta, produciendo una señal medible. Para conseguir imágenes en 2D o 3D, los haces deben moverse a diferentes posiciones, como esto lleva un tiempo realizarlo, se han desarrollado otras técnicas que reducen los tiempos de exploración (SHAN, 2019).

2. OCT de dominio espectral (Fourier-domain): el diseño es similar al anterior, pero en esta ocasión, el espejo de referencia permanece estacionario y la interferencia entre la referencia y los brazos de muestra se detecta como un espectro. Los brazos de referencia y de muestra se combinan y los componentes espectrales se separan mediante una rejilla de difracción que es capturada por una cámara acoplada. Esta técnica captura la profundidad en una sola imagen (SHAN, 2019).

3. OCT de fuente barrida (Swept-source): esta es una forma derivada de la tecnología de dominio espectral: en este caso, la longitud de onda de la fuente es de luz barrida y es capturada por un detector de puntos. En este tipo de dispositivos, proporciona una exploración óptica sin partes móviles, por lo que son posibles tasas de adquisición de hasta varios MHZ (SHAN, 2019).

### **2.10.5.2. OCT de segmento anterior**

Esta forma de aplicación de la OCT utiliza una tecnología adaptada para la obtención de imágenes de la superficie ocular y del segmento anterior (DAS, 2019; SHAN, 2019).

Para obtener las imágenes en esta porción del ojo, se requiere mayor amplitud y profundidad de exploración que los que se usan típicamente en el segmento posterior. Son preferibles las fuentes de onda de mayor longitud ya que proporcionan una mayor profundidad de penetración (ANG, 2018). Las mediciones procedentes de diferentes aparatos no deben considerarse intercambiables, porque éstos pueden diferir en su

tecnología OCT, algoritmos e índices de refracción, entre otros (SHAN, 2019). Requiere una mayor anchura y profundidad de exploración que la que se utiliza normalmente en el segmento posterior.

### **2.10.5.3. OCT-angiografía**

Esta modalidad de OCT (OCT-A) se introdujo para la visualización de la vascularización de la retina y la coroides sin el uso de colorantes intravenosos como la fluoresceína y el verde de indocianina (SIDDIQUI, 2019).

El principio en el que se basa es el contraste de movimiento intravascular calculando las diferencias en la intensidad de señal entre exploraciones secuenciales realizadas en una misma área. Detecta el movimiento de los glóbulos rojos independientemente de su dirección, a la vez que elimina la información estática (estructural). Es decir, obtiene información directamente de los glóbulos rojos, en contraste con los métodos que utilizan colorantes intravenosos, que usan el plasma. Las áreas de "no perfusión" en OCT-A son en realidad áreas sin movimiento de glóbulos rojos en el momento de la adquisición de imágenes; o áreas donde el flujo sanguíneo está por debajo del umbral mínimo detectable por lo que dichas áreas no deben considerarse como fallos u obstrucciones en la vascularización (SIDDIQUI, 2019).

La ventaja de esta tecnología es que es no invasiva y sin contacto. Tampoco hay límite de tiempo o ventana específica para la obtención de imágenes, como si ocurre con los colorantes intravenosos (SIDDIQUI, 2019).

Las limitaciones que presenta la OCT-A son de diversa naturaleza, ya que existen múltiples fuentes de artefactos capaces de proyectar sombras y bloquear el retorno de la iluminación de la retina (RODRIGUEZ, 2018; HOLLÓ, 2018). Por otro lado, en ojos con miopía alta, los rayos de luz pueden no ser perpendiculares a la superficie de la retina, lo que conduce a que se produzcan artefactos (RODRIGUEZ, 2018). Además, esta modalidad de OCT presenta una capacidad limitada para detectar fugas vasculares, lo que puede limitar su uso. La falta de uniformidad en los protocolos de adquisición y en la interpretación de las imágenes, son factores limitantes a tener en cuenta (RODRIGUEZ, 2018).

#### **2.10.5.4. Usos generales de la OCT en oftalmología**

Múltiples estudios han demostrado el amplio abanico de usos de la OCT en la oftalmología moderna. En cuanto al uso en el segmento anterior destaca el diagnóstico, cuantificación y seguimiento de alteraciones corneales como la distrofia de membrana basal (KUO, 2019), cuerpos extraños corneales (ARMARNIK, 2019), el queratocono, las queratitis microbianas y diversas neoplasias de la superficie ocular (SAHN, 2019). Esta técnica diagnóstica no solo es utilizada en la especie humana, su uso es cada vez más común en animales como caballos (BLANCHARD, 2019) y perros (HOEHN, 2018), entre otros.

Además, esta técnica se ha utilizado de manera experimental para poder estudiar el proceso de cicatrización corneal (PANTALON, 2019). Así mismo, está demostrada su utilidad en el estudio de malformaciones prenatales en modelos embriológicos (DUMAN, 2019).

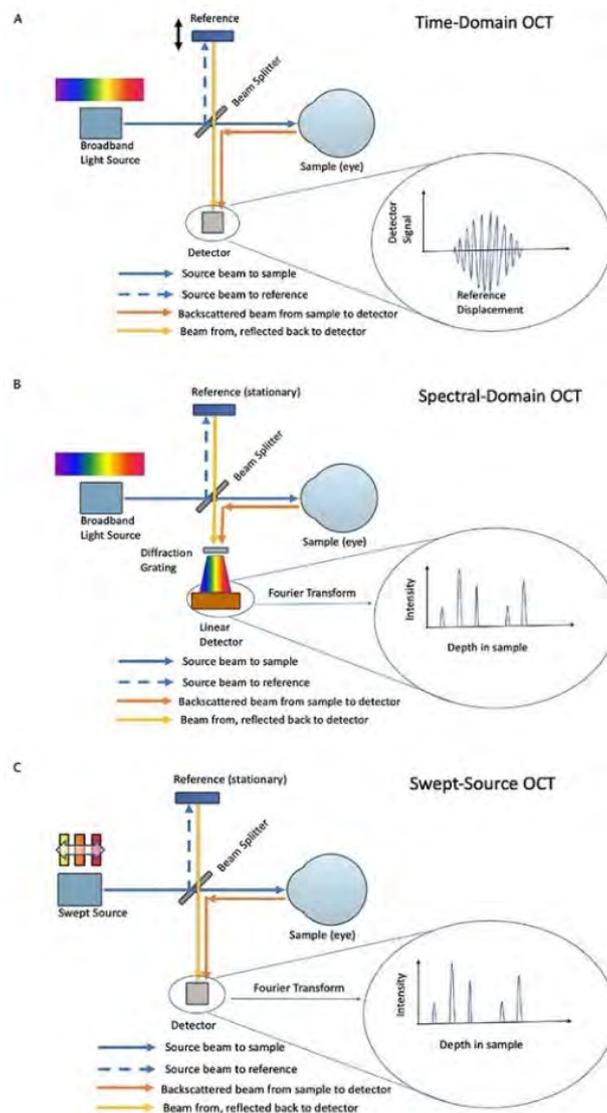
La OCT se usa como apoyo en la cirugía del segmento anterior como las queratoplastias lamelares (LIU, 2019), las biopsias corneales (SCHMIDT, 2019) y la cirugía refractiva en las que se usa el LASIK (SHAN, 2019). En la cirugía de cataratas su utilidad está demostrada en la evaluación de los posibles cambios que se producen en la córnea tras las incisiones iniciales (CHAVES, 2019) y como ayuda para decidir qué lente intraocular utilizar (SHAN, 2019).

Una de las alteraciones en las que se puede usar la OCT es el glaucoma, tanto para su diagnóstico y pronóstico, con la determinación de las medidas de las estructuras del ángulo iridocorneal y la capacidad del drenaje del humor acuoso a través ellas, como para el asesoramiento en diversas intervenciones que puedan ayudar a solucionarlo (PILAT, 2019; SHAN, 2019).

Con respecto a la angio-OCT, su uso está encaminado al diagnóstico y seguimiento de alteraciones que incluyan vascularización entre sus signos clínicos. En el caso de la córnea, está demostrado su uso en queratopatías lipídicas, neovascularizaciones asociadas a injertos y queratitis herpéticas, además de casos con deficiencia de células madre limbales (SIDDIQUI, 2019).

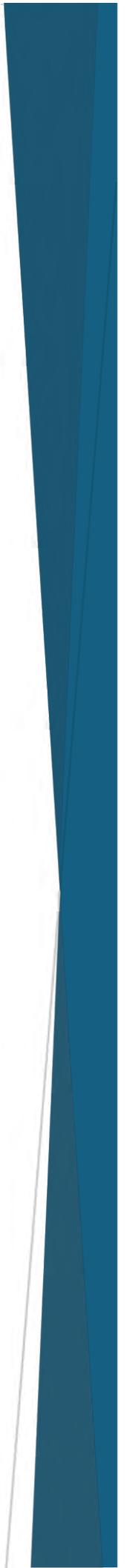
Asimismo, este tipo de dispositivos son muy útiles para la evaluación de la vascularización conjuntival e intraescleral y puede jugar un papel importante en la comprensión del flujo sanguíneo de la superficie ocular, así como del humor acuoso (AKAGI, 2018).

Otra de las estructuras que se puede evaluar con este tipo de técnica es el iris, siendo muy útil para monitorizar la existencia de masas, entre las que se incluyen los melanomas, nevus y quistes epiteliales pigmentados, entre otros. El uso está encaminado a la evaluación de una posible evolución o posible malignización, así como a valorar la respuesta a diversos tratamientos (SKALET, 2017).



Tipos de OCT. Imagen obtenida de SHAN, 2019. Asia-Pacific Journal of Ophthalmology 8, 2:146-57.

# Material y métodos





### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

Este estudio fue verificado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (OEBA-ULPGC 08/2016).

#### **3.1. SUJETO DE ESTUDIO**

La especie utilizada en este estudio fue el conejo, *Oryctolagus cuniculus*, pertenecientes al orden *Lagomorpha*. Animal común en la investigación de laboratorio al ser manejables, ocupar poco espacio y de mantenimiento económico. Además, al tratarse de un estudio oftalmológico, el ojo del conejo representa un modelo ampliamente estudiado en dicha disciplina. Asimismo, debido a su popularidad como mascota, el conejo doméstico es un paciente común en la práctica veterinaria diaria.

Todos los individuos eran de la raza “New Zealand”, que se caracteriza por presentar una longitud de mediana a grande, con un cuerpo ancho, musculoso y profundo. Los machos adultos pueden alcanzar los 4,5-5,4 kg y las hembras 4,1-5,0 kg.

El número total de sujetos en el estudio fue de dieciocho, todos adultos, que presentaban una buena condición física y clínicamente sanos es decir sin signos externos de enfermedad y actitud y actividad normales.

Los individuos se estabularon en el animalario de la Facultad de Ciencias de la Salud de la ULPGC, en un entorno controlado y aislados de otros animales de la misma especie, así como de otras especies. Cada uno tenía su propia jaula y contaba con agua y comida ad libitum, con un pienso comercial especialmente formulado para este tipo de animales que cubría correctamente las necesidades energéticas y nutricionales.

#### **3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL**

##### **3.2.1. OBJETIVO**

El objetivo de este estudio experimental es el de valorar de distintas maneras (clínicamente, mediante OCT e histología) el proceso de cicatrización corneal, comparando su evolución tras la aplicación, o no, de un tratamiento de recubrimiento con membrana amniótica deshidratada.

### 3.2.2. DISEÑO

Este estudio fue realizado en ojos de conejos sometidos a una queratectomía de una profundidad determinada en ambos ojos a los que se les realizó el injerto de membrana amniótica en uno de ellos.

Los conejos se separaron aleatoriamente en tres grupos de seis individuos cada uno: el “Grupo 1” comprendía los individuos del 1 al 6; el “Grupo 2”, del 7 al 12; y el “Grupo 3”, del 13 al 18.

El grupo 1 fue estudiado después de la primera semana tras el procedimiento quirúrgico; el grupo 2, después de dos semanas; y el grupo 3, después de 4 semanas.

GRUPO	INDIVIDUOS	TIEMPO DE ESTUDIO (semanas)			
		1	2	3	4
1	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				
2	7				
	8				
	9				
	10				
	11				
	12				
3	13				
	14				
	15				
	16				
	17				
	18				

### 3.2.3. PREPARACIÓN PREQUIRÚRGICA

Todos los conejos fueron anestesiados utilizando el mismo protocolo. Tras pesarlos, se calcularon las dosis de fármacos a administrar, que se cargaron en una misma jeringuilla. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- 50 microgramos/kg de Medetomidina (Dormisan<sup>®</sup>, Fatro)
- 5 mg / kg de Ketamina (Imalgene 1000<sup>®</sup>, Merial)
- 0.2 mg / kg de Butorfanol (Torbugesic<sup>®</sup>Vet, Zoetis)
- 0.5 mg / kg de Midazolam (Midazolam, Normon)

La aplicación fue subcutánea en la zona interescapular, con una aguja hipodérmica de 25G. Con este protocolo se consiguió que los animales se pudieran manipular

correctamente y gracias al efecto de la ketamina, que el globo ocular quedara centrado y relativamente fijo, lo que permitió que la intervención quirúrgica se realizara sin la necesidad de la aplicación de otros fármacos con los que se obtiene este efecto, como los bloqueantes neuromusculares.

Después de 20 minutos, y tras comprobar que los individuos se encontraban lo suficientemente relajados, se cateterizó una vena auricular con una cánula de 24G (Introcan<sup>®</sup>, Bbraun) para permitir la administración de cualquier medicación de rescate de urgencia, o un bolo de Propofol, si fuera necesario, a fin de mantener un plano anestésico ideal para realizar la intervención.

Una vez se encontraban relajados, todos los animales se colocaron en decúbito lateral, en este momento se procedió a la limpieza del campo quirúrgico, instilando previamente una gota de anestésico tópico (Colircusí anestésico doble<sup>®</sup>, Alcon). Después de 3-5 minutos, se limpiaron los ojos con una solución de Povidona Yodada (5%). Tras el lavado quirúrgico de manos y la colocación de guantes estériles, se preparó el campo quirúrgico con paños estériles de un solo uso (Foliodrape<sup>®</sup>, Bbraun).

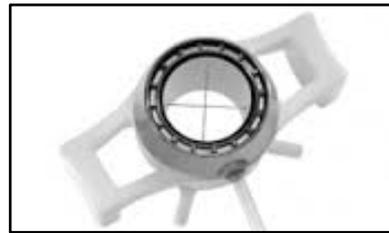
#### 3.2.4. MÉTODO QUIRÚRGICO

Se utilizó material quirúrgico esterilizado de un único uso o, alternativamente se esterilizó previamente con autoclave (Statim 2000S<sup>®</sup>, Scican).

El uso de un blefarostato de Castroviejo posibilitó la correcta visualización de la córnea.



Con la ayuda de unas gafas lupa de 3.5x como método de aumento, en todos los individuos se realizó un defecto estromal controlado en ambos ojos. Para que en todos los casos fueran del mismo diámetro y profundidad, se utilizó un trepano de vacío de 7 mm de diámetro de un solo uso (Clear-vue<sup>®</sup>, Moria).



El espesor de la queratectomía fue el mismo en todos los casos: la profundidad decidida fue de 200 micras, que es aproximadamente la mitad del espesor corneal total en la especie de estudio. Antes de proceder a la realización de la queratectomía, el queratotomo se regula a la profundidad de corte deseada, lo que se consigue girando la rueda central que tiene el dispositivo.

Después de posicionar el trépano en el centro de la córnea, con la ayuda de la jeringa de la que viene provista el dispositivo, se genera vacío entre éste y la córnea.



**Colocación del trépano**

A continuación, se procede a girar la rueda del trépano hasta el tope seleccionado previamente. Una vez alcanzado, se desbloquea la jeringa: de esta forma se pierde el vacío entre el dispositivo y la córnea permitiendo que se separen suavemente.

Para separar el botón de córnea trepanado, se utilizan unas pinzas corneales Bishop-Harmon y un bisturí biselado (Crescent Knife<sup>®</sup>, Alcon)



**Separación del botón corneal**



Resultado

### 3.2.5. MEMBRANA AMNIÓTICA

#### 3.2.5.1. Descripción del producto utilizado

La membrana amniótica utilizada en todos los ojos fue de origen humano, deshidratada, de 0,2 mm de espesor (Visio-Amatrix®, TBF-Tissue engineering).

La membrana amniótica se suministra en envases individuales esterilizados que contienen una lámina de membrana de 40x40 mm, cuya conservación se puede realizar a temperatura ambiente.

#### 3.2.5.2. Técnica de colocación

Se colocó una única capa de membrana de 8 mm de diámetro sobre el defecto corneal realizado exclusivamente en los ojos izquierdos (OS): de esta forma el OD actúa como control en el mismo individuo de estudio.



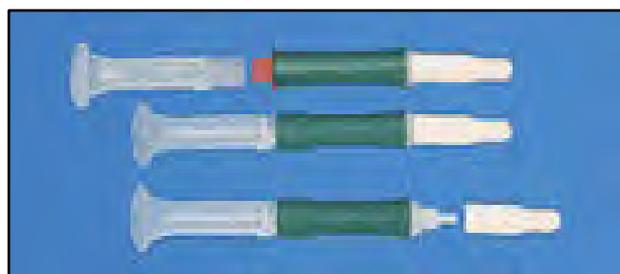
En la mitad de los individuos (1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14 y 15), el lado epitelial de la membrana se colocó en contacto con la úlcera estromal; y en la otra mitad (4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17 y 18), el estroma del defecto estaba en contacto con la matriz estromal de la membrana amniótica.

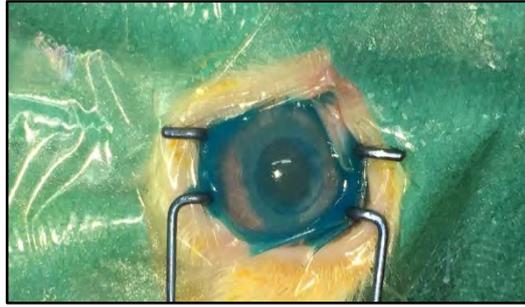
INDIVIDUOS	COLOCACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA	
	EPITELIAL	ESTROMAL
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		



La membrana se unió con pegamento tisular (OcuSeal®, Beaver-Visitec International): siguiendo las instrucciones del fabricante se mezclaron previamente las dos fracciones del mismo, y se cubrió la superficie corneal con una fina capa del pegamento, con la ayuda del pincel del dispositivo.

El pegamento se comercializa esterilizado de manera individual, y cada uno sirve para un único uso.





**Membrana adherida con pegamento**

Para evitar la reacción corneal secundaria, en la fijación de la membrana amniótica se evitó el uso de puntos de sutura, colgajos o lentes de contacto, lo que permitió visualizar directamente la córnea, permitiendo la evaluación de la reacción inflamatoria y la reparación sin interferencias.

### **3.2.6. MANEJO POSOPERATORIO**

Todos los sujetos fueron tratados con una gota, cada 12 horas, de antibiótico tópico (Ofloxacina 0.3%; Exocin<sup>®</sup>, Allergan) y lágrimas artificiales (Systane<sup>®</sup>, Alcon), hasta que se logró la epitelización completa.

Simultáneamente se instauró un tratamiento sistémico vía subcutánea, cada 12 horas, durante los tres primeros días postoperatorios. Como analgésico, se aplicó Buprenorfina, a 0.03mg/kg (Buprecare<sup>®</sup>, DFV). Para evitar los problemas digestivos derivados del manejo se administró Metoclopramida, a 0.5 mg/kg (Primperan<sup>®</sup>, Sanofi) y Ranitidina, a 2 mg/kg (Ranitidina, Normon).

## **3.3. EVALUACIÓN DE LOS SIGNOS CLÍNICOS**

### **3.3.1. OBJETIVO**

El objetivo de esta parte del estudio fue la valoración de los signos clínicos, que pueden encontrarse a lo largo del proceso de curación de una úlcera corneal con el fin de comparar la existencia de diferencias entre la colocación o no de la membrana amniótica, de la forma que se ha detallado anteriormente.

### 3.3.2. METODOLOGÍA DE ESTUDIO

Todos los ojos se evaluaron mediante observación a distancia y con una lámpara de hendidura, diariamente durante la primera semana y dos veces por semana, hasta la finalización del estudio.

### 3.3.3. OBTENCIÓN DE DATOS

Los datos fueron recopilados por un único observador, de acuerdo con el siguiente cronograma.

		DÍAS DE EXPLORACIÓN																													
INDIVIDUOS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1		■	■	■	■	■	■	■																							
2		■	■	■	■	■	■	■																							
3		■	■	■	■	■	■	■																							
4		■	■	■	■	■	■	■																							
5		■	■	■	■	■	■	■																							
6		■	■	■	■	■	■	■																							
7		■	■	■	■	■	■	■	■	■																					
8		■	■	■	■	■	■	■																							
9		■	■	■	■	■	■	■																							
10		■	■	■	■	■	■	■																							
11		■	■	■	■	■	■	■																							
12		■	■	■	■	■	■	■	■	■																					
13		■	■	■	■	■	■	■	■	■																					
14		■	■	■	■	■	■	■	■	■																					
15		■	■	■	■	■	■	■	■	■																					
16		■	■	■	■	■	■	■	■	■																					
17		■	■	■	■	■	■	■	■	■																					
18		■	■	■	■	■	■	■	■	■																					

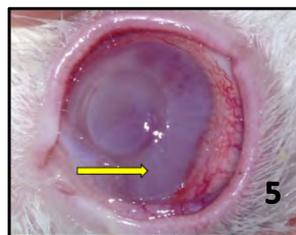
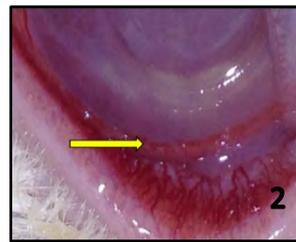
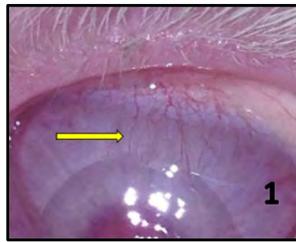
### 3.3.4. REGISTRO DE LOS SIGNOS CLÍNICOS

En los días señalados se obtuvieron datos para los siguientes signos clínicos:

1. Vascularización corneal superficial.
2. Vascularización corneal profunda.
3. Secreción.
4. Discomfort.
5. Edema corneal.
6. Blefarospasmo.
7. Congestión conjuntival
8. Hipopion.

El grado de presentación fue cuantificado, subjetiva e individualmente, para poder valorar con mayor detalle los signos clínicos del paciente. Los valores aplicados y sus significados fueron los siguientes:

- El valor “0”: ausencia.
- El valor “1”: presentación leve.
- El valor “2”: presentación moderada.
- El valor “3”: presentación intensa.



1. Vascularización superficial
2. Vascularización profunda
3. Secreción
4. Disconfort
5. Edema corneal
6. Blefarospasmo
7. Congestión conjuntival

### **3.4. TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA (OCT)**

#### **3.4.1. OBJETIVO**

El uso de esta tecnología tiene por objetivo evaluar y cuantificar el proceso de curación de una úlcera corneal y poder comparar si existen diferencias en este proceso entre los ojos a los que se les aplicó la membrana amniótica o no y la manera de colocarla.

#### **3.4.2. METODOLOGÍA DE ESTUDIO**

La obtención de numerosas medidas, en puntos determinados de cada muestra, permitió obtener información suficiente sobre el grosor o espesor corneal; y sobre la presencia y el tipo de edema corneal existente.

#### **3.4.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

##### **3.4.3.1. Día de obtención de las muestras**

Dependiendo del grupo de pertenencia del individuo se procedió a realizar una eutanasia humanitaria en los siguientes días:

- **Grupo 1:** día 8 posqueratectomía.
- **Grupo 2:** día 15 posqueratectomía.
- **Grupo 3:** día 30 posqueratectomía.

##### **3.4.3.2. Método de eutanasia**

En cada grupo, el día seleccionado se procedió a pesar a los individuos y a calcular la sedación, utilizando el mismo protocolo que durante el proceso preoperatorio.

Tras esperar 20 minutos a que se produjera una relajación suficiente, que permitiera la manipulación tranquila del individuo, se procedió a cateterizar una vena auricular con una cánula de 24G (Introcan<sup>®</sup>, Bbraun).

Una vez canulada la vena, se administró una solución de Tiopental sódico (Tiobarbital<sup>®</sup>, Bbraun), suficiente para producir una parada cardiorrespiratoria. Durante los 5 minutos siguientes se realizaron múltiples comprobaciones de la parada cardiorrespiratoria, así como de la ausencia de reflejo corneal, tras lo que se certificó la muerte del animal.

### 3.4.3.3. Enucleación

Tras la eutanasia, se procedió a realizar una enucleación bilateral en todos los individuos.

La técnica utilizada fue la transconjuntival: con el uso de unas tijeras de Stevens y unas pinzas Micro-Adson, se procedió a desbridar la conjuntiva bulbar, exponiendo la esclera y la inserción de los músculos extraoculares, que fueron desinsertados a continuación. Por último, se seccionó el nervio óptico, separando el globo ocular completamente de la órbita.

Los globos oculares fueron almacenados en botes contenedores individuales, debidamente identificados con el número del individuo y el ojo del que se trataba. En el interior de los botes solo se colocó una gasa sobre la que reposaba el globo ocular. Sobre la córnea se aplicó una gota de lágrima artificial para protegerla.



### 3.4.4. OBTENCIÓN DE DATOS

El modelo de OCT utilizado en el presente estudio fue Stratus Cirrus 500®, Zeiss. Se usó el modo "cámara anterior".



Las medidas de OCT se realizaron menos de una hora tras la enucleación. Inicialmente, se instiló una gota de lágrima artificial sobre la córnea para mejorar la superficie de obtención de la imagen. Para la obtención de las medidas, un ayudante sujetó

el globo ocular posicionándolo de manera paralela al dispositivo y enfrentado al punto de captura de imágenes.

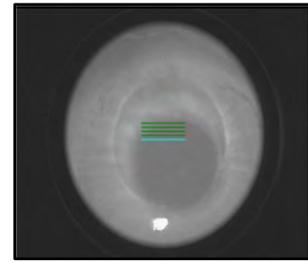
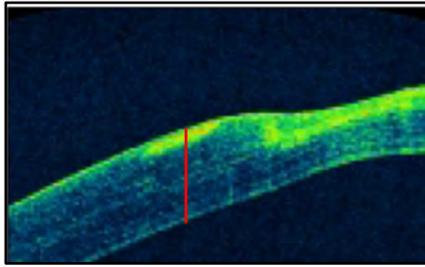
Los datos obtenidos se almacenaron informáticamente, debidamente identificados para su posterior análisis.

### 3.4.4.1. Registro de los valores de medidas corneales

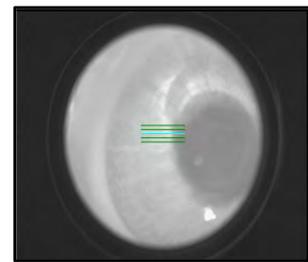
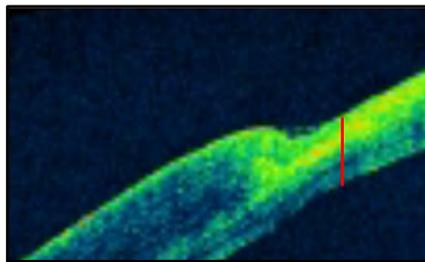
#### 1. Grosor corneal

Se realizaron diversas medidas en diferentes puntos de la córnea, para obtener datos sobre la evolución de la recuperación corneal. Las medidas realizadas fueron las siguientes:

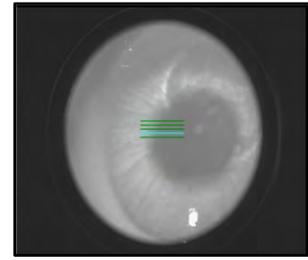
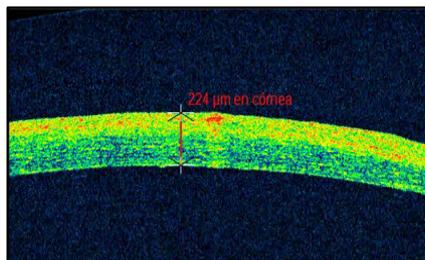
- **Espesor corneal normal:** medida tomada en una zona de córnea normal.



- **Espesor máximo de la úlcera:** el grosor máximo adyacente al punto de la incisión de la queratectomía.



- **Espesor central:** el grosor en el medio de la queratectomía.



## 2. Edema corneal

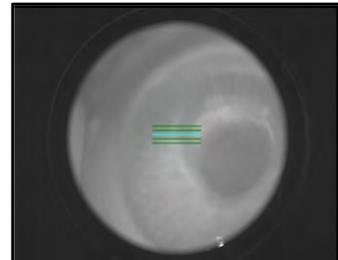
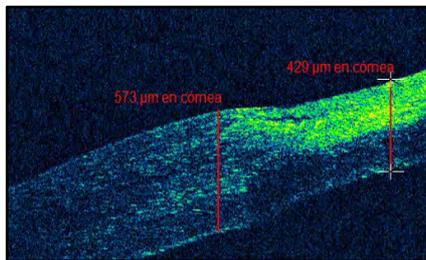
La OCT también proporciona datos sobre la presencia o no de edema lesional y/o perilesional. Se define el edema como la zona en la que se observa la separación de las lamelas estromales.

Después de medir el grosor de estas zonas, y según el grado del edema, las córneas se clasificaron en cuatro grupos diferentes: de "0" a "3".

- **Edema perilesional**

Se definió el edema perilesional, como el edema encontrado en la zona periférica a la queratectomía. Se clasificó de la siguiente manera:

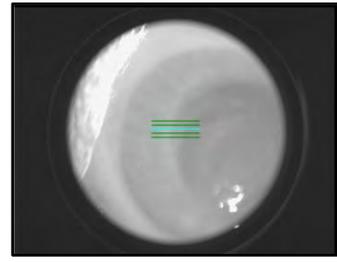
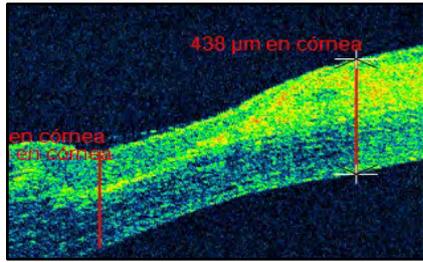
- Edema perilesional "0": no existe edema.
- Edema perilesional "1": valores entre 400 y 500 micras.
- Edema perilesional "2": edema entre 500 y 600 micras.
- Edema perilesional "3": para casos de más de 600 micras.



- **Edema lesional**

Por otro lado, el edema lesional se definió como la presencia de edema en la zona de la queratectomía. Se clasificó de la siguiente manera:

- Edema lesional "0": no existe edema.
- Edema lesional "1": edema por debajo de 400 micras.
- Edema lesional "2": edema entre 400 y 500 micras.
- Edema lesional "3": edema por encima de 500 micras.



### 3.5. HISTOLOGÍA

#### 3.5.1. OBJETIVO

Con el objetivo de detallar el proceso de curación de una úlcera corneal, se estudiaron histológicamente diferentes áreas de la córnea, con sus tipos celulares, así como la existencia de cambios normales o anómalos del epitelio y el estroma en los diferentes individuos. Asimismo, se buscaron diferencias entre los ojos a los que se les aplicó o no la membrana, y la manera de aplicación de la misma.

#### 3.5.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Después del análisis de OCT, los ojos se fijaron y conservaron en formaldehído tamponado al 4%. Se realizaron cortes macroscópicos a nivel de la cámara anterior, incluyendo córnea, limbo y cristalino. La córnea fue seccionada centralmente e incluida en parafina. Se obtuvieron cortes de 4 micras en un microtomo convencional y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E).

#### 3.5.3. METODOLOGÍA DE ESTUDIO

Las 36 muestras corneales se estudiaron histológicamente de manera individual, se observaron con microscopio óptico a 10, 20 y 40 aumentos y se recolectaron datos de cuatro puntos diferentes del epitelio y el estroma corneal:

- **Zona central:** un punto en el centro de la queratectomía.
- **Zona intermedia:** un punto intermedio entre el centro y uno de los bordes del defecto.
- **Zona próxima 1:** un punto cercano a uno de los bordes del defecto.
- **Zona próxima 2:** un punto cercano al otro borde del defecto.

Además, se evaluó el **limbo esclerocorneal**.

### 3.5.3.1. Registro de los datos histológicos

En función de la zona de estudio, se recopilaron y clasificaron los siguientes datos:

#### 1. En el epitelio corneal

- **Número de capas celulares:** se da un valor numérico, según el número de capas.
- **Células basales:** presencia (valor 1) o ausencia (valor 0).
- **Membrana basal:** presencia (valor 1) o ausencia (valor 0).

#### 2. En el estroma corneal

- **Queratocitos:** en función de su actividad se clasificaron en:
  - Maduros: valor 0. Son células sin actividad, normalmente se encuentran en los estratos inferiores del estroma corneal, se caracterizan por presentar un núcleo plano y alargado y estar separadas entre sí.
  - Relativamente inmaduros: valor 1. Queratocitos con núcleo alargado de mayor tamaño y que aparecían en mayor número y con menos separación entre ellos.
  - Inmaduros: valor 2. Células con núcleos muy grandes y nucleolo evidente.
- **Edema simple:** se define como la separación de las lamelas estromales, el espacio entre ellas es transparente. Se clasifica en:
  - Presencia: valor 1.
  - Ausencia: valor 0.
- **Edema con apariencia mixoide:** se define como la separación de las lamelas, pero el espacio interlamelar no es transparente. Se intuye la presencia de mucopolisacáridos. Se clasifica en:
  - Presencia: valor 1.
  - Ausencia: valor 0.

- **Disposición perivascular:** se define como la existencia de células endoteliales en una disposición que se asemeja a la de los capilares o vasos sanguíneos. Se clasifica en:
  - Presencia: valor 1.
  - Ausencia: valor 0.

### 3. En el limbo esclerocorneal.

- **Inflamación:** se define por la presencia de infiltrados de linfocitos perivascuales o intersticiales. Se clasifica en:
  - Negativo: valor 0.
  - Leve: valor 1.
  - Moderado: valor 2.
  - Intenso: valor 3.
- **Capilares neoformados:** se determina la presencia de capilares a este nivel
  - Presencia: valor 1.
  - Ausencia: valor 0.
- **Edema:** se valora la presencia de edema.
  - Presencia: valor 1.
  - Ausencia: valor 0.

#### 3.5.4. ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis de los datos obtenidos en el apartado de histología, se elaboró una fórmula en la que se combinaron todos estos datos en función de si su presencia y/o tipo se considera beneficioso o no para la reparación corneal.

**REPARACIÓN CORNEAL = REGENERACIÓN EPITELIAL + REPARACIÓN ESTROMAL + REPARACIÓN LIMBAL**

1. **Regeneración epitelial:** se recogen los siguientes datos en los diferentes puntos explicados con anterioridad (zona central, zona intermedia, zona próxima 1 y zona próxima 2):

- **Número de células (NCEL):** como valor positivo, a más capas celulares, mayor regeneración.
- **Células basales (BCEL):** como valor positivo, su existencia denota mayor regeneración.
- **Membrana basal (BMEM):** como valor positivo, su existencia denota mayor regeneración.

Por lo tanto:

$$\text{REGENERACIÓN EPITELIAL} = \text{NCEL} + \text{BCEL} + \text{BMEM}$$

2. **Reparación estromal:** la reparación estromal incluye los siguientes datos:

- **Queratocitos (KERAT):** en función del estadio denota, mayor o menor reparación. El mejor valor es el “0”.
- **Edema simple (EDEMA):** su existencia es negativa, denota menor grado de reparación.
- **Edema tipo mixoide (MIX):** su existencia es negativa, denota menor grado de reparación.
- **Vascularización (VASC):** su existencia es negativa, denota menor grado de reparación.

Por lo tanto:

$$\text{REPARACIÓN ESTROMAL} = \text{KERAT (0>1>2)} - \text{EDEMA} - \text{MIX} - \text{VASC}$$

3. **Reparación limbal:** en este caso se incluyen los siguientes datos:

- **Inflamación (LIMBUS\_INFL):** en función del grado de inflamación denota mayor o menor reparación. El valor que denota mayor reparación es el “0”.
  - **Vascularización (LIMBUS\_VASC):** su existencia es negativa, denota menor reparación.
  - **Edema (LIMBUS\_EDEMA):** su existencia es negativa, denota menor reparación.
-

Por lo tanto:

$$\text{REPARACIÓN LIMBAL} = \text{LIMBUS\_INFL (0>1>2>3)} - \text{LIMBUS\_VASC} - \text{LIMBUS\_EDEMA}$$

### 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

#### 3.6.1. DE LOS SIGNOS CLÍNICOS

Para el estudio de los signos clínicos se utilizó un modelo Zero Inflated para la evaluación del impacto de los tratamientos en la progresión del recuento de lesiones oculares en blefaroespasma, disconfort y congestión conjuntival.

Los otros signos clínicos presentaron demasiados resultados nulos, lo que los hizo imposibles de analizar.

Por lo tanto, para cada marcador, se indica como  $N_{(t,d,r,e)}$  para representar el recuento de lesiones en el ojo “e” (derecho o izquierdo) correspondiente al r-ésimo conejo tratado con “t” (Control, Epitelial, Estromal) el día “d” de seguimiento.

Dado que la mayoría de los recuentos son nulos, se modelaron utilizando un modo Zero-inflated de Poisson.

Además, considerando medidas repetidas dentro de cada conejo, incluimos el efecto del conejo como un efecto aleatorio, anidado dentro, que es el efecto ocular (HALL, 2000).

El modelo mixto Zero inflated resultante para cada marcador (blefaroespasma, disconfort y congestión conjuntival) se expresa como:

$$[M1]: N_{t,d,r,e} = \begin{cases} 0 & \text{con probabilidad } p \\ \text{Poisson}(\mu_{t,d,r,e}) & \text{con probabilidad } 1 - p \end{cases}$$

$$\text{siendo: } \ln(\mu_{t,d,r,e}) = \alpha + \beta d + \gamma_t + u_r + v_{e(r)}$$

Aquí,  $\gamma_t$ , representa el efecto fijo del tratamiento (el control se toma como referencia y, por lo tanto,  $\gamma_{\text{Control}} = 0$ ),  $u_r \sim N(0, \sigma^2)$  denota el efecto aleatorio del conejo y  $v_{e(r)}$  es el efecto aleatorio de ojo “e” anidado en el conejo “r”. Además, asumimos que la probabilidad de ceros  $p_d$  puede depender del día de observación, con una probabilidad mayor hacia el final del seguimiento.

### 3.6.2. DE LA OCT

En el estudio de las mediciones de OCT, las variables se resumieron como medianas según la semana, ojo y modo de colocación de la membrana amniótica (epitelial y estromal)

### 3.6.3. DE LA HISTOLOGÍA

En este apartado, proponemos una puntuación de reparación corneal como un promedio ponderado de los tres marcadores de reparación, que son la reparación epitelial, estromal y del limbo.

Por lo tanto, para ambos ojos, la puntuación de reparación corneal se define como una combinación lineal convexa de la siguiente manera:

$$\text{Reparación corneal} = w_1 \cdot R. \text{ Epitelial} + w_2 \cdot R. \text{ Estromal} + w_3 \cdot R. \text{ Limbo}$$

Para determinar los coeficientes  $w_1, w_2, w_3$ , consideramos la diferencia:

$$D = \text{Reparación corneal}_{\text{izquierda}} - \text{Reparación corneal}_{\text{derecha}}$$

Dado que el ojo derecho se utilizó como control en todos los casos, D mide el efecto de la membrana amniótica en sus dos modos de inserción en el ojo izquierdo (epitelial y estromal) sobre la reparación corneal en relación con el control (ojo derecho). Por lo tanto, nos referimos a D como la superioridad de la membrana insertada en el ojo izquierdo frente al control (ojo derecho). Por tanto, las comparaciones entre tratamientos se realizarán mediante D-diferencias según el siguiente modelo:

$$D = \mu + \alpha \cdot AM + \beta \cdot \text{Periodo} + \gamma \cdot AM \times \text{Periodo} + \text{Error} \quad [M2]$$

Aquí, “AM”, representa el factor que denota el modo de inserción de la membrana, siendo el modo epitelial y estromal codificados como 1 y 0 respectivamente (el estromal se toma como referencia). “Período” toma valores de 0 o 1 según si es en la primera semana o en la 2-4, y “Error” denota las variables aleatorias correspondientes a una variabilidad inexplicable.

Suponemos que estas variables son independientes y están distribuidas normalmente con una media de cero y una desviación estándar  $\sigma$ .

Elegimos los pesos  $w_1, w_2, w_3$ , como aquellos que maximizan el coeficiente- $R^2$  correspondiente al ajuste del modelo [M2] utilizando el método de mínimos cuadrados.

Es importante señalar que  $\gamma$  representa el efecto de la interacción entre los factores AM y Periodo (conurrencia de la membrana amniótica en el modo epitelial con el segundo periodo).

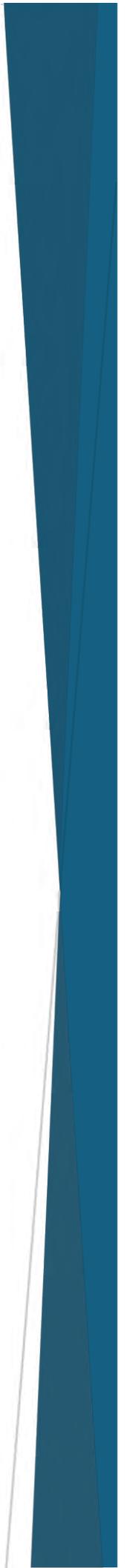
El modelo se estimó utilizando mínimos cuadrados y se resumió mediante estimaciones y errores estándar (SE). También se estimaron medias ajustadas para las diferencias D por período y modo de inserción de la membrana. Debido al bajo tamaño de la muestra, los parámetros se estimaron utilizando intervalos de confianza del 90%.

La significación estadística se estableció en  $P < 0.05$ . Los datos se analizaron utilizando el paquete R, versión 4.2.1 (R Development Core Team, 2022).

El modelo zero-inflated de Poisson model se estimó utilizando el paquete R “glmmTMB” (<https://github.com/glmmTMB/glmmTMB>).

El modelo para las diferencias en la reparación corneal (D), se analizó utilizando el paquete R “emmeans” (<https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html>).

# Resultados





---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. SIGNOS CLÍNICOS

En función del grupo al que pertenecían, se hicieron exploraciones oculares a los individuos en los días determinados previamente cuyos resultados se exponen en las siguientes líneas.

#### 4.1.1. GRUPO 1:

Los resultados de las exploraciones del grupo 1 (individuos 1-6) se detallan en las **Tablas SC\_1 - SC\_12**.

En el grupo 1, en el momento de la técnica quirúrgica resultaron perforadas dos córneas (**Imagen SC\_1**), los individuos afectados fueron el 2OS y el 6OD.

Ningún individuo de este grupo presentó hipopion.

1. Ningún individuo presentó en este grupo **vascularización superficial** durante el proceso de exploración.
2. **La vascularización profunda** se determinó en 2 ocasiones en un mismo individuo, en grado 1 (**Imagen SC\_5**).
3. Al igual que para el signo anterior, **el edema** se encontró en 2 ocasiones también en el individuo: en este caso, en grado 2 (**Imagen SC\_7**).
4. Con respecto a la presencia de **secreción**, se encontró en 5 días, siempre en grado 1, distribuyéndose en 3 ocasiones en el OD y en 2 en el OS (**Imagen SC\_9**).
5. La presencia de **blefarospasmo**, se determinó en 22 ocasiones en grado 1, 11 de las cuales en el OD y 11 en el OS (**Imagen SC\_10**). En grado 2 fue hallado en 9 días, 5 en el OD y 4 en el OS (**Imagen SC\_11**). Y en grado 3 sólo en 2 ocasiones, 1 en OD y 1 en OS (**Imagen SC\_12**).
6. **El disconfort** se encontró en 29 días en grado 1, 18 veces en el OD y 11 en el OS (**Imagen SC\_13**); en grado 2, se determinó en 8 ocasiones, 4 en el OD y 4 en el OS (**Imagen SC\_14**). El grado 3 se halló en 2 días: 1 en el OD y 1 en el OS (**Imagen SC\_15**).
7. Con respecto a **la congestión conjuntival**, en grado 1 se determinó en 23 días, 13 de los cuales en OD y 10 en OS (**Imagen SC\_16**). En grado 2, se encontró en 14

ocasiones, 7 en el OD y 7 en el OS (**Imagen SC\_17**). El grado 3 se determinó en 8 días, 6 en el OD y 2 en el OS (**Imagen SC\_18**).

#### 4.1.2. GRUPO 2:

Los resultados de las exploraciones del grupo 2 (individuos 7-12) se detallan en las **tablas SC\_13 - SC\_24**.

En este grupo, resultaron perforadas las córneas de los individuos 8OD y 8OS (**Imagen SC\_1**).

Ningún individuo de este grupo presentó hipopion.

1. **La vascularización superficial**, se encontró mayoritariamente en las córneas perforadas: en 7 ocasiones en grado 1, 4 de ellas en OD y 3 en OS (**Imagen SC\_2**). En grado 2 se determinó en 3 días, 1 en OD y 2 en OS (**Imagen SC\_3**). El mismo número de ocasiones y en la misma proporción se encontró para el grado 3 (**Imagen SC\_4**).
2. **La vascularización profunda**, se encontró en 2 ocasiones en OD y 2 en OS ambas, en grado 1 (**Imagen SC\_5**). Todos los casos pertenecieron a las córneas perforadas.
3. **El edema** se pudo determinar en 6 días en grado 1, 3 para el OD y 3 para el OS (**Imagen SC\_6**). En grado 2, se encontró en 2 ocasiones, 1 para OD y 1 para OS (**Imagen SC\_7**). El grado 3 se halló en 3 ocasiones, 1 para el OD y 2 para el OS (**Imagen SC\_8**). Este signo clínico se encontró exclusivamente en los casos de córneas perforadas.
4. Con respecto a **la secreción**, solo se determinó en grado 1 y fue en 10 ocasiones, distribuidas 4 en OD y 6 en OS (**Imagen SC\_9**).
5. La presencia de **blefarospasmo** se encontró en grado 1 en 17 días, 8 de ellos en OD y 9 en OS (**Imagen SC\_10**). En grado 2, en 14 ocasiones, 6 en OD y 8 en OS (**Imagen SC\_11**). En grado 3, en 4, 1 de ellas en OD y las otras 3 en OS (**Imagen SC\_12**).
6. **El disconfort** se pudo determinar en grado 1 en 21 ocasiones, 7 de ellas en el OD y 12 en el OS (**Imagen SC\_13**). En grado 2 se determinó en 13 días, 6 de los cuales en OD y 7 en OS (**Imagen SC\_14**). Mientras que el grado 3 sólo se encontró en 4 ocasiones, 1 de las cuales en OD y 3 en OS (**Imagen SC\_15**).

7. **La congestión conjuntival** fue el signo clínico más encontrado en este grupo. En grado 1 se encontró hasta en 27 ocasiones, 16 de ellas en OD y 11 en OS (**Imagen SC\_16**). En grado 2, se determinó en 25 días, 13 de los cuales en OD y 12 en OS (**Imagen SC\_17**). Mientras que en el grado 3 fueron 9 las ocasiones halladas, 3 en OD y 6 en OS (**Imagen SC\_18**).

#### 4.1.3. GRUPO 3

Los resultados de las exploraciones del grupo 3 (individuos 13-18) se detallan en las **tablas SC\_25 - SC\_36**.

En este grupo, ninguna córnea resultó perforada.

Ningún individuo de este grupo presentó hipopion.

1. Ningún individuo de este grupo presentó **vascularización superficial**.
2. Ningún individuo de este grupo presentó **vascularización profunda**.
3. Ningún individuo de este grupo presentó **edema corneal**.
4. Solo en 3 días de exploración se encontró **secreción**, todas en grado 1, 1 de las cuales en OD y 2 en OS (**Imagen SC\_9**).
5. **El blefarospasmo**, en grado 1 se presentó en 17 ocasiones, de las cuales 9 fueron en OD y 8 en OS (**Imagen SC\_10**). En cambio, en grado 2 se pudo constatar en 6 ocasiones, 3 en OD y 3 en OS (**Imagen SC\_11**).
6. **El discomfort**, al igual que en los otros signos clínicos en este grupo, se presentó en grado 1 y grado 2: en grado 1, en 21 ocasiones, de las cuales 11 fueron en OD y 10 en OS (**Imagen SC\_13**); mientras que, el grado 2 en 6 días, 3 de los cuales afectaron al OD y 3 al OS (**Imagen SC\_14**).
7. En este grupo, **la congestión conjuntival**, fue también el signo clínico encontrado con mayor frecuencia. En grado 1, 15 veces, 8 en OD y 7 en OS (**Imagen SC\_16**) y, en grado 2, hasta en 27 ocasiones, de las cuales 14 fueron en OD y 13 en OS (**Imagen SC\_17**).

#### 4.1.4. RESULTADOS ESTADÍSTICOS

La siguiente tabla (**Tabla EST\_1**) resume la estimación de los efectos fijos correspondientes al modelo zero-inflated de Poisson. Para los signos clínicos de

blefarospasmo, discomfort y congestión conjuntival, el recuento de lesiones mostró una disminución constante durante todo el período de seguimiento ( $p < 0.001$ ).

**Tabla EST\_1:** Estimation of the zero-inflated Poisson models.

<b>Marker</b>	<b>Effect</b>	<b>Coefficient (SE)</b>	<b>P-value</b>
<i>Blepharospasm</i>	(Intercept)	0.88 (0.21)	< 0.001
	Days ( $\beta$ )	-0.57 (0.06)	< 0.001
	<i>Treatment (<math>\gamma_t</math>)</i>		
	Control (reference)	0	-
	AM in mode epithelial	0.48 (0.21)	0.02
	AM in mode stromal	-0.44 (0.27)	0.102
<i>Discomfort</i>	(Intercept)	0.96 (0.20)	< 0.001
	Days ( $\beta$ )	-0.54 (0.05)	< 0.001
	<i>Treatment (<math>\gamma_t</math>)</i>		
	Control (reference)	0	-
	AM in mode epithelial	0.37 (0.20)	0.063
	AM in mode stromal	-0.44 (0.25)	0.083
<i>Conjunctival congestion</i>	(Intercept)	1.32 (0.14)	< 0.001
	Days	-0.42 (0.03)	< 0.001
	<i>Treatment (<math>\gamma_t</math>)</i>		
	Control (reference)	0	-
	AM in mode epithelial	0.18 (0.15)	0.24
	AM in mode stromal	-0.36 (0.18)	0.048

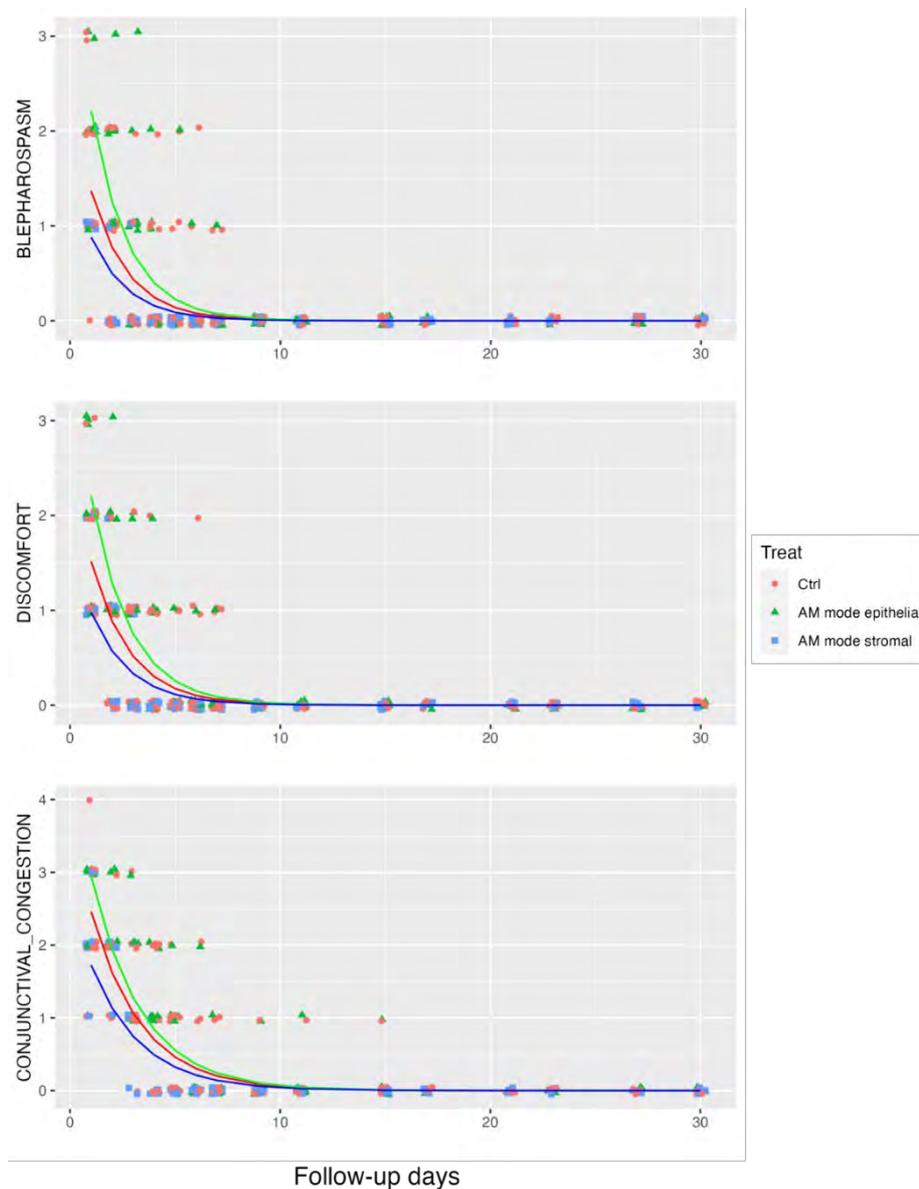
En cuanto al blefarospasmo, el modo de inserción epitelial se asoció consistentemente con un mayor número esperado de lesiones en comparación con el control durante todo el seguimiento ( $p = 0.02$ ), mientras que el modo de inserción estromal no mostró una diferencia significativa con respecto al control ( $p = 0.102$ ).

Aunque no se alcanzó significación estadística, para el signo clínico de discomfort, el recuento de lesiones tendió a ser mayor cuando la membrana se insertó en el modo epitelial en comparación con el control ( $p = 0.063$ ) y menor que el control cuando se insertó en el modo estromal ( $p = 0.083$ ).

Para la congestión conjuntival, el número esperado de lesiones se redujo significativamente en relación con el control para el modo de inserción estromal ( $p=0.048$ ), mientras que el modo de inserción epitelial no mostró diferencias significativas con respecto al control ( $p=0.24$ ).

Estos resultados se ilustran en la siguiente figura (**Fig EST\_1**), donde para cada marcador, se cuenta la evolución de la lesión según el tratamiento. Las curvas corresponden a los ajustes del modelo mixto.

**Fig EST\_1:** For each marker, evolution of lesion counts according to treatment. The curves correspond to the mixed-model fits.



## 4.2. OCT

Se encontraron diferentes resultados en las medidas realizadas, referentes al espesor corneal y a la existencia y tipo de edema presente.

### 4.2.1. GRUPO 1

En este grupo, en el momento de realizar la intervención quirúrgica, se perforaron en distinta medida los ojos 2OS (**Imagen OCT\_1**) y 6OD (**Imagen OCT\_2**).

No se pudieron obtener datos de diversas medidas de OCT para todos los ojos: en el caso del espesor corneal normal (Total thickness); y del espesor central (Central thickness) no hay datos fiables de los ojos 4OD (**Imagen OCT\_3**) y 6OD (**Tabla OCT\_1**). En el caso del 4OD por una reacción inflamatoria y edematosa generalizada en el ojo, lo que imposibilitó la recogida de estos datos; y en el de 6OD, probablemente debido a la reacción derivada de la perforación.

La tabla OCT\_1 recoge las medidas de espesor corneal realizadas en los distintos puntos estudiados. De ella se resaltan los valores máximos y mínimos para cada medida.

1. **Espesor corneal normal (Imagen OCT\_4; Imagen OCT\_5):** el valor mínimo es de 400 $\mu$ , (ojos 1OS y 1OD); el valor máximo es de 492 $\mu$  (ojo 3OS).
2. **Espesor máximo de la úlcera (Imagen OCT\_4; Imagen OCT\_5):** el valor mínimo es de 195 $\mu$ , (ojo 4OD) y el valor máximo 368 $\mu$  (ojo 2OD).
3. **Espesor central (Imagen OCT\_6 e Imagen OCT\_7):** el valor mínimo en este caso es de 261 $\mu$  (ojo 1OD) y el valor máximo 484 $\mu$  (2OD).

La tabla OCT\_2 recoge la presencia y tipo de edema en los distintos puntos estudiados.

1. **Edema perilesional (Imagen OCT\_8; Imagen OCT\_9; Imagen OCT\_10):** el edema perilesional está presente en 9 de los 12 ojos y se distribuye de la siguiente manera:
  - **Ojo derecho:** presente en 1 caso en grado 1; en 3 casos en grado 2; y en 1 caso en grado 3.
  - **Ojo izquierdo:** presente en 1 caso en el grado 1 y en 3 casos en grado 2.

2. **Edema lesional (Imagen OCT\_11; Imagen OCT\_12; Imagen OCT\_13):** se encuentra en 8 de los 12 casos, su distribución es la siguiente:

- **Ojo derecho:** presente en 1 caso en grado 1; 3 casos en grado 2; y 1 caso en grado 3.
- **Ojo izquierdo:** Presente en 2 casos en grado 1; y 1 caso en grado 2.

#### 4.2.2. GRUPO 2

En este grupo ocurrieron perforaciones en ambos ojos del individuo 8 (**Imagen OCT\_14; Imagen OCT\_15**).

Se recopilaron los datos de espesor corneal excepto para el espesor total para los ojos 7OS (**Imagen OCT\_16**), 8OD y 8OS (**Imagen OCT\_14; Imagen OCT\_15**). En la medida del espesor de la úlcera solo faltaron los datos del 8OD; y para el espesor central, para 8OD y 8OS (**Tabla OCT\_3**).

La **tabla OCT\_3** recoge las medidas de espesor corneal realizadas en los distintos puntos estudiados. De ella se resaltan los valores máximos y mínimos para cada medida.

1. **Espesor corneal normal (Imagen OCT\_17; Imagen OCT\_18):** el valor mínimo es de 452 $\mu$  (ojo 9OS), el máximo es de 470 $\mu$  (ojo 9OD).
2. **Espesor máximo de la úlcera (Imagen OCT\_17; Imagen OCT\_18):** el mínimo es de 290 $\mu$  (ojo 10OD) y el máximo 394 $\mu$  (ojo 8OS).
3. **Espesor central (Imagen OCT\_19; Imagen OCT\_20):** el mínimo en este caso es de 260 $\mu$  (ojo 7OD) y el máximo 420 $\mu$  (ojo 12OS).

La **tabla OCT\_4** recoge la presencia y tipo de edema en los distintos puntos estudiados.

1. **Edema perilesional (Imagen OCT\_21; Imagen OCT\_22):** está presente en 5 de los 12 ojos, y se distribuye de la siguiente manera:
  - **Ojo derecho:** presente en 1 caso en grado 1 y en 1 caso en grado 3.
  - **Ojo izquierdo:** presente en 2 casos en el grado 1 y en 1 casos en grado 3.
2. **Edema lesional (Imagen OCT\_23; Imagen OCT\_24; Imagen OCT\_25):** el edema lesional se encuentra en 6 de los 12 casos. Su distribución es la siguiente:

- **Ojo derecho:** presente en 1 caso en grado 1 y 2 casos en grado 3.
- **Ojo izquierdo:** presente en 2 casos en grado 2 y 1 caso en grado 3.

#### 4.2.3. GRUPO 3

En este grupo no ocurrieron perforaciones en ninguno de los ojos estudiados y se pudieron recopilar todos los datos para todas las medidas (**Tabla OCT\_5**).

La **tabla OCT\_5** recoge las medidas de espesor corneal realizadas en los distintos puntos estudiados. De ella se resaltan los valores máximos y mínimos para cada medida.

1. **Espesor corneal normal (Imagen OCT\_26; Imagen OCT\_27):** el valor mínimo es de 404 $\mu$  que corresponde al ojo 14OS, el máximo es de 445 $\mu$  en el ojo 14OD.
2. **Espesor máximo de la úlcera (Imagen OCT\_26; Imagen OCT\_27):** el mínimo es de 226 $\mu$  en el ojo 17OS y el máximo 310 $\mu$  en el 16OD.
3. **Espesor central (Imagen OCT\_28; Imagen OCT\_29):** el mínimo en este caso es de 275 $\mu$  en el ojo 18OS y el máximo 422 $\mu$  en el 13OS.

La **tabla OCT\_6** recoge la presencia y tipo de edema en los distintos puntos estudiados.

1. **Edema perilesional (Imagen OCT\_30; Imagen OCT\_31).** Está presente en 6 de los 12 ojos y se distribuye de la siguiente manera:
  - **Ojo derecho:** presente en 3 casos en grado 1 y en 1 caso en grado 2.
  - **Ojo izquierdo:** presente sólo en 2 casos en el grado 2.
2. **Edema lesional (Imagen OCT\_32; Imagen OCT\_33):** se encuentra en los 12 casos, su distribución es la siguiente:
  - **Ojo derecho:** presente en 4 casos en grado 1 y 2 casos en grado 2.
  - **Ojo izquierdo:** al igual que en el ojo izquierdo, presente en 4 casos en grado 1 y 2 casos en grado 2.

#### 4.2.4. RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Las características del espesor corneal por ojo y su seguimiento se resumen en la siguiente tabla (**Tabla EST\_2**):

**Tabla EST\_2: Corneal thickness according to treatment mode and week**

Thickness	Week	<i>Mode of insertion of the amniotic membrane (AM)</i>			
		Epithelial N = 9		Stromal N = 9	
		Left eye	Right eye	Left eye	Right eye
<i>Total</i>	1	413	483	422	470
	2	452	464	454	453
	4	427	422	429	429
<i>Ulcer</i>	1	272	219	259	234
	2	379	320	344	290
	4	285	273	254	245
<i>Central</i>	1	283	343	296	256
	2	368	306	418	409
	4	325	336	301	288

Data are medians.

Esta tabla presenta los valores de las medianas de los espesores corneales en cada ojo en diferentes puntos de la queratectomía: espesor corneal normal (total), el espesor máximo de la úlcera (ulcer max) y el espesor central (central).

Este resumen está organizado en función de la semana de observación y el método mediante el cual se insertó la membrana amniótica en el ojo izquierdo de cada conejo.

A lo largo del período de seguimiento, los espesores entre los dos ojos no mostraron diferencias estadísticamente significativas, posiblemente debido al pequeño tamaño muestral.

Lo mismo ocurren en la **Tabla EST\_3**, donde se presenta el análisis estadístico del edema lesional y perilesional.

**Tabla EST\_3: Statistical analysis of the lesional and perilesional edema.**

Week	Edema	Control eye	Eye with the amniotic membrane	
			≤ 400	> 400
1	Peri-lesional	≤ 400	0	0
		> 400	0	3
2		≤ 400	0	0
		> 400	0	2
4		≤ 400	0	0
		> 400	0	1
1	Lesional	≤ 400	1	0
		> 400	1	1
2		≤ 400	0	1
		> 400	0	2
4		≤ 400	4	0
		> 400	0	2

Data are frequencies

Esta tabla demuestra que, con el tiempo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los ojos de estudio y de control.

### 4.3.HISTOLOGÍA

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en el estudio histológico para el epitelio corneal, el estroma corneal y el limbo esclerocorneal.

#### 4.3.1. EPITELIO CORNEAL

Los resultados están recogidos en las **tablas HIST\_1** (OD) e **HIST\_2** (OS). Se obtuvieron datos referentes al número de capas celulares y a la presencia de células basales y de la membrana basal.

##### 1. Capas epiteliales

- **Grupo 1 (Imagen HIST\_1):** el número máximo de capas epiteliales es de 4 en OD; mientras que en OS es de 6 (este valor solo se encontró en una de las medidas realizadas). El número mínimo de capas coincide en OD y OS: su valor es 0,

---

circunstancia que ocurre 7 veces en las medidas de OD, y solo en 1 las del OS. En la mayoría de los casos, el número de capas de células es de 2, en el OD, y entre 2-4 en OS.

- **Grupo 2 (Imagen HIST\_2):** el número máximo de capas de células epiteliales encontradas en OD es de 6 (solo en 1 caso), mientras que en OS es de 10, también en un solo caso (en este espécimen, la córnea fue perforada en el momento de la queratectomía, por lo que, para evaluar el número de las capas que presentaron la mayoría de los OS, este caso no fue tomado en cuenta). El valor obtenido con mayor frecuencia fue de 3-4 capas para el OS y 3 para el OD. El número mínimo de capas es 0, para ambos ojos.
- **Grupo 3 (Imagen HIST\_3):** el número máximo de capas celulares es de 6 para el OD (en un único punto de medición) y, de 4 capas para el OS (en 6 de las mediciones). Tanto para OD como para OS, el número mínimo de capas es de 0: esta medida se encuentra 7 veces en el OD, y 5 en el OS. En la mayoría de los casos, encontramos 2-3 capas en el OD; y 3-4 capas en el OS.

## 2. Células basales

En cuanto a la presencia de células basales, los resultados encontrados para OD y OS coinciden en el grupo 1, siendo su presencia negativa (**Imagen HIST\_4**). En los grupos 2 y 3, se encontraron en la mayoría de los puntos analizados, tanto en OD como en OS. (**Imagen HIST\_5**)

## 3. Membrana basal

En el grupo 1 la membrana basal no aparece en el epitelio en la mayoría de los casos (**Imagen HIST\_4**); al contrario que sucede en el grupo 2, donde se encuentra en 16 (OD) y 15 (OS) de los 24 puntos analizados. En el grupo 3 se encontró diferencia entre los ojos: en el OD, solo la mitad de los puntos evaluados presentó esta membrana; mientras que en el OS se encontró en la mayoría de ellos (**Imagen HIST\_5**).

### 4.3.2. ESTROMA CORNEAL

Los resultados se muestran en las **tablas HIST\_3** (OD) y la **HIST\_4** (OS).

---

## 1. Queratocitos

- **Grupo 1 (Imagen HIST\_6):** hay coincidencias en el tipo de queratocitos encontrados en el estroma, la mayoría son inmaduros, aunque encontramos tanto queratocitos maduros (en mayor proporción en el OD) como queratocitos muy activos (en mayor número en el OS).
- **Grupo 2 (Imagen HIST\_7):** en contraste, la mayoría de los queratocitos en ambos casos presentan un cierto grado de actividad, con solo 4 (OD) y 5 casos (OS) de queratocitos maduros.
- **Grupo 3 (Imagen HIST\_8):** los queratocitos de este grupo tienen tendencia a la actividad, encontrando queratocitos inmaduros y muy activos principalmente en ambos subgrupos, aunque los queratocitos maduros también se encuentran en algunos lugares, siendo su número más abundante en el OD.

## 2. Edema

En cuanto a la presencia de edema simple en el estroma, se encontró en la mayoría de los puntos analizados en OD y OS de los 3 grupos (**Imagen HIST\_9**). Esto no sucede con el edema de tipo mixoide, donde se encuentran diferencias entre los grupos y entre el OD y OS (**Imagen HIST\_10**).

## 3. Vascularización

La presencia de patrones vasculares en el estroma es otra de las diferencias entre los grupos. En el grupo 1 (**Imagen HIST\_11**), no hay coincidencia entre OD y OS: en el OD la mitad de los casos los presentaron y la otra mitad no, mientras que en el OS solo 6 lo presentaron y 18 no. En el grupo 2 (**Imagen HIST\_12**), existen coincidencias entre el OD y el OS, no presentan patrones vasculares en la mayoría de los puntos analizados, lo mismo ocurre en la mayoría de los puntos del OD del grupo 3 (**Imagen HIST\_13**), pero no en los del OS, donde en la mayoría de ellos, encontramos patrones vasculares.

### 4.3.3. LIMBO CORNEAL

Los resultados están descritos en las **tablas HIST\_5** (OD) y la **HIST\_6** (OS).

## 1. Inflamación

Analizando la clasificación del tipo de inflamación que se encuentra en el limbo esclerocorneal, en el grupo 1 (**Imagen HIST\_14**), en OD, hay el mismo número de casos que presentan una inflamación leve, moderada y abundante, mientras que en OS solo 1 caso puede clasificarse como inflamación moderada y el resto como leve.

Esta tendencia en la cual hay más inflamación en el OD que en el OS, se repite en los siguientes grupos: en el grupo 2 (**Imagen HIST\_15**), la mitad de los casos de OD son leves y en la otra mitad no existe, mientras que en el OS solo hay 1 caso con signos inflamatorios leves y 5 sin inflamación. En el grupo 3, (**Imagen HIST\_16**), 2 casos tienen inflamación leve y 4 no la presentan en el OD, pero no hay signos de inflamación en ningún caso del OS.

## 2. Vascularización

Con respecto a la presencia de vascularización presente en el limbo, existe una coincidencia entre grupos y subgrupos, ya que está presente en todos los casos evaluados (**Imagen HIST\_17**).

## 3. Edema

Finalmente, la presencia de edema en el limbo coincide en los dos primeros grupos, tanto en OD como en OS (**Imagen HIST\_18**). En el grupo 3, hay diferencias en la presencia de edema, no se encontró en 1 caso de OD y en 2 de OS.

### 4.3.4. RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Como resumen de las variaciones en la puntuación de la reparación corneal (epitelial, estromal y limbal) entre los dos ojos, considerando el modo de implantación de la membrana y la semana de seguimiento se presenta la **Tabla EST\_4**:

En esta tabla se observa que al evaluar las diferencias en la reparación corneal (ojo izquierdo menos ojo derecho) según el grupo de tratamiento, la reparación epitelial de la primera semana exhibe una diferencia casi estadísticamente significativa entre los métodos de colocación de membranas ( $p= 0.077$ ).

**Tabla EST\_4:** Differences of the corneal repair (left eye minus right eye) according to treatment group

	Week	<i>AM insertion mode</i>		<i>P-value*</i>
		Epithelial N = 9	Stromal N = 9	
<i>Epithelial</i>	1	0 (-3; 1.5)	10 (10; 12.5)	0.077
	2	1 (-3; 12)	-3 (-10; 4)	0.7
	4	-2 (-2.5; 6)	-1 (-2; 0)	1
<i>Stroma</i>	1	1 (0.5; 2)	1 (0.5; 4)	1
	2	2 (1; 2)	0 (0; 0.5)	0.346
	4	0 (-0.5; 2)	0 (-1.5; 1.5)	0.825
<i>Limbo</i>	1	-1 (-1; -0.5)	-1 (-1.5; -0.5)	0.814
	2	0 (-0.5; 0)	0 (-0.5; 0)	1
	4	0 (0; 0)	0 (-0.5; 0)	0.505

Data are medians (25<sup>th</sup> – 75<sup>th</sup> percentile)

(\*) Wilcoxon test for independent samples

La puntuación del modelo de reparación corneal que codujo al mejor ajuste [M2] fue:

$$\text{Reparación corneal} = 0.0675x \text{ R.Epithelial} + 0.195x \text{ R.Estromal} + 0.7375x \text{ R. Limbo}$$

El análisis de los efectos de la membrana amniótica en la reparación corneal se resume en las dos tablas expuestas a continuación (**Tabla EST\_5** y **Tabla EST\_6**):

**Tabla EST\_5:** Linear model with treatment-week interaction for the difference *D* in proposed corneal repair score between left and right eyes (left minus right).

	Coefficient (SE)	<i>P-value</i>
(Intercept)	0.570 ± 0.312)	0.089
<i>Mode of insertion of the AM</i>		
Stromal	0 (Reference)	
Epithelial	-0.869 (0.441)	0.069
<i>Period</i>		
Week 1	0 (Reference)	
Weeks 2 and 4	-0.918 (0.382)	0.03
Interaction: epithelial mode of insertion and weeks 2-4*	1.615 (0.540)	0.01

(\*) The treatment-period interaction leads to the fact that in the first period AM is more effective in stromal mode while in the second period it is more effective in epithelial mode.

**Tabla EST\_6:** Adjusted means [90% CI†] deduced from the linear model.

<i>Period</i>	<i>Mode of insertion of the AM</i>		
	Stromal*	Epithelial*	Epithelial vs Stromal**
Week 1	0.570 [ 0.021; 1.119]	-0.299 [ -0.848; 0.250]	-0.869 [ -1.645; -0.093]
Weeks 2 and 4	-0.348 [ -0.736; 0.040]	0.397 [ 0.009; 0.785]	0.745 [ 0.197; 1.294]

(\*) Difference of the corneal repairs between the left and right eyes; adjusted means assess the superiority of AM in both modes (left eye) relative to the control (right eye).

(\*\*) Comparison of the epithelial and stromal insertion modes: superiority of the epithelial mode insertion minus superiority of the stromal mode AM.

(†) Since the sample size was small, 90% confidence intervals were used.

En la primera semana, el valor esperado de la puntuación de reparación fue mayor cuando se utilizó el modo de inserción estromal en comparación con el control (superioridad de la puntuación de la posición estromal vs control = 0.570; IC 90%= 0.021).

Sin embargo, en el segundo período, la colocación de la membrana por la cara epitelial fue superior al control (diferencia de puntuaciones = 0,397; IC 90%= 0.009; 0.785).

Finalmente, cuando se comparan directamente los modos de inserción, el modo estromal muestra mayor efectividad en el primer período (superioridad de la puntuación epitelial vs estromal = 0.869; IC 90%=-1.655; -0.093) mientras que, en el segundo período, el modo epitelial es más efectivo que el modo estromal (superioridad de la puntuación epitelial vs estromal= 0.745; IC del 90%= 0.197; 1.294).

## 4.4.ANEXO TABLAS

### 4.4.1. SIGNOS CLÍNICOS

**TABLA SC\_1:** signos clínicos del OD del individuo 1.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
1	2	0	0	0	0	0	0	0	1
1	3	0	0	0	0	0	0	0	0
1	4	0	0	0	0	0	0	0	0
1	5	0	0	0	0	0	0	0	0
1	6	0	0	0	0	0	0	0	0
1	7	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_2:** signos clínicos del OS del individuo 1.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
1	1	0	0	0	0	2	2	0	1
1	2	0	0	0	1	1	1	0	2
1	3	0	0	0	0	1	1	0	1
1	4	0	0	0	0	1	1	0	1
1	5	0	0	0	0	0	0	0	0
1	6	0	0	0	0	0	0	0	0
1	7	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_3:** signos clínicos del OD del individuo 2.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
2	1	0	0	0	0	1	1	0	2
2	2	0	0	0	0	1	1	0	1
2	3	0	0	0	0	1	1	0	1
2	4	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6	0	0	0	0	0	0	0	0
2	7	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_4:** signos clínicos del OS del individuo 2.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
2	1	0	0	0	1	3	3	0	3
2	2	0	0	0	0	1	1	0	2
2	3	0	0	0	0	1	1	0	2
2	4	0	0	0	0	0	0	0	1
2	5	0	0	0	0	0	0	0	1
2	6	0	0	0	0	0	0	0	0
2	7	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_5:** signos clínicos del OD del individuo 3.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
3	1	0	0	0	0	1	1	0	1
3	2	0	0	0	0	0	0	0	1
3	3	0	0	0	0	0	0	0	1
3	4	0	0	0	0	0	0	0	1
3	5	0	0	0	0	0	0	0	0
3	6	0	0	0	0	0	0	0	0
3	7	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_6:** signos clínicos del OS del individuo 3.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
3	1	0	0	0	0	2	2	0	2
3	2	0	0	0	0	1	1	0	2
3	3	0	0	0	0	1	1	0	1
3	4	0	0	0	0	0	0	0	1
3	5	0	0	0	0	0	0	0	0
3	6	0	0	0	0	0	0	0	0
3	7	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_7:** signos clínicos del OD del individuo 4.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
4	1	0	0	0	0	1	1	0	3
4	2	0	0	0	0	0	0	0	2
4	3	0	0	0	0	0	0	0	1
4	4	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5	0	0	0	0	1	1	0	1
4	6	0	1	2	0	2	2	0	2
4	7	0	1	2	1	1	1	0	1

**TABLA SC\_8:** signos clínicos del OS del individuo 4.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
4	1	0	0	0	0	1	1	0	3
4	2	0	0	0	0	0	0	0	2
4	3	0	0	0	0	0	0	0	1
4	4	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5	0	0	0	0	0	0	0	0
4	6	0	0	0	0	0	0	0	0
4	7	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_9:** signos clínicos del OD del individuo 5.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
5	1	0	0	0	0	2	2	0	3
5	2	0	0	0	0	1	1	0	2
5	3	0	0	0	0	0	1	0	1
5	4	0	0	0	0	0	1	0	0
5	5	0	0	0	0	0	1	0	0
5	6	0	0	0	0	0	1	0	0
5	7	0	0	0	0	0	1	0	0

**TABLA SC\_10:** signos clínicos del OS del individuo 5.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
5	1	0	0	0	0	2	2	0	3
5	2	0	0	0	0	1	1	0	2
5	3	0	0	0	0	0	0	0	1
5	4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
5	6	0	0	0	0	0	0	0	0
5	7	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_11:** signos clínicos del OD del individuo 6.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
6	1	0	0	0	1	3	3	0	3
6	2	0	0	0	1	2	2	0	3
6	3	0	0	0	0	1	1	0	3
6	4	0	0	0	0	2	2	0	2
6	5	0	0	0	0	2	1	0	2
6	6	0	0	0	0	1	1	0	1
6	7	0	0	0	0	1	1	0	1

RESULTADOS

**TABLA SC\_12:** signos clínicos del OS del individuo 6.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
6	1	0	0	0	0	2	2	0	2
6	2	0	0	0	0	1	1	0	1
6	3	0	0	0	0	1	1	0	1
6	4	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	6	0	0	0	0	0	0	0	0
6	7	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_13:** signos clínicos del OD del individuo 7.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
7	1	0	0	0	1	2	2	0	3
7	2	0	0	0	0	1	1	0	2
7	3	0	0	0	0	0	1	0	1
7	4	0	0	0	0	0	0	0	1
7	5	0	0	0	0	0	0	0	0
7	6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	7	0	0	0	0	0	0	0	0
7	9	0	0	0	0	0	0	0	0
7	11	0	0	0	0	0	0	0	0
7	15	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_14:** signos clínicos del OS del individuo 7.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
7	1	0	0	0	0	2	3	0	3
7	2	0	0	0	0	2	2	0	3
7	3	0	0	0	1	2	2	0	2
7	4	0	0	0	0	1	1	0	2
7	5	0	0	0	0	0	0	0	1
7	6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	7	0	0	0	0	0	0	0	0
7	9	0	0	0	0	0	0	0	0
7	11	0	0	0	0	0	0	0	0
7	15	2	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_15:** signos clínicos del OD del individuo 8.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
8	1	0	0	0	1	3	3	0	3
8	2	0	0	0	1	2	2	0	3
8	3	0	0	0	1	2	2	0	2
8	4	0	0	0	0	1	1	0	2
8	5	1	0	1	0	1	0	0	1
8	6	1	0	0	0	0	0	0	1
8	7	1	0	1	0	0	0	0	1
8	9	1	0	1	0	0	0	0	1
8	11	2	1	2	0	0	0	0	1
8	15	3	1	3	0	0	0	0	1

**TABLA SC\_16:** signos clínicos del OS del individuo 8.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
8	1	0	0	0	1	3	3	0	3
8	2	0	0	0	1	3	3	0	3
8	3	0	0	0	1	3	2	0	3
8	4	0	0	0	1	2	2	0	2
8	5	1	0	1	1	2	1	0	2
8	6	1	0	1	0	1	1	0	2
8	7	1	0	1	0	1	1	0	1
8	9	2	0	2	0	0	0	0	1
8	11	3	1	3	0	0	0	0	1
8	15	3	1	3	0	0	0	0	1

**TABLA SC\_17:** signos clínicos del OD del individuo 9.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
9	1	0	0	0	0	2	2	0	2
9	2	0	0	0	0	1	1	0	2
9	3	0	0	0	0	0	0	0	1
9	4	0	0	0	0	0	0	0	1
9	5	0	0	0	0	0	0	0	0
9	6	0	0	0	0	0	0	0	0
9	7	0	0	0	0	0	0	0	0
9	9	0	0	0	0	0	0	0	0
9	11	0	0	0	0	0	0	0	0
9	15	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_18:** signos clínicos del OS del individuo 9.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
9	1	0	0	0	0	2	1	0	2
9	2	0	0	0	0	1	1	0	2
9	3	0	0	0	0	0	0	0	1
9	4	0	0	0	0	0	0	0	1
9	5	0	0	0	0	0	0	0	0
9	6	0	0	0	0	0	0	0	0
9	7	0	0	0	0	0	0	0	0
9	9	0	0	0	0	0	0	0	0
9	11	0	0	0	0	0	0	0	0
9	15	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_19:** signos clínicos del OD del individuo 10.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
10	1	0	0	0	0	1	2	0	2
10	2	0	0	0	0	1	1	0	2
10	3	0	0	0	0	0	0	0	1
10	4	0	0	0	0	0	0	0	1
10	5	0	0	0	0	0	0	0	1
10	6	0	0	0	0	0	0	0	0
10	7	0	0	0	0	0	0	0	0
10	9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	11	0	0	0	0	0	0	0	0
10	15	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_20:** signos clínicos del OS del individuo 10.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
10	1	0	0	0	0	2	2	0	3
10	2	0	0	0	0	1	2	0	2
10	3	0	0	0	0	1	1	0	2
10	4	0	0	0	0	0	0	0	1
10	5	0	0	0	0	0	0	0	0
10	6	0	0	0	0	0	0	0	0
10	7	0	0	0	0	0	0	0	0
10	9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	11	0	0	0	0	0	0	0	0
10	15	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_21:** signos clínicos del OD del individuo 11.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
11	1	0	0	0	0	1	2	0	2
11	2	0	0	0	0	1	1	0	2
11	3	0	0	0	0	0	0	0	2
11	4	0	0	0	0	0	0	0	1
11	5	0	0	0	0	0	0	0	1
11	6	0	0	0	0	0	0	0	0
11	7	0	0	0	0	0	0	0	0
11	9	0	0	0	0	0	0	0	0
11	11	0	0	0	0	0	0	0	0
11	15	0	0	0	0	0	0	0	0

RESULTADOS

**TABLA SC\_22:** signos clínicos del OS del individuo 11.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
11	1	0	0	0	0	2	1	0	1
11	2	0	0	0	0	1	1	0	2
11	3	0	0	0	0	0	1	0	1
11	4	0	0	0	0	0	0	0	0
11	5	0	0	0	0	0	0	0	0
11	6	0	0	0	0	0	0	0	0
11	7	0	0	0	0	0	0	0	0
11	9	0	0	0	0	0	0	0	0
11	11	0	0	0	0	0	0	0	0
11	15	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_23:** signos clínicos del OD del individuo 12.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
12	1	0	0	0	0	2	1	0	2
12	2	0	0	0	0	2	1	0	2
12	3	0	0	0	0	0	1	0	2
12	4	0	0	0	0	0	0	0	1
12	5	0	0	0	0	0	0	0	0
12	6	0	0	0	0	0	0	0	0
12	7	0	0	0	0	0	0	0	0
12	9	0	0	0	0	0	0	0	0
12	11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	15	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_24:** signos clínicos del OS del individuo 12.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
12	1	0	0	0	0	1	2	0	2
12	2	0	0	0	0	1	1	0	2
12	3	0	0	0	0	0	1	0	1
12	4	0	0	0	0	0	0	0	0
12	5	0	0	0	0	0	0	0	0
12	6	0	0	0	0	0	0	0	0
12	7	0	0	0	0	0	0	0	0
12	9	0	0	0	0	0	0	0	0
12	11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	15	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_25:** signos clínicos del OD del individuo 13.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
13	1	0	0	0	1	1	1	0	2
13	2	0	0	0	0	1	1	0	2
13	3	0	0	0	0	0	1	0	1
13	4	0	0	0	0	0	0	0	0
13	5	0	0	0	0	0	0	0	0
13	6	0	0	0	0	0	0	0	0
13	7	0	0	0	0	0	0	0	0
13	9	0	0	0	0	0	0	0	0
13	11	0	0	0	0	0	0	0	0
13	15	0	0	0	0	0	0	0	0
13	17	0	0	0	0	0	0	0	0
13	21	0	0	0	0	0	0	0	0
13	23	0	0	0	0	0	0	0	0
13	27	0	0	0	0	0	0	0	0
13	30	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_26:** signos clínicos del OS del individuo 13.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
13	1	0	0	0	1	2	2	0	2
13	2	0	0	0	0	2	2	0	2
13	3	0	0	0	0	1	1	0	2
13	4	0	0	0	0	0	1	0	1
13	5	0	0	0	0	0	0	0	1
13	6	0	0	0	0	0	0	0	0
13	7	0	0	0	0	0	0	0	0
13	9	0	0	0	0	0	0	0	0
13	11	0	0	0	0	0	0	0	0
13	15	0	0	0	0	0	0	0	0
13	17	0	0	0	0	0	0	0	0
13	21	0	0	0	0	0	0	0	0
13	23	0	0	0	0	0	0	0	0
13	27	0	0	0	0	0	0	0	0
13	30	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_27:** signos clínicos del OD del individuo 14.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
14	1	0	0	0	0	2	2	0	2
14	2	0	0	0	0	1	1	0	2
14	3	0	0	0	0	0	1	0	1
14	4	0	0	0	0	1	1	0	2
14	5	0	0	0	0	0	0	0	1
14	6	0	0	0	0	0	0	0	0
14	7	0	0	0	0	0	0	0	0
14	9	0	0	0	0	0	0	0	0
14	11	0	0	0	0	0	0	0	0
14	15	0	0	0	0	0	0	0	0
14	17	0	0	0	0	0	0	0	0
14	21	0	0	0	0	0	0	0	0
14	23	0	0	0	0	0	0	0	0
14	27	0	0	0	0	0	0	0	0
14	30	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_28:** signos clínicos del OS del individuo 14.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
14	1	0	0	0	1	1	1	0	2
14	2	0	0	0	0	2	2	0	2
14	3	0	0	0	0	1	1	0	1
14	4	0	0	0	0	0	1	0	1
14	5	0	0	0	0	0	0	0	0
14	6	0	0	0	0	0	0	0	0
14	7	0	0	0	0	0	0	0	0
14	9	0	0	0	0	0	0	0	0
14	11	0	0	0	0	0	0	0	0
14	15	0	0	0	0	0	0	0	0
14	17	0	0	0	0	0	0	0	0
14	21	0	0	0	0	0	0	0	0
14	23	0	0	0	0	0	0	0	0
14	27	0	0	0	0	0	0	0	0
14	30	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_29:** signos clínicos del OD del individuo 15.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
15	1	0	0	0	0	2	2	0	2
15	2	0	0	0	0	2	2	0	2
15	3	0	0	0	0	1	1	0	1
15	4	0	0	0	0	1	1	0	2
15	5	0	0	0	0	0	0	0	1
15	6	0	0	0	0	0	0	0	0
15	7	0	0	0	0	0	0	0	0
15	9	0	0	0	0	0	0	0	0
15	11	0	0	0	0	0	0	0	0
15	15	0	0	0	0	0	0	0	0
15	17	0	0	0	0	0	0	0	0
15	21	0	0	0	0	0	0	0	0
15	23	0	0	0	0	0	0	0	0
15	27	0	0	0	0	0	0	0	0
15	30	0	0	0	0	0	0	0	0

RESULTADOS

**TABLA SC\_30:** signos clínicos del OS del individuo 15.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
15	1	0	0	0	0	1	1	0	2
15	2	0	0	0	0	1	1	0	2
15	3	0	0	0	0	0	0	0	1
15	4	0	0	0	0	0	0	0	1
15	5	0	0	0	0	0	0	0	0
15	6	0	0	0	0	0	0	0	0
15	7	0	0	0	0	0	0	0	0
15	9	0	0	0	0	0	0	0	0
15	11	0	0	0	0	0	0	0	0
15	15	0	0	0	0	0	0	0	0
15	17	0	0	0	0	0	0	0	0
15	21	0	0	0	0	0	0	0	0
15	23	0	0	0	0	0	0	0	0
15	27	0	0	0	0	0	0	0	0
15	30	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_31:** signos clínicos del OD del individuo 16.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
16	1	0	0	0	0	1	1	0	2
16	2	0	0	0	0	0	0	0	2
16	3	0	0	0	0	0	0	0	1
16	4	0	0	0	0	0	0	0	0
16	5	0	0	0	0	0	0	0	0
16	6	0	0	0	0	0	0	0	0
16	7	0	0	0	0	0	0	0	0
16	9	0	0	0	0	0	0	0	0
16	11	0	0	0	0	0	0	0	0
16	15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	17	0	0	0	0	0	0	0	0
16	21	0	0	0	0	0	0	0	0
16	23	0	0	0	0	0	0	0	0
16	27	0	0	0	0	0	0	0	0
16	30	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_32:** signos clínicos del OS del individuo 16.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
16	1	0	0	0	0	1	1	0	2
16	2	0	0	0	0	0	0	0	2
16	3	0	0	0	0	0	0	0	0
16	4	0	0	0	0	0	0	0	0
16	5	0	0	0	0	0	0	0	0
16	6	0	0	0	0	0	0	0	0
16	7	0	0	0	0	0	0	0	0
16	9	0	0	0	0	0	0	0	0
16	11	0	0	0	0	0	0	0	0
16	15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	17	0	0	0	0	0	0	0	0
16	21	0	0	0	0	0	0	0	0
16	23	0	0	0	0	0	0	0	0
16	27	0	0	0	0	0	0	0	0
16	30	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_33:** signos clínicos del OD del individuo 17.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
17	1	0	0	0	0	1	1	0	2
17	2	0	0	0	0	0	0	0	2
17	3	0	0	0	0	0	0	0	1
17	4	0	0	0	0	0	0	0	0
17	5	0	0	0	0	0	0	0	0
17	6	0	0	0	0	0	0	0	0
17	7	0	0	0	0	0	0	0	0
17	9	0	0	0	0	0	0	0	0
17	11	0	0	0	0	0	0	0	0
17	15	0	0	0	0	0	0	0	0
17	17	0	0	0	0	0	0	0	0
17	21	0	0	0	0	0	0	0	0
17	23	0	0	0	0	0	0	0	0
17	27	0	0	0	0	0	0	0	0
17	30	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_34:** signos clínicos del OS del individuo 17.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
17	1	0	0	0	0	1	1	0	2
17	2	0	0	0	0	0	0	0	2
17	3	0	0	0	0	0	0	0	0
17	4	0	0	0	0	0	0	0	0
17	5	0	0	0	0	0	0	0	0
17	6	0	0	0	0	0	0	0	0
17	7	0	0	0	0	0	0	0	0
17	9	0	0	0	0	0	0	0	0
17	11	0	0	0	0	0	0	0	0
17	15	0	0	0	0	0	0	0	0
17	17	0	0	0	0	0	0	0	0
17	21	0	0	0	0	0	0	0	0
17	23	0	0	0	0	0	0	0	0
17	27	0	0	0	0	0	0	0	0
17	30	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_35:** signos clínicos del OD del individuo 18.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_D	DEEP_VASC_D	CORNEAL_EDEMA_D	SECRETION_D	BLEPHAROSPASM_D	DISCOMFORT_D	HIPOPION_D	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_D
18	1	0	0	0	0	1	1	0	2
18	2	0	0	0	0	0	0	0	2
18	3	0	0	0	0	0	0	0	1
18	4	0	0	0	0	0	0	0	0
18	5	0	0	0	0	0	0	0	0
18	6	0	0	0	0	0	0	0	0
18	7	0	0	0	0	0	0	0	0
18	9	0	0	0	0	0	0	0	0
18	11	0	0	0	0	0	0	0	0
18	15	0	0	0	0	0	0	0	0
18	17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	21	0	0	0	0	0	0	0	0
18	23	0	0	0	0	0	0	0	0
18	27	0	0	0	0	0	0	0	0
18	30	0	0	0	0	0	0	0	0

**TABLA SC\_36:** signos clínicos del OS del individuo 18.

CLINICAL SIGNS									
ID	DATE	SUPERFICIAL_VASC_S	DEEP_VASC_S	CORNEAL_EDEMA_S	SECRETION_S	BLEPHAROSPASM_S	DISCOMFORT_S	HIPOPION_S	CONJUNCTIVAL_CONGESTION_S
18	1	0	0	0	0	1	1	0	2
18	2	0	0	0	0	0	0	0	2
18	3	0	0	0	0	0	0	0	1
18	4	0	0	0	0	0	0	0	0
18	5	0	0	0	0	0	0	0	0
18	6	0	0	0	0	0	0	0	0
18	7	0	0	0	0	0	0	0	0
18	9	0	0	0	0	0	0	0	0
18	11	0	0	0	0	0	0	0	0
18	15	0	0	0	0	0	0	0	0
18	17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	21	0	0	0	0	0	0	0	0
18	23	0	0	0	0	0	0	0	0
18	27	0	0	0	0	0	0	0	0
18	30	0	0	0	0	0	0	0	0

4.4.2. OCT

**TABLA OCT\_1:** Medidas ( $\mu$ ) del espesor corneal normal, espesor máximo de la úlcera y espesor central en el Grupo 1.

EYE	OCT_MEASURES ( $\mu$ )		
	TOTAL THICKNESS	ULCER MAX THICKNESS	CENTRAL THICKNESS
1 OD	400	216	261
1 OS	400	323	295
2 OD	483	368	484
2 OS	413	236	283
3 OD	490	219	343
3 OS	492	272	224
4 OD	*	195	*
4 OS	454	283	310
5 OD	470	234	256
5 OS	422	259	271
6 OD	*	350	*
6 OS	419	259	296

**TABLA OCT\_2:** Edema perilesional y lesional del grupo 1.

EYE	OCT_EDEMA ( $\mu$ )	
	PERILESIONAL EDEMA	EDEMA LESIONAL
1 OD	0	0
1 OS	2	0
2 OD	1	2
2 OS	0	2
3 OD	2	2
3 OS	2	0
4 OD	2	2
4 OS	2	1
5 OD	2	1
5 OS	1	1
6 OD	3	3
6 OS	0	0

**TABLA OCT\_3:** Medidas ( $\mu$ ) del espesor corneal normal, espesor máximo de la úlcera y espesor central en el Grupo 2.

EYE	OCT_MEASURES ( $\mu$ )		
	TOTAL THICKNESS	ULCER MAX THICKNESS	CENTRAL THICKNESS
7 OD	458	337	260
7 OS	*	379	394
8 OD	*	*	*
8 OS	*	394	*
9 OD	470	304	352
9 OS	452	294	341
10 OD	453	290	342
10 OS	457	314	342
11 OD	448	288	409
11 OS	447	355	418
12 OD	469	340	411
12 OS	454	344	420

**TABLA OCT\_4:** Edema perilesional y lesional del grupo 2.

EYE	OCT_EDEMA ( $\mu$ )	
	PERILESIONAL EDEMA	LESIONAL EDEMA
7 OD	0	3
7 OS	1	2
8 OD	3	3
8 OS	3	3
9 OD	0	1
9 OS	0	2
10 OD	1	0
10 OS	1	0
11 OD	0	0
11 OS	0	0
12 OD	0	0
12 OS	0	0

**TABLA OCT\_5:** Medidas ( $\mu$ ) del espesor corneal normal, espesor máximo de la úlcera y espesor central en el Grupo 3.

EYE	OCT_MEASURES ( $\mu$ )		
	TOTAL THICKNESS	ULCER MAX THICKNESS	CENTRAL THICKNESS
13 OD	422	273	367
13 OS	427	285	422
14 OD	445	253	315
14 OS	404	240	278
15 OD	422	280	336
15 OS	432	286	325
16 OD	429	310	337
16 OS	434	272	301
17 OD	415	232	277
17 OS	417	226	333
18 OD	435	245	288
18 OS	429	254	275

**TABLA OCT\_6:** Edema perilesional y lesional del grupo 3.

EYE	OCT_EDEMA ( $\mu$ )	
	PERILESIONAL EDEMA	LESIONAL EDEMA
13 OD	2	2
13 OS	0	2
14 OD	0	1
14 OS	0	1
15 OD	0	1
15 OS	1	1
16 OD	1	1
16 OS	1	1
17 OD	1	1
17 OS	0	1
18 OD	1	2
18 OS	0	2

## 4.4.3. HISTOLOGÍA

**TABLA HIST\_1:** resultados del epitelio en el ojo derecho (OD): número de células, presencia o no de células y membrana basal en diferentes puntos del epitelio.

ID	EPITHELIUM											
	Nº CEL_D				BASAL CEL_D				BASAL MEMB_D			
	PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL	PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL	PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL
1	3	3	4	3	0	1	1	1	0	1	1	1
2	4	4	3	2	1	1	1	0	1	1	1	0
3	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
4	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
6	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	3	3	3	2	1	1	1	0	1	1	0	0
8	2	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
9	4	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1
10	4	6	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1
11	0	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
12	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1
13	5	6	5	3	1	1	1	1	1	1	1	0
14	2	1	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0
15	0	3	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0
16	3	4	3	0	1	1	1	0	1	1	1	0
17	3	0	3	0	1	0	1	0	1	0	0	0
18	3	3	2	0	1	1	1	0	1	1	1	0

**TABLA HIST\_2:** resultados del epitelio en el ojo izquierdo (OS): número de células, presencia o no de células y membrana basal en diferentes puntos del epitelio.

ID	EPITHELIUM											
	Nº CEL_S				BASAL CEL_S				BASAL MEMB_S			
	PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL	PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL	PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL
1	3	3	3	4	0	1	1	1	1	1	0	1
2	4	4	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
3	4	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
4	2	2	6	3	0	0	1	1	1	1	1	1
5	4	4	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
6	3	3	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
7	4	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
8	10	10	4	0	1	1	1	0	1	1	1	0
9	4	4	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1
10	3	4	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1
11	4	3	3	0	1	1	1	0	1	1	1	0
12	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	4	4	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1
14	0	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
15	3	4	3	4	1	1	1	1	1	1	1	1
16	3	2	3	0	1	1	1	0	1	1	0	0
17	2	2	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
18	3	4	2	0	1	1	1	0	1	1	1	0

**TABLA HIST\_3:** resultados del estroma en el ojo derecho (OD): tipo de queratocitos, presencia o no de edema simple o tipo mixoide y presencia o no de vascularización, en diferentes puntos del estroma.

ID	STROMA															
	KERATOCYTE_D				MATRIX								VASC_D			
	PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL	EDEMA_D				MYKOID_D				PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL
				PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL	PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL	PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL	
1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
2	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
6	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
8	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
10	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
11	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
14	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
15	1	0	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1
16	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1
17	1	1	0	2	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1
18	1	1	2	2	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1

**TABLA HIST\_4:** resultados del estroma en el ojo izquierdo (OS): tipo de queratocitos, presencia o no de edema simple o tipo mixoide y presencia o no de vascularización, en diferentes puntos del estroma.

ID	STROMA															
	KERATOCYTE_S				MATRIX								VASC_S			
	PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL	EDEMA_S				MYKOID_S				PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL
				PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL	PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL	PROX 1	PROX 2	MEDIUM	CENTRAL	
1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
2	2	1	1	2	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1
3	1	1	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0
6	2	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0
7	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	2	1	2	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
13	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
14	1	1	1	2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1
15	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1
16	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
17	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
18	1	0	1	2	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1

**TABLA HIST\_5:** resultados del limbo en el ojo derecho (OD): tipo de inflamación, presencia o no de vascularización y edema.

ID	LIMBUS		
	INFL_D	VASC_D	EDEMA_D
1	1	1	1
2	2	1	1
3	3	1	1
4	3	1	1
5	1	1	1
6	2	1	1
7	1	1	1
8	1	1	1
9	0	1	1
10	0	1	1
11	1	1	1
12	0	1	1
13	0	1	0
14	0	1	1
15	1	1	1
16	0	1	1
17	1	1	1
18	0	1	1

**TABLA HIST\_6:** resultados del limbo en el ojo izquierdo (OS): tipo de inflamación, presencia o no de vascularización y edema.

ID	LIMBUS		
	INFL_S	VASC_S	EDEMA_S
1	1	1	1
2	1	1	1
3	2	1	1
4	1	1	1
5	1	1	1
6	1	1	1
7	1	1	1
8	0	1	1
9	0	1	1
10	0	1	1
11	0	1	1
12	0	1	1
13	0	1	0
14	0	1	1
15	0	1	0
16	0	1	1
17	0	1	1
18	0	1	1

## 4.5. ANEXO IMÁGENES

### 4.5.1. SIGNOS CLÍNICOS

**IMAGEN SC\_1:** perforación corneal.



**IMAGEN SC\_2:** vascularización corneal superficial grado 1.



**IMAGEN SC\_3:** vascularización corneal superficial grado 2.



**IMAGEN SC\_4:** vascularización corneal superficial grado 3.



**IMAGEN SC\_5:** vascularización corneal profunda grado 1.



**IMAGEN SC\_6:** edema corneal grado 1.



**IMAGEN SC\_7:** edema corneal grado 2.



**IMAGEN SC\_8:** edema corneal grado 3.



**IMAGEN SC\_9:** secreción grado 1.



**IMAGEN SC\_10:** blefarospasmo grado 1.



**IMAGEN SC\_11:** blefarospasmo grado 2.



**IMAGEN SC\_12:** blefarospasmo grado 3.



**IMAGEN SC\_13:** discomfort grado 1.



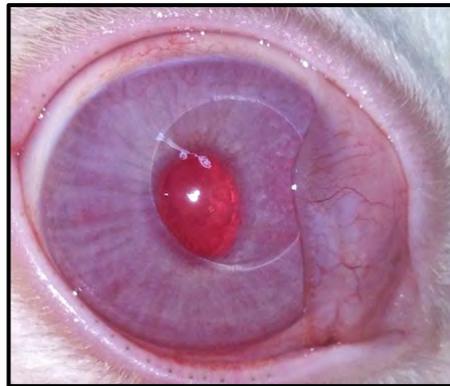
**IMAGEN SC\_14:** discomfort grado 2.



**IMAGEN SC\_15:** discomfort grado 3.



**IMAGEN SC\_16:** congestión conjuntival grado 1.



**IMAGEN SC\_17:** congestión conjuntival grado 2.



**IMAGEN SC\_18:** congestión conjuntival grado 3.



### 4.5.2. OCT

IMAGEN OCT\_1: ojo 2OS, perforación corneal. (Flecha: Pérdida de endotelio corneal).

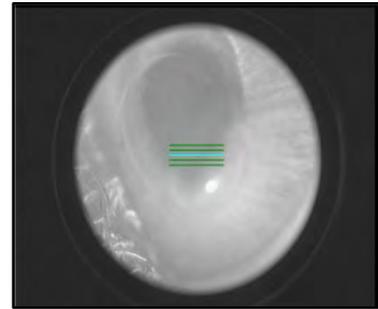
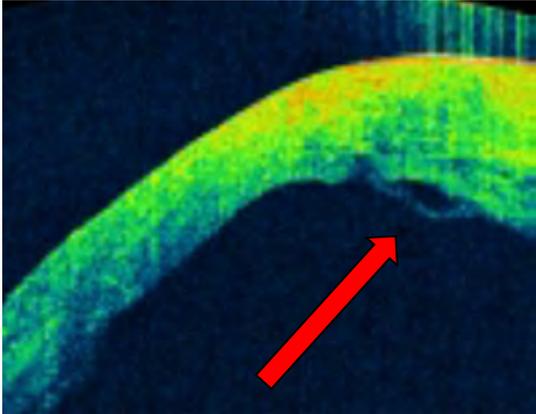


IMAGEN OCT\_2: ojo 6OD, perforación corneal.

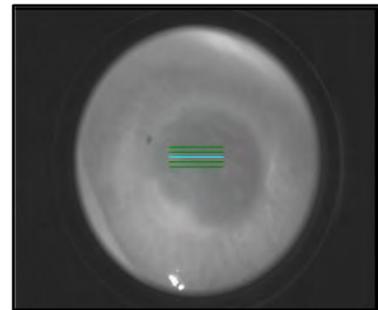
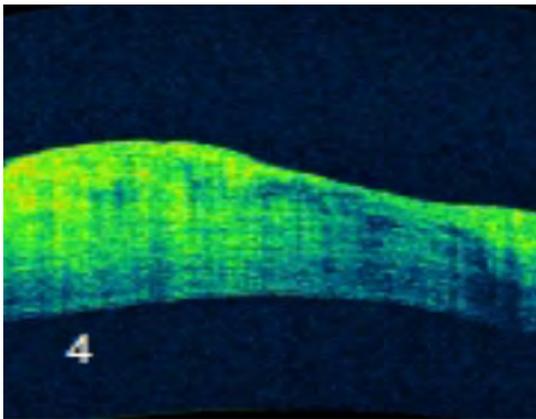
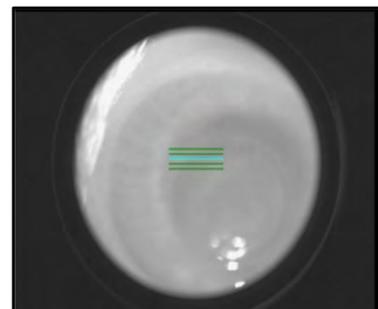
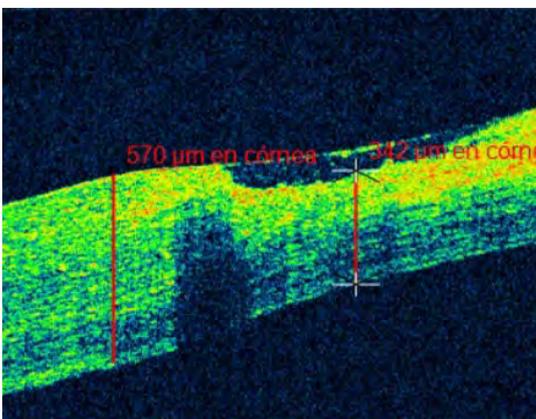
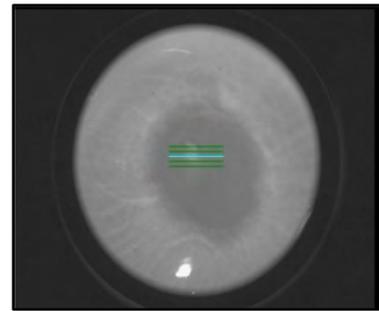
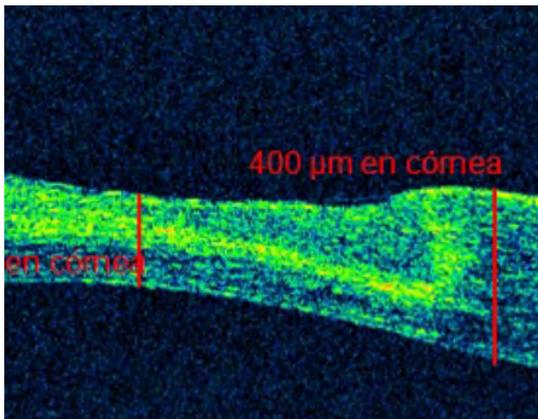


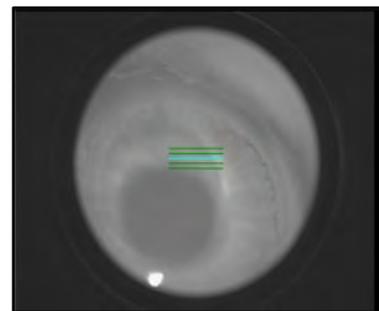
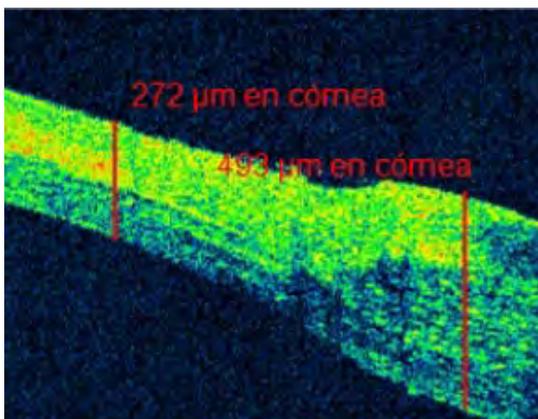
IMAGEN OCT\_3: ojo 4 OD, edema generalizado.



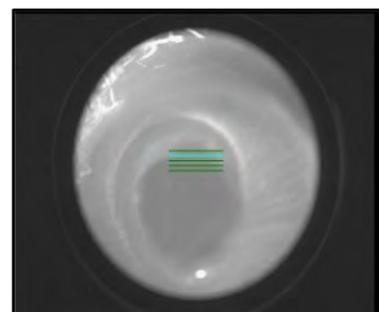
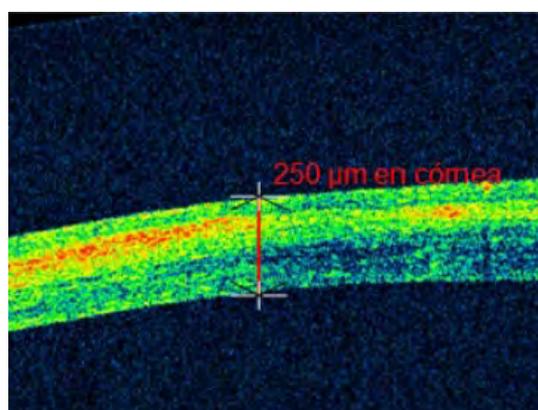
**IMAGEN OCT\_4:** espesor corneal normal y espesor máximo de la úlcera en OD. 1OD.



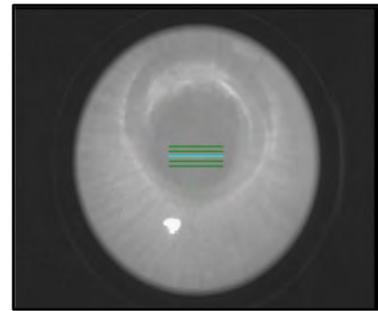
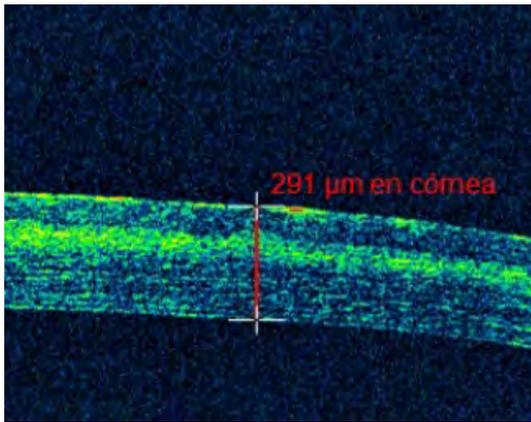
**IMAGEN OCT\_5:** espesor corneal normal y espesor máximo de la úlcera en OS. 4OS.



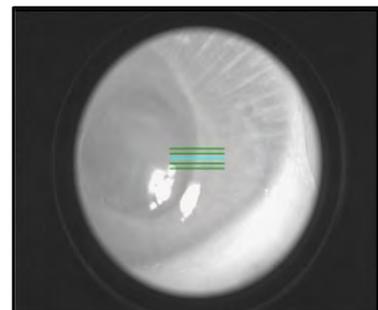
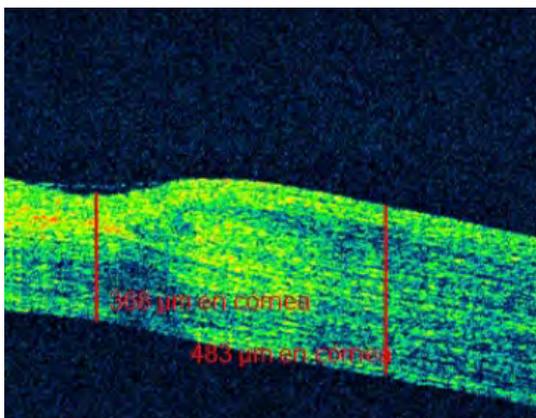
**IMAGEN OCT\_6:** espesor central en OD. 2OD.



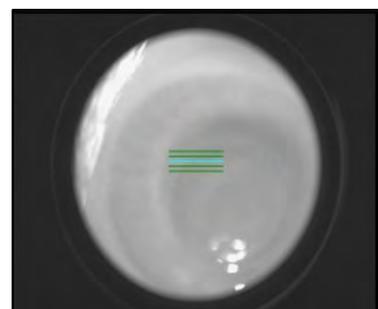
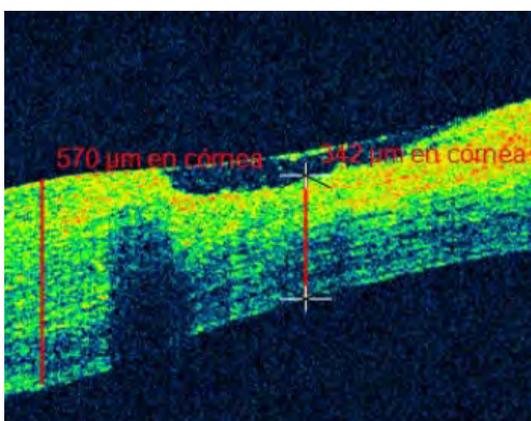
**IMAGEN OCT\_7:** espesor central en OS. 3OS.



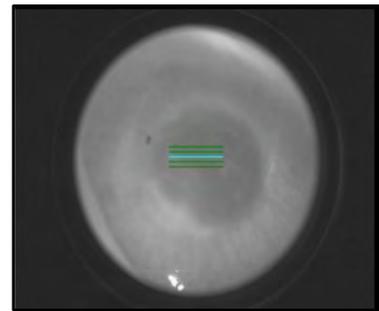
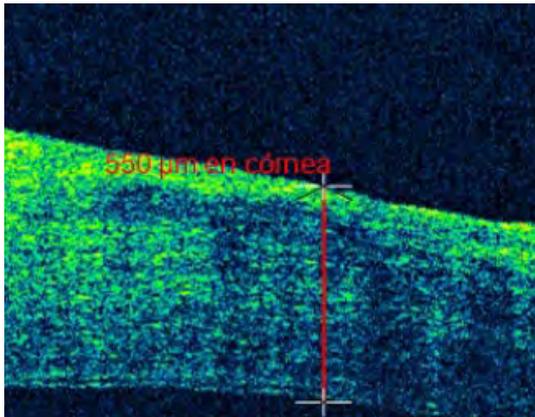
**IMAGEN OCT\_8:** edema perilesional grado 1. 2OD.



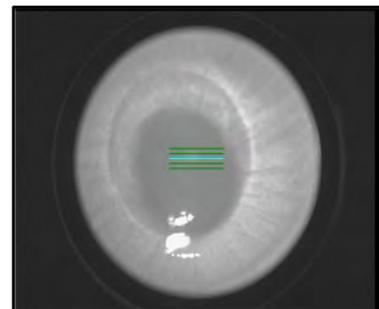
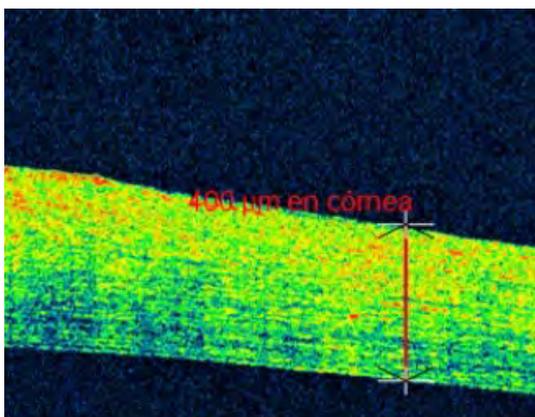
**IMAGEN OCT\_9:** edema perilesional grado 2. 4OS.



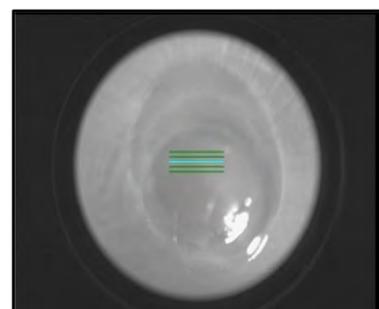
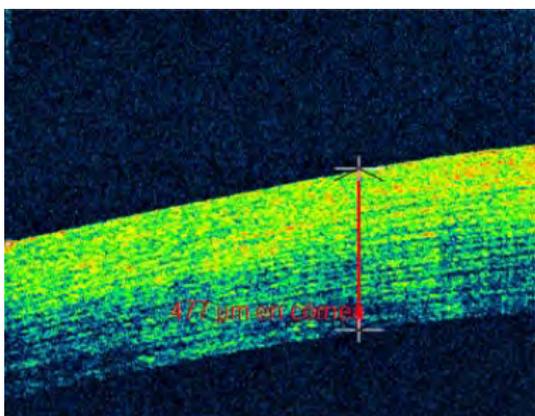
**IMAGEN OCT\_10:** edema perilesional grado 3. 6OD.



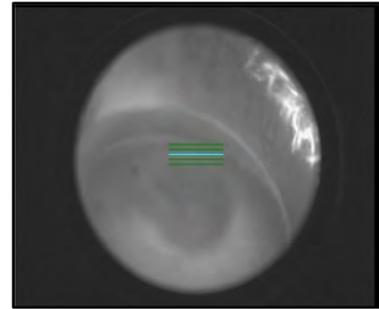
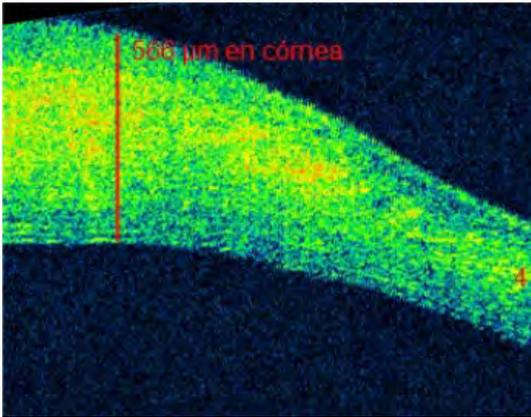
**IMAGEN OCT\_11:** edema lesional grado 1. 5OS.



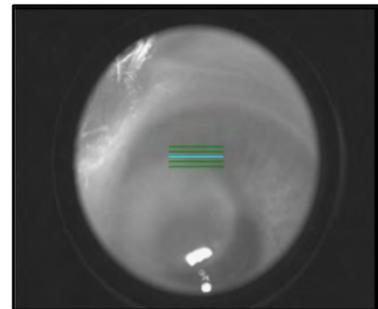
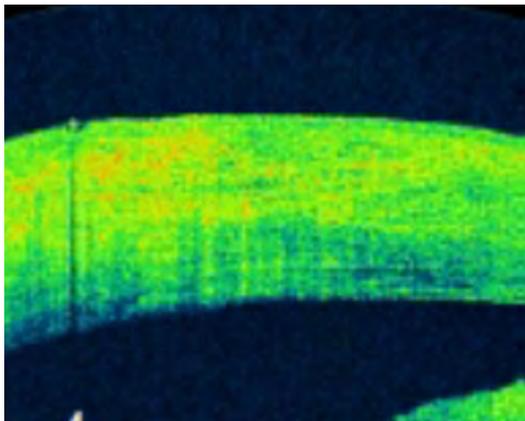
**IMAGEN OCT\_12:** edema lesional grado 2. 4OS.



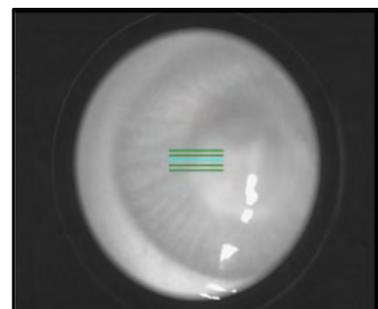
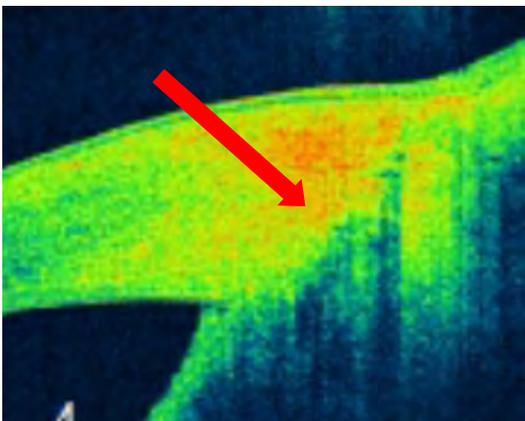
**IMAGEN OCT\_13:** edema lesional grado 3. 6OD.



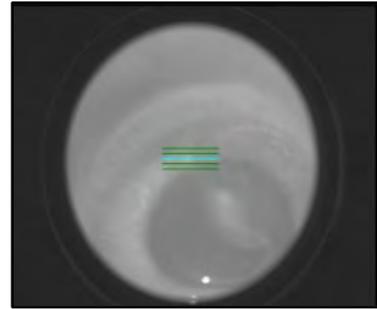
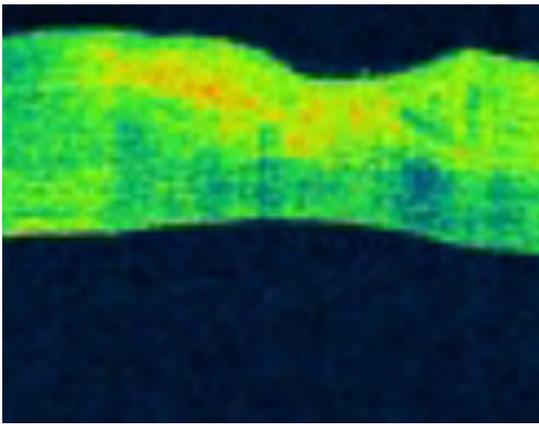
**IMAGEN OCT\_14:** ojo 8OD, perforación corneal.



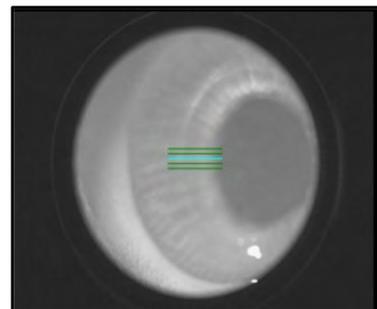
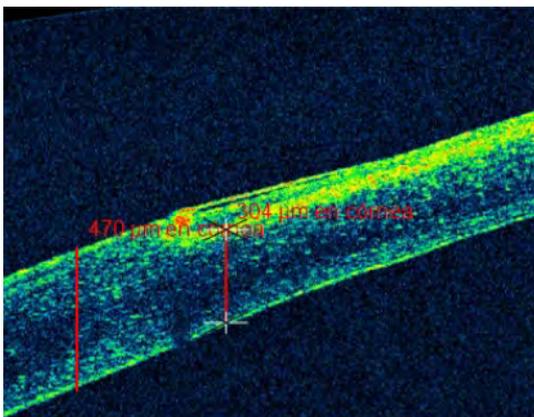
**IMAGEN OCT\_15:** ojo 8OS, perforación corneal. (Flecha: sinequia anterior de iris).



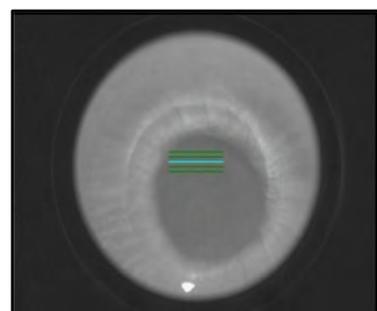
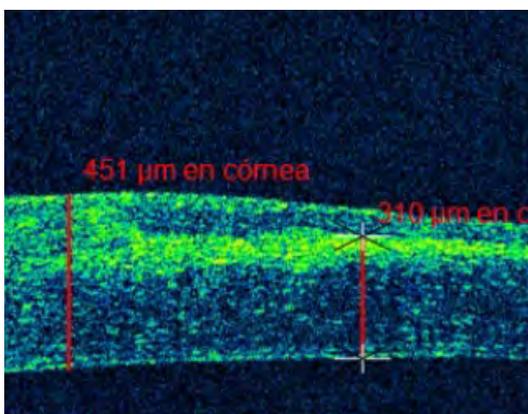
**IMAGEN OCT\_16:** ojo 7OS, edema generalizado.



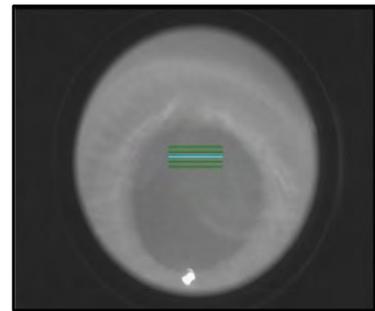
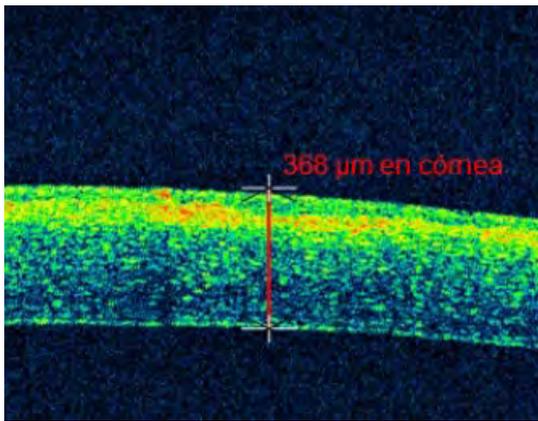
**IMAGEN OCT\_17:** espesor corneal normal y espesor máximo de la úlcera en OD. 90D.



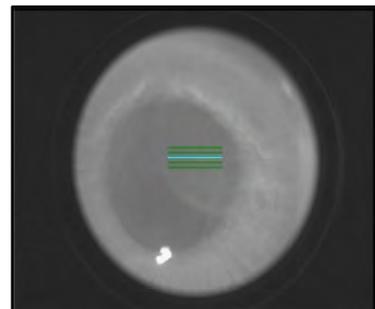
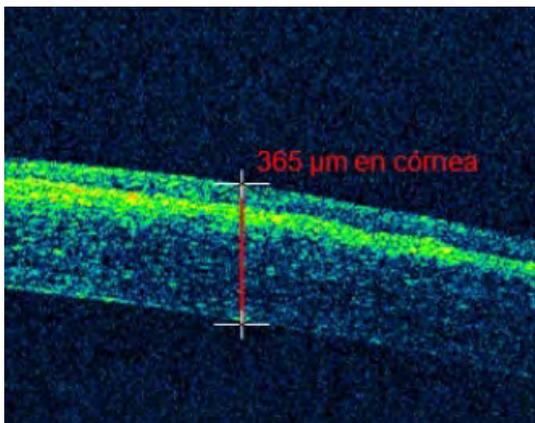
**IMAGEN OCT\_18:** espesor corneal normal y espesor máximo de la úlcera en OS. 100S.



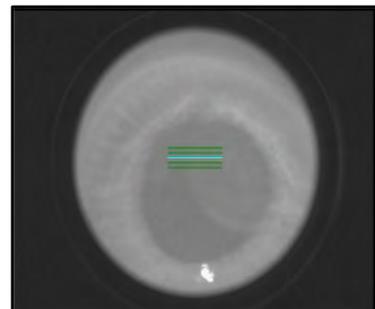
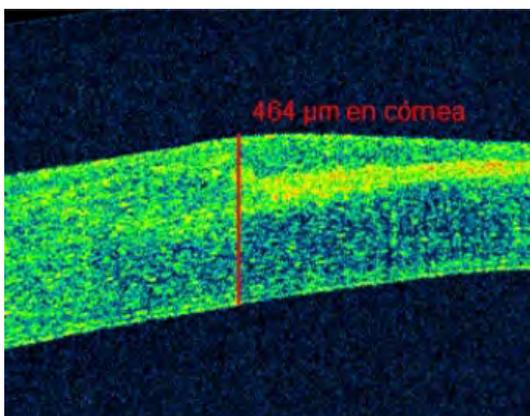
**IMAGEN OCT\_19:** espesor central en OD. 90D.



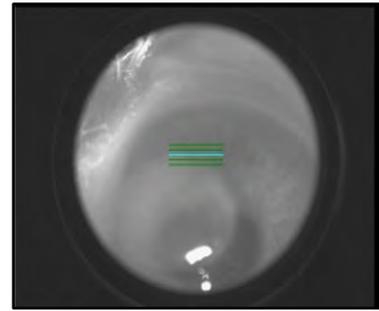
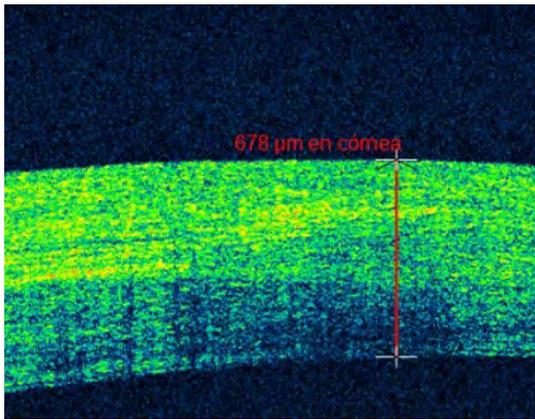
**IMAGEN OCT\_20:** espesor central en OS. 100S.



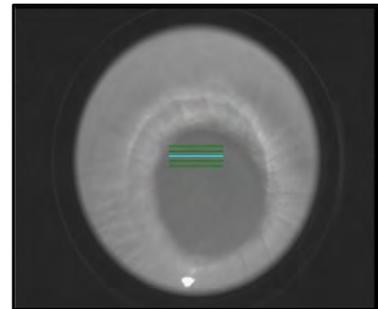
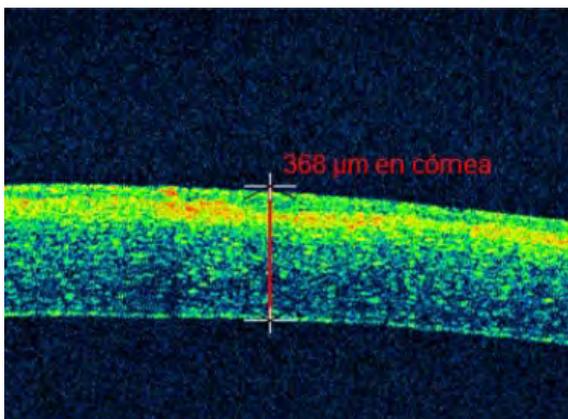
**IMAGEN OCT\_21:** edema perilesional grado 1. 100S.



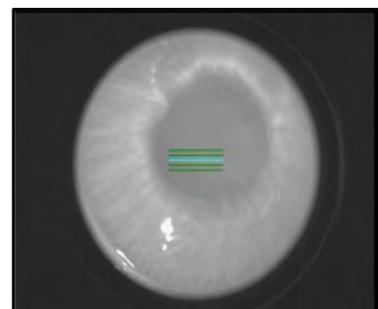
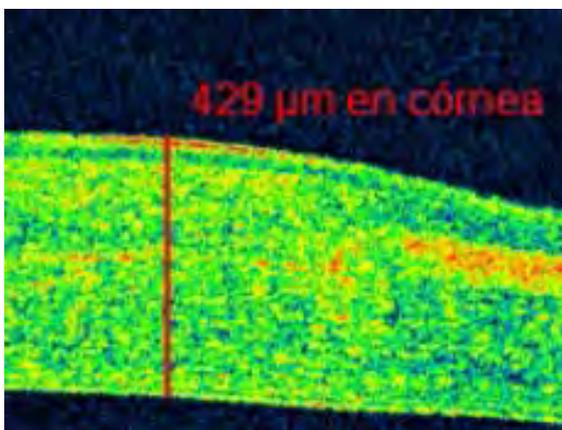
**IMAGEN OCT\_22:** edema perilesional grado 3. 8OD.



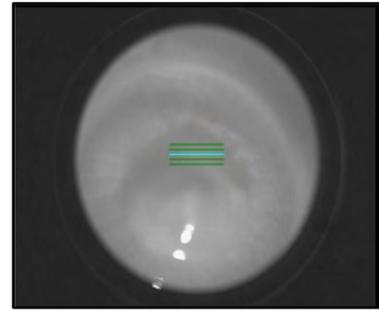
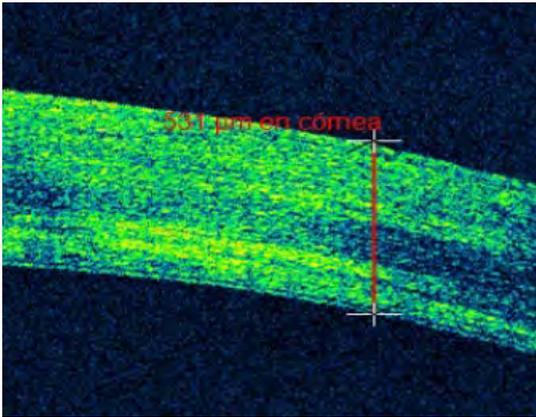
**IMAGEN OCT\_23:** edema lesional grado 1. 9OD.



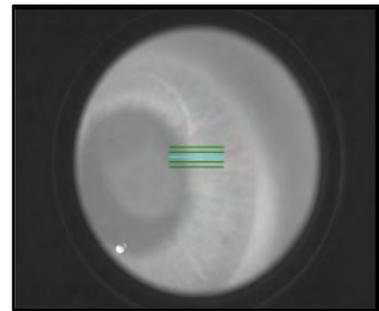
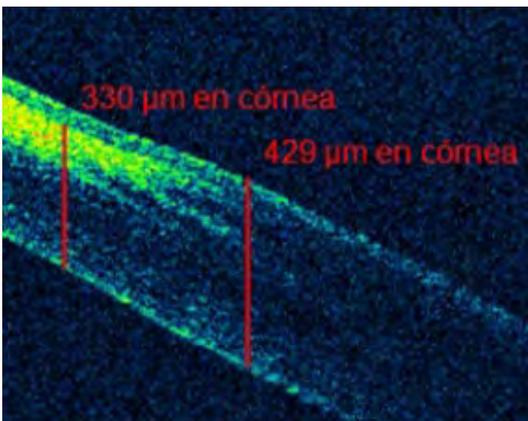
**IMAGEN OCT\_24:** edema lesional grado 2. 9OS.



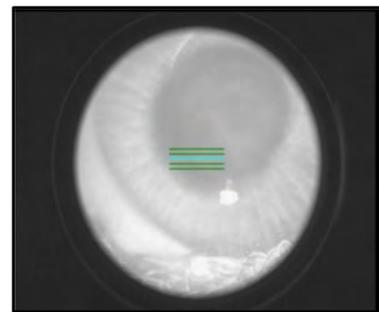
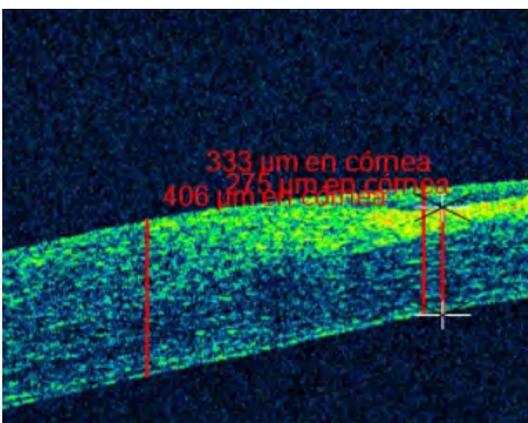
**IMAGEN OCT\_25:** edema lesional grado 3. 8OS.



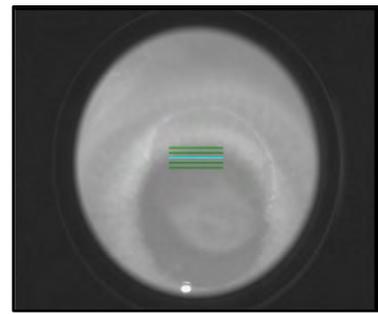
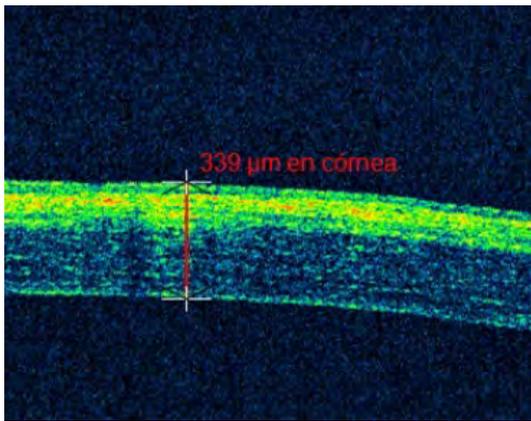
**IMAGEN OCT\_26:** espesor corneal normal y espesor máximo de la úlcera en OD 15OD.



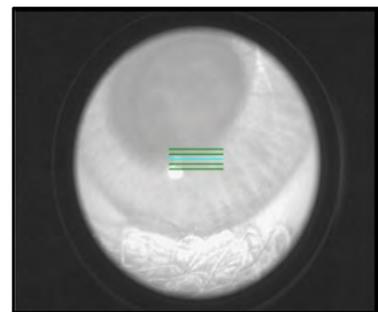
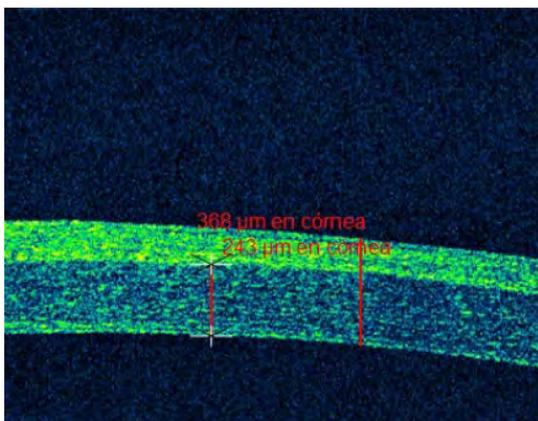
**IMAGEN OCT\_27:** espesor corneal normal y espesor máximo de la úlcera en OS. 14OS.



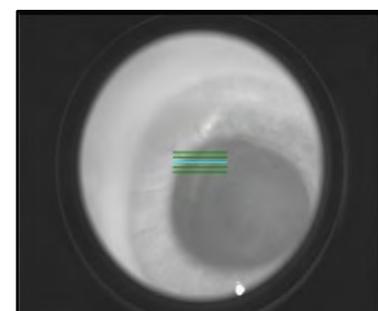
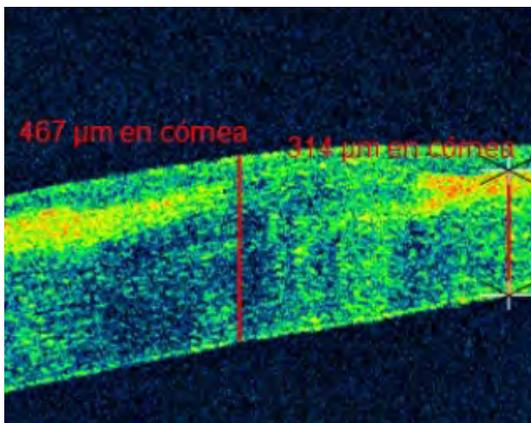
**IMAGEN OCT\_28:** espesor central en OD. 150D.



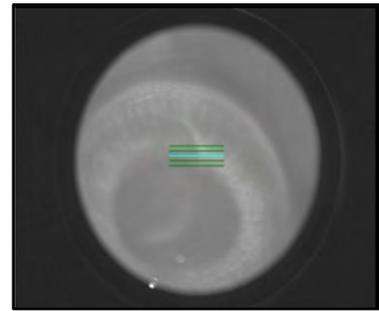
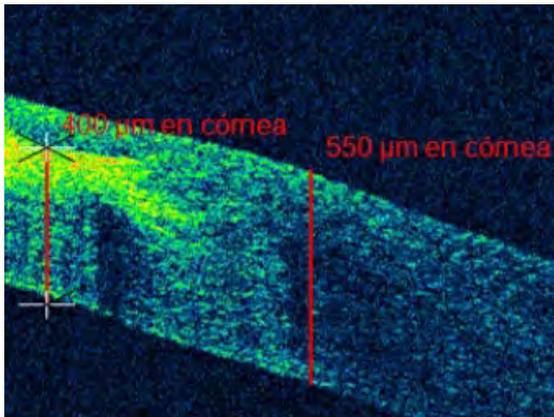
**IMAGEN OCT\_29:** espesor central en OS. 140S.



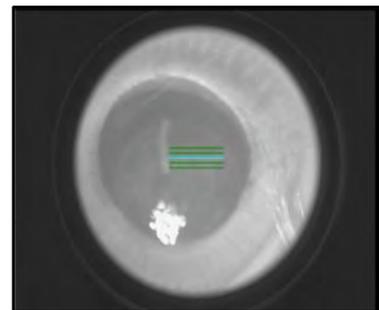
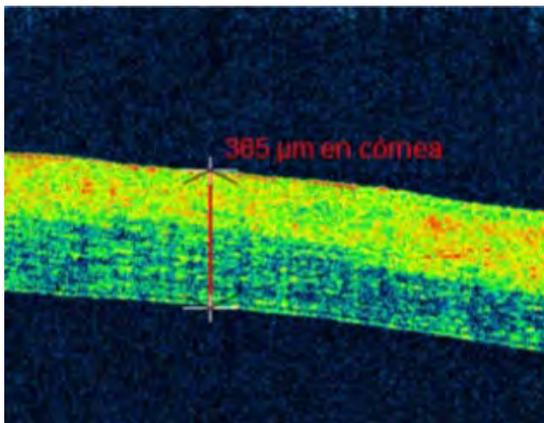
**IMAGEN OCT\_30:** edema perilesional grado 1. 150S.



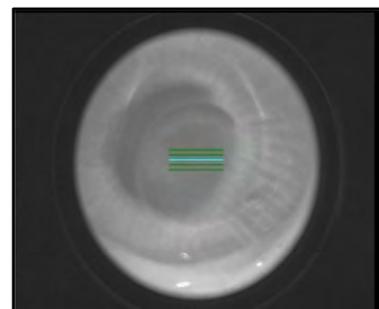
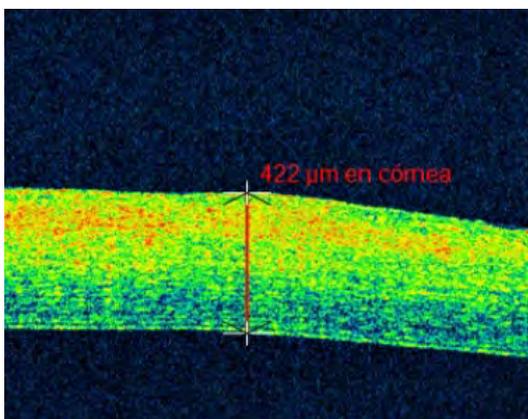
**IMAGEN OCT\_31:** edema perilesional grado 2. 13OD.



**IMAGEN OCT\_32:** edema lesional grado 1. 18OS.

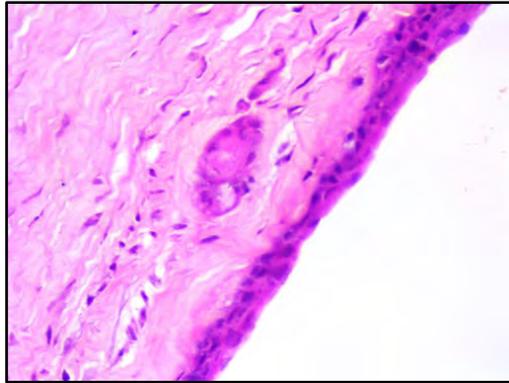


**IMAGEN OCT\_33:** edema lesional grado 2. 13OS.

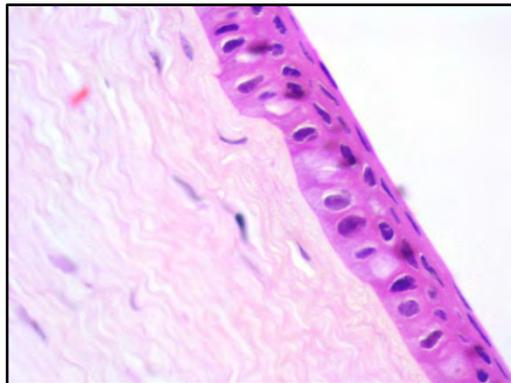


### 4.5.3. HISTOLOGÍA

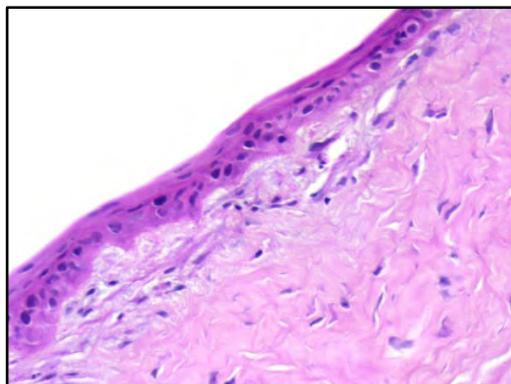
**IMAGEN HIST\_1:** Epitelio irregular con basal incompleta y resto de reepitelización a nivel del estroma. Membrana basal poco manifiesta. No visible la continuidad con el epitelio. Estroma denso con colágena eosinófila y queratocitos escasos. Se aprecia 2-3 capas de células epiteliales. Grupo 1.



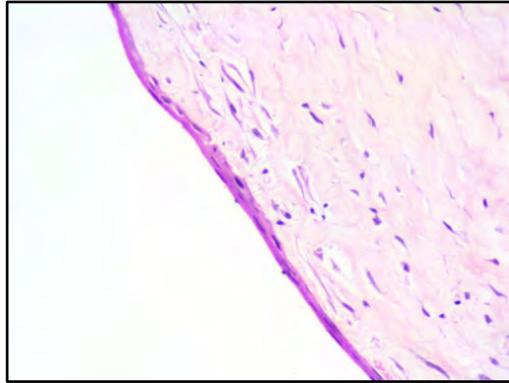
**IMAGEN HIST\_2:** Epitelio córneoal con tres capas y membrana basal visible. Estroma laxo y de aspecto normal. X40 HyE. Grupo 2.



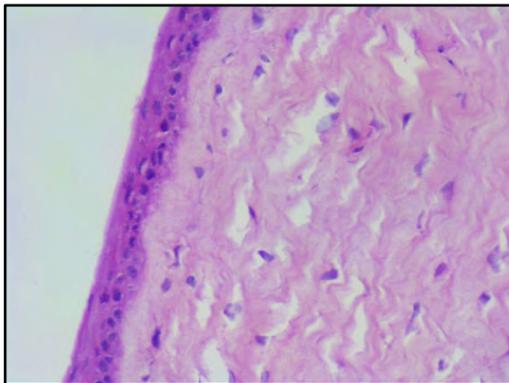
**IMAGEN HIST\_3:** Epitelio córneoal bien estructurado con 3-4 capas con células en disposición irregular y membrana basal visible. X10 HyE. Grupo 3.



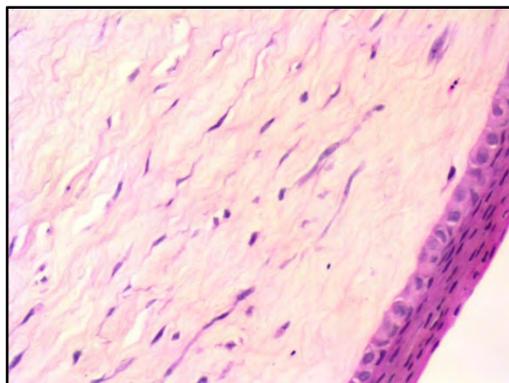
**IMAGEN HIST\_4:** Epitelio escaso, 2 o 3 capas, con ausencia de células basales y sin membrana basal evidente. (Low magnification). Estroma con colágena regularmente densa y queratocitos maduros. (Grupo1).



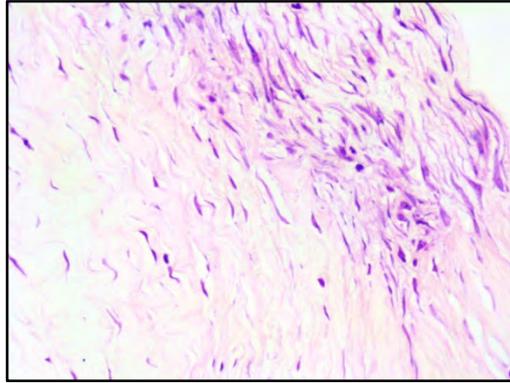
**IMAGEN HIST\_5:** Corte histológico corneal con epitelio de pocas capas (+2), presencia de células y membrana basales festoneada por algunos huecos claros. X20. Grupo 3.



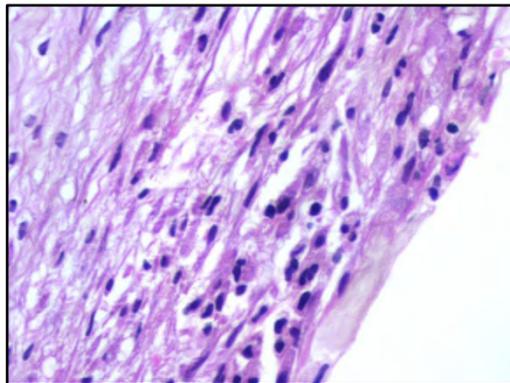
**IMAGEN HIST\_6:** Presencia de estroma denso y queratocitos inmaduros. Obsérvese los núcleos alargados y citoplasmas prolongados de aspecto fusiforme. No se aprecia edema. Grupo 1.



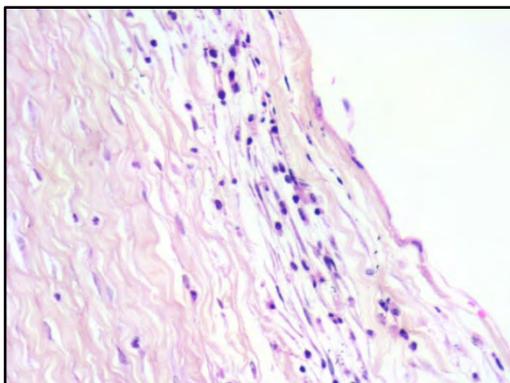
**IMAGEN HIST\_7:** Se aprecian abundantes queratocitos activos con núcleos alargados y en penacho, entre un estroma edematado y mixoide. X20. Grupo 2.



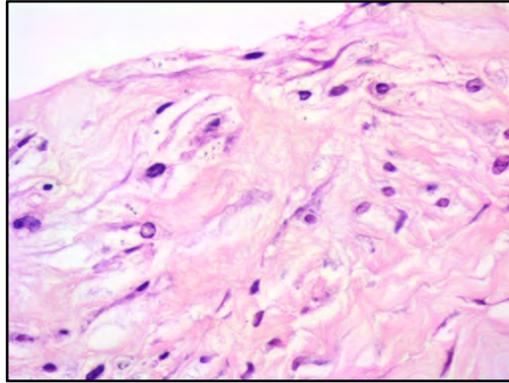
**IMAGEN HIST\_8:** Se aprecian algunos linfocitos de pequeño tamaño, queratocitos activos de núcleos grandes e hiper cromáticos, así como, estroma laxo y edematoso sin evidencia de componente mixoide. X40. Grupo 3.



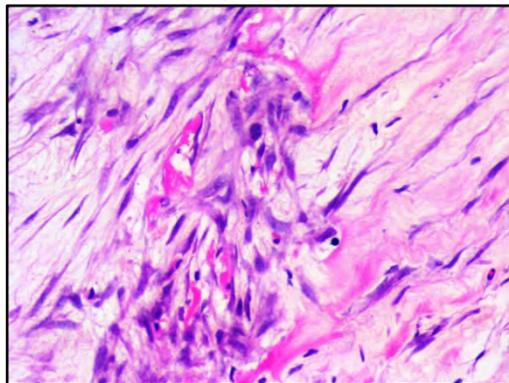
**IMAGEN HIST\_9:** Estructura corneal con epitelio ausente y un estroma edematoso en zona proximal que muestra además numerosos queratocitos activos acompañados por un infiltrado inflamatorio crónico con algunos eosinófilos x20. Grupo 2.



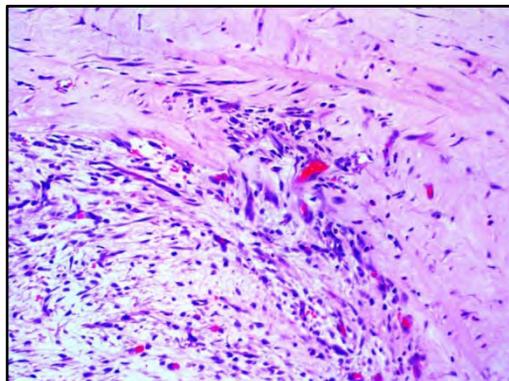
**IMAGEN HIST\_10:** estroma laxo con edema mixoide. Grupo 1.



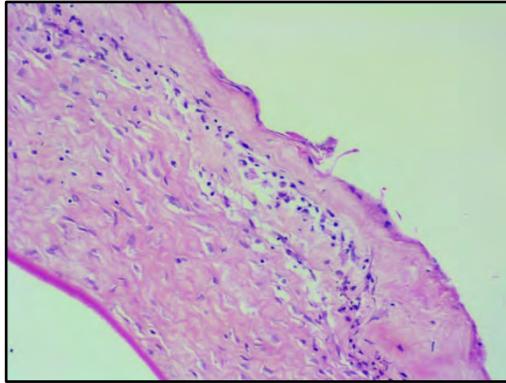
**IMAGEN HIST\_11:** queratocitos activos con remodelación colágena y algunos capilares. Grupo 1.



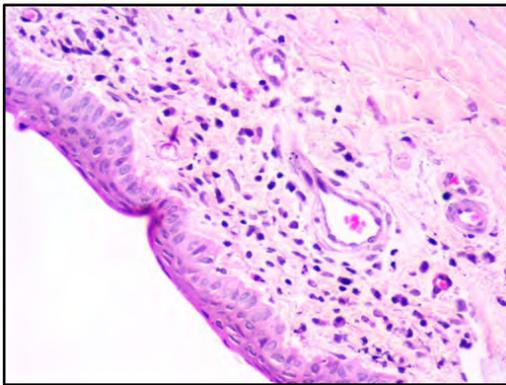
**IMAGEN HIST\_12:** Zona del estroma con margen inferior izquierda edematoso con queratocitos muy reactivos y algunos capilares presentes (centro), algunos con contenido hemático rojizo en su interior. Zona superior muestra estroma con edema rosáceo denso y proteináceo entre bandas colágenas amplias con pocos queratocitos visibles. X20. Grupo 2.



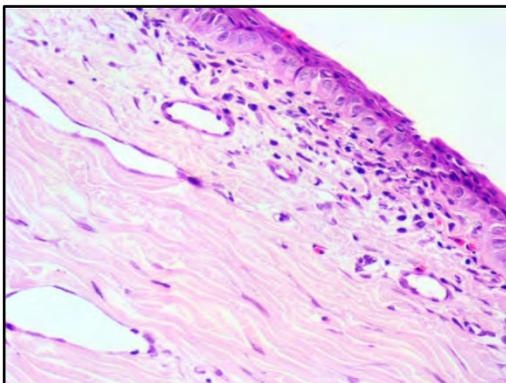
**IMAGEN HIST\_13:** Estroma Corneal a bajo aumento. Se aprecia marcada alteración con edema vacuolar e intersticial con zonas mixoides y algunos capilares. Se ven restos de membrana basal y el epitelio está ausente. X10. Grupo 3.



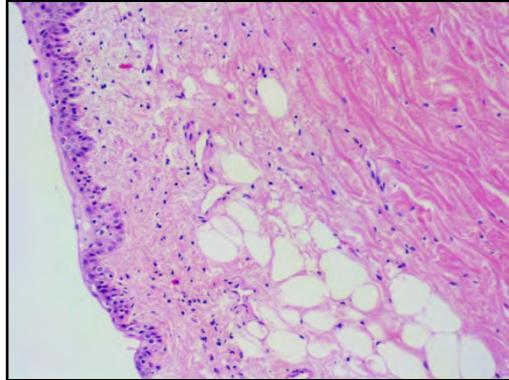
**IMAGEN HIST\_14:** área del limbo con signos inflamatorios crónicos inespecíficos con dos capilares visibles. Grupo 1.



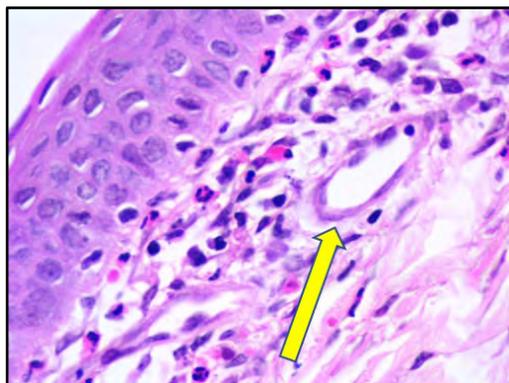
**IMAGEN HIST\_15:** Vista general del Limbo. Capilares dilatados, infiltrado inflamatorio crónico linfocítico e inespecífico de predominio subepitelial. Epitelio normal con varias capas incluida la capa basal y su membrana. X10. Grupo 2.



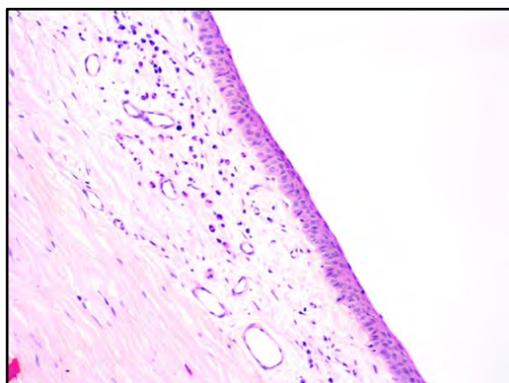
**IMAGEN HIST\_16:** Aspecto general del Limbo. Epitelio con 2-3 capas, infiltrado inflamatorio linfocitario leve y disperso con algún eosinófilo en el estroma con edema. Se aprecia infiltración grasa intersticial con grandes vacuolas. Arriba a la derecha, se observa tejido colágeno denso del Limbo. X4. Grupo 3.



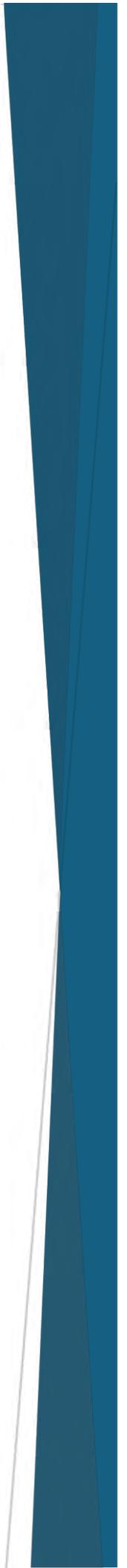
**IMAGEN HIST\_17:** infiltrado inflamatorio inespecífico consistente en linfocitos, monocitos, células plasmáticas y eosinófilos. La flecha señala un capilar. Grupo 1.



**IMAGEN HIST\_18:** limbo que presenta marcado edema estromal. Grupo 1.



# Discusión





## **5. DISCUSIÓN**

### **5.1. EL CONEJO COMO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN EN OFTALMOLOGÍA**

Los conejos son animales comunes en el laboratorio de investigación porque son manejables, ocupan poco espacio y son económicos de mantener. Debido a su popularidad como mascota, el conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) podría ser un paciente común en la práctica veterinaria diaria (ANDREW SE, 2002).

Los conejos tienen ojos prominentes colocados lateralmente que les permiten un gran campo de visión, típico de las especies de presa.

Tanto como animales salvajes, mascotas o sujetos de experimentación se han descrito alteraciones en todas las estructuras oculares, donde la córnea es la más afectada y la úlcera corneal es la patología más común en esta especie (ANDREW, 2002). Estas características han hecho que el conejo sea uno de los animales de experimentación más utilizados en estudios oftalmológicos.

Estos estudios incluyen diferentes partes y alteraciones del globo ocular, como el vítreo (GONG, 2020; KARACHRYSAFI, 2020), posibles implantes para glaucoma (GRIERSON, 2020) y la esclera (URIAS, 2020) entre otros.

### **5.2. EXPERIMENTACIÓN Y CÓRNEA**

En los conejos, la córnea ocupa aproximadamente el 30% del globo ocular (PRABHASAWAT, 2007) y mide 15 mm en horizontal y 14 mm en vertical (DONNELLY, 1997).

La córnea del conejo presenta diferentes capas: epitelio, estroma, membrana de Descemet y endotelio.

El epitelio es una capa queratinizada de 30 a 40 micras en conejos. (ANDREW, 2002).

El estroma se compone principalmente de fibrillas de colágeno, queratinocitos, nervios y glicosaminoglicanos. Las fibrillas de colágeno se organizan en lamelas que

---

discurren paralelas a la superficie corneal. El queratán sulfato, el condroitín sulfato y el dermatán sulfato son los glicosaminoglicanos predominantes en la córnea.

La posición, el tamaño y el grado de hidratación de estas fibrillas de colágeno además de la ausencia de vasos sanguíneos y pigmento y un epitelio de la superficie anterior no queratinizado, dan como resultado una córnea transparente.

La membrana de Descemet es la membrana basal de las células endoteliales y se vuelve más gruesa con la edad, aumenta de 7-8 a 15 micras/micrómetros en conejos mayores (PEIFFER, 1994)

El endotelio es una capa unicelular que cuenta con la presencia de bombas de sodio-ATPasa, fundamentales para el mantenimiento de la transparencia corneal. En la córnea del conejo, la regeneración de las células endoteliales sucede con la división de las células en el margen de la herida, esto no ocurre en otras especies animales como gatos y primates, donde las células endoteliales se agrandan para llenar los huecos existentes (HORN, 1977). Esta capacidad es diferente a medida que el individuo envejece, en los conejos mayores de 1 año las heridas de las células endoteliales corneales son aproximadamente un 50% más lentas en su recuperación, que en los conejos más jóvenes (6-8 semanas) (STAATZ, 1980).

Teniendo en cuenta estas características y el uso del conejo como modelo en experimentación de diferentes alteraciones corneales, este estudio se ha realizado en esta especie, evaluando el epitelio corneal y el estroma superficial principalmente, aunque se estudió la córnea en su totalidad, a diferencia de MONTALVO-PARRA (2020), cuyo estudio se centró en las células endoteliales, igual que LI (2020), que realizó un estudio en la reparación trabecular de córneas de conejos.

Como en el caso de WANG (2020), nuestro estudio se centra en la recuperación corneal tras un daño controlado, aunque en nuestro estudio se trata de una queratectomía superficial, mientras en el estudio de WANG se trataba de una quemadura química.

---

### **5.3. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE ÚLCERAS CORNEALES**

La úlcera corneal se define como la ruptura del epitelio corneal que provoca la exposición del estroma. Es una de las alteraciones corneales más comunes, tanto en la especie humana como en las especies que acuden a consulta en la clínica veterinaria.

El tratamiento depende de diversos factores y principalmente se divide en tratamiento médico y quirúrgico. Habitualmente son complementarios.

Igual que en el presente trabajo, se han realizado múltiples estudios para evaluar el modo de recuperación de la córnea ante diversas alteraciones. Estos estudios se inician en la década de 1980, como es el caso del uso de los colgajos o flaps conjuntivales (HERMAN, 1983).

Entre los tratamientos quirúrgicos se encuentran las queratoplastias de diferente espesor. BACHMANN (2018) estudia, como posible técnica quirúrgica, la “DMEK” (Descement membrane endothelial keratoplasty) para córneas que presentan distrofia corneal endotelial de Fuch. XIE (2018) también realiza un estudio sobre queratoplastias, en el que evalúa el proceso de recuperación corneal tras la realización de una queratoplastia criopreservada lamelar limbal.

Otra de las técnicas que se han estudiado en úlceras de diferentes profundidades es la transposición corneconjuntival en perros (GOGOVA, 2020).

### **5.4. LOS BIOMATERIALES EN EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LA CÓRNEA**

En el presente trabajo se utiliza un trasplante de membrana amniótica (AMT). Este tipo de material está clasificado dentro de los biomateriales que se utilizan para la recuperación de alteraciones corneales como úlceras o deficiencias de células madre limbales entre otras, pero no es el único biomaterial utilizado.

ZHAO (2018) realizó un estudio sobre el uso de las células epiteliales de la mucosa oral como biomaterial para la reconstrucción del epitelio corneal. Otros autores han realizado también estudios sobre la idoneidad de diversos cultivos celulares en la recuperación corneal (HONG, 2018; XU, 2018).

Así mismo, se ha evaluado la acción de córneas obtenidas por bioingeniería en pacientes que precisan de un trasplante corneal en casos de úlceras refractarias o complicadas (GONZÁLEZ-ANDRADES, 2017).

Otra de las líneas de investigación sobre biomateriales para el uso en la recuperación corneal es la del trasplante del limbo o de células de esta porción del globo ocular en diversas alteraciones que incluyen las quemaduras químicas (EL-HOFI, 2019; SACCHETTI, 2018).

### **5.5. LA MEMBRANA AMNIÓTICA COMO TRATAMIENTO DE LAS ALTERACIONES OCULARES**

El uso de la membrana amniótica como biomaterial en oftalmología está ampliamente extendido y estudiado.

Diversos estudios han demostrado su utilidad en la reconstrucción en neoplasias, tanto conjuntivales como localizadas en el limbo esclerocorneal (GOKTAS, 2017) y en casos de melanoma conjuntival (PALAMAR, 2018); además, en ciertas neoplasias oculares se ha combinado el uso de la membrana amniótica junto al tratamiento tópico con interferón alfa-2b (XIE, 2018).

El pterigium es otra de las alteraciones oculares en las que se ha estudiado el uso de la membrana amniótica como parte de su tratamiento quirúrgico (AKBARI, 2017; CLEARFIELD, 2017), y como posible tratamiento en caso de recurrencias (ROSEN, 2018).

También está ampliamente estudiado su uso en casos de deficiencia de células madre en el limbo esclerocorneal (LE, 2019; SABATER, 2017; KIM, 1995).

Con respecto a la córnea, dos grandes grupos de estudios incluyen la membrana amniótica dentro del tratamiento de afecciones de esta parte del globo ocular. El primero es el de las quemaduras corneales, (TAMHANE, 2005; LO, 2013; SUBASI, 2017) y el segundo, el de las queratitis.

Los estudios de las queratitis se han realizado en casos de diverso origen y grado de complicación (LIU, 2019; COSTA, 2019), existiendo estudios de queratitis fúngicas

(CHEN, 2016), bacterianas y herpéticas (ALTAY, 2016) y de diferentes profundidades: desde laceraciones (SOEKEN, 2018), a perforaciones corneales (FAN, 2016)

Otras alteraciones oculares y de la superficie ocular en las que se ha evaluado la viabilidad de la membrana amniótica son el estrabismo (NAXER, 2018), el síndrome de Sjögren (SHAFER, 2019), la queratopatía bullosa (SIU, 2019) y el dolor corneal neuropático (MORKIN, 2018 entre otras.

En todos estos estudios, la membrana amniótica ha sido aplicada después de que la alteración haya sido diagnosticada, y dentro del tratamiento de ésta, a diferencia del presente estudio, donde los ojos de los sujetos estaban en perfectas condiciones antes de realizar la queratectomía y colocar la membrana. Esto último ocurre en los estudios experimentales de SUBASI (2017) y TIGUE (2017): en el caso de SUBASI, se realizó una quemadura alcalina en la córnea y se colocó en ese momento el AMT combinado o no con otros tratamientos. Mientras que el trabajo de TIGUE consistió en la realización de una herida epitelial central de 2 mm de diámetro para luego comprobar la eficacia de los colirios de membrana amniótica y cordón umbilical.

## **5.6. EL USO DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA EN EL OJO DEL CONEJO**

La membrana amniótica no es el único biomaterial que se ha utilizado para la reparación de un defecto ocular determinado. PINHO (2018) utilizó una biomembrana de látex validando su uso como biomaterial para la reconstrucción comparándola con un autotrasplante conjuntival. Otro ejemplo de biomaterial diferente al utilizado en nuestro estudio es el utilizado por FENG (2015), que realizó un trasplante corneal lamelar utilizando una córnea acelular xenogénica.

La membrana amniótica ha sido utilizada en múltiples estudios realizados en diferentes partes del ojo en conejos, como la conjuntiva (MIYAKOSH, 2020; WITTT, 2019), los músculos extraoculares (KENNEDY, 2018; KASSEM, 2018) y en el sistema nasolagrimal (MA, 2019) entre otros.

En cuanto al uso en la córnea, igual que en el presente trabajo, encontramos numerosos estudios en los que se utiliza el trasplante corneal de membrana amniótica en conejos. Algunos de estos, igual que el presente estudio, se centran en la respuesta que

---

se produce en la cicatrización corneal después de realizar un trasplante corneal sobre un daño epitelial (KIM, 1995; HIGA, 2019; ZHOU,2019).

En cambio, otros autores combinan diferentes técnicas con el uso de la membrana amniótica, como es el caso de SUBASI (2017), en el que compara esta técnica con el uso del Cross Linking (CXL) en córneas que han sufrido quemaduras de distinto grado; de JIE (2018) en el que modifica la membrana amniótica desnudando su superficie para evaluar su acción o de HUANG (2020) donde, además de aplicar la membrana amniótica, se añaden factores de crecimiento endotelial en córneas que presentan deficiencias en el limbo.

### **5.7. TIPOS DE MEMBRANA AMNIÓTICA**

La membrana amniótica es un biomaterial que puede encontrarse en diferentes formas para su uso médico y quirúrgico en oftalmología.

Su uso no quirúrgico, lo encontramos en los trabajos de MURRIS (2018) y TIGUE (2017). MURRIS, estudió el uso de extracto y colirio de membrana amniótica en casos de ojo seco y en quemaduras oculares entre otras alteraciones oculares; mientras TIGUE lo hizo de manera experimental, en el ojo de ratón como modelo de quemaduras oculares, usando colirio de membrana amniótica y cordón umbilical, encontrando una mejoría en la restauración corneal y reducción de inflamación.

De manera experimental, el AMT se realizó para valorar su uso en cultivos celulares (DRAGUNOVA, 2019).

LO (2013) y KIM (1995) estudiaron su aplicación, utilizando AMT con membranas refrigeradas, en el caso de LO en quemaduras corneales agudas y KIM en un estudio experimental en el ojo de conejo tras la realización de una queratectomía.

En su estudio, JIE (2018) aplicó de manera experimental un trasplante de membrana amniótica tras desnudarla, encontrando que esta técnica mejora la repoblación epitelial y la diferenciación de las goblet cells, lo que disminuye la inflamación y la cicatriz posterior.

La mayoría de los estudios que se pueden encontrar en la bibliografía, sean experimentales o clínicos, están realizados con membrana amniótica criopreservada.

KIM en el año 2019 realizó un metaanálisis, en el que incluyó 18 estudios (390 ojos de 385 pacientes, que presentaban úlceras corneales), en los que se realizó un AMT con AM criopreservada.

COSTA (2019) también evaluó su uso en la córnea canina en diferentes tipos de úlceras, obteniendo buenos resultados en estos pacientes con este tipo de biomaterial.

TAMHANE (2005) y TANDON (2016) realizaron sus estudios con este tipo de AM en casos de quemaduras corneales.

Las úlceras corneales no son las únicas alteraciones oculares en las que se ha estudiado la AM criopreservada. PALAMAR (2018) utilizó este biomaterial en el tratamiento del melanoma conjuntival, MORKIN en 2018 encontró buenos resultados tras su uso en pacientes con dolor corneal neuropático y SHAFER (2019) encontró beneficios en su uso en pacientes con el síndrome de Sjögren refractarios a los tratamientos estándares, aunque, en estos casos, la mejoría fue temporal.

Al contrario que en todos los estudios anteriormente expuestos, el tipo de membrana amniótica utilizado en nuestro estudio es la membrana amniótica deshidratada.

COOKE, (2014) estudia el uso de distintos tipos de MA, utilizando ensayos bioquímicos y funcionales, compara los tejidos de la membrana amniótica (AM) y del cordón umbilical (CU) criopreservados con el tejido de la membrana amniótica y corion deshidratado (dHACM). Los resultados indican que la criopreservación preserva mejor las moléculas de señalización estructural y biológica de los tejidos fetales, concluyendo que con las membranas criopreservadas se pueden obtener mejores resultados que con las deshidratadas. Apoyándonos en estos resultados, proponemos más estudios en el futuro comparando ambos tipos de membranas utilizando la fórmula de recuperación corneal propuesta en este trabajo.

## **5.8. TÉCNICA EMPLEADA CON LA MEMBRANA AMNIÓTICA**

En el presente estudio, la técnica utilizada para la colocación de la AM es la unicapa, donde como su propio nombre indica, se coloca una única capa de membrana amniótica sobre el defecto que se quiere tratar.

Múltiples trabajos utilizan esta técnica para el tratamiento de diferentes alteraciones corneales como el pterigium (AKBARI, 2017; CLEARFIELD, 2017; ROSEEN, 2018), quemaduras corneales (TAMHANE, 2005; SUBASI, 2017), queratitis (ALTAY, 2016), queratopatía bullosa (SIU, 2019), además de otras alteraciones oculares y de la superficie ocular (NAXER, 2018; MORKIN, 2018).

Diversos autores incluyen la técnica unicapa dentro de sus estudios de AMT, ya sea comparando su resultado con otras técnicas o incluyéndola como una opción en la práctica clínica para resolver quirúrgicamente úlceras corneales complicadas como se detalla a continuación:

En su metaanálisis, LIU (2019) evalúa los resultados obtenidos en diversos estudios tras colocar la membrana amniótica de diferentes maneras sobre defectos corneales en úlceras, tanto infectadas como no infectadas.

Las técnicas empleadas fueron la unicapa, técnica de superposición u “overlay”, técnica de incrustación multicapa o “multilayered inlay technique” y la técnica sándwich.

La técnica de unicapa, consiste en posicionar y anclar la membrana amniótica del tamaño del defecto a cubrir (igual que en nuestro trabajo). La posición de la membrana en estos estudios fue siempre con la membrana basal hacia arriba, mientras que, en el presente estudio, colocamos la mitad de las membranas de esta manera y la otra mitad con la membrana basal hacia abajo.

Las otras técnicas difieren a la técnica utilizada en nuestro trabajo en la manera de colocarlo sobre el defecto: en el caso de la técnica “overlay”, la córnea se cubre completamente con la membrana, anclándola al limbo esclerocorneal, en vez de que cubrir exclusivamente del tamaño del defecto, como se hizo en el presente estudio.

También difieren en la cantidad de capas de membrana amniótica: tanto en la multilayered como en la sandwich se colocan varias capas sobre el defecto; al contrario que en nuestro trabajo, donde solo se coloca una capa.

LIU concluye que el uso de la AM es efectivo para la curación de las úlceras corneales, no encontrando diferencias entre su uso en úlceras infectadas o no infectadas. Donde sí encontraron diferencias entre el uso de las diferentes técnicas fue en la tasa de recuperación epitelial y en la tasa de la mejora de la visión, siendo en ambos casos la técnica unicapa la que presentó mejores resultados. El autor explica que esto puede ser debido a que probablemente esta técnica se utilice más en los casos menos complicados.

También se utilizaron diferentes técnicas de AMT, entre ellas la unicapa, como en el presente estudio, en un trabajo retrospectivo en úlceras corneales complicadas en el ojo canino, evaluando el uso de la técnica unicapa, bicapa o multicapa, con anclaje de la membrana al limbo esclerocorneal, al defecto corneal o a ambos COSTA (2019). El resultado del estudio determinó que el uso de este tipo de biomaterial es efectivo para úlceras complejas como los descemetocelos, las úlceras tipo Melting o infectadas o en perforaciones entre otras, dando un buen resultado visual y cosmético al paciente. Nosotros encontramos que los ojos tratados con AMT mejoraban su recuperación, pero, en nuestro caso, el tipo de úlcera sobre la que se realizó el trasplante no fue complicada, profunda ni infectada, como evaluó COSTA, por lo que proponemos futuros estudios en los que, para valorar la recuperación corneal en estas úlceras, se evalúe histológicamente las córneas y se emplee la fórmula que utilizamos en este trabajo.

En el año 2016 FAN realizó un estudio retrospectivo en el que confirmó la eficacia del uso de la membrana amniótica utilizando la técnica de “roll-in filling” combinada con una cobertura multicapa para perforaciones corneales de menos de 3mm de diámetro. Además de realizar esta técnica, este autor colocaba una burbuja de gas mixto C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> al 20% en la cámara anterior. Aunque tanto la técnica como el problema corneal a solucionar difieren del que presentamos en nuestro trabajo, el trabajo de FAN supone una confirmación más del éxito del uso del AMT, ya que, en el 100% de los casos evaluados, se consiguió conservar la integridad del globo ocular.

## **5.9. EVALUACIÓN TRAS LA IMPLANTACIÓN DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA**

### **5.9.1. CONTROL DEL DOLOR**

Los estudios sobre trasplantes de membrana amniótica (AMT) en la córnea han reportado diferentes resultados sobre la reducción del dolor postrasplante en diversas alteraciones corneales. TAMHANE (2005), en un estudio en quemaduras oculares agudas, determinó que los pacientes que recibían un trasplante de membrana amniótica experimentaban importante alivio del dolor en comparación con los pacientes que solo recibieron terapia médica, a diferencia del presente estudio, donde el ojo tratado con la membrana amniótica (OS), presentó mayor malestar, congestión conjuntival y blefarospasmo que el ojo contralateral en las primeras fases del estudio ( $p < 0.001$ ), signos que fueron disminuyendo a lo largo del estudio como se puede observar en la **Tabla EST\_1** y en la **Figura EST\_1**.

Además, en el presente estudio se ven diferencias en relación con la forma de colocación de la membrana: se encontraron más casos de blefarospasmo y discomfort en pacientes con la membrana colocada por el lado epitelial, que en los que la membrana se colocó en posición estromal, a pesar de no existir significancia estadística para el discomfort ( $p = 0.063$ ) como refleja la **Tabla EST\_1**.

Estos resultados pueden explicarse atendiendo a la sensación de cuerpo extraño descrita por Shafer en pacientes con síndrome de Sjögren tratados con trasplante de membrana amniótica (SHAFER, 2019).

### **5.9.2. AGUDEZA VISUAL**

Otro factor muy importante que considerar, para la evaluación de la idoneidad del uso de la membrana amniótica, es la agudeza visual; atendiendo a su recuperación y a si esta es mejor en el caso de utilizar AMT, en lugar de otras técnicas o tratamientos.

Diversos estudios determinan que no existe diferencias estadísticamente representativas en la mejoría de la agudeza visual ni signos que puedan alterarla, como la opacidad o el edema corneal. Esto ocurre en casos de quemadura ocular aguda, si se compara el AMT con la aplicación de tratamiento médico únicamente (TAMHANE, 2005), en casos de cirugía de pterigión comparando el AMT con el autoinjerto

---

conjuntival libre (AKBARI, 2017) y cuando se compara esta técnica con el uso de Cross-Liniking en quemaduras alcalinas (SUBASI, 2017).

En cambio, para el tratamiento de la queratitis fúngica recalcitrante, se evidencia que existen diferencias en la agudeza visual al comparar diferentes técnicas, entre la que se incluye el uso de la membrana amniótica. CHEN (2016) compara el uso de membrana amniótica combinada con queratectomía escisional y crioterapia focal (EKCAI) con la realización de una queratectomía escisional combinada con injerto de colgajo conjuntival (EKCFI) y con una queratoplastia penetrante terapéutica (TPK). Los mejores resultados son para el grupo TPK y los peores para el grupo EKCFI.

Asimismo, según ALTAY (2016), la agudeza visual mejora en la queratitis estromal bacteriana tratada con trasplante de membrana amniótica, pero no lo hace en pacientes con queratitis herpética.

En nuestro estudio no fue factible una comparación estadística de la presentación del edema corneal entre los sujetos del estudio, debido a la alta prevalencia de valores nulos o “0”. Estudios futuros en los que se puedan incluir un mayor número de individuos quizás puedan esclarecer este dato, lo que aportaría más información sobre la recuperación visual de los pacientes.

Un metaanálisis realizado por LIU (2019), donde se incluyeron 390 ojos de 385 pacientes humanos en dieciocho estudios tratados con AMT, revela que existen diferencias en la tasa de mejora de la visión (VIR) según la técnica elegida para cubrir la úlcera. El VIR más alto coincide en los casos en los que el AMT se colocó en una sola capa, luego para la técnica multicapa, mientras que el valor más bajo fue en el grupo “sándwich”.

En el presente estudio, la técnica empleada fue la unicapa. Futuros estudios del uso de esta membrana posiblemente aporten información sobre si se cumple esta predicción diferencial según el tipo de técnica y los diferentes grados de complicación de las úlceras.

### 5.9.3. VASCULARIZACIÓN

La vascularización corneal fue uno de los signos clínicos que evaluó KIM (1995), en su estudio en córneas de conejos. En dicho estudio, se colocó un AMT después de un mes de realizar una queratectomía superficial química y se comparó con un grupo control en el que no se realizó dicho trasplante.

Al evaluar las córneas al final del estudio tres meses después, se encontró diferencias entre estos dos grupos, ya que grupo control se presentó vascularización e incluso granulomas en el centro de la córnea en todos los individuos, mientras en el grupo experimental los resultados fueron variables: en 5 de 13 especímenes fue moderada, y en los 3 restantes estaba presente no solo una vascularización moderada completa, sino, además se presentó edema corneal.

En un estudio de TANDON (2011), los resultados fueron consistentes con respecto a la presentación de la vascularización. TANDON, en casos de quemaduras oculares moderadas, no encontró diferencias significativas entre la colocación de un AMT, o no, para el factor de vascularización corneal.

Por su parte, TAMHANE (2005) evaluó la diferencia en la presencia de vascularización corneal comparando el uso de AMT y el tratamiento médico en úlceras ocasionadas por quemaduras moderadas y graves. En esta ocasión y posiblemente por el tamaño muestral, no se encontró diferencias estadísticamente representativas entre los grupos, igual que ocurre en nuestro caso, en el que no existe diferencia entre grupos para esta característica.

Aunque en el trabajo de TAMHANE se encontró vascularización tanto en el grupo control como en el del AMT tras tres meses de comenzar el estudio, en nuestro estudio, concretamente en el tercer grupo, que se evaluó a las cuatro semanas de comenzar, ningún individuo presentó vascularización profunda ni superficial. Esto puede deberse a que en nuestro estudio los individuos no presentaban alteraciones corneales previas al tratamiento mientras que en el estudio de TAMHANE las córneas presentaban una quemadura.

También encontró diferencias SUBASI (2017), que realizó un estudio sobre el uso de AMT en córneas de conejo a las que realizaron una quemadura alcalina. La presentación de vascularización fue evaluada de una manera similar a la de nuestro

---

trabajo, no solo usando AMT sino comparando esta técnica con la realización de Cross-linking (CXL) y la combinación de ambas técnicas. En cuanto a la vascularización, encontró diferencias entre grupos, siendo el grupo con AMT como único tratamiento y el de AMT combinado con CXL los que mayor vascularización presentaron al finalizar el estudio.

En nuestro caso, igual que para el edema y otros signos clínicos, no se pudieron obtener resultados estadísticamente comparables en cuanto a la presentación de vascularización entre los ojos a los que se les había realizado el AMT y los que no, así como tampoco entre los diferentes modos de colocación de la membrana, por lo que proponemos realizar estudios adicionales que posibiliten evaluar en mayor profundidad este factor, factor que consideramos altamente significativo y que ha sido discutido extensamente por numerosos autores.

#### **5.9.4. REPARACIÓN CORNEAL**

En el presente estudio, definimos la reparación corneal como la suma de la regeneración epitelial, más la reparación estromal y la reparación limbal.

Los datos que se utilizan para evaluar este factor se han obtenido a partir del estudio histopatológico y cada uno de ellos tienen, a su vez, aspectos que influyen positiva o negativamente en la reparación corneal en su conjunto.

Esta definición de la reparación corneal es la primera vez que se utiliza, aunque diversos autores hablan de la recuperación o regeneración corneal teniendo en cuenta uno o varios factores de los que se han incluido en esta nueva fórmula, tales como la reepitelización, o la recuperación del espesor corneal entre otros.

Las técnicas no inmunohistoquímicas con las que se han obtenido estos resultados también son diversas y serán discutidas a continuación.

#### **5.9.5. RECUPERACIÓN DEL ESPESOR CORNEAL**

Tras la realización de un AMT, numerosos autores, como RAGHUNATHAN (2017); CHE (2019) y COSTA (2019) utilizan el término “recuperación del espesor corneal” para valorar la recuperación corneal.

Para valorar este dato, utilizan diversas técnicas, entre las que se incluye el uso de las medidas con OCT, como en el presente estudio; además de otras que serán discutidas a continuación.

Existen diferentes artículos en los que el uso de la AMT representa una mejora en la recuperación del grosor corneal, aunque, en su mayoría, utilizan combinaciones del uso de MA con otras técnicas como el cross-linking (SOEKEN, 2018), la técnica multicapa (COSTA, 2019), o incluso combinación de multicapa con otras técnicas como como el gas mixto C3F8 en la cámara anterior (FAN, 2016) o la adición de células del estroma corneal entre las capas de un AM ultradelgado (CHE, 2019).

Por otro lado, GOKTAS (2017) encontró una recuperación completa al realizar un trasplante de MA monocapa tras la exéresis del tumor conjuntival y limbal, que es la técnica utilizada en el presente estudio.

#### **5.9.5.1. Otras técnicas de diagnóstico por imagen para la evaluación de la recuperación corneal**

En la literatura, además de la OCT, se puede encontrar diferentes técnicas de diagnóstico por imagen avanzado para la valoración del estado corneal.

FENG (2015) utilizó el microscopio electrónico de barrido, junto con la observación con lámpara de hendidura, para valorar el estado de la córnea tras la realización de un trasplante lamelar de córneas frescas de perro decelularizadas, en córneas de conejo como receptor. De esta forma, confirmó la idoneidad de su uso como posible tejido para trasplantes corneales.

En el año 2018, MORKIN presentó un estudio en pacientes con dolor corneal neuropático, en el que realizaron AMT, evaluando la eficacia, tolerancia y seguridad de su uso en pacientes que presentaban esta alteración. Entre los factores que evaluaron incluyeron los signos clínicos y la densidad y morfología de los nervios corneales subbasales utilizando un microscopio confocal in vivo.

El microscopio confocal in vivo también se utilizó en el trabajo de SIU (2019), que, junto a la evaluación con OCT, confirmó la eficacia del AMT en pacientes con queratopatía bullosa.

CHE (2019), en su estudio sobre un tejido diseñado por ingeniería tisular basado en membrana amniótica y queratocitos, utilizó la OCT para medir el grosor de este trasplante. Además, en dicho estudio se utilizó el microscopio electrónico de barrido y el microscopio electrónico de transmisión para evaluar la microestructura de la matriz extracelular del tejido.

#### **5.9.5.2. El uso de la OCT para evaluar la recuperación corneal**

La OCT se ha utilizado en diversos estudios corneales experimentales y clínicos para la determinación de medidas de diferentes áreas de la córnea, obteniéndose una reproducibilidad aceptable, lo que la faculta para ser utilizada en la obtención de resultados específicos de córnea en ensayos clínicos (DAS, 2019; DUMAN, 2019).

En nuestro estudio, el valor máximo obtenido con OCT en los diferentes puntos estudiados, espesor corneal normal (grosor corneal normal), espesor máximo de la úlcera (el grosor máximo adyacente a la incisión de queratectomía) y espesor central (el espesor en el medio de la queratectomía), se detectó el día 15, excepto para el valor de “Espesor normal” del OD que coincidió con el día 7.

Posteriormente los valores disminuyeron en el grupo de 4 semanas, aunque siempre por encima de los valores de la primera semana, lo que indica recuperación del defecto quirúrgico realizado. Esta tendencia coincide con el estudio de RAGHUTHAN (2017), para el que los valores máximos de la córnea central se encontraron en los primeros días y luego disminuyeron. Aunque el mayor grosor se encontró durante la segunda semana y no durante la primera (3 días), este efecto puede explicarse por la existencia de edema corneal.

En nuestro caso, si tenemos en cuenta los resultados obtenidos por las medidas de OCT, la realización de un AMT no representa una mejora en cuanto a la recuperación del espesor corneal, ya que no existen diferencias estadísticamente representativas de que la recuperación corneal sea mejor con su uso.

### **5.9.6. REEPITELIZACIÓN**

De acuerdo con la literatura consultada, en la mayoría de los casos, la reepitelización es determinada mediante el examen con lámpara de hendidura y la evaluación de la tinción de fluoresceína.

TAMHANE (2005), en un estudio de la evaluación del uso del AMT en casos de quemaduras corneales, utilizó el valor de la reepitelización como método para valorar si esta técnica era más efectiva que el tratamiento médico por sí solo. Para evaluar la reepitelización, utilizó la observación con lámpara de hendidura tras la tinción de fluoresceína de las córneas del estudio y midió el área del defecto epitelial en relación a sus dimensiones.

Con respecto al grupo control, los resultados obtenidos por este autor demostraron la existencia de una mayor reepitelización en los casos en los que se colocó el AMT cuando la quemadura que presentaba el paciente era de grado moderado, mientras que, si la quemadura estaba catalogada como grave, no se encontró diferencias entre el grupo control y el del AMT. El autor explica estos resultados como consecuencia del tamaño muestral del estudio.

TANDON (2011) obtuvo resultados similares a TAMHANE en cuanto a la reepitelización en caso de quemaduras moderadas y graves, siendo mejor si, además, se realiza un AMT en los casos moderados, y no tanto para los graves. Para este autor la diferencia puede explicarse porque este tipo de quemaduras suele estar asociado a isquemias limbales y deficiencia de células madre. Igual que en el estudio de TAMHANE, el método utilizado para la obtención de estos resultados fue la observación con lámpara de hendidura y fluoresceína.

En un estudio realizado por ALTAY (2016), se evaluó el tiempo de epitelización en úlceras bacterianas y herpéticas tratadas con AMT, consiguiendo la reepitelización en ambos grupos y demostrando la idoneidad de su uso para este tipo de alteraciones, a pesar de que presentaron cantidades variables de cicatrices corneales.

AKBARI (2017) realizó un estudio comparando el uso del AMT con la técnica de autoinjerto libre conjuntival para el tratamiento del pterigium. En este caso, no se encontraron diferencias en cuanto a la recuperación epitelial entre ambas técnicas.

Como en casos anteriores, la exploración externa fue el método de diagnóstico de los posibles cambios epiteliales.

También en el año 2017, ASHRAF realizó un estudio sobre el AMT en diferentes alteraciones corneales, siendo la reepitelización nuevamente uno de los factores que utilizaron para justificar el uso de esta técnica. En este caso, se confirma con la exploración que el 80.7% de los pacientes que presentaban úlceras corneales consiguieron la reepitelización.

El metaanálisis realizado por LIU (2019), también se evaluó la reepitelización como un factor de la recuperación corneal tras un AMT. En este estudio se compararon diferentes técnicas de trasplante: la que mejor reepitelización presentó fue la técnica denominada como sándwich, seguida por la unicapa y por último la multicapa. Para definir la epitelización, en este estudio se basaron en el tiempo en el que se observó el estado de fluoresceína negativo en los pacientes.

## **5.10. EL USO DE LA HISTOLOGÍA PARA EVALUAR LA RECUPERACIÓN CORNEAL**

A diferencia de los estudios anteriormente mencionados, en nuestro estudio la evaluación histológica se realizó atendiendo al estado morfológico y funcional del epitelio, el estroma y el limbo corneoescleral. En cada uno de estos puntos, se valoraron las estructuras y los posibles cambios que se podían encontrar y que, de alguna forma, pudieran afectar, positiva o negativamente, a la recuperación corneal.

### **5.10.1. EPITELIO**

El epitelio corneal es la capa más externa del globo ocular, mide unas 50 $\mu$  de grosor, es homogéneo de tipo “escamoso estratificado no queratinizado”, y está compuesto por 5-10 capas celulares que se encuentran distribuidos de diferente forma en función de la localización, mientras que, en la zona central el epitelio tiene entre 5 y 7 capas, en la periferia se encuentran entre 7 y 10 (SRIDHAR, 2018).

En el presente estudio el **número de capas** varió en función del grupo y por lo tanto del tiempo transcurrido desde la queratectomía. En el grupo 1, tras 1 semana de la

queratectomía, la mayoría de los casos presentaron 2 capas celulares en el ojo control (OD) y entre 2 y 4 en el ojo en el que se realizó el AMT (OS). Variando su número entre 0 y 4 en el OD y 0 y 6 en el OS.

Los resultados en el segundo grupo, tras 2 semanas de la intervención, el valor obtenido en mayor frecuencia es de 3 para el OD y 3-4 para el OS. Los valores oscilaron entre 0 y 6 para el OD y 0 y 10 para el OS (sólo se encontró en 1 caso de una córnea perforada). Estos resultados coinciden con los de JIE (2018), que evaluó con hematoxilina-eosina el estado de las córneas de conejos tras la realización de AMT con membranas denudadas e intactas. Este autor refiere haber encontrado un epitelio ya estratificado, a pesar de no especificar el número de capas epiteliales presentes.

En nuestro trabajo, tras 4 semanas de evolución, aún no se había alcanzado el número de capas epiteliales normales en la mayoría de los casos, ya que se encontraron 2-3 capas en el OD y 3-4 en el OS. El número de capas osciló entre 0 y 6 para el OD y de 0 y 4 en el OS.

Estos resultados difieren de los referidos en el trabajo de JIE (2018) para el que, ya a las 3 semanas de evaluación, el epitelio era uniforme. Esto puede deberse, por un lado, a las diferencias entre los tipos de membrana utilizada (deshidratada en nuestro caso; criopreservada en el estudio de JIE), así como el estado de la córnea previo de la colocación de la membrana amniótica: en nuestro estudio, se realiza previamente una queratectomía de 200 micras y, en el caso de JIE, se realiza sobre ojos sanos a los que se les eliminó parcialmente conjuntiva limbal y bulbar antes del AMT.

Las **células basales** están localizadas en una única capa en el epitelio. Su altura es de 20 $\mu$  aproximadamente, son de morfología cuboidal o columnar y se encuentran situadas en la parte inferior de las células epiteliales. Su citoplasma contiene queratina, compuesto que es muy importante para la formación y mantenimiento de la membrana basal. Algunas enfermedades, como la diabetes, o la cirugía ocular, pueden estar relacionadas con la anormalidad morfológica y funcional de las células basales (QU, 2016).

En nuestro trabajo, no se encuentran células basales en el grupo 1 mientras que en los grupos 2 y 3, se encontraron en la mayor parte de los puntos analizados, tanto en OD como en OS.

Inmediatamente debajo de las células basales, se encuentra la **membrana basal**. Esta lámina tiene un espesor de unos 40-60 nm, está compuesta por colágeno tipo IV, y en ella se distinguen una lámina lúcida y una lámina densa. Desde el epitelio, se desprenden las fibrillas de anclaje, que atraviesan la membrana basal y acaban como placas de anclaje, estructuras compuestas por distintos tipos de colágeno (SRIDHAR, 2018).

En el grupo 1, la membrana basal no aparece en el epitelio en la mayoría de los casos, al contrario que sucede en el grupo 2, donde se localiza en 16 (OD) y 15 (OS) de los 24 puntos analizados. En el grupo 3 se encontró diferencia entre los ojos: en el OD, solo la mitad de los puntos evaluados presentó esta membrana; mientras que en el OS pudo ser encontrada en la mayoría de ellos.

### **5.10.2. ESTROMA**

El estroma de la córnea forma la mayor parte de su estructura, ocupando aproximadamente el 80-85% de su espesor. Esta porción de la córnea tiene la característica de ser transparente. Está compuesto por queratocitos, colágeno, linfocitos, macrófagos y neutrófilos aislados (MAGGS, 2009; SRIDHAR, 2018).

En el presente estudio, se evaluaron las características de los **queratocitos**: en el grupo 1, aunque encontramos tanto queratocitos maduros (en mayor proporción en el OD) como queratocitos muy activos (en mayor número en el OS), la mayoría eran inmaduros. Mientras que en grupo 2, la mayoría de los queratocitos en ambos ojos presentan un cierto grado de actividad, con solo 4 (OD) y 5 casos (OS) de queratocitos maduros.

En el grupo 3 estas células presentaron tendencia a la actividad, encontrando queratocitos inmaduros y muy activos principalmente en ambos subgrupos, aunque los queratocitos maduros también se encuentran en algunos lugares, siendo su número más abundante en el OD.

Por lo tanto, al evaluar las características histológicas de los queratocitos, encontramos cierta tendencia a que presenten mayor actividad a medida que pasa el tiempo.

A diferencia del presente estudio, diversos autores evalúan los cambios que presentan estas células en procesos de reparación corneal con técnicas inmunohistoquímicas, como es el caso de MORISHIGE (2011), en el que se evalúa la transdiferenciación de los queratocitos en miofibroblastos en córneas que presentaban queratopatía bullosa; o de TAKAHASHI (2007) que valoró la diferenciación miofibroblástica tras colocar un parche de membrana amniótica en una córnea que presentaba una quemadura alcalina.

El **edema corneal** es otro de los factores histológicos que pudimos evaluar. Este cambio patológico en el estroma corneal se produce cuando existe una disfunción del endotelio, del estroma o del epitelio, que permite la entrada de agua desde el exterior o del interior del globo ocular a la córnea. Un exceso de fluidos acumulados en el estroma separa las lamelas de colágeno, dando lugar a la pérdida de la transparencia corneal (MAGGS, 2009).

En el presente estudio, el edema se produce por la disrupción existente en el epitelio tras la queratotomía y se catalogó como edema simple y edema mixoide.

El edema simple se encontró en la mayoría de los puntos analizados en OD y OS de los 3 grupos, mientras que para el edema de tipo mixoide se encuentran diferencias tanto entre los grupos y entre el lado estudiado (OD y OS), siendo dispares sus resultados.

En el presente trabajo, la presencia de **patrones vasculares** en el estroma es otra de las diferencias presentes entre los grupos. En el grupo 1, no hay coincidencia entre OD y OS: en el OD la mitad de los casos los presentaron y la otra mitad no, mientras que en el OS solo 6 lo presentaron y 18 no. En el grupo 2, existen coincidencias apreciables entre el OD y el OS, ya que no presentan patrones vasculares en la mayoría de los puntos analizados; lo mismo ocurre en la mayoría de los puntos del OD del grupo 3, pero no en los del OS, donde, en la mayoría de ellos, encontramos patrones vasculares.

En la evaluación de queratocitos, en cuanto a la presencia de patrones vasculares o neovascularización en el estroma corneal, diversos autores han utilizado técnicas inmunohistoquímicas, a diferencia del presente estudio, que se realizó exclusivamente con la observación histológica de las córneas. Es el caso de LOPEZ (2018), que utilizó el VEGFA (Vascular endothelial growth factor-A) tras la aplicación de diferentes

fármacos en un modelo corneal de conejo, y JIANG (2017) donde este factor se evaluó junto con otros mediadores para valorar la reparación corneal.

### **5.10.3. LIMBO**

En el limbo se valoraron histológicamente signos de **inflamación**, y se encuentra que, en los tres grupos valorados, existe una tendencia a que se presente más inflamación en el OD que en el OS. Aunque hay que resaltar que se presentan en diferentes grados en los distintos grupos.

Con respecto a la **vascularización**, existe una coincidencia entre grupos y subgrupos, ya que está presente en todos los casos evaluados.

La presencia de **edema** en el limbo coincide en los dos primeros grupos, tanto en OD como en OS, mientras que, en el tercer grupo, hay diferencias en la presencia de edema, no se encontró en 1 caso de OD y en 2 de OS.

## **5.11. FORMULA MATEMÁTICA PARA LA EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN CORNEAL**

En nuestro conocimiento, para la evaluación de la recuperación corneal, es la primera vez que se utiliza una fórmula matemática en la que se tienen en cuenta las características histológicas del proceso de regeneración corneal.

De esta manera, para nosotros la reparación corneal es un término más complejo que el utilizado habitualmente para describir la recuperación corneal.

No se encontraron diferencias entre grupos cuando se examinaron exclusivamente los signos clínicos y las medidas de OCT. Incluso, ni siquiera cuando se evaluaban las imágenes histológicas por sí solas, se pudo concluir en la existencia de mejoría tras la colocación de la membrana amniótica, ni si existían diferencias en el modo de colocación.

Sin embargo, gracias al empleo de la fórmula que hemos desarrollado en este trabajo, basada en nuestros resultados histológicos, podemos afirmar que la reparación corneal es más efectiva con la aplicación de un trasplante unicapa de membrana

amniótica tras la realización de un defecto corneal controlado, si lo comparamos con un ojo en el que no se coloca dicha membrana.

Esto coincide con los resultados de diferentes artículos que indican que esta técnica supone una mejoría en la recuperación del espesor corneal. Sin embargo, la mayoría de los artículos usan combinaciones de la membrana amniótica con otras técnicas como Cross-linking (SOEKEN, 2018), técnica multicapa (COSTA, 2019), combinando la técnica multicapa con otras técnicas como aplicando gas mixto C3F8 en cámara anterior (FAN, 2016), o añadiendo células corneales estromales entre capas de membrana amniótica ultrafina (GONZÁLEZ-ANDRADES, 2017).

El presente estudio utiliza la técnica de trasplante monocapa, cuya efectividad ha sido demostrada en otros estudios, como el de GOKTAS (2017). Sin embargo, consideremos que son necesarios más estudios que sostengan esta afirmación, incluyendo evaluaciones de diferentes métodos de colocación de la membrana, tiempos de aplicación, y técnicas quirúrgicas. Además, proponemos que se aplique la nueva fórmula que hemos desarrollado para evaluar la capacidad de reparación corneal en posibles variaciones.

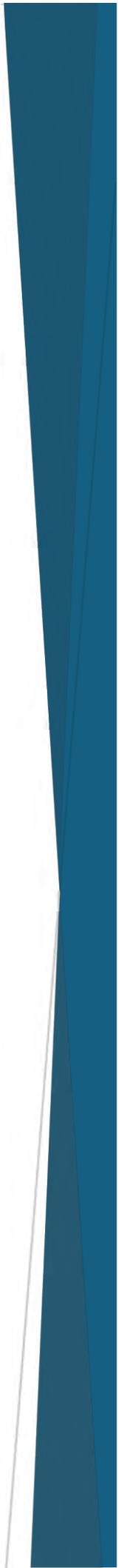
Con más detalle, tras la evaluación de las **tablas EST\_5 y EST\_6**, encontramos que, en la reparación inicial, tras la primera semana, la mejoría es mayor en los individuos en los que la membrana se colocó por el lado estromal (TMA estromal vs control=0.570, con un intervalo de confianza del 90%= 0.021;1.119). Mientras que, en el período más avanzado (2-4 semanas), los individuos a los que se les colocó la membrana por el lado epitelial presentaron mayor reparación (diferencia de resultados= 0.097, con un intervalo de confianza del 90%= 0.009;0.785).

Estos resultados se confirman en la **Tabla EST\_6**, cuando se comparan directamente los modos de inserción (epitelial y estromal), siendo el resultado -0.869, con un intervalo de confianza del 90%= -1.655; -0.093, en la primera semana. Mientras que, en la segunda fase, la superioridad de la colocación por el lado epitelial con respecto a la estromal es de 0.745, con un intervalo de confianza del 90%= 0.197; 1.294.

Todos los análisis sugieren que en la primera semana el trasplante de membrana amniótica es más efectivo cuando se coloca en el modo estromal, mientras que, a largo plazo, el modo epitelial es más efectivo.



# Conclusiones





## 6. CONCLUSIONES

**PRIMERA.** La evaluación de los signos clínicos presentados durante el proceso de reparación corneal concluye que no existe una diferencia si se realiza o no un trasplante de membrana amniótica, tras la realización de una queratectomía superficial.

**SEGUNDA.** El estudio de medidas de OCT en diferentes puntos de la córnea durante el proceso de curación corneal demuestra que no hay diferencia en la recuperación corneal si se realiza o no un trasplante de membrana amniótica, tras la realización de una queratectomía superficial.

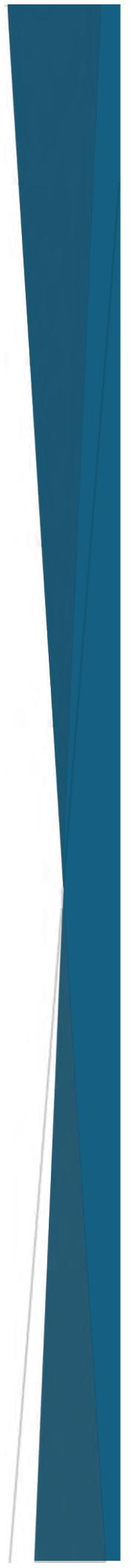
**TERCERA.** La valoración de los resultados histopatológicos recabados en el proceso de recuperación corneal confirma que el uso de una capa de membrana amniótica resulta en una mayor recuperación corneal tras la realización de una queratectomía superficial controlada, ya que existe un modelo lineal que demuestra una interacción estadísticamente representativa entre el tiempo y el modo de implantación de la membrana amniótica.

**CUARTA.** Los resultados histopatológicos confirman que, a corto plazo, la colocación del trasplante de membrana amniótica es más efectivo por el lado estromal, mientras que a largo plazo la colocación por el lado epitelial es más efectivo.

**QUINTA.** El uso de la fórmula matemática que emplea los resultados histopatológicos presentada en este trabajo ofrece un método más efectivo y preciso para la evaluación de la recuperación corneal, comparado con la observación directa de los signos clínicos o realizando medidas de OCT durante el proceso de reparación corneal.



# Resumen





## 7. RESUMEN

El estudio tiene como objetivo evaluar la curación corneal post trasplante de membrana amniótica en defectos corneales controlados, justificando su aplicación en la práctica oftalmológica habitual. El objetivo es establecer un método confiable para evaluar el proceso de reparación.

En tres grupos de seis conejos adultos de Nueva Zelanda, se realizó una queratectomía y trasplante en monocapa de membrana amniótica (AM) humana deshidratada en el ojo izquierdo (OS), tomando el ojo derecho (OD) como ojo de control. Se evaluaron los signos clínicos y se enuclearon ambos ojos a las 1, 2 y 4 semanas para mediciones por tomografía de coherencia óptica (OCT) y análisis histológico, recopilando datos de diferentes regiones de epitelio, estroma y limbo. Este estudio se realizó utilizando una fórmula que combina datos histológicos categorizando su presencia y/o tipo como beneficioso para la reparación corneal.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los ojos experimentales y de control con respecto a todos los signos clínicos y mediciones de OCT. Sin embargo, un modelo lineal utilizando resultados histopatológicos mostró una interacción período-modo de implante con significación estadística ( $p=0,010$ ). El uso de la membrana amniótica de una sola capa dio como resultado una mejor recuperación corneal: el lado estromal mostró una mejor recuperación en la primera semana y el lado epitelial demostró ser más efectivo que el lado estromal a largo plazo.

Por primera vez, se introduce una fórmula estadística que emplea datos histopatológicos para determinar la recuperación corneal, ofreciendo potencialmente un método más preciso y confiable en comparación con la observación de signos clínicos y mediciones corneales con OCT.

## 7. SUMMARY

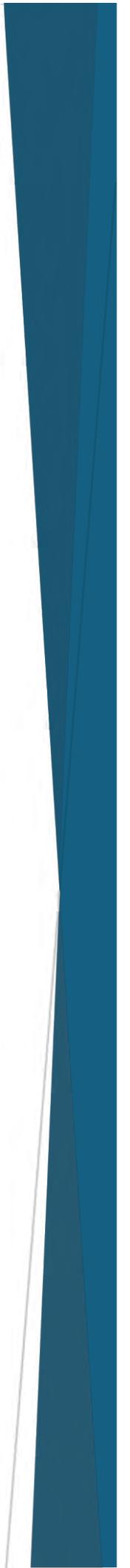
The study aims to evaluate corneal healing post amniotic membrane transplantation in controlled corneal defects, justifying its application in routine ophthalmology practice. The objective is to establish a reliable method for assessing the repair process.

In three groups of six adult New Zealand rabbits, keratectomy and a monolayer transplant of dehydrated human amniotic membrane (AM) were conducted in the left eye (OS) with the right eye (OD) serving as the control eye. Clinical signs were assessed, and both eyes were enucleated at 1, 2, and 4 weeks for optical coherence tomography (OCT) measurements and histological analysis, collecting data from different epithelium, stroma, and limbus regions. This study was conducted using a formula that combines histologic data categorizing their presence and/or type as beneficial for corneal repair.

No statistically significant differences were found between the experimental and control eyes regarding all clinical signs and OCT measurements. However, a linear model using histopathological results showed a period-implant mode interaction with statistical significance ( $p=0.010$ ).

The use of the single-layer amniotic membrane resulted in improved corneal recovery with the stromal side showing better performance in the first week and the epithelial side proving to be more effective than the stromal side in the long term. For the first time, a statistical formula employing histopathological data is introduced to determine corneal recovery, potentially offering a more accurate and reliable method compared to the observation of clinical signs and corneal measurements with optical coherence tomography. (OCT).

# Bibliografía





---

## 8. BIBLIOGRAFÍA

**ABAHUSSIN M., HAYES S., KNOX CARTWRIGHT N.E., et al. 2009.** 3D collagen orientation study in human cornea using X-ray diffraction and femtosecond laser technology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50:5159-5164.

**ABDO M., HADDAD S., EMAM M. 2017.** Development of the New Zealand White Rabbit Eye: I. Pre-and Postnatal Development of Eye Tunics. *Anat. Histol. Embryol*, 46(5):423-430.

**AGHAMOHAMMADZADEH H., NEWTON R.H, MEEK K.M. 2004.** X-ray scattering used to map the preferred collagen orientation in the human cornea and limbus. *Structure.* 12:5 49-56.

**AKAGI T., UJI A., HUANG A.S., et al. 2018.** Conjunctival and Intrasccleral Vasculatures Assessed Using Anterior Segment Optical Coherence Tomography Angiography in Normal Eyes. *Am. J. Ophthalmol.* 196:1-9.

**AKBARI M., SOLTANI-MOGHADAM R., ELMIR., et al. 2017.** Comparison of free conjunctival autograft versus amniotic membrane transplantation for pterygium surgery. *J. Curr. Ophthalmol.* 18;29(4):282-286.

**ALDAHLAWI N.H., HAYES S., O'BRART D.P., et al. 2016.** An investigation into corneal enzymatic resistance following epithelium-off and epithelium-on corneal crosslinking protocols. *Exp. Eye Res.* 153:141-151.

**ALHARBI A, SWARCRICK H.A. 2003.** The effects of overnight orthokeratology lens wear on corneal thickness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44(6):2518-2523.

**ALI M., RAGHUNATHAN V.K., LI J.Y., et al. 2016.** Biomechanical Relationships Between the Corneal Endothelium and Descemet's Membrane. *Exp. Eye Res.* 152:57-70.

**ALMAHMOUD T., ELHENAN M., ELSHAMSY M.H., et al. 2019.** Management of Infective Corneal Ulcers in a High-Income Developing Country. *Medicine (Baltimore)* 98(51): e18243.

**ALTAY Y., TAMER S., BURCY A., et al. 2016.** Amniotic membrane transplantation in bacterial and herpetic stromal keratitis. *Turk. J. Med. Sci.* 17;46(2):457-462.

**AMBROSIO R. JR, NOGUEIRA L.P., CALDAS D.L., et al. 2011.** Evaluation of corneal shape and biomechanics before LASIK. *Int. Ophthalmol. Clin.* 51(2):11-38.

- ANDREASSEN T.T., SIMONSEN A.H., OXLUND H. 1980.** Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp. Eye Res.* 31(4):435-441.
- ANDREW S.E. 2002.** Corneal diseases of rabbits. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 5 (2002) 341-356.
- ANG M., BASKARAN M., WEKMEISTER R.M., et al. 2018.** Anterior Segment optical coherence tomography. *Prog. Retin. Eye Res.* 66:132-156.
- ANGMO D., DHIMAN R., CHAURASIA S., et al. 2018.** Pigment Dispersion syndrome Presenting as Endothelial Dystrophy: An Atypical Presentation. *J. Curr. Ophthalmol.* 2;31(4):446-449.
- ARMARNIK S., MIMOUNI M., GOLDERNBERG D., et al. 2019.** Characterization of deeply embedded corneal foreign bodies with anterior segment optical coherence tomography. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 257(6):1247-52.
- ASHRAF N.N., ADHI M. 2017.** Outcome of application of amniotic membrane graft in ocular surface disorders. *J. Pak. Med. Assoc.* 67(7):1045-1049.
- AUSTIN A., LIETMAN T., ROSE-NUSSBAUMER J.R. 2017.** Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology* 124(11):1678-1689.
- AZAR D.T., SPURRMICHAUD S.J., TISDALE A.S., et al. 1989.** Decreased penetration of anchoring fibrils into the diabetic stroma. *Arch. Ophthalmol.* 107 (10):1520-1523.
- BACHMANN B., SCHRITTENLOCHER S., MATTHAEI M., et al. 2018.** Descemet membrane endothelial keratoplasty in complex eyes. *Ophthalmologie.* 26; 116(3):228-235.
- BALDOCK C., GILPIN C.J., KOSTER A.J., et al. 2002.** Three-dimensional reconstructions of extracellular matrix polymers using automate electron tomography. *J. Struct. Biol.* 138: 130-136.
- BALLAND O., POINSARD A.S., FAMOSE F., et al. 2016.** Use of a Porcine Urinary Bladder Acellular Matrix for Corneal Reconstruction in Dogs and Cats. *Vet Ophthalmol.* 19(6):454-463.
- BAO F., DENG M., ZHENG X., et al. 2017.** Effects of diabetes mellitus on biomechanical properties of the rabbit cornea. *Exp. Eye Res.* 161:82-88.
- BARATHI A., THU M.K, BEUERMAN R.W. 2002.** Dimensional Growth of the Rabbit Eye. *Cells Tissues Organs.* 171 (4):267-285.

- BATLLE J.P, PERDOMO F.J. 1993.** Placental membranes as a conjunctival substitute. *Ophthalmology* 100:107. Abstract 9 A.
- BELIN M.W, KHACHIKIAN S.S. 2009.** An introduction to understanding elevation-based topography: How elevation data are displayed. A review. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 37:14-29.
- BERGMANSON J.P., HORNE J., DOUGHTY M.J., et al. 2005.** Assessment of the number of lamellae in the central region of the normal human corneal stroma at the resolution of the transmission electron microscope. *Eye Contact Lens* 31:281-287.
- BINDER P.S., MAY C.H, GRANT S.C. 1980.** An evaluation of orthokeratology. *Ophthalmology* 87(8):729-744.
- BLANCHARD A., BARR E.M, GILGER B.C. 2019.** Evaluation of equine corneal disease using spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT). *Vet Ophthalmol.* 22(6):791-798.
- BLODI F.C. 1980.** Eye Problems of the Elderly. *Ophthalmologica*; 181 (3-4):121-128.
- BOOTE C, DENNIS S., NEWTON R.H., et al. 2003.** Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, 44 (7):2941-2948.
- BOOTE C., DENNIS S., HYANG Y., et al. 2005.** Lamellar orientations in human cornea in relation to mechanical properties. *J. Struc. Biol.* 149 (1):1-6.
- BOOTE C., KAMMA-LORGER C.S., HAYES S., et al. 2011.** Quantification of collagen organisation in the peripheral human cornea at micron-scale resolution. *Biophys. J.* 101: 33-42.
- BOURNE W.M., NELSON L.R, HODGE D.O. 1997.** Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci*, 38:779-782.
- BOWEN J.M., SOBEY G.J., BURROWS N.P., et al. 2017.** Ehlers-Danlos syndrome, classical type. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 175:27-39.
- BOYCE B.L., GRAZIER J.M., JONES R.E., et al. 2008.** Full-field deformation of bovine cornea under constrained inflation conditions. *Biomaterials.* 29:3896-3904.
- BOYDE A. 1986.** Applications of tandem scanning reflected light microscopy and three-dimensional imaging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 483:428-439.
- BOYDE A., PETRAN M, HADRAVSKY M. 1983.** Tandem scanning reflected light microscopy of internal features in whole bone and tooth samples. *J. Microsc.* 132:1-7.
-

**BRODY J., WALLER S, WAGONER M. 1994.** Corneal topography: History, technique, and clinical uses. *Int. Ophthalmol. Clin.* 34:197-207.

**BURMAN S., TEJWANIS., VEMUGANTI G.K., et al. 2004.** Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: a review of current indications. *Cell Tissue Bank* 5(3):161-175.

**CAIRNS G, McGHEE C.N. 2005.** OrbSCAN computerized topography: Attributes, applications, and limitations. *J. Cataract Refract. Surg.* 31:205-220.

**CANKAYA A.B., BEYAZYULDIZ E., ILERI D., et al. 2012.** The effect of contact lens usage on corneal biomechanical parameters in myopic patients. *Cornea* 31(7):764-769.

**CENDELLA R.J, FLESCHNER C.R. 1990.** Kinetics of corneal epithelium turnover in vivo. Studies of lovastatin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31 (10):1957-1962.

**CHAI DAROON W., PHAOCHAROEN N., SRISOMBOON T., et al. 2019.** *Exserohilum rostratum* Keratitis in a Patient with Human Immunodeficiency Virus. 2019. *Case Rep Ophthalmol* 17;10(1):127-133.

**CHAVES M.A.P.D., DE MEDEIROS A.L., VILAR C.M.C., et al. 2019.** Architecture evaluation of the main clear corneal incisions in femtosecond laser-assisted cataract surgery by optical coherence tomography imaging. *Clin. Ophthalmol.* 14;13: 365-372.

CHE X., WU H., JIA C., et al. 2019. A Novel Tissue-Engineered Corneal Stromal Equivalent Based on Amniotic Membrane and Keratocytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1;60(2):517-527.

**CHEN Y., GAO M., DUNCAN J.K., et al. 2016.** Excisional keratectomy combined with focal cryotherapy and amniotic membrane inlay for recalcitrant filamentary fungal keratitis: A retrospective comparative clinical data analysis. *Exp. Ther. Med.* 12(5):3014-3020.

**CINTRON C., SZAMIER R.B., HASSINGER L.C., et al. 1982.** Scanning Electron Microscopy of Rabbit Corneal Scars. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 23(1):50-63.

**CLARE G., SULEMAN H., BUNCE C., et al. 2012.** Amniotic membrane transplantation for acute ocular burns. *Cochrane Database Syst. Rev.* 12 (9):CD009379.

**CLEARFIELD E., HAWKINS B.S, KUO I.C. 2017.** Conjunctival autograft Versus Amniotic Membrane Transplantation for treatment of Pterygium: Findings from a Cochrane Systematic Review. *Am. J. Ophthalmol.* Oct; 182:8-17.

---

- COLITZ C.M.H. 2019.** Ocular Surface Diseases in Marine Mammals. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 22(1):35-51.
- COOKE M., TAN E.K., MANDRYCKY C., et al. 2014.** Comparison of cryopreserved amniotic membrane and umbilical cord tissue with dehydrated amniotic membrane/chorion tissue. *J. Wound Care.* 23(10):465-474.
- COOPER L.J., BENTLEY A.J., NIEDUSZYNSKI I.A., et al. 2006.** The role of dermatopontin in the stromal organization of the cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47:3303-3310.
- COSTA D., LEIVA M., SANZ F., et al. 2019.** A Multicenter Retrospective Study on Cryopreserved Amniotic Membrane Transplantation for the Treatment of Complicated Corneal Ulcers in the Dog. *Vet. Ophthalmol.* 22(5):695-702.
- COURVILLE C.B., SMOLEK M.K, KLYCE S.D. 2004.** Contribution of the ocular surface to visual optics. *Exp. Eye Res.* 78:417-425.
- CRESPO-MORAL M., GARCÍA-POSADAS L., LÓPEZ-GARCÍA A., et al. 2020.** Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular Surface. *PLoS. One.* 13;15 (1):e0227732.
- CURY P.R., ARAUJO V.C., CANAVEZ F., et al. 2007.** Hydrocortisone affects the expression of matrix metalloproteinases (MMP-1,-1, -2,-7 an-11) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP-1) in human gingival fibroblasts. *J. Periodontol.* 78(7):1306-1315.
- DAPENA I., PARKER J.S, MELLES G.R. 2020.** Potential Benefits of Modified corneal Tissue Grafts for Keratoconus: Bowman Layer “Inlay” and “Onlay” Transplantation, and Allogenic Tissue Ring Segments. *Curr. Opin. Ophthalmol.* Jul;31(4):276-283.
- DAS M., MENDA S.A., PANIGRAHI A.K., et al. 2019.** Repeatability and Reproducibility of Slit Lamp, Optical Coherence Tomography, and Scheimpflug Measurements of Corneal Scars. *Ophthalmic Epidemiol.* 26:251-256.
- DAVISON P.F, GALBANY E.J. 1986.** Connective Tissue Remodeling in Corneal and Scleral Wounds. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27(10):1478-1484.
- DE JONG T., SHEEHAN M.T., DUBBELMAN M., et al. 2013.** Shape of the anterior cornea: Comparison of height data from 4 corneal topographers. *J. Cataract Refract. Surg.* 39:1570-1580.
-

- DE JONG T., SHEEHAN M.T., KOOPMANS S.A., et al. 2017.** Posterior corneal shape: Comparison of height data from 3 corneal topographers. *J. Cataract Refract. Surg.* 43:518-524.
- DE LINDE HERIKSEN M., PLUMMER C.E, BROOKS D.E. 2013.** Modified Kuhnt-Szymanowski Surgical Procedure for Secondary Cicatricial Ectropion in a Horse. *Vet. Ophthalmol.* 16(4):276-281.
- DE ROTTH A. 1940.** Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch. Ophthal.* 23:522-555.
- DONNELLY T.M. 1997.** Basic husbandry, physiology, and husbandry. In: Hillyer EV, Auesenberry KE, editors. *Ferrets, rabbits, and rodents: clinical medicine and surgery.* Philadelphia: WB Saundert; p.147-159.
- DOUGHTY M.J. 2015.** Assessment of Size and Nucleo-Cytoplasmic Characteristics of the Squamous Cells of the Corneal Epithelium. *Clin. Exp. Optom.* 98 (3):218-223.
- DRAGÚŇOVÁ J., KABÁT P., CUCOROVÁ V., et al. 2019.** Deep frozen amniotic membrane used as a scaffold and/or carrier for different cell types. *Cell Tissue Bank.* 20(1):35-48.
- DREWS R.C. 1964.** Depth of field in slit lamp phtography. An optical solution using the Scheimpflug principle. *Ophthalmologica.* 148:143-150.
- DUA H.S., FARAJ L.A., SAID D.G., 2013.** Human corneal Anamoty Redefined: A Novel pre-Descemet's Layer (Dua's Layer). *Ophthalmology,* 120 (9):1778-1785.
- DUA H.S., GOMES J.A.P., KING A.J., et al. 2004.** The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.* 49:51-77.
- DUBBELMAN M., WEEBER H.A., VAN DER HEIJDE R.G., et al. 2002.** Radius and asphericity of the posterior corneal surface determined by corrected scheimplug phtography. *Acta Ophthalmol. Scand.* 80:379-383.
- DUMAN R., ERTEKIN T., DUMAN R., et al. 2019.** The novel model: Experimental optical coherence tomography-guided anterior segment imaging chick embryo model. *Indian J. Ophthalmol.* 67(1):54-58.
- EGHRARI A.O., RIAZUDDIN S.A, GOTTSCH J.D. 2015.** Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. In, *Progress in Molecular Biology and Translational Science,* vol 134, Pages 7-23.

- 
- EL-HOFI A.H, HELALY H.A. 2019.** Evaluation of limbal transplantation in eyes with bilateral severe ocular surface damage secondary to chemical injury. *Clin Ophthalmol.* 18; 13:383-390.
- ELSHEIKH A., ALHASSO D, RAMA P. 2008.** Assessment of the epithelium's contribution to corneal biomechanics. *Exp. Eye Res.* 86 (2):445-451.
- FAN J., WANG M, ZHONG F. 2016.** Improvement of Amniotic Membrane Method for the Treatment of Corneal Perforation. *Biomed. Res. Int.* 2016:1693815.
- FAN R., CHAN T.C., PRAKASH G., et al. 2018.** Applications of corneal Topography and Tomography: A Review. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 46(2):133-146.
- FARES U., OTRI A.M., AL-AQBA M.A., et al. 2012.** Correlation of central and peripheral corneal thickness in healthy corneas. *Cont. Lens Anterior Eye,* 35:39-45.
- FEIZI S., JAFARINASAB M.R., KARIMIAN F., et al. 2014.** Central and peripheral corneal thickness measurement in normal and keratoconic eyes using three corneal pachymeters. *J. Ophthalmic. Vis. Res.* 9:296-304.
- FEIZI S., NAJAFI M., RAHMANI S., et al. 2020.** An Analysis of Factors Associated with Graft Topographic Outcomes After Deep Anterior Lamellar Keratoplasty. *Int. Ophthalmol.* 40(10):2449-2459.
- FENG Y, WANG W. 2015.** In Vivo Confocal Microscopic Observation of Lamellar Corneal Transplantation in the Rabbit Using Xenogenic Acellular Corneal Scaffolds as a Substitute. *Chin. Med. J. (Engl).* 5;128(7):933-940.
- FERNÁNDEZ A., MORENO J., PRÓSPER F., et al. 2008.** Regeneration of the Ocular Surface: Stem Cells and Reconstructive Techniques. *An. Sis. Sanit. Navar.* 31(1):53-69.
- FITCH J.M., BIRK D.E., LINSENMAYER C., et al. 1990.** The spatial organization of Descemet's membrane-associated type IV collagen in the avian cornea. *J Cell Biol.* 1990;110(4):1457-1468.
- FRIEND J., ISHII Y., THOFT R.A. 1982.** Corneal epithelial changes in diabetic rats. *Ophthalmic. Res.* 14 (4):269-278.
- FUJIMOTO J.G., PITRIS C., BOPPART S.A., et al. 2000.** Optical coherence tomography: an emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy. *Neoplasia* 2:9-25.
- FUKUDA K., ISHIDA W., FUKUSHIMA A., et al. 2017.** Corneal Fibroblasts as Sentinel Cells and Local Immune Modulators in Infectious Keratitis. *Int. J. Mol. Sci.* 23;18(9):1831.
-

**FUNDERBURGH J., FUNDERBURGH M., RODRIGUES M., et al. 1990.** Altered antigenicity of keratan sulfate proteoglycan in selected corneal diseases. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 31(3):419-428.

**GARCÍA-PORTA N., FERNANDEZ P., QUEIROS A., et al. 2014.** Corneal biomechanical properties in different ocular conditions and new measurement techniques. *ISRN Ophthalmol.* 4:2014:724546.

**GATINEL D, THANH H-X. 2006.** Measurement of combined corneal, internal, and total ocular optical quality analysis in anterior segment pathology with the OPS-scan and OPD-station. *J. Refract. Surg.* 22: S1014-20.

**GEKKA M., MIYATA K., NAGAI Y., et al. 2004.** Corneal epithelial barrier function in diabetic patients. *Cornea.* 23(1):35-37.

**GIANNACARE G., PELLEGRINI M., BOVONE C., et al. 2020.** Anti-VEGF Treatment in Corneal Diseases. *Curr. Drug. Targets.* 21(12):1159-1180.

**GIPSON I.K. 1989.** The Epithelial Basement Membrane Zone of the Limbus. *Eye Lond.* 3 (Pt2):132-140.

**GIPSON K. 1992.** Adhesive Mechanisms of the Corneal Epithelium. *Acta Ophthalmol. Suppl,* 202:13-17.

**GOGOVA S., LEIVA M., ORTILLÉS A., et al. 2020.** Corneoconjunctival Transposition for the Treatment of Deep Stromal to Full-Thickness Corneal Defects in Dogs: A Multicentric Retrospective Study of 100 Cases (2012-2018). *Vet. Ophthalmol.* 23(3):450-459.

**GOKTAS S.E., KATIRCIOGLU Y, CELIK T. 2017.** Surgical amniotic membrane transplantation after conjunctival and limbal tumor excision. *Arq. Bas. Oftalmol.* 80(4):242-246.

**GONG Y., CHEN K., WU Y., et al. 2020.** Effect on rabbits' intraocular structure by cross-linked hyaluronic formations as vitreous substitute. *Int. J. Ophthalmol.* 18;13 (10):1531-1537.

**GONZÁLEZ-ANDRADES M., MATA R., GONZÁLEZ-GALLARDO M.D.C., et al. 2017.** A study protocol for a multicentre randomised clinical trial evaluating the safety and feasibility of a bioengineered human allogeneic nanostructured anterior cornea in patients with advanced corneal trophic ulcers refractory to conventional treatment. *BMJ. Open.* 24;7(9): e016487.

- GOSH T., MAITY N., SUR V.P., et al. 2020.** Mitigating fibrosis-An Impediment to Corneal Re-Innervation Following Lamellar Flap Surgery. *Exp. Eye Res.* 20;194 :108009.
- GREENE C.A., MISRA S.L., LEE H., et al. 2018.** The Sheep cornea: Structural and Clinical Characteristics. *Curr. Eye Res.* 43 (12): 1432-1438.
- GRIERSON I., MINCKLER D., RIPPY M.K., et al. 2020.** A novel suprachoroidal microinvasive glaucoma implant: in vivo biocompatibility and biointegration. *BMC Biomed. Eng.* 14; 2:10.
- GRIS O., WOLLEY-DOD C., GÜELL J.L., et al. 2002.** Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea. *Ophthalmology* 109:508-512.
- GU H.W., BIEN D.M., HU N., et al. 2011. Effects of amniotic membrane transplantation on cytokines expression in chemically burned rat corneas. *Int. J. Ophthalmol.* 4:33-36.
- GUALDI L., CAPPELLO V., GIORDANO C. 2009.** The use of NIKED OPD scan II wavefront aberrometry in toric intraocular lens implantation. *J. Refract. Surg.* 25: S110-115.
- GUARNIERI F.A. 2015.** Corneal biomechanics. In: Santa Fe SF (ed). *Corneal Biomechanics and Refractive Surgery.*
- GUPTA M.K., CHANDRA A., PRAKASH P., et al. 2018.** Necessity to Identify the Causative Agent for Appropriate Treatment in Fungal Corneal Ulcer: An in Vitro Study. *J. Mycol. Med.* 28(1):201-205.
- HART R.W., FARRELL R.A. 1969.** Light scattering in the cornea. *J. Opt. Soc. Am.* 59:766-774.
- HASHEMI H., MEHRAVARAN S. 2010.** Day to day clinically relevant corneal elevation, thickness, and curvature parameters using the orbscan II scanning slit topographer and the pentacam scheimpflug imaging device. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.* 17:44-55.
- HASSELL J.R., BIRK D.E. 2010.** The Molecular Basis of Corneal Transparency. *Exp. Eye Res.*, 91 (3),326-335.
- HASSELL J.R., CINTRON C., KUBLIN C., et al. 1983.** Proteoglycan Changes During Restoration of Transparency in Corneal Scars. *Arch. Biochem. Biophys.* 15;222(2):362-369.
- HATOU S. 2011.** Hormonal regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells. *Cornea.* 30(10): S60-66.
-

**HERMAN W.K., DOUGHMAN D.J., and LINDSTROM R.L. 1983.** Conjunctival autograft transplantation for unilateral ocular surface diseases. *Ophthalmology*. 90(9):1121-1126.

**HIGA K., HIGUCHI J., KIMOTO R., et al. 2019.** Effects of Amniotic Membrane-Derived Fibroblast Supernatant on Corneal Epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 3;60(12):3718-3726.

**HILL S.J. 2008.** Placental Amniotic Membrane: The Pathway to Ocular Transplantation. *AORN Journal* 88, (5):731-742.

**HILLEGASS J.M., VILLANO C.M., COOPER K.R., et al. 2008.** Glucocorticoids alter craniofacial development and increase expression and activity of matrix metalloproteinases in developing zebrafish. *Toxicol. Sci.* 10(2):413-424.

**HOEHN A.L., THOMASY S.M., KASS P.H., et al. 2018.** Comparison of Ultrasonic Pachymetry and Fourier-domain Optical Coherence Tomography for Measurement of Corneal Thickness in Dogs with and Without Corneal Disease. *Vet. J.* 242:59-66.

**HOLLÓ G. 2018.** Coherence Tomography Angiography in Glaucoma. *Turk. J. Ophthalmol.* 48:196-201.

**HOLMES D.F, KADLER K.E. 2005.** The precision of lateral size control in the assembly of corneal collagen fibrils. *J. Mol. Bio.* 345:773-784.

**HONG S., YUN J.H., KIM E.S., et al. 2018.** Human Conjunctival Epithelial Sheets Grown on Poly (Lactic-Co-Glycolic) Acid Membranes and Cocultured with Human Tenon's Fibroblasts for Corneal Repair. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1;59(3):1475-1485.

**HORN V., SENDELE D.D., SEIDEMAN S., et al. 1977.** Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16:597-613.

**HOSOTANI H., OHASHI Y., YAMADA M., et al. 1995.** Reverse of abnormal corneal epithelial cell morphologic characteristics and reduced corneal sensitivity in diabetic patients by aldose reductase inhibitor, CT-112. *Am. J. Ophthalmol.* 119(3):288-294.

**HUANG B., ZHAO M., ZHANG H., et al. 2020.** Corneal recovery following rPBMC-amniotic membrane transplantation with anti-VEGF in LSCD rabbits. *Tissue Eng. Part C Methods.* 26(10):541-522.

**IMRE G, BÖGI J. 1980.** Causal Treatment of Corneal Vascularization. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* 177(6):798-801.

**IMRE G, BÖGI J. 1981.** Corneal Edema in Young Glaucoma Patients. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* 179(6):465-466.

---

- IZATT J.A., HEE M.R., SWANSON E.A., et al. 1994.** Micrometer-scale resolution imaging of the anterior eye in vivo with optical coherence tomography. *Arch. Ophthalmol.* 112 (12):1584-1589.
- JAVALOY J., VIDAL M.T., RUIZ-MORENO J.M., et al. 2005.** Microscopía confocal de la córnea en la cirugía fotorrefractiva. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 80; 9:497-510.
- JIANG S.Y., TANG J.J., XIAO X., et al. 2019.** Schnyder corneal Dystrophy-Associated UBIAD<sub>1</sub> Mutations Cause Corneal Cholesterol accumulation by Stabilizing HMG-CoA Reductase. *PLoS. Genet.* 19;15(7).
- JIANG Z., LIU G., MENG F., et al. 2017.** Paracrine Effects of mesenchymal stem cells on the activation of keratocytes. *Br. J. Ophthalmol.* 101 (11): 1583-1590.
- JIE J., YANG J., HE H., et al. 2018.** Tissue remodeling after ocular surface reconstruction with denuded amniotic membrane. *Sci. Rep.* 23;8(1):6400.
- JIRSOVA K, JONES G.L.A. 2017.** Amniotic Membrane in Ophthalmology: Properties, Preparation, Storage and Indications for Grafting-A Review. *Cell. Tissue Bank.* 18(2):193-204.
- KAAS-HANSEN M. 1993.** The histopathological changes of keratoconus. *Acta Ophthalmol.* 71 (3): 411-414.
- KAMMA-LORGER C.S., BOOTE C., HAYES S., et al. 2010.** Collagen and mature elastic fiber organization as a function of Depth in the human cornea and limbus. *J. Struct. Biol.* 169: 424-430.
- KANG H., ARYAL A.C.S., MARINI J.C. 2017.** Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. *Transl. Res.* 181:27-48.
- KARACHRYSAFI S., SIOGA A., KOMNENOU A., et al. 2020.** Histological Effects of Intravitreal Injection of Antifungal Agents in New Zealand White Rabbits: An Electron Microscopic and Immunohistochemical Study. *Pharmaceuticals.* (Basel). 23;13(10):267.
- KASSEM R.R., EL-MOFY R.M.A.M., KHODEIR M.M. 2018.** A comparative study of different amniotic membrane orientations during extraocular muscle surgery in rabbits. *Curr. Eye. Res.* 43(3):325-332.
- KAUR S., KHURANA S, RAM J. 2020.** Abnormal Corneal Pigmentation by Psychotropic Drugs. *Indian J. Ophthalmol.* 65(5):917.
-

**KENNEDY J.B., LAROCHELLE M.S., PEDLER M.G., et al. 2018.** The effect of amniotic membrane grafting on healing and wound strength after strabismus surgery in a rabbit model. *J. AAPOS.* 22(1):22-26. e1.

**KENNEY M.C, BROWN D.J. 2003.** The cascade hypothesis of keratoconus. *Cont. Lens Anterior Eye* 26(3):139-146.

**KIM E.C, KIM T.K., PARK S.H., et al. 2012.** The wound healing effects of vitamin A eye drops after a corneal alkali burn in rats. *Acta Ophthalmol.* 90(7).

**KIM J.C, SCKEFFER C.G. 1995.** The Effect on Inhibition of Corneal Neovascularization After Human Amniotic Membrane Transplantation in Severely Damaged Rabbit Corneas. *Korean J. Ophthalmol.* 9;32-46.

**KIM J.C, TSENG S.C. 1995.** Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea.* 14:473-484.

**KOSTYUK O., NALOVINA O., MUBARD T.M., et al. 2002.** Transparency of the bovine corneal stroma at physiological hydration and its dependence on concentration of the ambient ion. *J. Physiol.* 543 (2):633-642.

**KRACHMER J.H., FEDER R.S, BELIN M.W. 1984.** Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv. Ophthalmol.* 28(4):293-322.

**KRECNY M., TICHY A., RUSHTON J., et al. 2015.** A Retrospective Survey of Ocular Abnormalities in Pugs: 130 Cases. *J. Small Anim. Pract.* 56(2):96-102.

**KREMER I., EAGLE R.C., RAPUANO C.J., et al. 1995.** Histologic evidence of recurrent keracoconus seven years after keratoplasty. *Am. J. Ophthalmol.* 119 (4):551-552.

**KUO Y.C, LEE Y.C. 2019.** A CARE-Compliant article: optical coherence tomography for epithelia basement membrane dystrophy: A case report. *Medicine (Baltimore).* 98(13): e15032.

**LABAT-ROBERT J, ROBERT L. 2012.** Fifty years of structural glycoproteins. *Pathol. Biol. (Paris).* 60(1):66-75.

**LAU W, PYE D. 2011.** Changes in corneal biomechanics and applanation tonometry with induced corneal swelling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(6):3207-3214.

**LE Q, DENG S.X. 2019.** The application of human amniotic membrane in the surgical management of limbal stem cell deficiency. *Ocul. Surf.* 17(2):221-229.

**LEE S.H, TSENG S.C. 1997.** Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am. J. Ophthalmol.* 123(3):303-312.

---

- LEONARD B.C., STEWART K., SHAW G.C., et al. 2019.** Comprehensive Clinical, Diagnostic, and Advanced Imaging Characterization of the Ocular Surface in Spontaneous Aqueous Deficient Dry Eye Disease in Dogs. *Cornea*. 38(12):1568-1575.
- LEUENBERGER P.M. 1978.** Functional Morphology of the Cornea. *Adv. Ophthalmol.* 35: 94-166.
- LEVINE J.R. 1965.** The true inventors of the keratoscope and photo-keratoscope. *Br. J. Hist. Sci.* 2:324-342.
- LI S., KIM E., OGANDO D.G., et al. 2020.** Corneal Endothelial Pump coupling to Lactic Acid Efflux in the Rabbit and Mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 7;6(2):7.
- LI X., XIAO Y., GAO X.W., et al. 2020.** Experimental study of trabecular tissue repair for corneal defect in rabbits. *Int. J. Ophthalmol.* 18;13(9):1356-1360.
- LIABOE A., ALDRICH B., CARTER P., et al. 2017.** Assessing the Impact of Diabetes Mellitus on Donor Corneal Endothelial Cell Density. *Cornea*. 36(5):561-566.
- LIU F.F., LI W., LIU Z.G., et al. 2016.** Recent Studies on corneal Epithelial Barrier Function. *Chin. J. Ophthalmol.* 53:631-635.
- LIU J., LI L., LI X. 2019.** Effectiveness of Cryopreserved Amniotic Membrane Transplantation in Corneal Ulceration: A Meta-Analysis. *Cornea*. 28(4):454-462.
- LIU Y.C., WITTEWER V.V., YUSOFF N.Z.M., et al. 2019.** Intraoperative Optical coherence Tomography-Guided Femtosecond Laser-Assisted Deep Anterior Lamellar Keratoplasty. *Cornea*. 38(5):648-653.
- LO K., KOHANIM S. TRIEF D., et al. 2013.** Role of amniotic membrane transplantation in acute chemical injury. *Int. Ophtlmol. Clin. Fall*;53(4):33-41.
- LOMBARDO M., PAREKH M., SERRAO S., et al. 2017.** Twon-photon optical microscopy imaging of endothelial keratoplasty grafts. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 255 (3):575-582.
- LOPEZ C., PARK S., EDWARDS S., et al. 2019.** Matrix Metalloproteinase-Deactivating Contact Lens for corneal Melting. *ACS. Biomater. Sci. Eng.* 11;5(3):1195-1199.
- LOPEZ E.S., ORTIZ G.A. POTILINSKI C., et al. 2018.** Corneal Neovascularization: A Combined Approach of Bevacizumab and Suramin Showed Increased Antiangiogenic Effect Through Downregulation of BFGF and P<sub>2</sub>X<sub>2</sub>. *Curr. Eye Res.* 43(4):466-473.
-

- LU F., XU S. QU J., et al. 2007.** Central corneal thickness and corneal hysteresis during corneal swelling induced by contact lens wear with eye closure. *Am. J. Ophthalmol.* 143(4):616-622.
- LWIGALE PY. 2015.** Corneal Development; Different Cells from a common progenitor. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 134:43-59.
- MA J., WANG Y., WEI P., et al. 2018.** Biomechanics and structure of the cornea: implications and association with corneal disorders. *Survey of Ophthalmology.* 63:851-861.
- MA M., YUAN Q., YE L., et al. 2019.** An experimental study of amniotic lacrimal duct stents in the treatment of perimenopausal female rabbits with dry eye. *Mol. Med. Rep.* 19(2):1056-1064.
- MAGGS D.J. 2009.** Córnea y Esclera. In: *Slatter Fundamentos de Oftalmología Veterinaria.* 4ed, Elsevier Barcelona, Cap 10. 179-208.
- MAGGS D.J. 2009.** Farmacología y terapéutica oculares. In: *Slatter Fundamentos de Oftalmología Veterinaria.* 4ed, Elsevier Barcelona, Cap 3. 35-84.
- MAGGS D.J. 2009.** Técnicas diagnósticas básicas. In: *Slatter Fundamentos de Oftalmología Veterinaria.* 4ed, Elsevier Barcelona, Cap 5. 85-110.
- MAINI S., EVERSON R., DAWSON C., et al. 2019.** Pigmentary Keratitis in Pugs in the United Kingdom: Prevalence and Associated Features. *BMC. Vet. Res.* 30;15(1):384.
- MANDELL R.B, FARREL R. 1980.** Corneal Swelling at Low Atmospheric Oxygen Pressures. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19(6):697-702.
- MANEA G, STANCA H.T. 2011.** Specular Microscopy and Clinical Correlations. *Oftalmologia.* 55(3):22-29.
- MARFURT C., ANOKWUTE M.C., FETCKO K., et al. 2019.** Comparative Anatomy of the Mammalian Corneal Subbasal Nerve Plexus. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2; 60(15):4972-4984.
- MARTIN R. 2018.** Cornea and Anterior Eye Assessment With Placido-Disc Ketascopy, Stil Scanning Evaluation Topography and Scheimplflug Imaging Tomography. *Indian J. Ophthalmol.* (6683):360-366.
- MATALON R., ARBOGAST B., JUSTICE P., et al. 1974.** Morquio's syndrome: deficiency of a chondroitin sulfate Nacetylhexosamine sulfate sulfatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61(2):759-765.
-

- MATERSON E., EDELHAUSER H.F, VAN HORN D.L. 1977.** The role of thyroid hormone in the development of the chick corneal endothelium and epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16(2):105-115.
- MAURICE D.M. 1968.** Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. *Experientia.* 24:1094-1095.
- MAURICE D.M. 1970.** The transparency of the corneal stroma. *Vision Res.* 10(1): 107-108.
- McCAREY B., EDELHAUSER H.F, LYNN M.J. 2008.** Review of Corneal Endothelial specular Microscopy for FDA Clinical Trials of Refractive Procedures, Surgical Devices, and New Intraocular Drugs and Solutions. *Cornea.* 27(1):1-16.
- McKAY T.B., HUTCHEON A.E.K, ZIESKE J.D. 2020.** Biology of Corneal Fibrosis: Soluble Mediators, Integrins, and Extracellular Vesicles. *Eye (Lond).* 34(2):271-278.
- MEEK K.M, BOOTE C. 2004.** The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp. Eye Res.* 78:503-512.
- MEEK K.M, KNUPP C. 2015.** Corneal structure and transparency. *Progress in Retinal and Eye Research.* 49:1-16.
- MEEK K.M., BLAMIRE T., ELLIOTT G.F., et al. 1987.** The organization of collagen fibrils in the human corneal stroma: a synchrotron X-ray diffraction study. *Curr. Eye Res.* 6: 841-846.
- MEEK K.M., LEONARD D.W. 1993.** Ultrastructure of the corneal stroma: a comparative study. *Biophys. J.* 64:273-280.
- MEEK K.M., LEONARD D.W., CONNON C.J., et al. 2003.** Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma. *Eye (Lond.)* 17:927-936.
- MEEK K.M., TUFT S.J., HUANG Y., et al. 2005.** Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46 (6):948-956.
- MELLER D., PAUKLIN M., THOMASEN H., et al. 2011.** Amniotic membrane transplantation in the human eye. *Dtsch. Arztebl. Int.* 108:243-248.
- MENASSA N., KAUFMANN C., GOGGIN M., et al. 2008.** Comparison and reproducibility of corneal thickness and curvature readings obtained by the Galilei and the Orbscan II analysis systems. *J. Cataract Refract. Surg.* 34:1742-1747.
- MEYER K. 1948.** Mucopolysaccharides and mucoids of ocular tissues. In: Sorsby, A. (Ed.), *Modern Trends in Ophthalmology*, vol. 2. Butterworth and Co., London, pp.71-78.
-

- MEYER K., LINKER A., DAVIDSON E.A., et al. 1953.** The mucopolysaccharides of bovine cornea. *J. Biol. Chem.* 295:611-616.
- MIKULA E.R., JESTER J.V, JUHASZ T. 2016.** Measurement of an elasticity map in the human cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57 (7):3282-3286.
- MILLER D, GREINER J.V. 1994.** Corneal measurements and tests. In: Albert DM, Jakobiec FA, editors. *Principles and Practice of Ophthalmology: Clinical Practice.* Philadelphia (USA): W.B. Saunders Company; 199. pp.4-13.
- MILLER P.E. 2009.** Sistema lagrimal. In: Slatter *Fundamentos de Oftalmología Veterinaria.* 4ed, Elsevier Barcelona, Cap 9. 161-178.
- MISHIMA S. 1982.** Clinical Investigations on the Corneal Endothelium. *Ophthalmology.* 89 (6), 523-530.
- MIYAKOSHI A., NISHIDA Y., TANAKA A., et al. 2020.** Histological Equivalence of a Hyper-Dry Amniotic Membrane and the Ambio2™ after Implantation in the Rabbit Conjunctiva. *Ophthalmic Res.* 63(4):423-426.
- MOORE B.A, GJELTEMA J. 2019.** Once in a Blue Moon: Lipid Keratopathy and intrastromal Hemorrhage in a Mission Golden-Eyed Tree Frog (*Trachycephalus Resinifictrix*). *Vet. Ophthalmol.* 22(6):933-936.
- MORISHIGE N., NOMI N., MORITA Y., et al. 2011.** Immunohistofluorescence análisis of myofibroblast transdifferentiation in human corneas with bullous keratopathy. *Cornea.* 30(10): 1129-1134.
- MORISHIGE N., PETROLL W.M., NICHIDA T., et al. 2006.** Non-invasive corneal stromal collagen imaging using two-photon-generated second-harmonic signals. *J. Cataract Refract. Surg.* 32:1784-1791.
- MORKIN M.I, HAMRAH P. 2018.** Efficacy of self-retained cryopreserved amniotic membrane for treatment of neuropathic corneal pain. *Ocul. Surf.* 16(1):132-138.
- MOTALVO-PARRA M.D., VIDAL-PAREDES I.A., CALZADA-RODRIGUEZ C.E., et al. 2020.** Experimental design of a culture approach for corneal endothelial cells of New Zealand white rabbit. *Heliyon.* 6;6(10):e05178.
- MÜLLER L.J., PELS E, VRENSEN G.F. 2001.** The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature *Br. J. Ophthalmo.* 85:437-443.
- MUNDT G.H, HUGHES W.F. 1956.** Ultrasonics in ocular diagnosis. *Am. J. Ophthalmol,* 42:488-498.
-

- MURRIS M.S., MOSHIRFAR M., BIRDSONG O.C., et al. 2018.** Amniotic membrane extract and eye drops: a review of literature and clinical application. *Clin. Ophthalmol.* 18;12: 1105-1112.
- MYLONA J., TSINOPOULOS I, ZIAKAS N. 2019.** Comorbidity of Keratoconus and Fuchs' Corneal Endothelial Dystrophy: A Review of the Literature. *Ophthalmic Res.* 63(4):369-374.
- NANBA H., MIMURA T., MIZUNO Y., et al. 2019.** Clinical course and Risk Factors of Recurrent Corneal Erosion: Observational Study. *Medicine (Baltimore)* 98(16): e14964.
- NAUTSCHER N., BAUER A., STEFFL M., et al. 2016.** Comparative Morphological Evaluation of Domestic Animal Cornea. *Vet. Ophthalmol.* 19 (4): 297-304.
- NAVAS A., MAGAÑA-GUERRERO F.S., DOMÍNGUEZ-LOPEZ A., et al. 2018.** Anti-Inflammatory and Anti-Fibrotic Effects of Human Amniotic Membrana Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Corneal Repair. *Stem Cells. Transl. Med.* 7(12):906-917.
- NAXER S., HORN M., and SCHITTKOWSKI M. 2018.** Processed amniotic membrane for conjunctival reconstruction in complex strabismus surgery. *Strabismus.* 21:1-7.
- NISHIDA T. 2008.** The Cornea: Stasis and Dynamics. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 112(3): 179-212.
- O'DOHERTY M.A, O'DOHERTY J.V, O'KEEFE M. 2006.** Outcome of LASIK for myopia in women on hormone replacement therapy. *J. Refract. Surg.* 22(4):350-353.
- O'DONELL C, MALDONADO-CODINA C. 2005.** Agreement and repeatability of central thickness measurement in normal corneas using ultrasound pachymetry and the OCULUS Pentacam. *Cornea.* 24:920-924.
- OLIVEIRA-SOTO L, EFRON N. 2001.** Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea,* 20:374-384.
- ORTIZ D., PIÑERO D., SHABAYEK M.H., et al. 2007.** Corneal biomechanical properties in normal, post-laser in situ keratomileusis, and keratoconic eyes. *J. Cataract Refract. Surg.* 33(8):1371-1375.
- ORTIZ-TOQUERO S, MARTIN R. 2016.** Keratoconus screening in primary eye care- A general overview. *Eur. Ophthalmic.* 10:80-85.
-

**ORTIZ-TOQUERO S, MARTIN R. 2017.** Current optometric practices and attitudes in keratoconus patient management. *Cont. Lens. anterior Eye* 40:253-259.

**ORUCOGLU F., TALAZ S., AKSU A., et al. 2014.** Corneal Densitometry Evaluation in archipelago Keratitis. *Int. Ophthalmol.* 34(1):99-102.

**PALAMAR M., YAMAN B., AKALIN T., et al. 2018.** Amniotic Membrane Transplantation in Surgical Treatment of Conjunctival Melanoma: Long-term results. *Turk. J. Ophthalmol.* 48(1):15-18.

**PANAGIOTOU D.Z., CHRANIOTI A.A., TZORAKOLEFTHERAKI S-E., et al. 2020.** Primary Melanoma of the Cornea. *GMS. Ophthalmol. Cases* 18;10: Doc12.

**PANTALON A., PFISTER M., ARANHA DOS SANTOS V., et al. 2019.** Ultrahigh-resolution anterior segment optical coherence tomography for analysis of corneal microarchitecture during wound healing. *Acta Ophthalmol.* 97(5): e761-771.

**PASQUALE A., WYLEGALA E., WROBLEWSKA-CZAJKA W., et al. 2014.** Clinical, confocal, and Morphological Investigations on the Cornea in Human Mucopolysaccharidosis IH-S. *Cornea.* 33 (1):35-42.

**PAVLIN C.J., HARASIEWICZ K., SHERAR M.D., et al. 1991.** Clinical use of ultrasound biomicroscopy. *Ophthalmology* 98:287-295.

**PAVLIN C.J., SHERAR M.D, FOSTER F.S. 1990.** Subsurface ultrasound microscopic imaging of the intact eye. *Ophthalmology* 97:244-250.

**PEIFFER R.L., POHM-THORSEN L, CORCORAN K. 1994.** Models in ophthalmology and vision research. In Manning PJ, Ringler DH, Newcomer CE, editors. *The biology of the laboratory rabbit.* 2nd edition. San Diego: Academic Press; p.409-433.

**PILAT A.V., PROUDLOCK F.A., SHAH S., et al. 2019.** Assessment of the anterior segment of patients with primary congenital glaucoma using handheld optical coherence tomography. *Eye (Lond)* 33(8):1232-1239.

**PINHO E.C.C.M., CHAHUD F., LACHAT J.J., et al. 2018.** The study of the use of a latex biomembrane and conjunctival autograft in rabbit conjunctiva wound healing. *Arq. Bras. Oftalmol.* 81.(2):125-129.

**POLCZ M.E, BARBUL A. 2019.** The role of Vitamin A in Wound Healing. *Nutr. Clin. Pract.* 34(5):695-700.

**PRABHASAWAT P., TESAVIBUL N., PRAKAIRUNGTHONG N., et al. 2007.** Efficacy of amniotic membrane patching for acute chemical and thermal ocular burns. *J. Med. Assoc. Thai.* 90:319-326.

---

- PRAUS R, GOLDMAN J.N. 1971.** Glycosaminoglycans in human corneal buttons removed at keratoplasty. *Ophthalmic Res.* 2(3-4):223-230.
- PRIYADARSINI S., WHELCHER A., NICHOLAS S., et al. 2020.** Diabetic Keratopathy: Insights and Challenges. *Surv. Ophthalmol.* 22; S0039-6257 (20) 30029-1.
- PUIG M., WEISS M., SALINAS R., et al. 2020.** Etiology and Risk Factors for Infectious Keratitis in South Texas. *J. Ophthalmic Vis. Res.* 6;15(2):128-137.
- QU J.H, SUN X.G. 2016.** Research Progress of corneal Epithelial Basal Cells and Basement Membrane. *Chin. J. Ophthalmol.* 2016, 52:703-707.
- QUANTOCK A.J., YOUNG R.D, AKAMA T.O. 2010.** Structural and biochemical aspects of keratan sulphate in the cornea. *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (6): 891-906.
- RABINOWITZ Y.S. 1998.** Keratoconus. *Surv. Ophthalmol.* 42(4):297-319.
- RADNER W, MALLINGER R. 2002.** Interlacing of collagen lamellae in the midstroma of the human cornea. *Cornea* 21, 598-601.
- RADNER W., ZEHETMAYER M., AUFREITER R., et al. 1988.** Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea. *Cornea* 17:537-543.
- RAGHUNATHAN V.K., THOMASY S.M., STROM P., et al. 2017.** Tissue and Cellular Biomechanics During Corneal Wound Injury and Repair. *Acta Biomater.* 58:291-301.
- RAISKUP-WOLF F., HOYER A., SPOERL E., et al. 2008.** Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J. Cataract Refract. Surg.* 34(5):796-801.
- RAMA P., GIANNINI R., BRUNI A., et al. 2001.** Further evaluation of amniotic membrane banking for transplantation in ocular surface diseases. *Cell Tissue Bank* 2(3):155-163.
- RAO P, SUVAS S. 2019.** Development of Inflammatory Hypoxia and Prevalence of Glycolytic Metabolism in Progressing Herpes Stromal Keratitis Lesions. *J. Immunol.* 15;202(2):514-526.
- REGINI J.W., ELLIOTT G.F, HODSON S.A. 2004.** The ordering of collagen fibrils with increasing ionic strength. *J. Mol. Biol.* 336:179-186.
- RIGAS B., HUANG W, HONKANEN R. 2020.** NSAID-induced Corneal Melt: Clinical Importance, Pathogenesis, and Risk Mitigation. *Surv. Ophthalmol.* 65(1):1-11.
- RIO-CRISTOBAL A, MARTIN R. 2014.** Corneal assessment technologies: Current Status. *Surv. Ophthalmol*, 59:599-614.
-

ROCHELS R. 1984. Animal Experiment Studies on the Role of Inflammation Mediators in Corneal Neovascularization. *Doc. Ophthalmol.* 30;57(3):215-262.

**RÖCK T., BART-SCHMIDT K.U., LANDERBERGER J., et al. 2018.** Amniotic membrane transplantation in reconstructive and regenerative ophthalmology. *Ann. Transplant.* 6;23:160-165.

**RODRIGUEZ F.J., STAURENGHI G, GALE R. 2018.** The role of OCT-A in retinal disease management. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 256:2019-2026.

**RODRIGUEZ M.M., NEWSOME D.A., KRACHMER J.H., et al. 1981.** Pellucid marginal corneal degeneration: a clinicopathologic study of two cases. *Exp. Eye Res.* 33(3):277-288.

**ROPER-HALL M. 1965.** Thermal and chemical burns. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK* 58:634-640.

**ROSEN R. 2018.** Amniotic Membrane Grafts to Reduce Pterygium Recurrence. *Cornea.* 37(2):189-193.

**RÜFER F., SHORÖDER A, ERB C. 2005.** White to White corneal diameter: Normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II tomography system. *Cornea.* 24:259-261.

**SABATER A.L, PEREZ V.L. 2017.** Amniotic membrane use for management of corneal limbal stem cell deficiency. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 28 (4):369-369.

**SACCHETTI M., RAMA P., BRUSCOLINI A., et al. 2018.** Limbal Stem Cell Transplantation: clinical results, limits and perspectives. *Stem Cell.* 11; 2018: 8086269.

**SAMOILA O. 2012.** Corneal Stem Cells. *Oftalmologia,* 56(3): 9-19.

**SANTACRUZ C., LINARES M., GARFIAS Y., et al. 2015.** Expression of IL-8, IL-6 and IL-1 $\beta$  in Tears as a Main Characteristic of the Immune Response in Human Microbial Keratitis. *Int. J. Mol. Sci.* 3;16(3):4850-4864.

**SANTÝ M., VACLOVÁ M, VRABLIK M. 2020.** Familiar Hypercholesterolemia-A Diagnosis That Every Plastic Surgeon Can Experience. *Winter.* 60(2-4):54-58.

**SCHMIDT E.M., STIEFEL H.C., HOUGHTON D.C., et al. 2019.** Intraoperative Optical Coherence Tomography to Guide Corneal Biopsy: A Case Report. *Cornea.* 38(5):639-641.

**SEITZ B., BEHRENS A, LANGERBUCHER A. 1997.** Corneal topography. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 8:8-24.

- SEVEL D, ISAACS R. 1988.** A Re-Evaluation of Corneal Development. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 86:178-207.
- SHAFFER B., FUERST N.M., MASSARO-GIORDANO M., et al. 2019.** The use of self-retained, cryopreserved amniotic membrane for the treatment of Sjögren syndrome: a case series. *Digit. J. Ophthalmol.* 8;25(2):21-25.
- SHAHRIARI H.A., TOKHMEHCHI F., REZA M., et al. 2008.** Comparison of the effect of amniotic membrane suspension and autologous serum on alkaline corneal epithelial wound healing in the rabbit model. *Cornea.* 27:1148-1150.
- SHAN J., DEBOER C, XU B. 2019.** Anterior Segment Optical Coherence Tomography: Applications for Clinical Care and Scientific Research. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology* 8; 2:146-157.
- SHAPIRO M.S., FRIEND J, THOFT R.A. 1981.** Corneal Re-Epithelialization from the Conjunctiva. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 21:135-142.
- SHARMA N., SINGHAL D., NAIR S.P., et al. 2017.** Corneal Edema After Phacoemulsification. *Indian J. Ophthalmol.* 65(12):1381-1389.
- SHEPPARD C.J.R, SHOTTON D.M. 1997.** Confocal laser scanning microscopy. *Microscopy Handbook Series N°38.* New York: BIOS Scientific Publishers Ltd.
- SHIH K.C., TSE R.H., LAU Y.T., et al. 2019.** Advances in corneal Imaging: Current Applications and Beyond. *Asia Pac. J. Ophthalmol. (Phila).* 8(2):105-114.
- SHIH P.J., WANG I.J., CAI W.F., et al. 2017.** Biomechanical simulation of stress concentration and intraocular pressure in corneas subjected to myopic refractive surgical procedures. *Sci. Rep.* 7(1):13906.
- SHULTZ R.O., MATSUDA M., YEE R.W., et al. 1984.** Corneal endothelial changes in type I and type II diabetes mellitus. *Am. J. Ophthalmol.* 98(4):401-410.
- SIDDIQUI Y, YIN J. 2019.** Anterior Segment Applications of Optical Coherence Tomography Angiography. *Seminars in Ophthalmology.* Taylor & Francis 1-6.
- SILVERMAN R.H. 2009.** High-resolution Ultrasound Imaging of the Eye- A Review. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 37(1):54-67.
- SIMION M, SELARU D. 2011.** Normal Corneal Wound Healing. *Oftalmologia.* 55 (3): 12-21.
- SIMON G., REN Q., KERVICK G.N., et al. 1993.** Optics of the Corneal Epithelium. *Refract. Corneal Surg.* 9 (1), 42-50.
-

- SIU G.D.J., KAM K.W, YOUNG A.L. 2019.** Amniotic membrane transplant for bullous keratopathy: confocal microscopy & anterior segment optical coherence tomography. *Semin. Ophthalmol.* 34(3):163-167.
- SKALET A.H., LI Y., LU C.D et al. 2017.** Optical Coherence Tomography Angiography. Characteristics of Iris Melanocytic Tumors. *Ophthalmology.* 124(2):197-204.
- SLONIECKA M, DANIELSON P. 2020.** Acetylcholine Decreases Formation of Myofibroblasts and Excessive Extracellular Matrix Production in an in Vitro Human Corneal Fibrosis Model. *J Cell Mol Med* 24 (8):4850-4862.
- SOEKEN T.A., ZHU H., DEMARTELAERE S., et al. 2018.** Sealing of Corneal Lacerations Using Photoactivated Rose Bengal Dye and Amniotic Membrane. *Cornea.* 37(2):211-217.
- SORSBY A, SYMONS H.M. 1946.** Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns of the second degree). *Br. J. Ophthalmol.* 30:337-345.
- SORSBY A., HAYTHRONE J, REED H. 1947.** Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br. J. Ophthalmol.* 31:409-418.
- SPOERL E., HUHLE M, SEILER T. 1998.** Introduction of cross-links in corneal tissue. *Exp. Eye Res.* 66(1):97-103.
- SPOERL E., ZUBATY V., RAISKUP-WOLF F., et al. 2007.** Oestrogen-induced changes in biomechanics in the cornea as a possible reason for keratectasia. *Br. J. Ophthalmol.* 91(11):1547-1550.
- SPOERL E., ZUBATY V., TERAJ N., et al. 2009.** Influence of high-dose cortisol on the biomechanics of incubated porcine corneal strips. *J. Refract. Surg.* 25(9):794-798.
- SRIDHAR M.S. 2018.** Anatomy of cornea and ocular Surface. *Indian J. Ophthalmol.* 66:190-194.
- STAATZ W.D, VAN HORN D.L. 1980.** The effects of aging and inflammation on corneal endothelial wound healing in rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19:983-986.
- STAMATE A.C, TATARU C.P, ZEMBA M. 2019.** Update on Surgical Management of Corneal Ulceration and Perforation. *Rom. J Ophthalmol.* 63(2):166-173.
- SUBASI S., ALTINTAS O., YARDIMOGLU M., et al. 2017.** Comparison of Collagen Cross-Linking and Amniotic Membrane Transplantation in an Experimental Alkali Burn Rabbit Model. *Cornea.* 36(9):1106-1115.
-

- SUGIOKA K., MISHIMA H., KODAMA A., et al. 2016.** Regulatory Mechanism of collagen Degradation by Keratocytes and Corneal Inflammation: The Role of Urokinase-Type Plasminogen Activator. *Cornea*. 35 Suppl 1: S59-S64.
- SUZUKI K., TANAKA T, ENOKI M. 2000.** Coordinated Reassembly of the Basement Membrane and Junctional Proteins During Corneal Epithelial Wound Healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (9):2495-2500.
- SWARBRICK H.A., WONG G, O'LEARY D.J. 1998.** Corneal response to orthokeratology. *Optom. Vis. Sci.* 75(11):791-799.
- TAKAHASHI H., IGARASHI T., FUJIMOTO C., et al. 2007.** Immunohistochemical observation of amniotic membrane patching on a corneal alkali burn in vivo. *Jpn. J. Ophthalmol.* Jan-Feb;51(1):3-9.
- TAMHANE A., VAJPAYEE R., BISWAS N.H., et al. 2005.** Evaluation of Amniotic Membrane Transplantation as an Adjunct to Medical Therapy as Compared with Medical Therapy Alone in Acute Ocular Burns. *Ophthalmology*. 112 (11):1963-1969.
- TANAKA M., OHNISHI Y, KUWABARA T. 1983.** Membrane Structure of Corneal Epithelium-Freeze Fracture Observations. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 87(8):611-620.
- TANDON R., GUPTA N., KALAIVANI M., et al. 2011.** Amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical therapy in acute ocular burns. *Br. J. Ophthalmol.* 95:199-204.
- TAYLOR H.R, KIMSEY R.A. 1981.** Corneal epithelial basement membrane changes in diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 20(4):548-553.
- THIBODEAU G.A, PATTON K.T. 2006.** *Anthony's Anatomy and Physiology*. 6<sup>th</sup> ed. St Louis, MO: Mosby, Inc.
- THOMAS S.M., RAGHUNATHAN V.K., WINKLER M., et al. 2014.** Elastic modulus and collagen organization of the rabbit cornea: epithelium to endothelium. *Acta Biomater.* 10(2):785-791.
- TIAN L, SUN X.G. 2020.** A Clinical Analysis of 46 Cases of Neurotrophic Keratitis. *Chin. J. Ophthalmol.* 56:274-298.
- TIGUE S., MOEIN H.R., CHUA L., et al. 2017.** Topical Cryopreserved Amniotic Membrane and Umbilical Cord Eye Drops Promote Re-epithelialization in a Murine Corneal Abrasion Model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1;58(3):1586-1593.
-

**TOUBOUL D., GENNISSON J-L., NGUYEN T-M., et al. 2014.** Supersonic shear wave elastography for the in vivo evaluation of transepithelial corneal collagen cross-linking. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55(3):1976-1984.

**TSENG S.C. 2001.** Amniotic membrane transplantation for persistent corneal epithelial defect. *Br. J. Ophthalmol.* 85(12):1400-1401.

**TSENG S.C., PRABHASAWAT P., BARTON K., et al. 1998.** Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch. Ophthalmol.* 116(4):431-441.

**UHLIG C.E., FRINGS C., ROHLOFF N., et al. 2015.** Long-term efficacy of glycerine-processed amniotic membrane transplantation in patients with corneal ulcer *Acta Ophthalmol.* 9: e481-487.

**URIAS M.G., PATEL N., EBRAHIMI A., et al. 2020.** Robotic Retinal Surgery Impacts on Scleral Forces: In Vivo Study. *Transl. Vis. Sci. Technol.* 1;9(10):2.

**VAIDYANATHAN U., HOPPING G., LIU H.Y., et al. 2019.** Persistent Corneal Epithelial Defects: A Review Article. *Med Hypothesis Discov. Innov. Ophthalmol.* 8(3):163-176.

**VAN CRUCHTEN S., VROLYK V., PERRON-LEPAGE M.F., et al. 2017.** Pre-and postnatal Development of the Eye: A species Comparison. *Birth Defects res.* 109 (19):1540-1567.

**VILLA-COLLAR C., GONZÁLEZ-MÉIJOME J.M., QUEIRÓS A., et al. 2009.** Short-term corneal response to corneal refractive therapy for different refractive targets. *Cornea.* 28(3):311-316.

**VIRCHOW H. 1905.** *Mikroskopische Anatomie der äusseren Augenhaut und des Lidapparates.* Hb. D. ges. Augenheilk. Graefe-Saemisch, second ed., vol. 1, p.1.

**VOLLMER L, SOWKA J. 2019.** Case Report: Corneal Ulceration from Bilateral Ectropion Due to Congenital Ichthyosis. *Optom. Vis. Sci.* 96(9):706-709.

**VON VERSEN-HOYNCK F., HESSELBARTH U, MOLLER D.E. 2004.** Application of sterilized human amnion for reconstruction of the ocular Surface. *Cell Tissue Bank* 5(1):57-65.

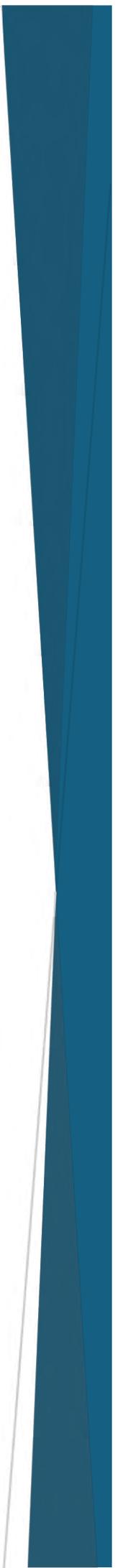
**VON VERSEN-HOYNCK F., SYRING C., BACHMANN S., et al. 2004.** The influence of different preservation and sterilization steps on the histological properties of amnion allografts-light and scanning electron microscopic studies. *Cell Tissue Bank* 5(1):45-56.

---

- 
- WALL R.S., ELLIOTT G.F., GYI T.J., et al. 1988.** Bovine corneal stroma contains a structural glycoprotein located in the gap region of the collagen fibrils. *Biosci. Rep.* 8:77-83.
- WANG Y., GAO G., WU Y., et al. 2020.** S100A4 Silencing Facilitates Corneal Wound Healing After Alkali Burns by Promoting Autophagy via Blocking the P13K/Akt/mTOR Signalling Pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 61(11):19.
- WHITLEY R.D, GILGER B.C. 1998.** Diseases of the Canine Cornea and Sclera. In: K. Gelatt *Veterinary Ophthalmology* 3<sup>rd</sup> ed. USA. Williams & Wilkins; 636-673.
- WILLIAMS R., LACE R., KENNEDY S., et al. 2018.** Biomaterials for Regenerative Medicine Approaches for the Anterior Segment of the Eye. *Adv. Healthc. Mater.* 7(10): e1701328.
- WILSON S.E, HONG J.W. 2000.** Bowman's Layer Structure and Function: Critical or Dispensable to Corneal Function? A Hypothesis. *Cornea.* 19 (4), 417-420.
- WILSON S.E., TORRICELLI A.A.M, MARINO G.K. 2020.** Corneal Epithelial Basement Membrane: Structure, Function and Regeneration. *Exp. Eye Res.* 194:108002.
- WINKLER M., CHAI D., KRILING S., et al. 2011.** Non-linear optical macroscopic assessment of 3-D corneal collagen organization and axial biomechanics. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(12):8818-8827.
- WINKLER M., SHOA G., TRAN S.T., et al. 2015.** A comparative Study of Vertebrate corneal Structure: The Evolution of a Refractive Lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 (4): 2764-2772.
- WITCHER H.P., SRINIVASAN M, UPADHYAY M.P. 2001.** Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 79:214-221.
- WITT J., BORRELLI M., MERTSCH S., et al. 2019.** Evaluation of Plastic-Compressed Collagen for Conjunctival Repair in Rabbit Model. *Tissue Eng. Part A.* 25(15-16) 1084-1095.
- WOLLENSAK G., SPOERL E, SEILER T. 2003.** Riboflavin/ultraviolet e induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am. J. Ophthalmol.* 135(5):620-627.
- XIE H.T., LI J., LIU Y., et al. 2018.** Cryopreserved limbal lamellar keratoplasty for peripheral corneal and limbal reconstruction. *Int. J. Ophthalmol.* 18;11(4):699-702.
-

- XIE H.T., ZHANG Y.Y., JIANG D.L., et al. 2018.** Amniotic membrane transplantation with topical interferon alfa-2b after excision of ocular surface squamous neoplasia. *Int. J. Ophthalmol.* 18;11(1):160-162.
- XU W., WAND Z., LIU Y., et al. 2018.** Carboxymethyl chitosan/gelatin/hyaluronic acid blended-membranes as epithelia transplanting scaffold for corneal wound healing. *Carbohydr. Polym.* 15; 192:240-250.
- YANGZES S., GUPTA P.C., JHA V., et al. 2019.** J. Pigmented corneal ulcer. *Ophthalmic. Vis. Res.* 24;14(4):506-508.
- YEE R.W., GEROSKI D.H, MATSUDA M. 1985.** Correlation of Corneal Endothelial Pump Site Density, Barrier Function, and Morphology in Wound Repair. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 26 (9), 1191-1201.
- YOO L., REED J., GIMZEWSKI J.K., et al. 2011.** Mechanical interferometry imaging for creep modeling of the cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 (11):8420-8424.
- YU A.C., MATTIOLI L, BUSIN M. 2020.** Optimizing Outcomes for Keratoplasty in Ectatic Corneal Disease. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 31(4):268-275.
- ZHAO X.Y., XIE H.T., DUAN C.Y., et al. 2018.** Rat limbal niche cells can induce transdifferentiation of oral mucosal epithelial cells into corneal epithelial-like cells in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* 26;9(1):256.
- ZHOU Z., LONG D., HSU C.C., et al. 2019.** Nanofiber-reinforced decellularized amniotic membrane improves limbal stem cell transplantation in a rabbit model of corneal epithelial defect. *Acta Biomater.* 1;97:310-320.

# Anexo (artículo)





# Histopathological and statistical study of corneal repair in rabbits. A new way to understand corneal recovery

Patricia Ramírez-Perdomo<sup>1</sup>, Juan Daniel Hernández-Marrero<sup>2</sup>, Santiago Guillén-Molina<sup>3</sup>, Pedro Saavedra-Santana<sup>4</sup>, Mónica de León-Vera<sup>5</sup>, Eduardo José Araujo-Ruano<sup>1</sup>, Juan Francisco Loro-Ferrer<sup>6</sup>, Juan José Cabrera-Galván<sup>1</sup> and Juan Andrés Ramírez-González<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Morphology Department, Las Palmas de Gran Canaria University (ULPGC), <sup>2</sup>Exotics Animal's Veterinary Service (Servieuxotic), <sup>3</sup>Albion Ophthalmological Clinic, <sup>4</sup>Mathematics Department, Las Palmas de Gran Canaria University (ULPGC), <sup>5</sup>Veterinary Specialities (OFTALVET) and <sup>6</sup>Clinical Sciences Department, Las Palmas de Gran Canaria University, Gran Canaria, Spain

**Summary.** The study aims to evaluate corneal healing post amniotic membrane transplantation in controlled corneal defects, justifying its application in routine ophthalmology practice. The objective is to establish a reliable method for assessing the repair process.

In three groups of six adult New Zealand rabbits, keratectomy and a monolayer transplant of dehydrated human amniotic membrane (AM) were conducted in the left eye (OS) with the right eye (OD) serving as the control eye. Clinical signs were assessed, and both eyes were enucleated at 1, 2, and 4 weeks for optical coherence tomography (OCT) measurements and histological analysis, collecting data from different epithelium, stroma, and limbus regions. This study was conducted using a formula that combines histologic data categorizing their presence and/or type as beneficial for corneal repair.

No statistically significant differences were found between the experimental and control eyes regarding all clinical signs and OCT measurements. However, a linear model using histopathological results showed a period-implant mode interaction with statistical significance ( $P=0.010$ ).

The use of the single-layer amniotic membrane resulted in improved corneal recovery with the stromal side showing better performance in the first week and the epithelial side proving to be more effective than the stromal side in the long term. For the first time, a statistical formula employing histopathological data is introduced to determine corneal recovery, potentially offering a more accurate and reliable method compared with the observation of clinical signs and corneal measurements with OCT.

**Key words:** Corneal ulcer, Amniotic membrane, Corneal histopathology, Biomaterial

## Introduction

The outer fibrous tunica of the eye comprises the sclera and the cornea. The limbus serves as the transitional zone between the cornea (anterior) and the sclera (posterior). The cornea, positioned at the front of the eyeball and transparent in nature, facilitates the passage of light into the eye, thereby enabling vision. In mammals, the cornea comprises the external corneal epithelium, the corneal stroma, and internally, Descemet's membrane and endothelium (Maggs, 2009).

Corneal ulceration occurs when the corneal epithelium is breached, exposing the underlying corneal stroma. It ranks among one of the most prevalent eye diseases in veterinary ophthalmology and is particularly common in rabbits, as indicated by some authors (Andrew, 2002; Maggs, 2009). The disease is classified as one of the inflammatory keratopathies, which can manifest either as ulcerative or non-ulcerative. Clinical signs, possible treatments, and prognosis may vary according to the depth of the defect. It is important to note that depth is not the only factor affecting healing; bacterial or fungal contamination may also adversely affect treatment (Maggs, 2009).

In superficial ulcers, the absence of infection, the elimination of the original cause, and topical treatment usually suffice to resolve the condition (Maggs, 2009).

In cases of deeper ulcers complicated by bacteria or fungal involvement, resolving them may necessitate corneal surgery and the application of biomaterials (Xie et al., 2018; Gogova et al., 2020). Some examples of such materials include stem cell transplantation, the use of polymer membranes, oral mucosa, amniotic membrane, and porcine bladder, among others (Sorsby et

*Corresponding Author:* Juan José Cabrera-Galván, Avda. Blas Cabrera Felipe s/n, Facultad de Medicina, 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain. e-mail: juanjose.cabrera@ulpgc.es  
www.hh.um.es. DOI: 10.14670/HH-18-750



al., 1947; Arora et al., 2005; Lo et al., 2013).

The amniotic membrane has been shown to be an effective biological material for restoring conjunctival and corneal surfaces in both human and veterinary patients when used as graft material (Tejwani et al., 2007; Rosen et al., 2018; Costa et al., 2019). In transplantation (Che et al., 2019; Dragúňová et al., 2019), it can be employed either independently or in conjunction with other tissues, such as the umbilical cord. Additionally, it is applied in eye drops to facilitate corneal re-epithelialization yielding satisfactory results (Tighe et al., 2017; Murriss et al., 2018).

The amnion possesses several advantageous properties including its anti-fibrotic, anti-angiogenic, anti-protease, and anti-inflammatory properties. These properties contribute to the reduction of neutrophil infiltration, lipid peroxidation, and keratocyte death, thereby preventing symblepharon formation and decreasing stromal inflammation (Tamhane et al., 2005; Tandon et al., 2011; Lo et al., 2013).

Advanced diagnostic imaging tests are employed to acquire the most precise and accurate information regarding an individual's eye condition. Optical coherence tomography (OCT) can provide cross-sectional or tomographic images of the eye with micrometric resolution. Anterior segment OCT (AS-OCT) is utilized for diagnosing corneal diseases or anomalies, such as dystrophies or foreign bodies, and their repair following specific eye surgeries, among other applications (Armarnik et al., 2019; Kuo and Lee, 2019; Wang et al., 2019). Furthermore, studies have demonstrated its effectiveness in assisting corneal and intraocular surgery, particularly in determining the dimension of a corneal biopsy (Schmidt et al., 2019; Shan et al., 2019).

Moreover, histopathology serves as a valuable tool for examining morphology and analyzing its indicators can shed light on healing mechanisms by providing morphological evidence of the reparative process in corneal ulcers, while also gauging the extent of inflammation and fibrosis (Raghunathan et al., 2017; Jie et al., 2018).

The objective of this study was to scrutinize the corneal healing process by intentionally inducing a controlled stromal defect using an amniotic membrane.

This investigation aims to validate the membrane's application as a viable treatment in routine clinical ophthalmology and to find a reliable method for evaluating the reparative process.

To assess the procedure, clinical signs, OCT measurements and histopathology were assessed at different stages of the recovery process. Comparisons were drawn between the amniotic membrane placed over the stromal or epithelial side of the defect and the control eye, where no membrane was applied.

## Materials and methods

This study was verified and approved by the ethics committee of the University of Las Palmas de Gran Canaria (OEBA-ULPGC 08/2016).

### Design

This clinical trial aimed to evaluate the effects of inserting an amniotic membrane (AM) into the eye for corneal recovery in rabbits. Eighteen healthy, adult New Zealand rabbits, in optimal physical condition, were involved in the study. The rabbits were divided into three groups of six individuals: "Group 1" (individuals 1-6), "Group 2" (7-12), and "Group 3" (13-18). Group 1 was sacrificed after the first week, Group 2 after two weeks, and Group 3 after four weeks. Measurements of total corneal thickness, maximum ulcer thickness, and central thickness were taken for each eye.

Treatments (mode de insertion of AM) were randomly assigned according to Table 1.

### Surgical approach

All rabbits underwent anesthesia using a uniform protocol and prepared for sterile procedures. A controlled stromal defect was induced in 36 eyes. This keratectomy was performed with a 7 mm vacuum trephine (Clear-vue<sup>®</sup>, Moria, France) set at a depth of 200 microns, following the manufacturer's instructions.

A single 8 mm diameter and 0.2 mm thick layer of dehydrated human AM (Visio-Amatrix<sup>®</sup>, TBF-Tissue engineering, France) was applied exclusively over the defect to the left eye (OS). In half of the cases (1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, and 15), the epithelial side of the membranes made contact with the corneal stroma, while in the other half, the stroma of the defect was in contact with the stromal matrix of the amniotic membrane.

Tissue glue (OcuSeal<sup>®</sup>, Beaver-Visitec International, Waltham, MA) was used to adhere the membrane following the manufacturer's instructions. To prevent a corneal reaction, no stitches, flaps, or contact lenses were utilized to fix the membrane, allowing for the evaluation of inflammatory and reparative reactions without interference from suture material, as well as the assessment of external evolution.

**Table 1.** Experimental model. Treatment Assignment.

Number of rabbits	Eye		Follow-up days*		
	Left	Right	7	15	30
9	AM in mode epithelial	Control	3	3	3
9	AM in mode stromal	Control	3	3	3

\*: Data are treatments and frequencies. Distribution of individuals (n=18) in different groups (n=3), treatment assignment according to epithelial side (n=9) or stromal side (n=9) in the left eye of each individual (the OD always acts as a control), and follow-up time until euthanasia (7, 15, and 30 days).

## Histology and amniotic membrane for ulcer repair in rabbit corneas

### Postoperative management

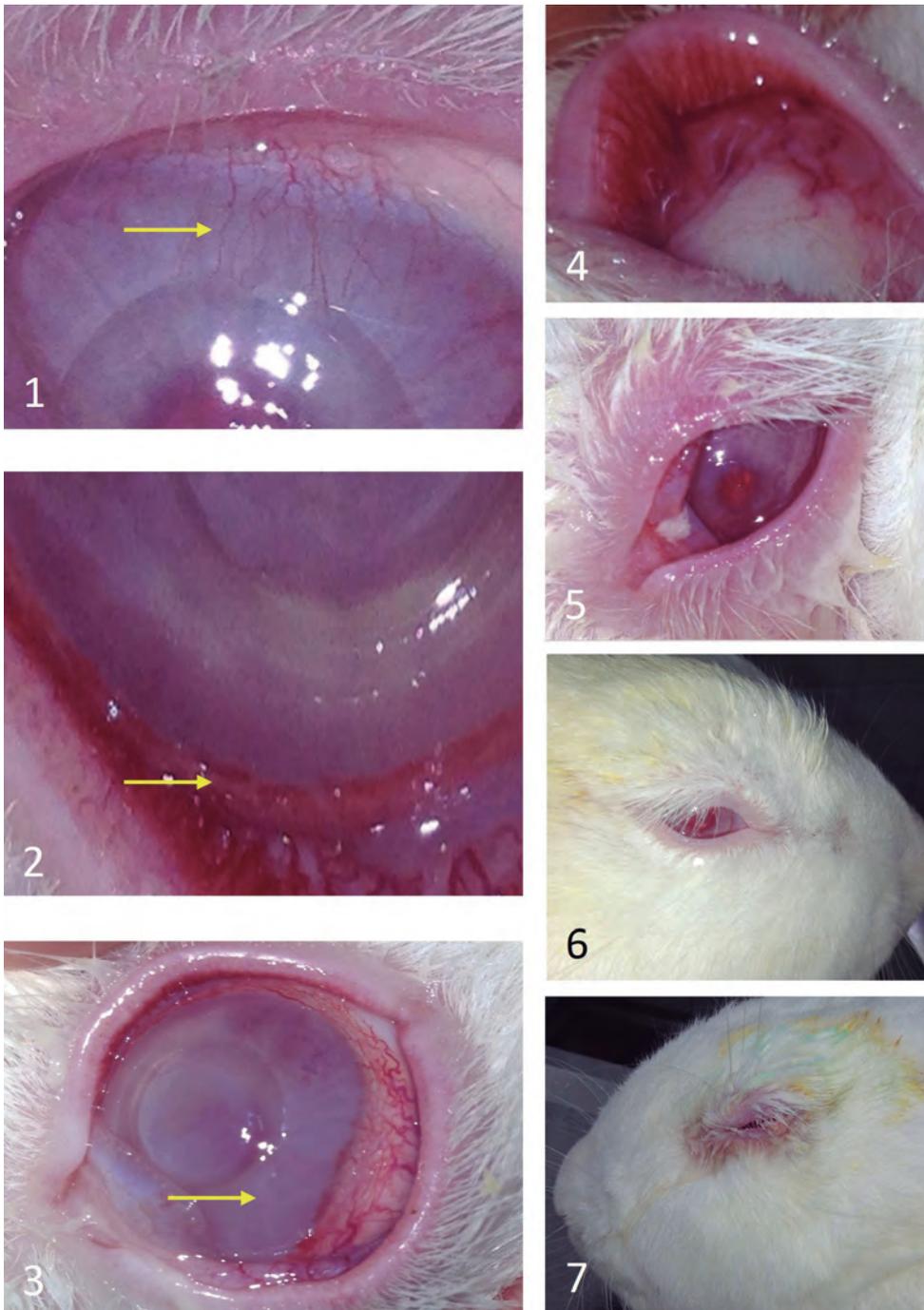
A topical antibiotic (Ofloxacin 0.3%; Exocin<sup>®</sup>, Allergan, Ireland) was applied every 12 hours to all subjects, in conjunction with artificial tears (Systane<sup>®</sup>, Alcon, USA) until complete epithelialization was achieved.

To prevent potential digestive issues caused by handling, analgesic therapy with buprenorphine (0.03

mg/kg), metoclopramide (0.5 mg/kg), and ranitidine (2 mg/kg) were administered every 12 hours for the first three postoperative days (given subcutaneously).

### Clinical signs

Throughout the initial week and bi-weekly thereafter until the study's conclusion, all eyes underwent daily remote and slit-lamp observations. These assessments



**Fig. 1.** Example of the different clinical signs studied. 1. Superficial vascularization (arrow). 2. Deep vascularization (arrow). 3. Corneal edema (arrow). 4. Conjunctival congestion. 5. Secretion. 6. Discomfort. 7. Blepharospasm.

involved documenting the presence or absence of superficial and deep vascularization, discharge, discomfort, corneal edema, blepharospasm, hypopyon, and conjunctival congestion. (Fig. 1). The classification was assigned a value of "0" for the absence of a clinical sign, "1" for mild presentation, "2" for moderate presentation, and "3" for severe presentation.

### *OCT*

On the specified date for each group, rabbits were euthanized and transconjunctival enucleation was performed on both eyes for subsequent OCT and histological analysis.

The OCT model employed in the present study was Stratus Cirrus 500<sup>®</sup>, Zeiss, Germany, operating in "anterior chamber" mode). Each cornea underwent several OCT examinations to derive average measurements, encompassing normal corneal thickness, maximum ulcer thickness (the maximum thickness adjacent to the keratectomy incision), and central thickness (the thickness in the middle of the keratectomy) (Fig. 2).

The OCT also provides information regarding the presence or absence of lesional and/or perilesional edema. According to their degree of edema, corneas were classified into four groups ranging from "0" (no edema) to "3". Perilesional edema was classified as "1" if the edema ranged from 400 to 500 microns, "2" if the edema ranged from 500 to 600 microns, and "3" if the edema exceeded 600 microns. For lesional edema, "1" denoted edema less than 400 microns, "2" for edema between 400 and 500 microns, and "3" for edema greater than 500 microns. (Fig. 2).

### *Histopathology*

Following OCT analysis, the eyes were preserved and fixed in 4% buffered formaldehyde. Macroscopic sections were made at the level of the anterior chamber, encompassing the cornea, limbus, and lens. The cornea was sectioned centrally and embedded in paraffin. Four-micron sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

In total, the 36 corneal samples underwent histological studies, with data collected from areas of the epithelium and stroma (central zone, intermediate zone between the center and one of the defects, and a point close to both defects). Additionally, the condition of the sclerocorneal limbus was also assessed.

*Epithelium:* For each of these areas, the following information was obtained: number of cell layers (numerical value), and the presence (1) or absence (0) of the basal layer and the basement membrane.

*Stroma:* keratocytes were studied and classified based on their activity at the stromal level, with a value (0) assigned to those without activity or mature keratocytes,

typically found in lower strata of the corneal stroma and characterized by elongated, flat nuclei that are separated from one another. In contrast, keratocytes with larger elongated nuclei and appearing in greater numbers with less separation were identified as immature keratocytes with value (1), and the more active immature keratocytes with large nuclei and obvious nucleoli were identified as having value (2).

The same assessment was conducted at the stromal level determining the presence (1) or absence (0) of simple edema, myxoid edema, and capillary blood vessels.

For the sclerocorneal limbus: inflammation was assessed by examining the presence of lymphocytic infiltrates within the perivascular or interstitial spaces. Assigned values ranged from negative (0) to mild (1), moderate (2), and marked (3). The examination also included the presence (1) or absence (0) of neofomed capillaries as well as edema.

### *Histopathological data analysis*

Using the data obtained from the histology section, a formula was developed that integrated all the data based on whether their presence and/or type contribute to corneal repair. The formula is outlined as follows:  
Corneal repair= Epithelial regeneration+ Stromal repair+ Limbal repair.

For epithelial regeneration: data were collected at the different points described above (central zone, intermediate zone, proximal zone 1, and proximal zone 2). The number of cells (NCEL) is considered a positive value, with a higher count of cell layers indicating a more advanced level of regeneration. Additionally, basal cells (BCEL) and the presence of the basement membrane (BMEM) are considered positive values, reflecting enhanced regeneration. Therefore:

$$\text{Epithelial regeneration} = \text{NCEL} + \text{BCEL} + \text{BMEM}$$

Data related to stromal repair include the following: Concerning Keratocytes (KERAT), the degree of repair varies according to the stage. A value of "0" signifies the optimal condition. It is important to note that the presence of simple edema (EDEMA), myxoid edema (MIX), and vascularization (VASC) indicates a lower degree of repair. Accordingly:

$$\text{Stromal Repair} = \text{KERAT} (0 > 1 > 2) - \text{EDEMA} - \text{MIX} - \text{VASC}$$

In the case of limb repair, the following data are considered: Inflammation (LIMBUS\_INFL): depending on the degree of inflammation, indicates varying levels of repair activity with a value of "0" denoting the highest level of repair. Vascularization (LIMBUS\_VASC) and edema (LIMBUS\_EDEMA): Their presence implies a lesser degree of repair. Therefore:

Histology and amniotic membrane for ulcer repair in rabbit corneas

Limbal repair=LIMBUS\_INF (0>1>2>3) - LIMBUS\_VASC - LIMBUS\_EDEMA

Statistical analysis

Zero-inflated Poisson model

The impact of treatments on the progression of eye lesion counts in Blepharospasm, Discomfort, and Conjunctival congestion was assessed. However, the other clinical signs yielded too many null results, making them unanalyzable. Thus, for each marker, denoted as  $N_{t,d,r,e}$  to represent the lesion count in eye “e” (right or left) corresponding to the  $r^{th}$  rabbit treated with “t” (Control, Epithelial, Stromal) on day “d” of follow-up. Given that most counts are null, they were modeled

using a zero-inflated Poisson mode. Additionally, considering repeated measures within each rabbit, we included the rabbit effect as a random effect, nested within, which is the eye effect (Hall, 2000). The resulting zero-inflated mixed model for each marker (Blepharospasm, Discomfort, and Conjunctival congestion) is as expressed as

$$[M]: N_{t,d,r,e} = \begin{cases} 0 & \text{with probability } p \\ \text{Poisson}(\mu_{t,d,r,e}) & \text{with probability } 1 - p \end{cases}$$

being:  $\ln(\mu_{t,d,r,e}) = \alpha + \beta d + \gamma_t + u_r + v_{e(r)}$   
 Here,  $\gamma_t$  represents the fixed effect of treatment (Control is taken as reference and thus,  $\gamma_{\text{Control}} = 0$ ),  $u_r \sim N(0, \sigma^2)$  denotes the random effect of the rabbit and  $v_{e(r)}$  is the random effect of eye “e” nested in the rabbit “r”. Additionally, we assume that the probability of zeros

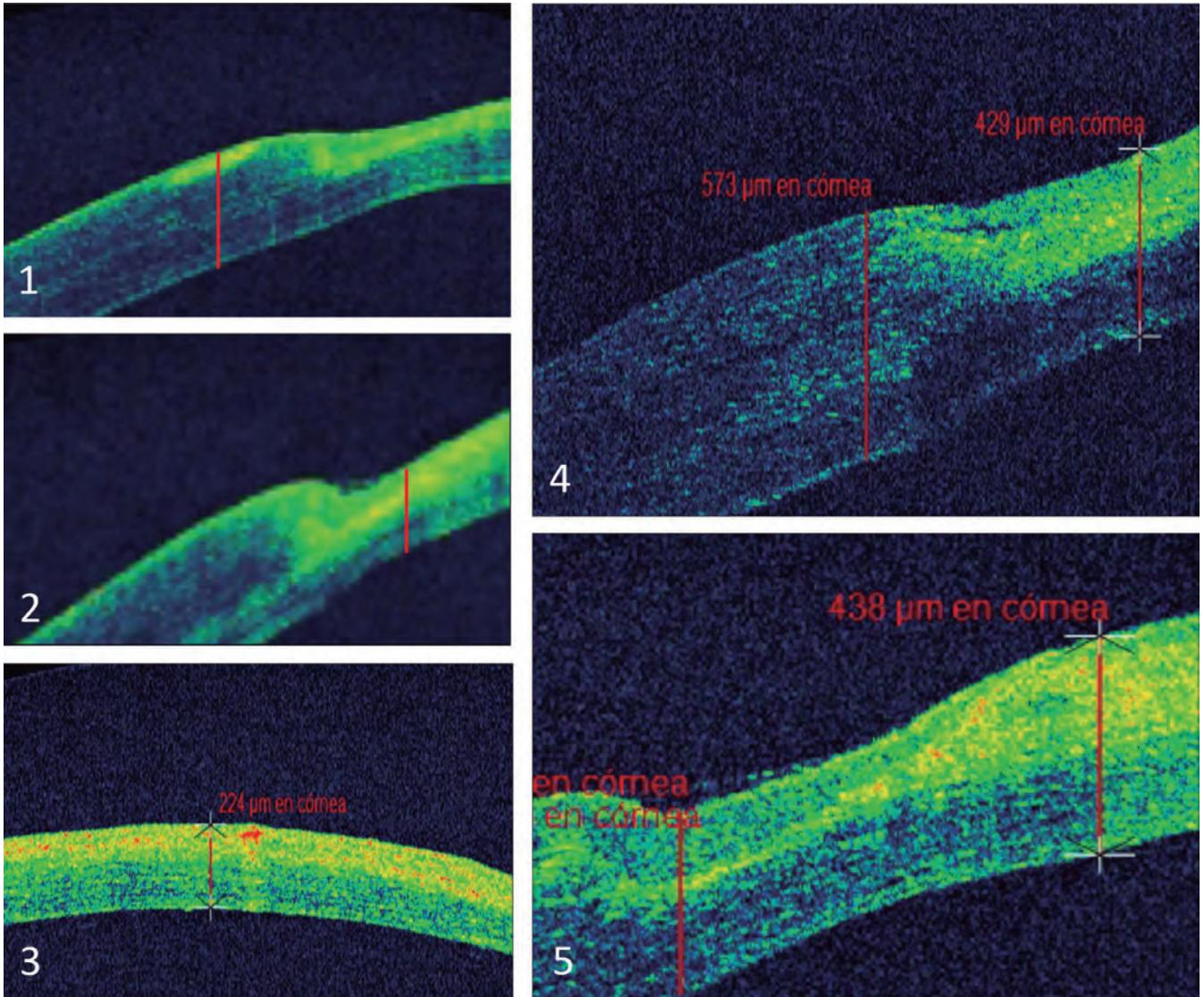


Fig. 2. Different OCT measurements. 1. Normal corneal thickness. 2. Maximum ulcer thickness. 3. Central thickness. 4. Perilesional edema. 5. Lesional edema.

p<sub>d</sub> may depend on the day of observation, with a higher probability towards the end of the follow-up.

### OCT

In the study of OCT measurements, the variables were summarized as medians according to the week, eye, and mode of placement of the AM (epithelial and stromal).

### Corneal repair score

We propose a corneal repair score as a weighted average of the three repair markers, namely: epithelial, stromal, and limbus repairs. Thus, for both eyes, the corneal repair score is defined as a convex linear combination in the form:

$$\text{Corneal.Repair} = w_1 \cdot \text{R. Epitelial} + w_2 \cdot \text{R. Stroma} + w_3 \cdot \text{R. Limbus}$$

To determine the coefficients  $w_1$ ,  $w_2$ ,  $w_3$ , we consider the difference:

$$D = \text{Corneal. Repair}_{\text{Left}} - \text{Corneal. Repair}_{\text{Right}}$$

Since the right eye was used as a control in all cases, D measures the effect of AM in its two modes of insertion in the left eye (epithelial and stromal) on corneal repair

relative to the control (right eye). Thus, we refer to D as the superiority of the AM inserted in the left eye *versus* the control (right eye). Therefore, comparisons between treatments will be carried out using D-differences according to the following model:

$$D = \mu + \alpha \cdot \text{AM} + \beta \cdot \text{Period} + \gamma \cdot \text{AM} \times \text{Period} + \text{Error} [\text{M2}]$$

Here, "AM" represents the factor denoting the insertion mode of AM, with epithelial and stromal modes coded as 1 and 0, respectively (stromal is taken as reference), "Period" takes values of 0 or 1 based on the first or 2-4 weeks and "Error" denotes the random variables corresponding to unexplained variability. We assume that these variables are independent and normally distributed with a mean of zero and standard deviation  $\sigma$ .

We choose the weights  $w_1$ ,  $w_2$ ,  $w_3$ , as those that maximize the adjusted-R<sup>2</sup> coefficient corresponding to the fit of the model [M2] using the least squares method. It is important to note that  $\gamma$  represents the effect of the interaction between AM and Period factors (AM concurrence in the epithelial mode with the second period).

The model was estimated using least squares and summarized by parameter estimates and standard errors (SE). Adjusted means for the differences D by period and mode of insertion of the AM were also estimated. Due to the low sample size, parameters were estimated

**Table 2.** Estimation of the zero-inflated Poisson models.

Marker	Effect	Coefficient (SE)	P-value
Blepharospasm	(Intercept)	0.88 (0.21)	<0.001
	Days ( $\beta$ )	-0.57 (0.06)	<0.001
	Treatment ( $\gamma_i$ )		
	Control (reference)	0	-
	AM in mode epithelial	0.48 (0.21)	0.02
	AM in mode stromal	-0.44 (0.27)	0.102
Discomfort	(Intercept)	0.96 (0.20)	<0.001
	Days ( $\beta$ )	-0.54 (0.05)	<0.001
	Treatment ( $\gamma_i$ )		
	Control (reference)	0	-
	AM in mode epithelial	0.37 (0.20)	0.063
	AM in mode stromal	-0.44 (0.25)	0.083
Conjunctival congestion	(Intercept)	1.32 (0.14)	<0.001
	Days	-0.42 (0.03)	<0.001
	Treatment ( $\gamma_i$ )		
	Control (reference)	0	-
	AM in mode epithelial	0.18 (0.15)	0.24
	AM in mode stromal	-0.36 (0.18)	0.048

For Blepharospasm, Discomfort, and Conjunctival congestion, the lesion counts decrease throughout the follow-up period ( $P < 0.001$ ). Regarding Blepharospasm, the epithelial insertion mode was consistently associated with a higher expected number of lesions compared with the control ( $P = 0.02$ ) throughout the follow-up, while the stromal insertion mode showed no significant difference with the control ( $P = 0.102$ ). For Discomfort, although statistical significance was not reached, the expected lesion count in the nonconforming group tended to be higher when inserting the amniotic membrane in the epithelial mode relative to the control ( $P = 0.063$ ) and lower than the control when inserted in stromal mode ( $P = 0.083$ ). For Conjunctival congestion, the expected number of lesions was significantly reduced relative to the control for the stromal insertion mode ( $P = 0.048$ ), while the epithelial insertion mode showed no significant difference from the control ( $P = 0.24$ ).

## Histology and amniotic membrane for ulcer repair in rabbit corneas

using 90% confidence intervals.

Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . Data were analyzed using the R package, version 4.2.1 (R Development Core Team, 2022). The zero-inflated Poisson model was estimated using R-package “glmmTMB” (<https://github.com/glmmTMB/glmmTMB>). The model for the differences in corneal repair (D) was analyzed using R-package “emmeans” (<https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html>).

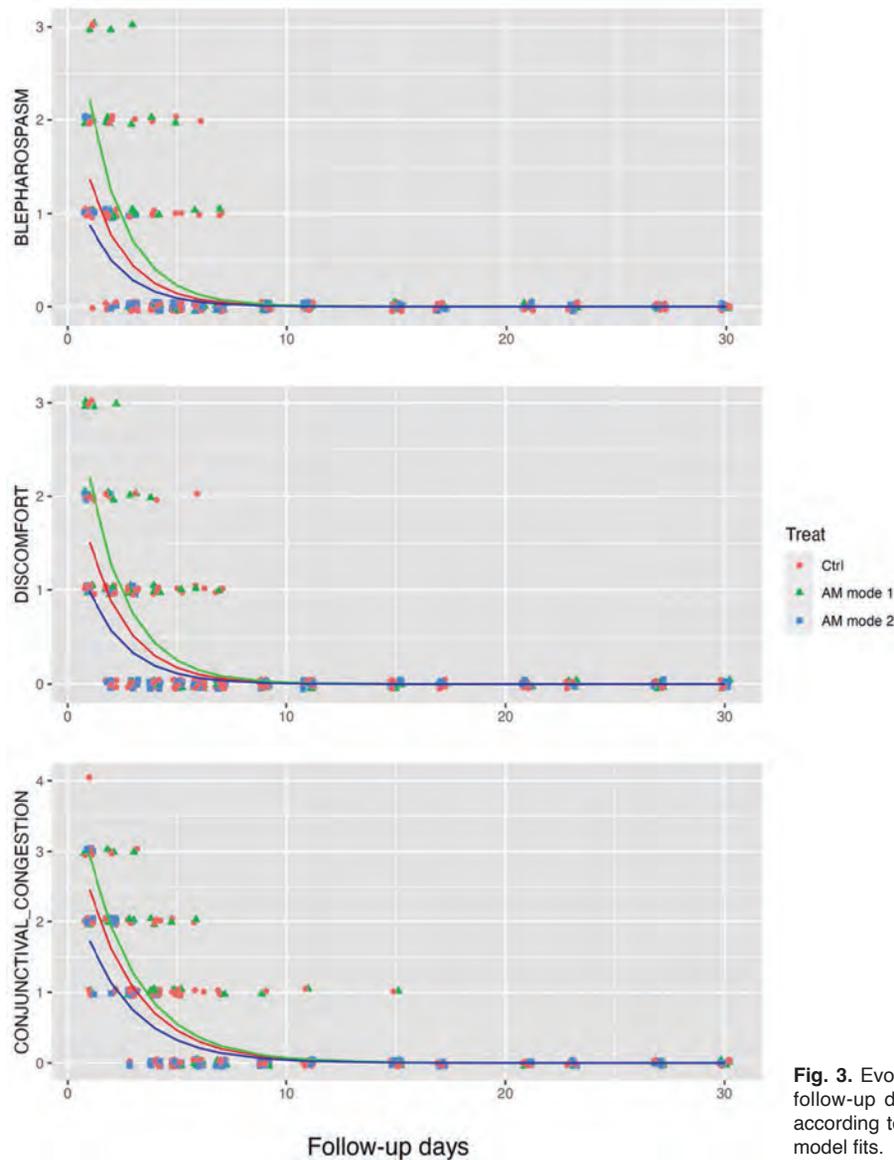
### Results

#### Clinical signs

Data were collected by one investigator. All 18

specimens were scanned and data collected daily from days 1 to 7. Scans were performed on days 7, 9, 11, and 15 for the second group (rabbits 7-12). In Group 3 (rabbits 13-18), scans were conducted on days 17, 21, 23, 27, and 30.

Table 2 summarizes the estimation of the fixed effects corresponding to the zero-inflated Poisson model. For the three markers (Blepharospasm, Discomfort, and Conjunctival congestion), the lesion counts showed a consistent decrease throughout the follow-up period ( $P < 0.001$ ). Regarding Blepharospasm, the epithelial insertion mode was consistently associated with a higher expected number of lesions compared to the control throughout the follow-up ( $P = 0.02$ ), while the stromal insertion mode did not exhibit a significant difference from the control ( $P = 0.102$ ). Although statistical



**Fig. 3.** Evolution of lesion counts according to treatment and follow-up day. For each marker, evolution of lesion counts according to treatment. The curves correspond to the mixed-model fits.

*Histology and amniotic membrane for ulcer repair in rabbit corneas*

significance was not achieved, the expected lesion count in the nonconforming group tended to be higher when the AM was inserted in the epithelial mode compared with the control ( $P=0.063$ ) and lower than the control when inserted in the stromal mode ( $P=0.083$ ). For the conjunctiva, the expected number of lesions was significantly reduced relative to the control for the stromal insertion mode ( $P=0.048$ ), while the epithelial insertion mode showed no significant difference from the control ( $P=0.24$ ). These results are illustrated in Figure 3.

*OCT*

According to the measurements performed, different results were obtained concerning corneal thickness and the presence and type of edema.

**Table 3.** Corneal thickness according to treatment mode and week.

Thickness	Week	Mode of insertion of the amniotic membrane (AM)			
		Epithelial N=9		Stromal N=9	
		Left eye	Right eye	Left eye	Right eye
Total	1	413	483	422	470
	2	452	464	454	453
	4	427	422	429	429
Ulcer	1	272	219	259	234
	2	379	320	344	290
	4	285	273	254	245
Central	1	283	343	296	256
	2	368	306	418	409
	4	325	336	301	288

Descriptive table summarizing the corneal thicknesses in medians for each eye according to the week of observation and the method of amniotic membrane insertion in the left eye of each rabbit. Data are medians.

**Table 4.** Statistical analysis of the lesional and perilesional edema.

Week	Edema	Control eye	Eye with the amniotic membrane	
			≤400	>400
1	Peri-lesional	≤400	0	0
		>400	0	3
2		≤400	0	0
		>400	0	2
4		≤400	0	0
		>400	0	1
1	Lesional	≤400	1	0
		>400	1	1
2		≤400	0	1
		>400	0	2
4		≤400	4	0
		>400	0	2

No statistically significant differences were found when comparing the control eye with the test eye over time. Data are frequencies.

Several OCT measurement results could not be obtained for all eyes: in Group 1 at 4OD and 6OD for total thickness (TT) and central thickness (CT); in Group 2 at 7OS, 8OD, and 8OS for TT; 8OD for Ulcer Max Thickness (UMT) and in 8OD and 8OS for CT.

The characteristics of corneal thickness by eye and follow-up are summarized in Table 3, which presents median values of corneal thicknesses in each eye at different points of the keratectomy: the normal corneal thickness (total), ulcer maximum thickness (ulcer max), and central thickness (central). This summarization is organized based on the week of observation and the method by which the AM was inserted in the left eye of each rabbit. Throughout the follow-up period, thicknesses between the two eyes did not exhibit statistically significant differences, possibly due to small sample sizes.

The same occurs with Table 4, which presents the statistical analysis of lesional and perilesional edema. Over time, no statistically significant differences were observed between the control and study eyes.

*Histopathology*

Table 5 summarizes the variations in corneal repair scores (epithelial, stromal, and limbal) between the two eyes, considering the mode of AM implantation and the week of follow-up.

In this table, it is noted that when evaluating differences in corneal repair (left minus right eye) based on the treatment group, the epithelial repair of the first week exhibits an almost statistically significant difference between the methods of membrane placement ( $P=0.077$ ).

Figure 4 illustrates the findings of most cases in Group 1 during the first week of treatment. The presence of stromal reactivity and irregular regenerated

**Table 5.** Differences in corneal repair (left eye minus right eye) according to treatment group.

	Week	AM insertion mode		P-value*
		Epithelial N=9	Stromal N=9	
<i>Epithelial</i>	1	0 (-3; 1.5)	10 (10; 12.5)	0.077
	2	1 (-3; 12)	-3 (-10; 4)	0.7
	4	-2 (-2.5; 6)	-1 (-2; 0)	1
<i>Stroma</i>	1	1 (0.5; 2)	1 (0.5; 4)	1
	2	2 (1; 2)	0 (0; 0.5)	0.346
	4	0 (-0.5; 2)	0 (-1.5; 1.5)	0.825
<i>Limbo</i>	1	-1 (-1; -0.5)	-1 (-1.5; -0.5)	0.814
	2	0 (-0.5; 0)	0 (-0.5; 0)	1
	4	0 (0; 0)	0 (-0.5; 0)	0.505

Data are medians (25-75<sup>th</sup> percentile). \*: Wilcoxon test for independent samples. When examining variations in corneal repair (left eye minus right eye) based on treatment groups, a statistically significant difference was observed in epithelial repair during the first week, with a P-value of 0.077 indicating the impact of the method of membrane placement.

*Histology and amniotic membrane for ulcer repair in rabbit corneas*

epithelium, in the membrane epithelial side (A), contrasts with the absence of such features in image (B) corresponding to the cornea with the membrane placed on the stromal side in OS, exhibiting a mature stroma. Below, control case (C) with scant epithelium can be observed. The limbal area shows marked habitual activity (D).

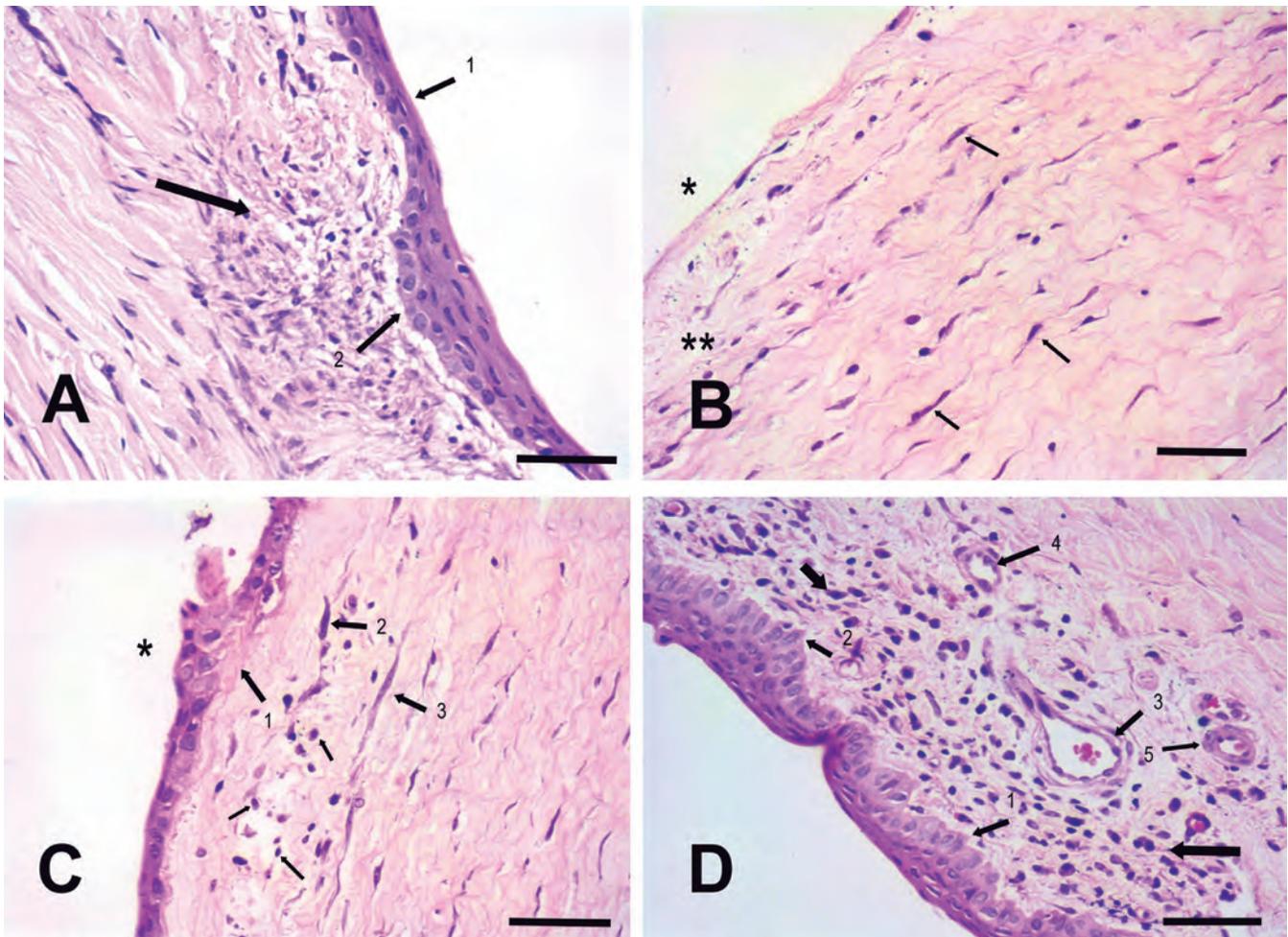
The score of the corneal repair model leading to the best fit [M2] was:

$$\text{Corneal.Repair} = 0.0675 \times R. \text{ Epithelial} + 0.195 \times R. \text{ Stroma} + 0.7375 \times R. \text{ Limbus}$$

The analysis of the effects of AM on corneal repair is summarized in Tables 6 and 7. In the first week, the

expected value of the repair score was higher when the stromal insertion mode was used compared with the control (superiority of AM-stromal score vs. control=0.570; 90% CI=0.021; 1.119). However, in the second period, the insertion in epithelial mode was superior to the control (difference in scores=0.397; 90% CI=0.009; 0.785). Finally, when the insertion modes are directly compared, the stromal mode shows greater effectiveness in the first period (superiority of AM-epithelial score vs. stromal=0.869; 90% CI=-1.655; -0.093) while in the second period, the epithelial mode is more effective than the stromal mode (superiority of AM-epithelial score vs. stromal=0.745; 90% CI=0.197; 1.294).

Figure 5 illustrates the evolution of corneal repair in



**Fig. 4.** Histopathological section of corneas corresponding to Group 1. **A.** OS. Membrane placed on the epithelial side. High stromal reparative activity in the proximal area of the surgical wound: thick arrow; asterisk\*: normal stroma. Irregular number of epithelium layers and altered basal cells: thin arrows 1, 2. H&E. **B.** OS. Membrane placed on the stromal side. Cornea with absent epithelium: (asterisk). Lax stroma with superficial and myxoid edema: (double asterisk). Immature keratocytes in the stroma: (arrows). H&E. **C.** OD Control. Cornea with two or three layers of reactive epithelium: (asterisk). Irregular basal cells and imprecise basement membrane: (arrow 1). Reactive keratocytes: (arrows 2, 3) Sparse inflammatory cells into lax stroma with myxoid edema: (small arrows). H&E. **D.** OS. Limbus. Area of the corneal limbus with non-specific chronic inflammatory signs: (thick arrows). Regular basal cells: (arrows 1, 2). Capillary vessel in formation structure: (arrow 3). Two conformed capillaries: (arrows 4, 5). Well-formed epithelium: (asterisk). H&E. Scale bars: A, D, 50  $\mu$ m; B, C, 70  $\mu$ m

Groups 2 and 3. One case with the membrane placed on the epithelial side (A) in mode 1 in OS showed a high, regenerated epithelium with residual active stroma, whereas, in image (B), there is a well-formed epithelium and stroma with immature keratocytes and aqueous edema. The control case (C). The limbus exhibits an apparent structure and moderate activity (D).

## Discussion

It is well known that rabbits are commonly used in laboratory research due to their manageability, space efficiency, and cost-effectiveness. Since domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) are popular pets, they are frequently encountered in veterinary practice. As prey species, rabbits have prominent, laterally positioned eyes that provide them with a wide field of vision (Maggs, 2009).

Extensive research has been conducted on ocular alterations in wild animals, pets, and experimental animals, with the cornea being the most commonly affected organ and corneal ulcers being the most common pathology in this species (Andrew, 2002).

### Clinical signs

Different studies have reported different results on

the reduction of pain after AM transplantation in various corneal diseases. A study of patients with acute ocular burns (Tamhane et al., 2005) found that patients undergoing amniotic transplantation did not experience as much pain as those receiving only medical therapy. Comparatively, our study found that the eye with AM (OS) exhibited more signs of pain, including greater discomfort, conjunctival congestion, and blepharospasm than the OD, as shown in table 2, and figure 3. The statistical results for the three clinical signs indicate  $P < 0.001$ .

The placement of the membrane predetermined differences as to its location: blepharospasm and discomfort were more common in patients with the membrane in the epithelial position than in those with the membrane in the stromal position, although discomfort was not statistically significant ( $P = 0.063$ ). These results may correlate with the sensation of a foreign body in patients with Sjögren's syndrome who have undergone amniotic membrane transplantation (AMT) (Shafer et al., 2019).

Another factor to consider when determining whether AMT is more advantageous than other techniques or treatments is the recovery of visual acuity. Accordingly, several studies have demonstrated that there is no statistically significant difference in visual acuity improvement or signs that may alter it, such as

**Table 6.** Linear model with treatment-week interaction for the difference  $D$  in proposed corneal repair score between left and right eyes (left minus right).

	Coefficient (SE)	P-value
(Intercept)	0.570 ± 0.312)	0.089
<i>Mode of insertion of the AM</i>		
Stromal	0 (Reference)	
Epithelial	-0.869 (0.441)	0.069
<i>Period</i>		
Week 1	0 (Reference)	
Weeks 2 and 4	-0.918 (0.382)	0.03
Interaction: epithelial mode of insertion and weeks 2-4*	1.615 (0.540)	0.01

\*: The treatment-period interaction leads to the fact that in the first period, AM is more effective in stromal mode while in the second period, it is more effective in epithelial mode. This table summarizes the estimation of the corresponding linear model, showing statistical significance for the period-implant mode interaction ( $P = 0.010$ ).

**Table 7.** Adjusted means [90% CI<sup>†</sup>] deduced from the linear model (Table 6).

Period	Mode of insertion of the AM		Epithelial vs Stromal**
	Stromal*	Epithelial*	
Week 1	0.570 [0.021; 1.119]	-0.299 [-0.848; 0.250]	-0.869 [-1.645; -0.093]
Weeks 2 and 4	-0.348 [-0.736; 0.040]	0.397 [0.009; 0.785]	0.745 [0.197; 1.294]

\*: Difference in corneal repairs between the left and right eyes; adjusted means assess the superiority of AM in both modes (left eye) relative to the control (right eye). \*\*: Comparison of the epithelial and stromal insertion modes: superiority of the epithelial mode insertion minus superiority of the stromal mode AM. †: Since the sample size was small, 90% confidence intervals were used. This table confirms, through the confidence interval, that corneal repair is superior in both modes (OS) compared with the control (OD). It also demonstrates that in the second period (weeks 2 and 4), insertion in the epithelial mode relative to the stromal mode leads to a marked superiority of 0.745 (90% CI).

### Histology and amniotic membrane for ulcer repair in rabbit corneas

opacity or corneal edema, after acute ocular burn (Tamhane et al., 2005), alkali burn (Subasi et al., 2017), or following pterygium surgery (Akbari et al., 2017).

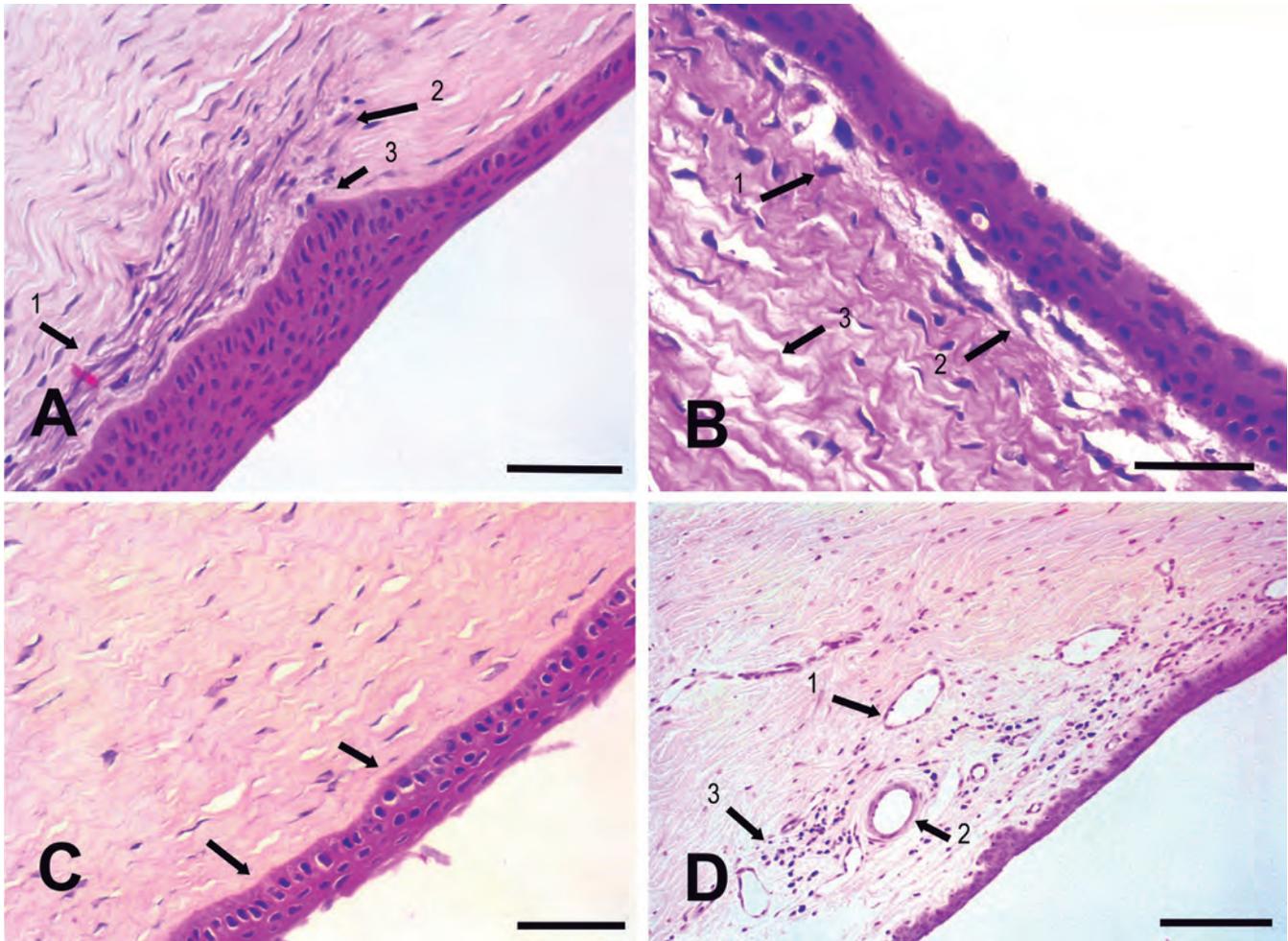
However, several authors have observed differences in visual acuity when comparing the use of AM with different techniques to treat recalcitrant filamentous fungal keratitis (Chen et al., 2016) or bacterial stromal keratitis (Altay et al., 2016).

In this study, a statistical comparison of corneal edema presentation among the study subjects was not feasible due to the prevalence of numerous "0" or null results. Subsequent studies, potentially involving a larger number of individuals, should be undertaken to yield insights into visual recovery outcomes.

Several methods have been described for placing the AM with varying results. A meta-analysis type study

published in 2019 (Liu et al., 2019) revealed that there are differences in vision improvement rates (VIR) depending on the technique used to cover the ulcer: the highest VIR was found in cases where the AM was placed in a single layer, followed by those whose AM was placed in a multilayer technique, and those with the lowest VIR were the "sandwich" group. In the present study, the unilayer technique was used. Future studies may provide further insight into the differences between different techniques and the severity of ulcer complications.

The presence of corneal vascularization was examined in a study where AMT was implanted one month after performing a superficial chemical keratectomy. Significant differences were found between the experimental and control groups three months after



**Fig. 5.** Histopathological section of corneas corresponding to Groups 2 and 3. **A.** OS. Membrane placed on the epithelial side. Wound area with dense stroma with active keratocytes: (arrows 1, 2). High epithelium and well-formed basal layer: (arrow 3). H&E. **B.** OS. Membrane placed on the stromal side. Well-formed epithelium with more than five layers with moderately preserved basal cells. Corneal stroma with immature and active keratocytes surrounded by interstitial aqueous edema: (arrows 1, 2, 3). H&E. **C.** OD. Control. Epithelium with several layers. Irregular basal cell layer and visible basement membrane: (arrows). Stroma with mature keratocytes, light edema, and no vessels: (asterisks). H&E. **D.** OD. Limbus. General view of the limbus area, with conformed capillaries: (arrows 1, 2) moderate edema and some infiltrating lymphocytes: (arrow 3). H&E. Scale bars: A, D, 70  $\mu$ m; B, 50  $\mu$ m; D, 100  $\mu$ m.

the keratectomy (Kim and Tseng, 1995).

In a study by Tandon et al. (2011), the results were consistent regarding vascularization presentation, since no difference was found between the placement of an AMT or not for corneal vascularization factors in patients with moderate ocular burns.

Similarly, Tamhane evaluated the combination of AMT with medical treatment for ulcers caused by burns, specifically moderate and severe. Their findings revealed no statistically significant differences in the manifestation of vascularization between the groups, aligning with our study, where no statistically significant distinction between groups was detected for this characteristic (Tamhane et al., 2005). It is worth noting that vascularization was observed in both groups three months after initiating the study. In a study carried out by Subasi (Subasi et al., 2017), they examined the effects of AMT on rabbit corneas affected by alkali burns. Vascularization was evaluated in a manner similar to our work, not only using the AMT technique but also comparing it with crosslinking (CXL) and the combination of both. In terms of vascularization, a significant difference was found between groups, with the group receiving AMT as the sole treatment and the group receiving AMT combined with CXL showing the highest degree of vascularization (Subasi et al., 2017).

In this study, like with edema and other clinical signs, we were unable to carry out statistically reliable comparisons between the eye where the AM was placed and the control, as well as between different placement modes. We suggest conducting additional studies to delve deeper into this factor, which we deem highly significant and has been extensively discussed by numerous authors.

#### *Corneal repair*

Several authors have employed the recovery of corneal thickness as a factor in evaluating the efficacy of AMT. This can be measured using various methods, including OCT, which was utilized in the current study (Raghunathan et al., 2017; Che et al., 2019; Costa et al., 2019).

The OCT technique has been employed for determining thickness measurements in different areas of the cornea, providing reliable diagnostic reproducibility, for cornea-specific results (Das et al., 2019; Duman et al., 2019). Despite this, there have only been a few studies in which this technology has been used to evaluate corneal regeneration (Raghunathan et al., 2017).

In the present study, as presented in Table 3, the highest measurements were obtained in the corneas evaluated in the second week after keratectomy. These values decreased in the third group (week four) but remained higher than those of the first week, except for three measurements (TT OD, TT OS, and CT OD), indicating some recovery of the defect.

A similar trend was observed in Raghunathan et al.'s

study (2017), where maximum corneal values were found in the initial days and then decreased. It is noteworthy, however, that in our study, we found a greater thickness during the second week rather than the first (Table 3). The presence of corneal edema may be the cause of this condition.

Therefore, in our work, the use of AMT evaluated by OCT as demonstrated in Table 3 did not indicate an improvement in corneal thickness recovery.

The present study defines corneal repair as the sum of epithelial regeneration and stromal and limbal repair. Without using immunohistochemical techniques, the data used were obtained from the histopathological study. Each of these three components has its own factors that influence corneal repair as a whole, either positively or negatively.

To our knowledge, this definition of corneal repair has not been employed previously. Nevertheless, various authors describe the process using terms like corneal regeneration or corneal recovery, considering factors like re-epithelialization or the restoration of corneal thickness, which are integrated into this novel formula.

In numerous studies, re-epithelialization has been identified as a factor in corneal recovery. AMT has been employed as a therapeutic intervention for various types of ulcers and their underlying causes, encompassing ulcers induced by burns (Tamhane et al., 2005), ulcers exhibiting different levels of severity (Tandon et al., 2011), and ulcers infected by multiple microorganisms (Altay et al., 2016). Moreover, this terminology is encountered in research studies where AMT is applied in conjunction with alternative surgical methods (Akbari et al., 2017) or implemented through diverse placement approaches (Liu et al., 2019).

According to the literature consulted, re-epithelialization is determined by external slit lamp examination and fluorescein staining assessment (Tandon et al., 2011; Altay et al., 2016; Akbari et al., 2017), whereas in the present study, it was determined by histological analysis and the corneal repair formula.

Based on our results, we propose that corneal repair is a more comprehensive term than those typically used to describe corneal recovery. No distinctions were noted between groups when exclusively examining clinical signs and OCT measurements in this study. Furthermore, even upon scrutinizing histological images alone, it remains inconclusive whether there is an improvement with the membrane's use or if one placement side is superior to the other.

Nevertheless, the outcomes derived from the new formula suggest that, as illustrated in Tables 6 and 7, corneal repair is more effective with the application of AM when compared with the control eye. Specifically, the initial repair, occurring within the first week, showed superiority in individuals with the membrane placed on the stromal side (AM-stromal score vs. control=0.570; 90% CI=0.021; 1.119). Conversely, during the extended recovery period (weeks 2 and 4), individuals with the AM placed on the epithelial side exhibited better corneal

## Histology and amniotic membrane for ulcer repair in rabbit corneas

repair (difference of scores=0.397; 90% CI=0.009; 0.785).

These results were confirmed when directly comparing the insertion modes (difference of epithelial score vs. stromal=-0.869; 90% CI=-1.655; -0.093) in the first week, while in the second period, the superiority of epithelial score vs. stromal=0.745; 90% CI=0.197; 1.294.

All the analysis suggests that, in the first week, AMT is more effective in stromal mode, while in the long term, the epithelial mode is more effective. This aligns with different articles indicating that AMT results in an improvement in corneal thickness recovery. However, most articles use combinations of AM with other techniques such as cross-linking (Soeken et al., 2018), the multilayer technique (Costa et al., 2019), or even combining the multilayer technique with other techniques such as mixed gas C3F8 in the anterior chamber (Fan et al., 2016) or the addition of corneal stromal cells between layers of ultrathin AM (González-Andrades et al., 2017).

The present study utilized a monolayer TMA technique, demonstrated to be fully effective by Goktas et al. (Goktas et al., 2017). However, further research is necessary to substantiate its use, including investigating various methods of applying the AM in terms of positions, times, and surgical techniques. Additionally, exploring the application of the new formula for corneal repair in different corneal conditions is essential.

### Conclusion

Our findings suggest that the use of AM with the unilayer technique enhances corneal healing after a controlled-depth corneal defect. In a short recovery period, placing the membrane on the stromal side yields better results, while in the longer term, positioning it on the epithelial side demonstrates superior outcomes in terms of corneal recovery. Therefore, we propose the use of a statistical formula based on a combination of histopathological results to measure corneal recovery. To our knowledge, this is the first time it has been employed and it may offer a more accurate and reliable method than the observation of clinical signs and the measurement of corneal thickness by OCT.

*Disclosure of funding received.* Our research was funded by the European Society of Veterinary Ophthalmology; ESVO Grant 2016.

*Conflict of interest.* Authors have no conflict of interest to declare.

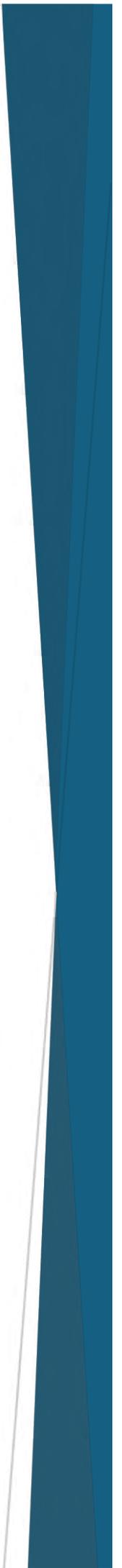
### References

- Akbari M., Soltani-Moghadam R., Elmi R. and Kazamnejad E. (2017). Comparison of free conjunctival autograft *versus* amniotic membrane transplantation for pterygium surgery. *J. Curr. Ophthalmol.* 29, 282-286.
- Altay Y., Tamer S., Burcu A. and Balta Ö. (2016). Amniotic membrane transplantation in bacterial and herpetic stromal keratitis. *Turk. J. Med. Sci.* 46, 457-462.
- Andrew S.E. (2002). Corneal diseases of rabbits. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 5, 341-356.
- Armarnik S., Minouni M., Goldenberg D., Segev F., Meshi A., Segal O. and Geffen N. (2019). Characterization of deeply embedded corneal foreign bodies with anterior segment optical coherence tomography. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 257, 1247-1252.
- Arora R., Mehta D. and Jain V. (2005). Amniotic membrane transplantation in acute chemical burns. *Eye* 19, 273-278.
- Che X., Wu H., Jia C., Sun H., Ou S., Wang J., Jeyalatha M.V., He X., Yu J., Zuo C., Liu Z. and Li W. (2019). A novel tissue-engineered corneal stromal equivalent based on amniotic membrane and keratocytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60, 517-527.
- Chen Y., Gao M., Duncan J.K., Ran D., Roe D.J., Belin M.W. and Wang M. (2016). Excisional keratectomy combined with focal cryotherapy and amniotic membrane inlay for recalcitrant filamentary fungal keratitis: A retrospective comparative clinical data analysis. *Exp. Ther. Med.* 12, 3014-3020.
- Costa D., Leiva M., Sanz F., Espejo V., Esteban J., Vergara J., Díaz C., Huguet E., Cairó M., Ríos J. and Peña M.T. (2019). A multicenter retrospective study on cryopreserved amniotic membrane transplantation for the treatment of complicated corneal ulcers in the dog. *Vet. Ophthalmol.* 22, 695-702.
- Das M., Menda S.A., Panigrahi A.K., Pranja N.V., Yen M., Tsang B., Kumar A., Rose-Nussbaumer J., Acharya N.R., McCulloch C.E., Lietman T.M., McLeod S.D. and Keenan J.D. (2019). Repeatability and reproducibility of slit lamp, optical coherence tomography, and Scheimpflug measurements of corneal scars. *Ophthalmic Epidemiol.* 26, 251-256.
- Dragúňová J., Kabát P., Cucorová V., Hajsáková M. and Koller J. (2019). Deep frozen amniotic membrane used as a scaffold and/or carrier for different cell types. *Cell Tissue Bank.* 20, 35-48.
- Duman R., Edtekin T., Duman R., Aslan E., Sabaner M.C. and Cetinkaya E. (2019). The novel model: Experimental optical coherence tomography-guided anterior segment imaging chick embryo model. *Indian J. Ophthalmol.* 67, 54-58.
- Fan J., Wang M., and Zhong F. (2016). Improvement of amniotic membrane method for the treatment of corneal perforation. *Biomed. Res. Int.* 2016, 1693815.
- Gogova S., Leiva M., Orillés A., Lacerda R.P., Seruca C., Laguna F., Crasta M., Ríos J. and Peña M.T. (2020). Corneoconjunctival transposition for the treatment of deep stromal to full-thickness corneal defects in dogs: A multicentric retrospective study of 100 cases (2012-2018). *Vet. Ophthalmol.* 23, 450-459.
- Goktas S.E., Katircioglu Y., Celik T. and Ornek F. (2017). Surgical amniotic membrane transplantation after conjunctival and limbal tumor excision. *Arq. Bras. Oftalmol.* 80, 242-246.
- González-Andrades M., Mata R., González-Gallardo M.D.C., Medialdea S., Arias-Santiago S., Martínez-Atienza J., Ruiz-García A., Pérez-Fajardo L., Lizana-Moreno A., Garzón I., Campos A., Alaminos M., Carmona G. and Cuende N. (2017). A study protocol for a multicenter randomized clinical trial evaluating the safety and feasibility of a bioengineered human allogeneic nanostructured anterior cornea in patients with advanced corneal trophic ulcers refractory to conventional treatment. *BMJ Open* 7, e016487.
- Hall D.B. (2000). Zero-inflated poisson and binomial regression with random effects: a case study. *Biometrics* 56, 1030-1039.
- Jie J., Yang J., He H., Zheng J., Wang W., Zhang L., Li Z., Chen J., Jeyalatha M.V., Dong N., Wu H., Liu Z. and Li W. (2018). Tissue

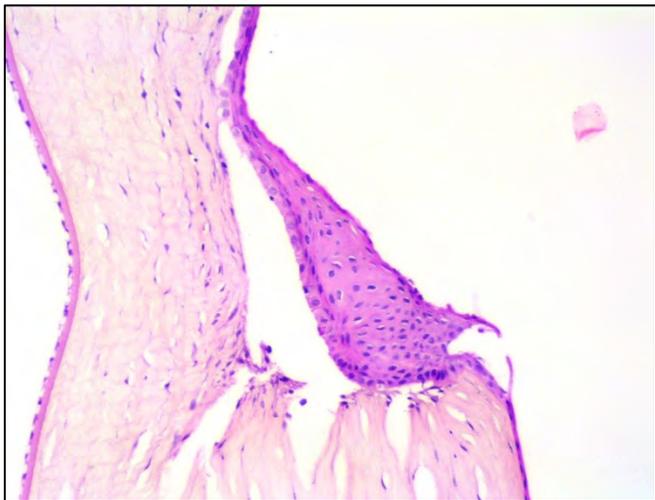
## *Histology and amniotic membrane for ulcer repair in rabbit corneas*

- remodeling after ocular surface reconstruction with denuded amniotic membrane. *Sci. Rep.* 8, 6400.
- Kim J.C. and Tseng S.C. (1995). The effect on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J. Ophthalmol.* 9, 32-46.
- Kuo Y.C. and Lee Y.C. (2019). A CARE-compliant article: optical coherence tomography for epithelial basement membrane dystrophy: A case report. *Medicine* 98, e15032.
- Liu J., Li L. and Li X. (2019). Effectiveness of cryopreserved amniotic membrane transplantation in corneal ulceration: A meta-analysis. *Cornea* 38, 454-462.
- Lo K., Kohanim S., Trief D. and Chodosh J. (2013). Role of amniotic membrane transplantation in acute chemical injury. *Int. Ophthalmol. Clin.* 53, 33-41.
- Maggs D.J. (2009). *Córnea y Esclera*. In: Slatter, *Fundamentos de Oftalmología Veterinaria*. 4th ed. Maggs D (ed). Elsevier Barcelona. pp 179-208.
- Morris M.S., Moshirfar M., Birdsong O.C., Ronquillo Y.C., Ding Y. and Hoopes P.C. (2018). Amniotic membrane extract and eye drops: a review of literature and clinical application. *Clin. Ophthalmol.* 18, 1105-1112.
- Raghunathan V.K., Thomasy S.M., Strom P., Yañez-Soto B., Garland S.P., Sermeno J., Reilly C.M. and Murphy C.J. (2017). Tissue and cellular biomechanics during corneal wound injury and repair. *Acta Biomater.* 58, 291-301.
- Rosen R. (2018). Amniotic membrane grafts to reduce pterygium recurrence. *Cornea* 37, 189-193.
- R Core Team (2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Schmidt E.M., Stiefel H.C., Houghton D.C. and Chamberlain D. (2019). Intraoperative optical coherence tomography to guide corneal biopsy: A case report. *Cornea* 38, 636-641.
- Shafer B., Fuerst N.M., Massaro-Giordano M., Palladino V., Givnish T., Macci I., Sulewski M.E., Orlin S.E. and Bunya V.Y. (2019). The use of self-retained cryopreserved amniotic membrane for the treatment of Sjögren syndrome: a case series. *Digit. J. Ophthalmol.* 25, 21-25.
- Shan J., De Boer C. and Xu B.J. (2019). Anterior segment optical coherence tomography applications for clinical care and scientific research. *Asia Pac. J. Ophthalmol.* 8, 146-157.
- Soeken T.A., Zhu H., DeMartelaere S., Davies B.W., Kim M., Wang H.C., Aden J., Grimm R., Alt C., Kochevar I.E. and Johnson A.J. (2018). Sealing of corneal lacerations using photoactivated rose bengal dye and amniotic membrane. *Cornea* 37, 211-217.
- Sorsby A., Haythorne J. and Reed H. (1947). Further experience with amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye. *Br. J. Ophthalmol.* 31, 409-418.
- Subasi S., Altintas O., Yardimoglu M., Yazir Y., Karaman S., Rencber S.F. and Kavram K. (2017). Comparison of collagen cross-linking and amniotic membrane transplantation in an experimental alkali burn rabbit model. *Cornea* 36, 1106-1115.
- Tamhane A., Vajpayee R., Biswas N.H., Pandey R.M., Sharma N., Titiyal J.S. and Tandon R. (2005). Evaluation of amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical therapy as compared with medical therapy alone in acute ocular burns. *Ophthalmology* 112, 1963-1969.
- Tandon R., Gupta N., Kalaivani M., Sharma N., Titiyal J. and Vajpayee R.B. (2011). Amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical therapy in acute ocular burns. *Br. J. Ophthalmol.* 95, 199-204.
- Tejwani S., Kolari R.S., Sangwan V.S. and Rao G.N. (2007). Role of amniotic membrane graft for ocular chemical and thermal injuries. *Cornea* 26, 21-26.
- Tighe S., Moein H.R., Chua L., Cheng A., Hamrah P. and Tseng S.C.G. (2017). Topical cryopreserved amniotic membrane and umbilical cord eye drops promote re-epithelialization in a murine corneal abrasion model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, 1586-1593.
- Wang S.B., Cornish E.E., Grigg J.R. and McCluskey P.J. (2019). Anterior segment optical coherence tomography and its clinical applications. *Clin. Exp. Optom.* 102, 208-217.
- Xie H.T., Zhang Y.Y., Jiang D.L., Wu J., Wang J.S. and Zhang M.C. (2018). Amniotic membrane transplantation with topical interferon alfa-2b after excision of ocular surface squamous neoplasia. *Int. J. Ophthalmol.* 11, 160-162.

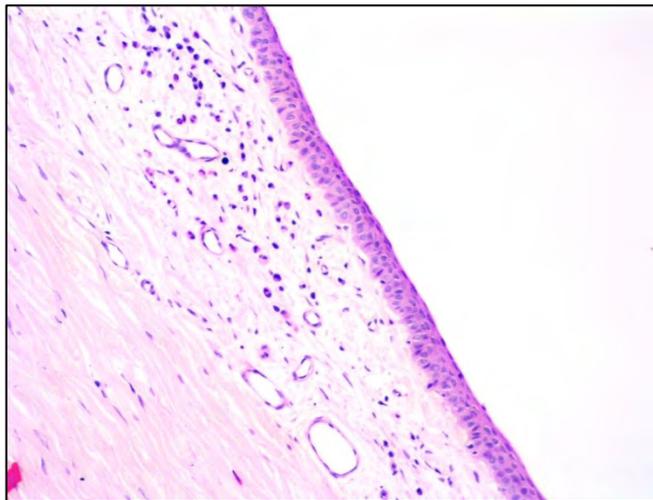
# Anexo (imágenes)



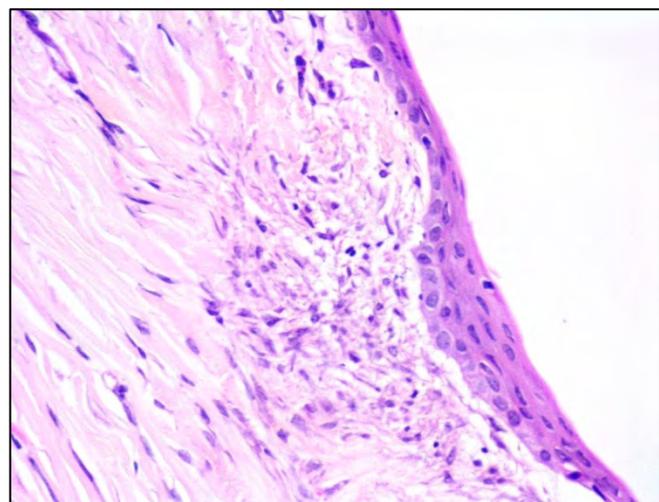




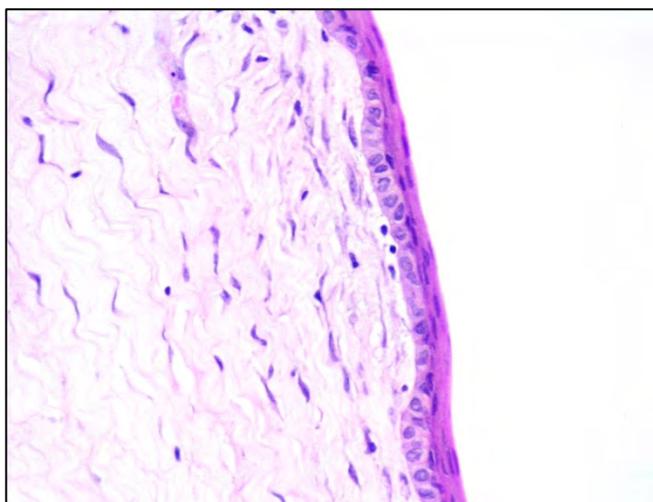
**Fig. 1.- 1OD.** Zona del borde de la herida con reepitelización importante.



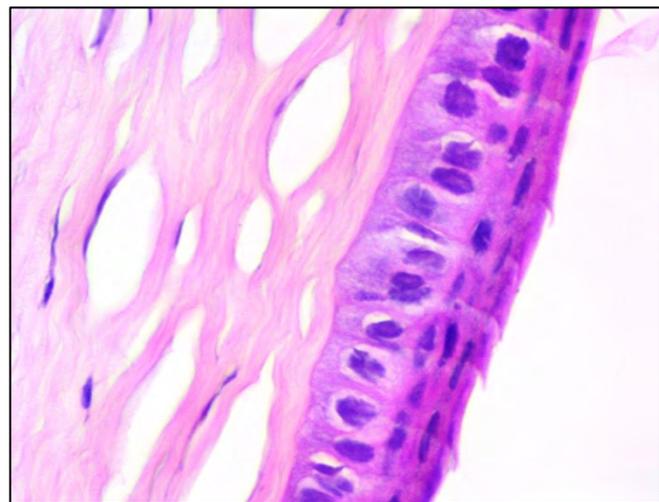
**Fig. 2.- 1OD.** Limbo, Infiltrado inflamatorio. Estroma superficial edematoso con abundantes capilares. Epitelio normal con 5 capas.



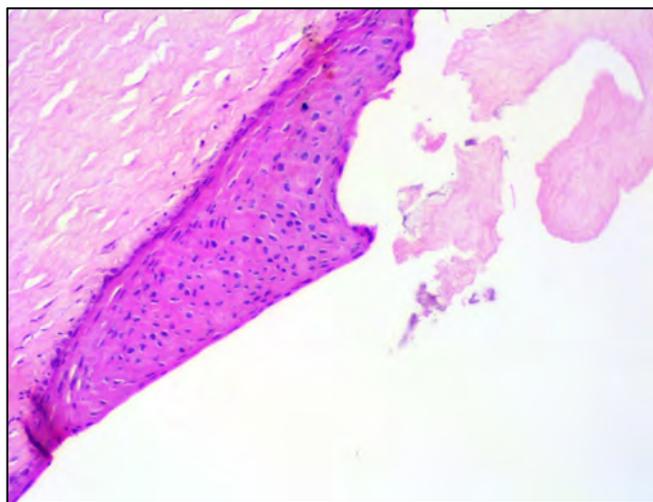
**Fig. 3.- 1OD.** Presencia de mucha actividad de queratocitos en zona proximal de la herida quirúrgica con disminución del número de capas y alteración de las células basales en algunos focos.



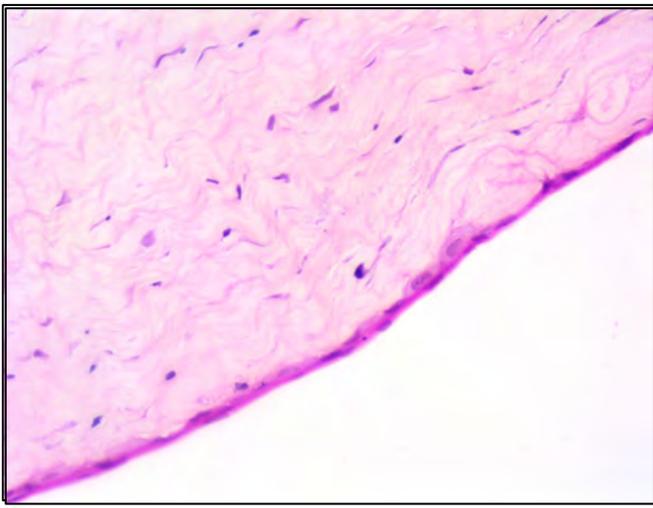
**Fig. 4.- 1OD.** Estroma laxo y algo edematoso con queratocitos activos. El epitelio muestra dos capas y capa basal con su membrana.



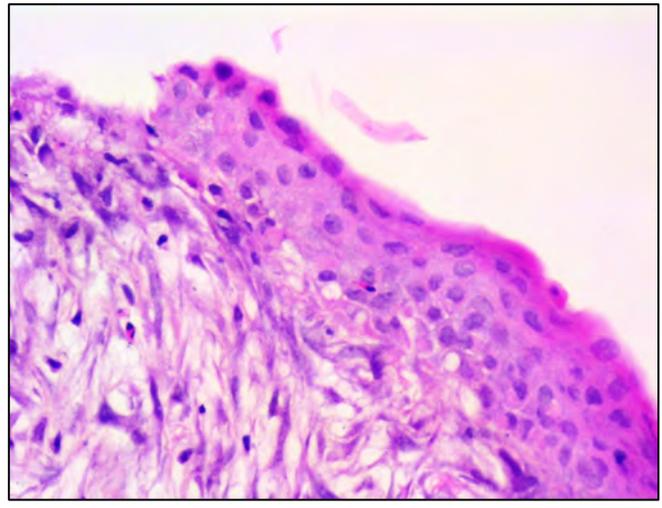
**Fig. 5.- 1OD.** Capas del epitelio corneal, incluida la membrana basal



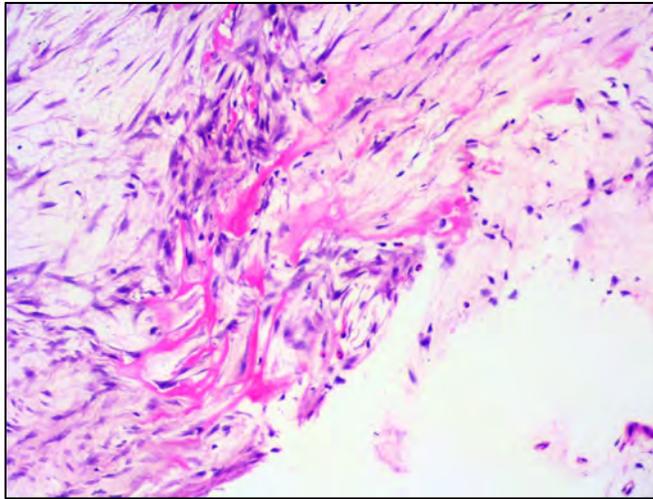
**Fig. 6.- 1OS.** Zona de la herida con marcada reepitelización y aumento de capas epiteliales. Estroma denso con escasos queratocitos.



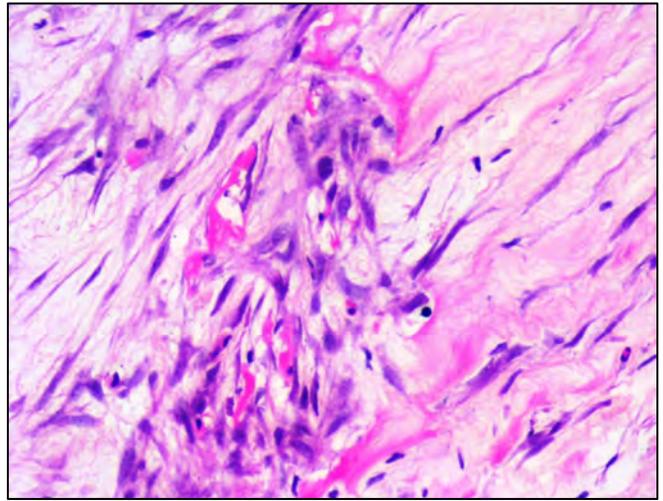
**Fig 7.- 2OS. Perforación corneal. Perdida de epitelio con estroma denso y muy reactivo. Queratocitos amplios y numerosos con un estroma edematoso.**



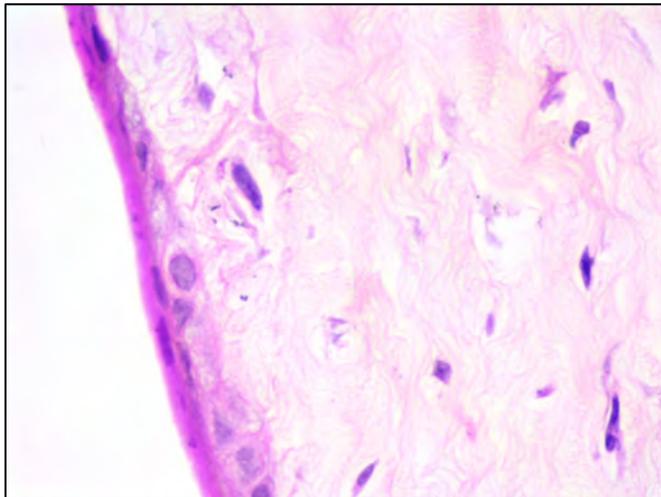
**Fig 8.- 2OS. Zona de perdida epitelial. Queratocitos muy activos y reactivos con núcleos irregulares y prolongaciones filiformes de la colágena. Capa basal epitelial alterada y amplia y desestructurada.**



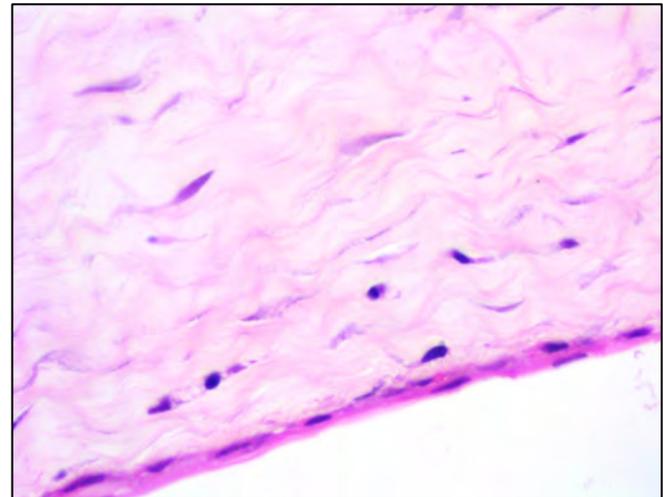
**Fig 9.- 2OS. Estroma muy reactivo de la zona perforada. Queratocitos activos con colágena remodelada entre abundante edema estromal.**



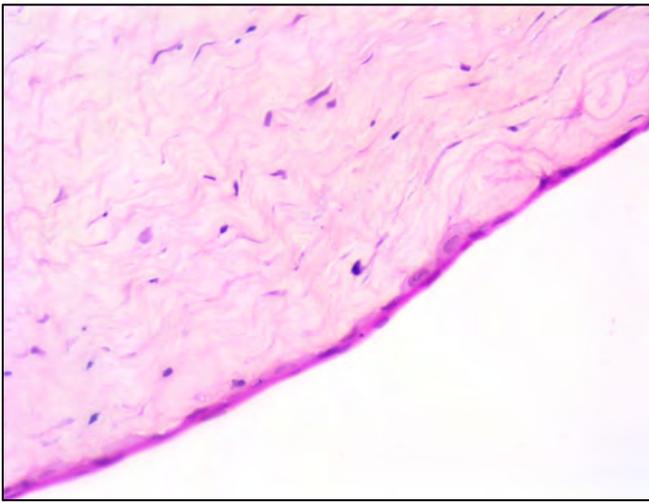
**Fig 10.- 22OS. Mayor aumento de la foto 0014. Queratocitos activos con remodelación colágena y algunos capilares. Prolongaciones citoplásmicas con colágena remodelada y eosinófila.**



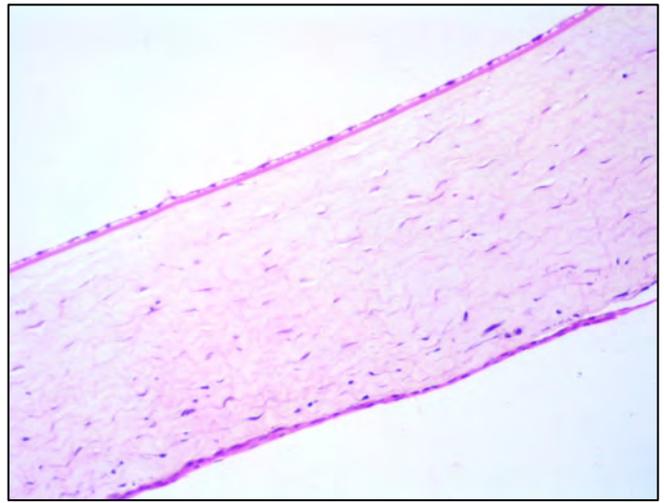
**Fig.- 11.- 3OD. Mayor aumento de la imagen anterior. Área lateral en que se aprecia epitelio escaso, con alguna célula basal con núcleo irregular, presente. Estroma denso con queratocitos maduros. No se aprecia edema intersticial.**



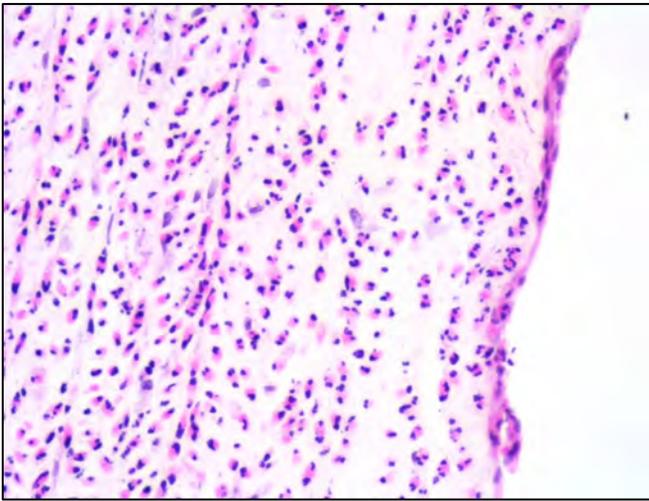
**Fig. 12.- 3OS. Epitelio no basal. Área epitelio-estromal, sin membrana basal, solo dos capas epiteliales. Estroma regular y denso con algunos queratocitos normales.**



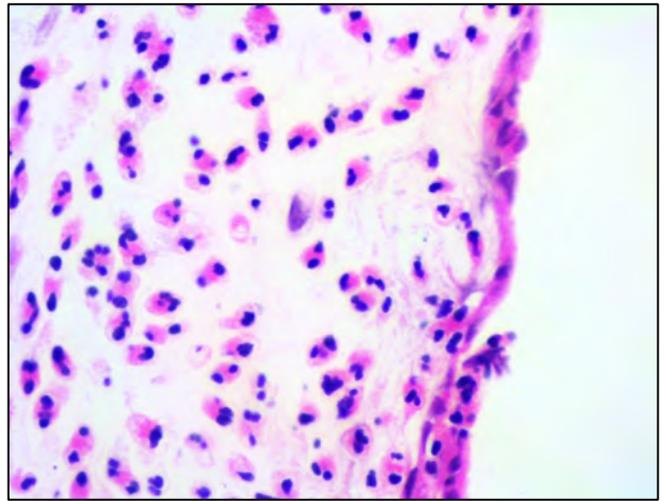
**Fig. 13.- 3OS. Vista general de la imagen anterior.**



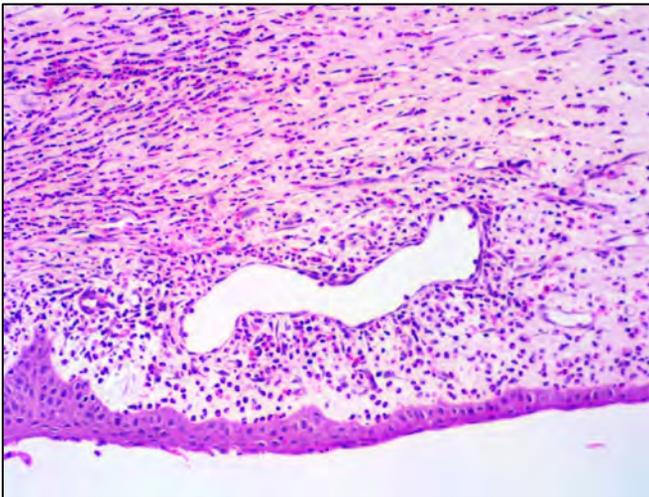
**Fig. 14.- 3OS. Imagen bajo aumento de la córnea en totalidad, desde el epitelio (abajo) hasta endotelio (arriba). Estroma denso y normal.**



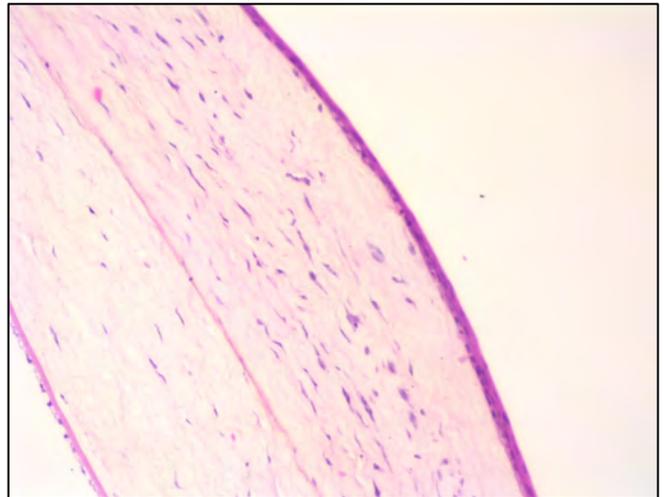
**Fig. 15.- 4OD. Corte corneal con epitelio delgado (derecha) y estroma con numerosos eosinófilos e intersticio edematoso.**



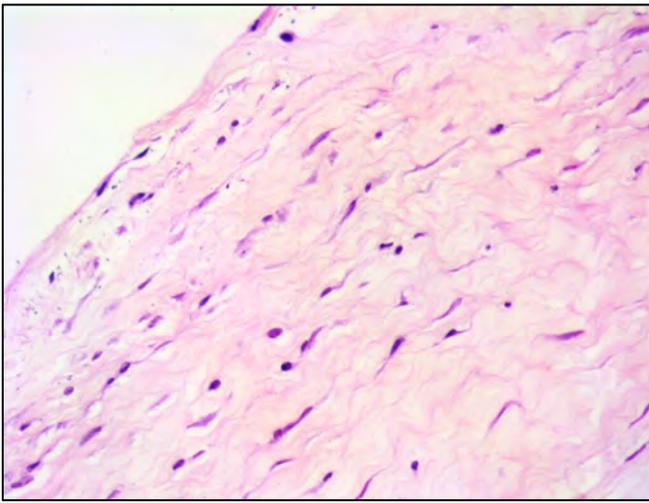
**Fig. 16.- 4OD. 16 Mayor aumento de la imagen anterior. Epitelio fino (derecha) con solo dos capas. Estroma con abundantes eosinófilos y estroma edematoso.**



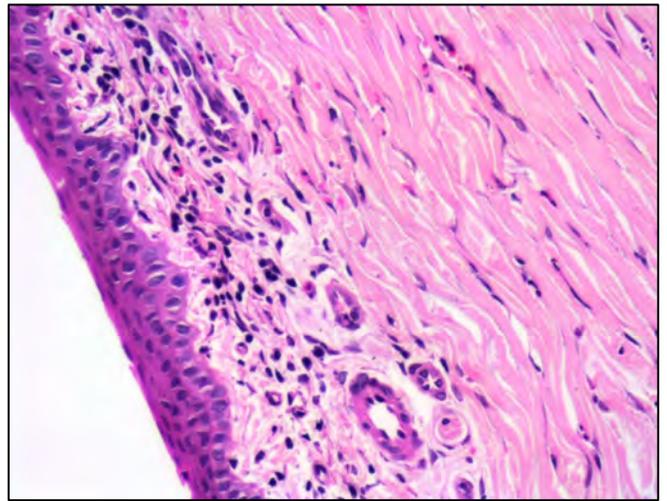
**Fig. 17.- 4OD. Bajo aumento corneal. Estroma denso y edematoso subepitelial con un gran capilar. Inflamación aguda a expensas de eosinófilos, neutrófilos y algunos linfocitos. Epitelio alto con varias capas. El estroma medio y bajo aparece menos edematoso y es muy notoria la presencia de los eosinófilos.**



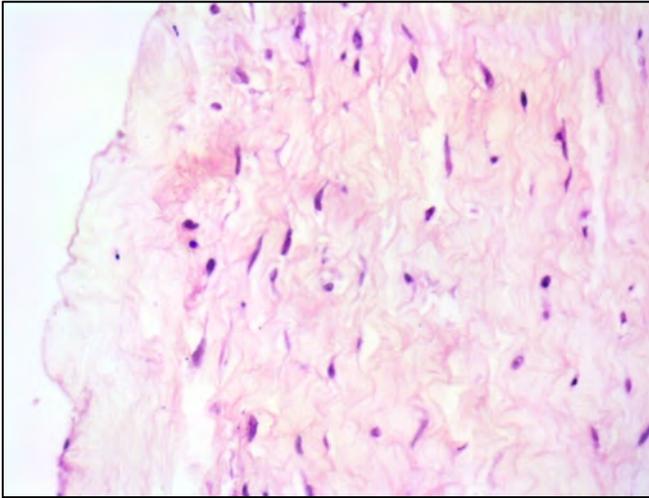
**Fig. 18.- 4OS. Bajo aumento con epitelio con epitelio normal y estroma denso en zona proximal y queratocitos inmaduros.**



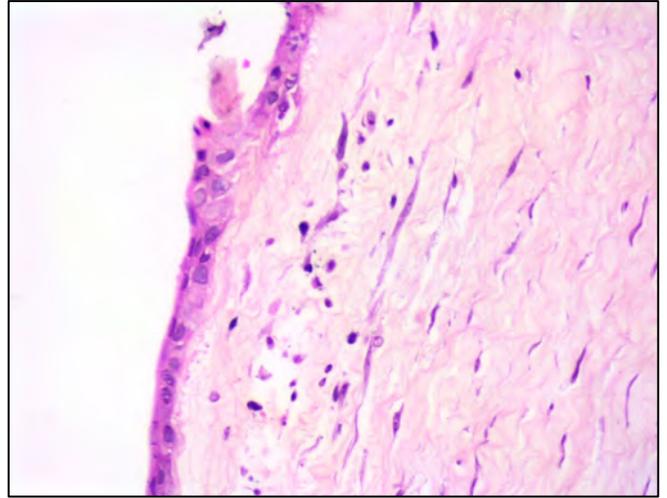
**Fig. 19.- 5OD.** Córnea con ausencia epitelial y un estroma muy laxo por edema superficial y de aspecto mixoide. Queratocitos inmaduros.



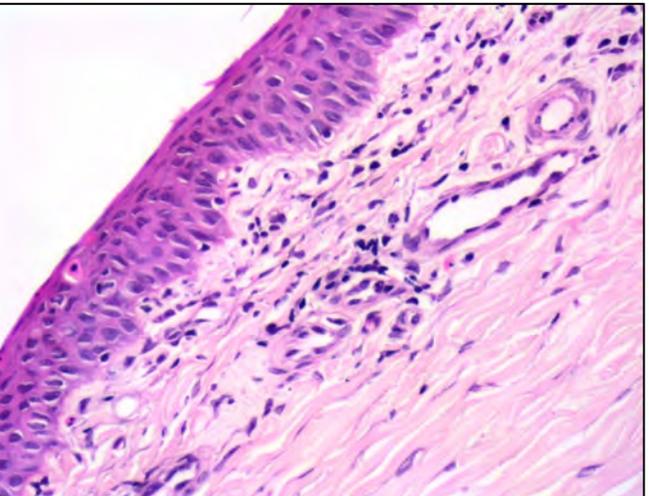
**Fig. 20.- 5OD.** Zona del limbo con infiltrado inflamatorio linfocítico crónico y edema discreto. Se observan algunos capilares arteriulares.



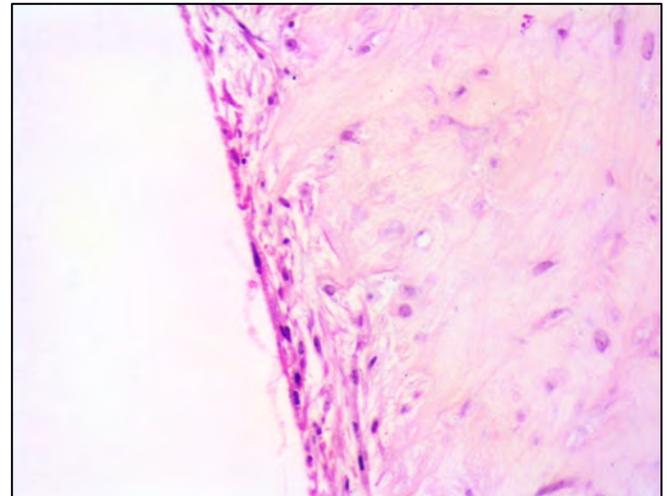
**Fig. 21.- 5OS.** Estroma corneal sin evidencia de epitelio con marcado edema mixoide y queratocitos inmaduros.



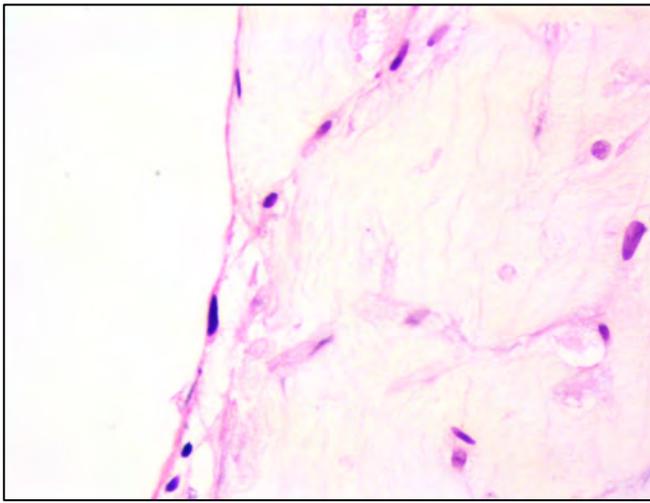
**Fig. 22.- 5OS.** Córnea con epitelio alterado, dos tres capas reactivas con células basales irregulares y membrana basal poco precisa. Estroma laxo con edema mixoide y presencia de escasas células inflamatorias y algún eosinófilo.



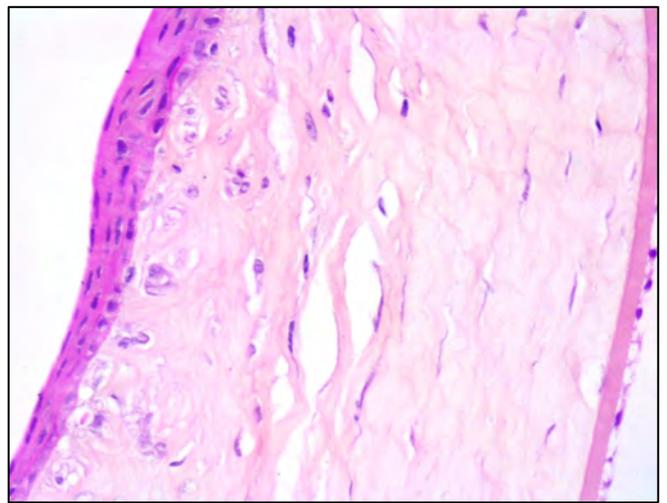
**Fig. 23 5OS.** Área del limbo con epitelio activo con muchas capas celulares y estroma denso colágeno con restos celulares inflamatorios de tipo crónico. Algunos vasos capilares se pueden



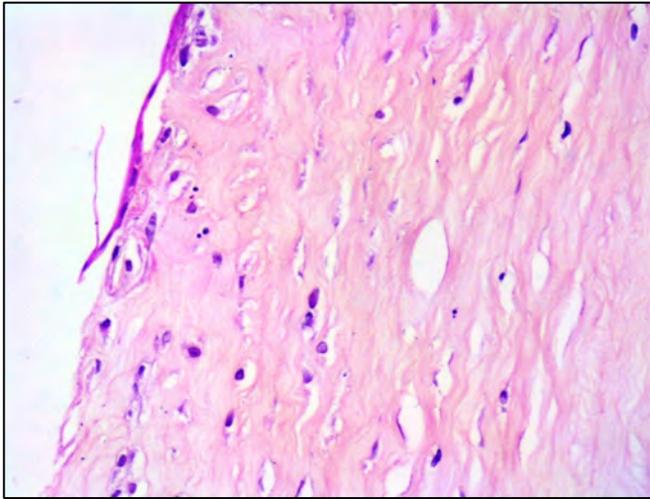
**Fig. 24.- 6OD.** Zona proximal con ausencia epitelial y cambios reactivos estromales superiores con edema estromal y queratocitos activos e inmaduros.



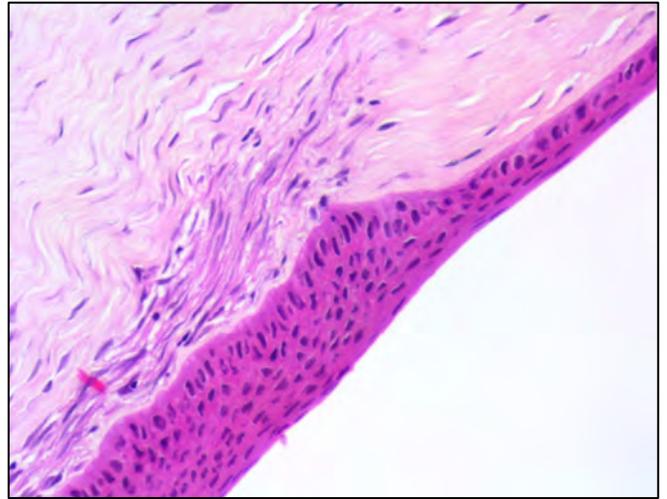
**Fig. 25.- 6OD.** Área central corneal con ausencia de epitelio, edema corneal y un capilar centro-derecha.



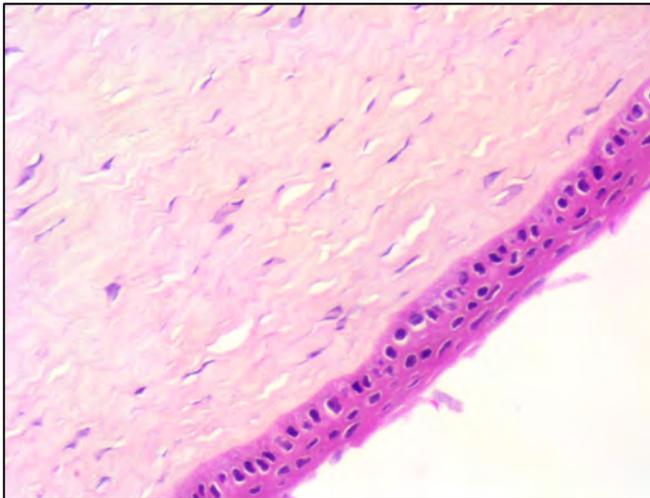
**Fig. 26.- 6OD.** Zona estromal con queratocitos activos y algunos capilares.



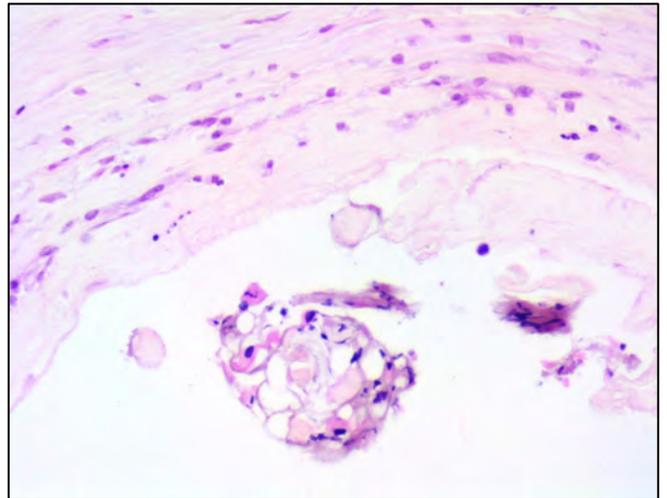
**Fig. 27.- 6OS.** Estroma con capilares y queratocitos amplios y activos



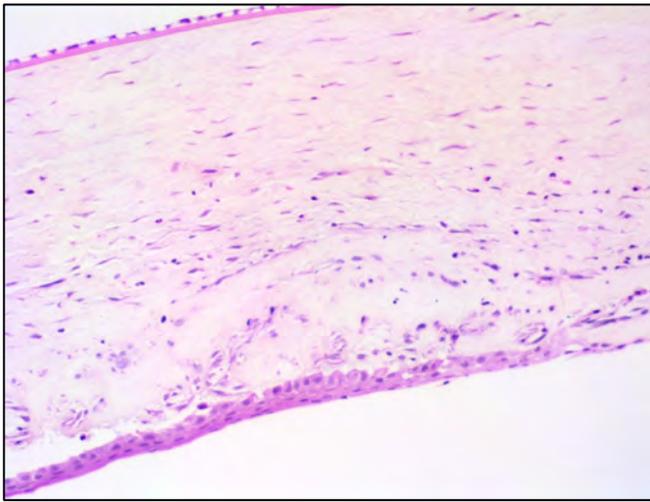
**Fig. 28.- 7OD.** Zona de la herida con epitelio alto y estroma denso con queratocitos activos. HyE. X20.



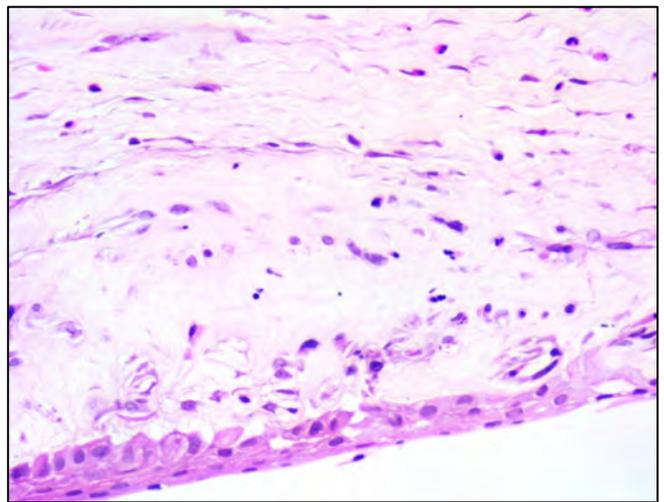
**Fig. 29.- 7OS.** Epitelio con varias capas, con células superficiales desprendidas, capa de células basales irregular y membrana basal visible. Estroma con queratocitos maduros, sin evidencia de edema mixoide ni de vasos. X20



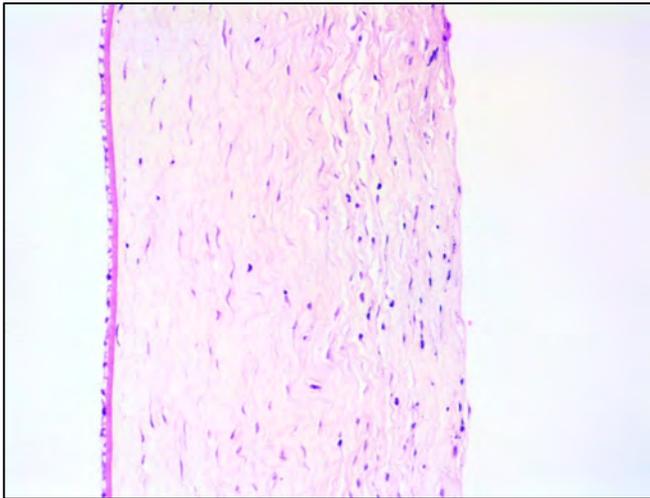
**Fig. 30.- 8OD.** Córnea con ausencia de epitelio y grupo celular epitelial desprendido, en el centro. Estroma denso con queratocitos muy activos. Epitelio sin membrana ni células basales x10



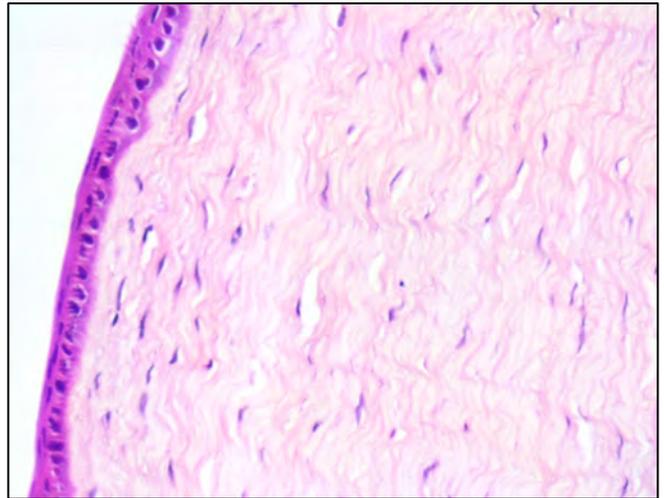
**Fig. 31.- 8OD.** Área distal corneal con epitelio en proceso de desprenderse, membrana basal alterada con celularidad irregular. El estroma presenta acusados signos reparativos, queratocitos muy activos, edema de fondo y algunos capilares. X10.



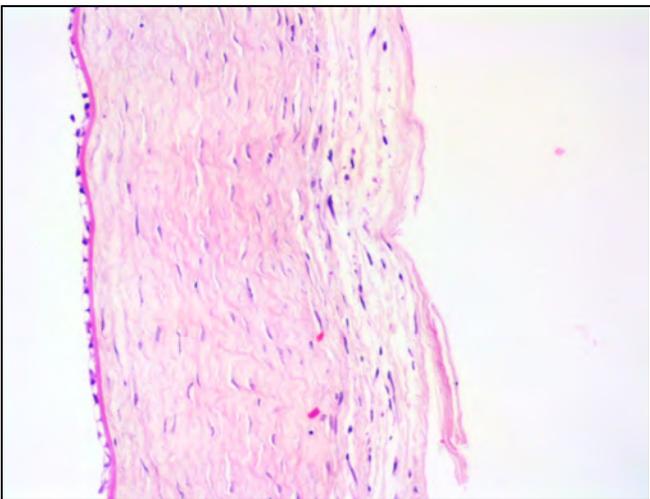
**Fig. 32.- 8OD.** Detalle de la foto anterior a mayor aumento. Se aprecia epitelio alterado, membrana basal rota y un estroma reparativo con queratocitos activos, capilares y edema. X20



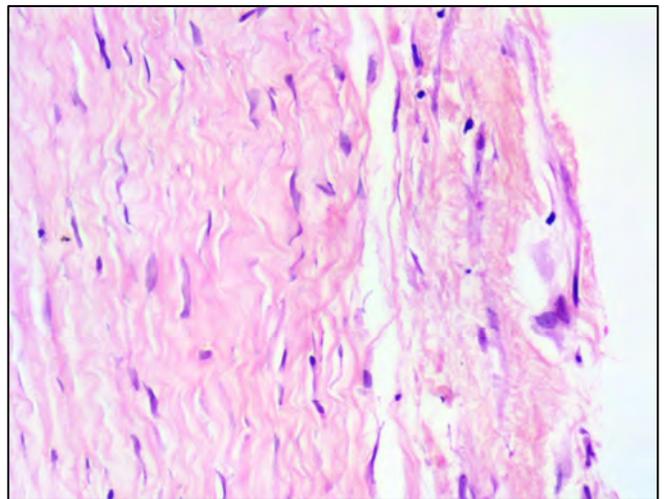
**Fig. 33.- 8OS.** Córnea con epitelio ausente y estroma con queratocitos inmaduros. X10



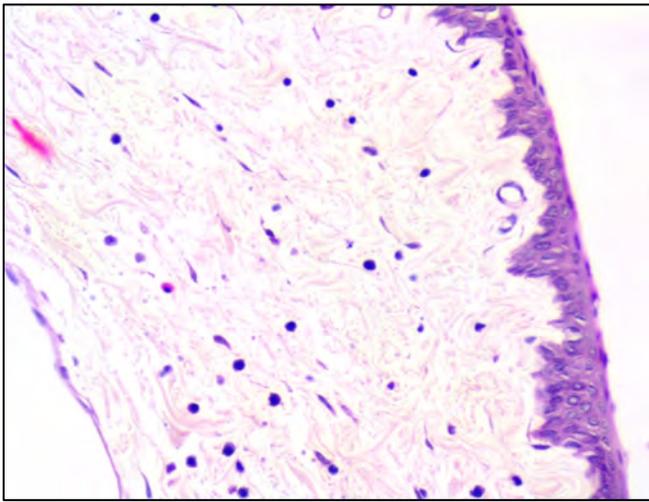
**Fig. 34.- 9OD.** Epitelio corneal con varias capas normales y estroma con queratocitos maduros. Ondulado colágeno maduro y sin evidencia de edema. X20



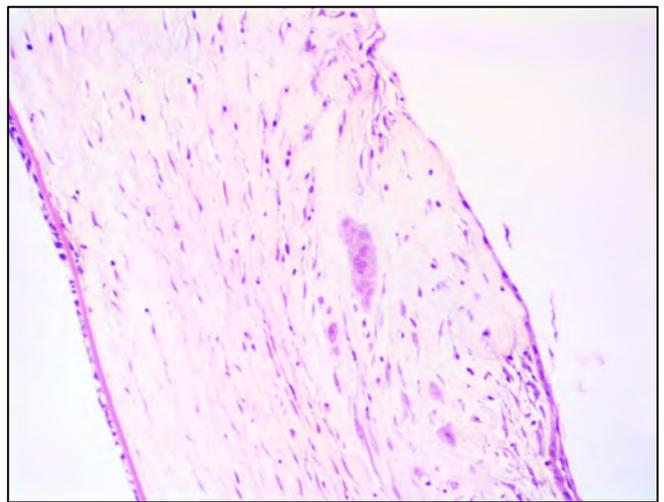
**Fig. 35.- 9OS.** Córnea con estroma denso y queratocitos normales. Se detecta falta de epitelio y de membrana basal, estando el estroma subyacente dislacerado y edematoso. X10



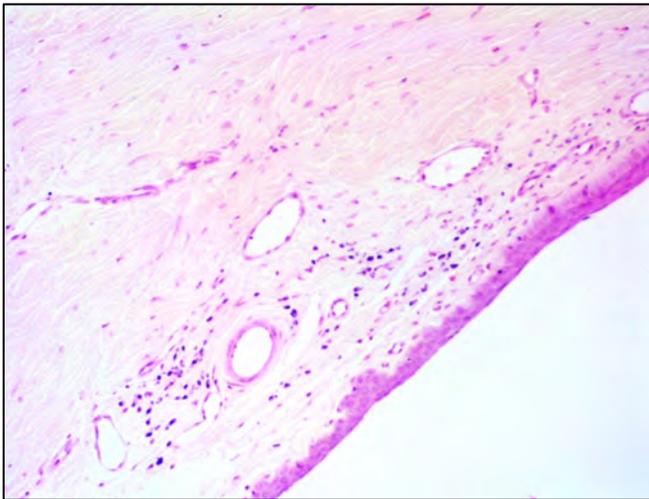
**Fig. 36.- 9OS.** Mayor aumento de la imagen anterior. Obsérvese la carencia epitelial, solo se aprecia en su lugar algún resto celular basal, estando ausente la membrana basal., mientras la zona está edematosa. X20



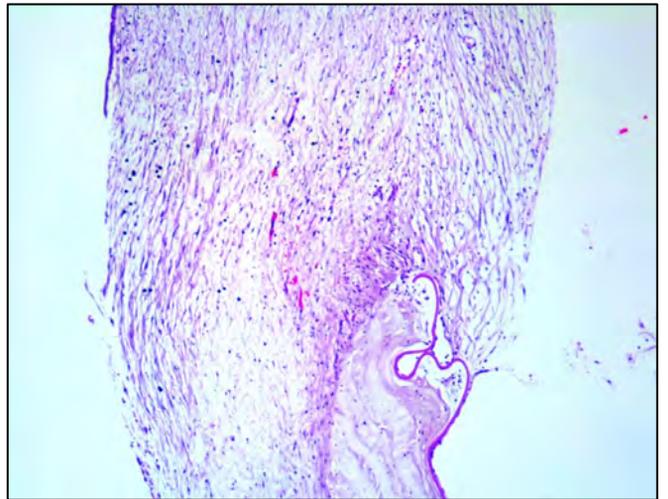
**Fig.- 37.- 10OD. Zona del limbo con leve infiltración por linfocitos y edema intersticial moderado. X10**



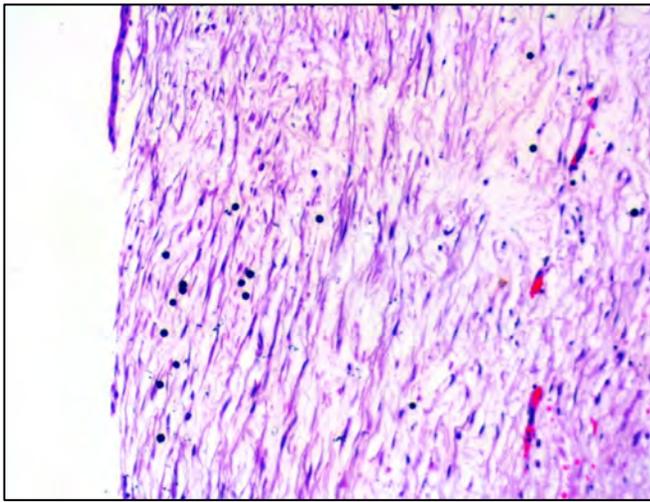
**Fig.- 38.- 10OS. Estroma denso con marcado edema en el tercio superior de aspecto mixoide. No se aprecia epitelio, solo un resto en el margen inferior. En el centro de la imagen algunas células gigantes de probable origen queratocítico activo, relacionadas con el proceso de cicatrización. En los márgenes superior e inferior se aprecian algunos capilares neoformados. X10**



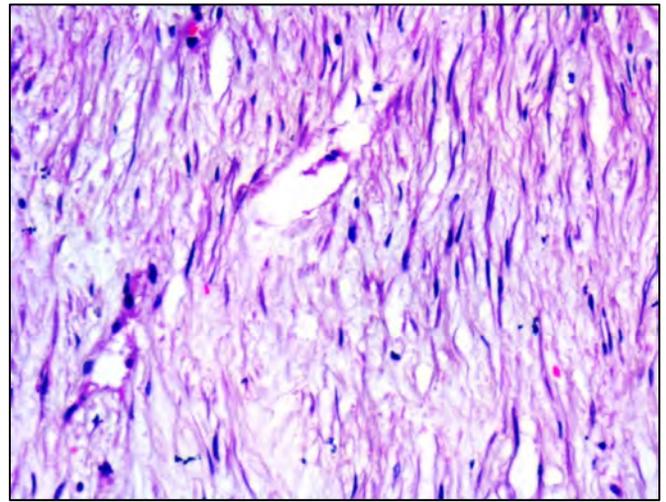
**Fig.- 39.- 10OS. Vista amplia de la zona del Limbo, con capilares dilatados, moderado edema y algunos linfocitos infiltrando. X4.**



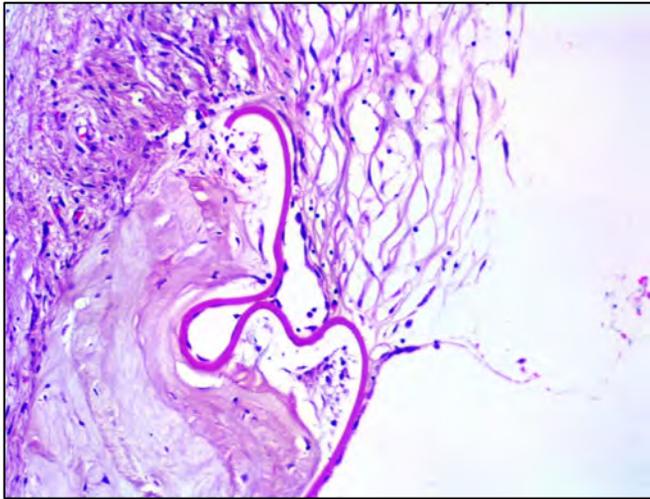
**Fig. 40.- 11OD. Vista corneal zona perforación desde margen izquierdo zona epitelio que solo queda una tira superior, estroma edematoso, hasta margen derecho con resto endotelial que aparece roto y enrollado sobre sí mismo. X4**



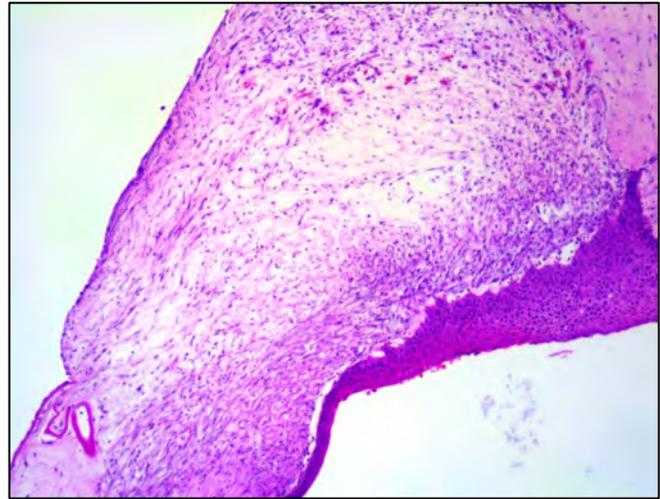
**Fig. 41.- 11OD.** Mayor aumento de la imagen anterior correspondiente al margen izquierdo con tira residual epitelial, (arriba). Estroma laxo y edematoso con queratocitos “fibroblásticos” muy reactivos con núcleos alargados seguidos de amplios penachos o prolongaciones citoplásmicas bilaterales. Marcado edema en todo su espesor. X10



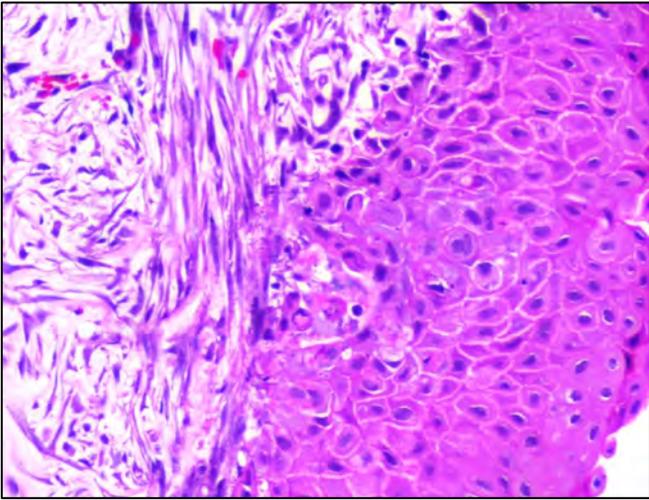
**Fig. 42.- 11OD.** Zona central del estroma con queratocitos activos, edema intersticial y un capilar (abajo izquierda) con luz cubiera por células endoteliales. X20



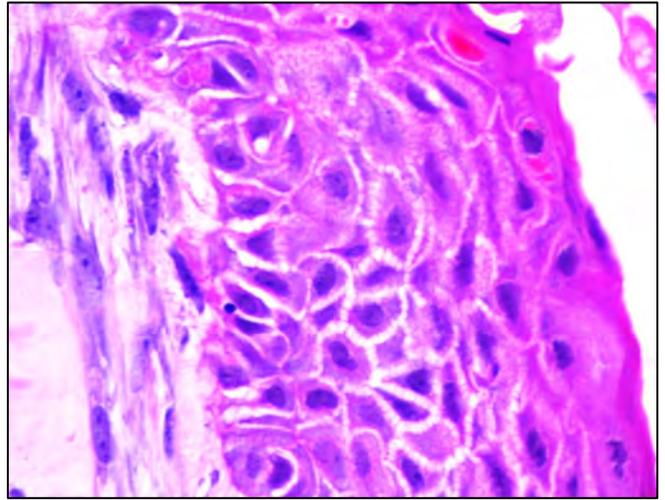
**Fig. 43.- 11OD.** Mayor aumento de la imagen 33, zona derecha, área endotelial enrollada con su membrana de Descemet bien visible. Se ven queratocitos muy activos y debajo del complejo endotelial se aprecia amplia zona de depósito edematoso rosáceo por imbibición. X20



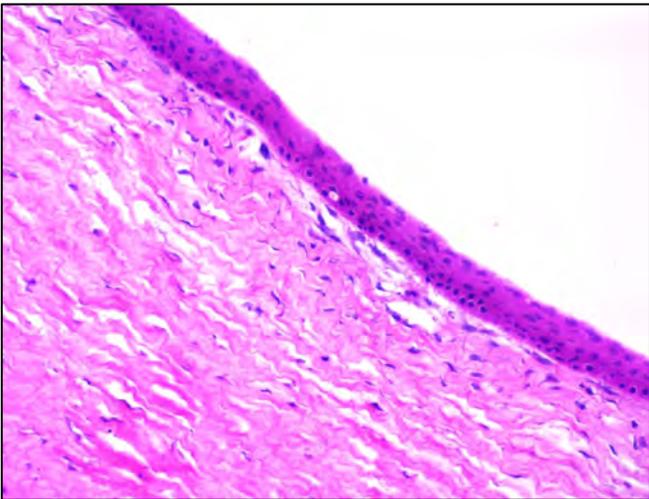
**Fig. 44.- 11OS.** Área proximal de la perforación corneal en la que se aprecia epitelio amplio e hipertrófico por intento reparativo (abajo centro-derecha), estroma denso y edematoso en la zona central y un area endotelial también reactiva con dos restos enrollados de Descemet (abajo izquierda) x10



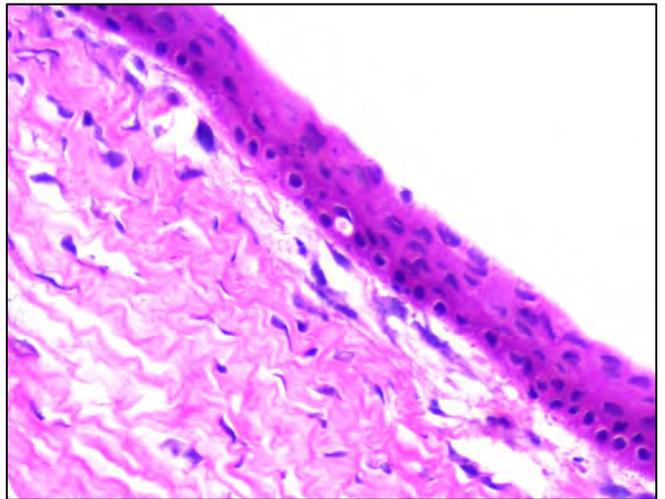
**Fig. 45.- 11OS.** Detalle del área epitelial hipertrófica constituida por un epitelio amplio con más de 10 capas y de tipo escamoso en el que se puede ver los espacios claros intercelulares de separación. La capa de células basales no es prominente y la membrana de basal o de Bowman apenas se percibe. Se ve estroma denso con queratocitos entrecruzados y un estroma intersticial laxo y algo edematoso x20



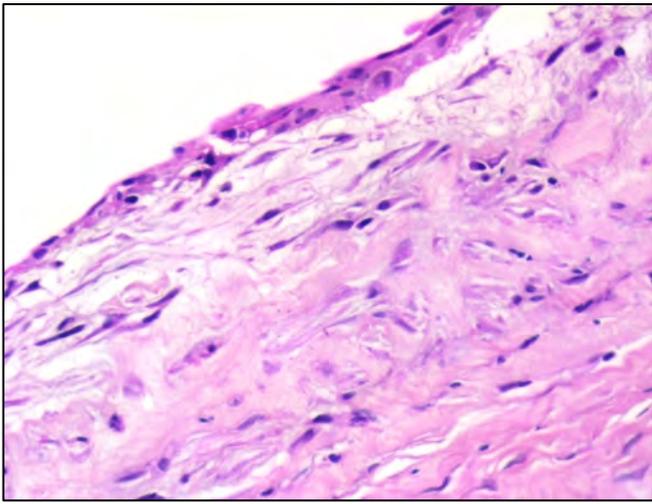
**Fig. 46.- 11OS.** Foco de epitelio a mayor aumento con sus células escamosas bien enmarcadas por las espículas desmosómicas espinosas. Mmembrana basal rota y debajo se insinúan los queratocitos activos con su edema x40



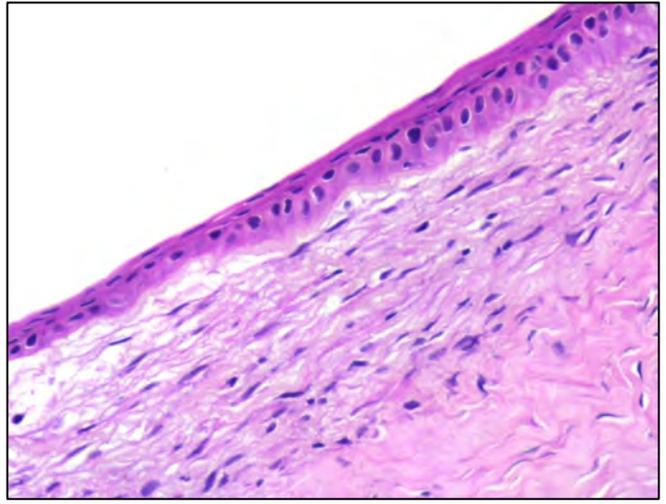
**Fig. 47.- 12OD.** Estroma denso y muy colagenizado con ondulaciones de sus badas, escasos queratocitos en zona central, mientras que en el área subepitelial éstos se ven grandes e inmaduros rodeados de discreto edema intersticial x10.



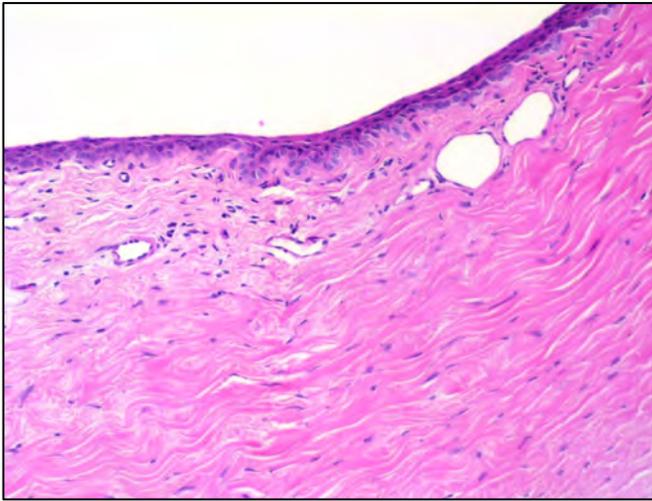
**Fig. 48.- 12OD.** Mayor aumento imagen anterior con epitelio habitual de 5 capas con basal moderadamente conservada. Debajo del epitelio dental de los queratocitos inmaduros y activos rodeados del citado edema intersticial acuoso. En el resto de la imagen se puede ver la colágena estromal con sus típicas ondulaciones que indican madurez estructural. X 20.



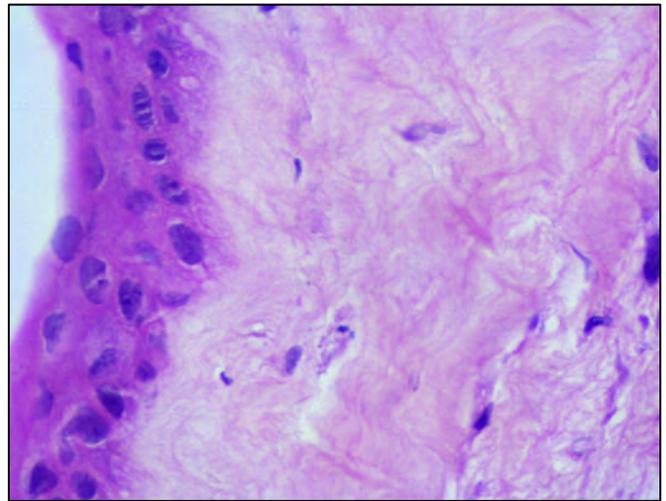
**Fig. 49.- 13OD.** Epitelio escaso y alterado, una sola capa epitelial alterada con edema subepitelial, queratocitos activos y cambios estromales consistentes en colágena densa e inmadura. X20



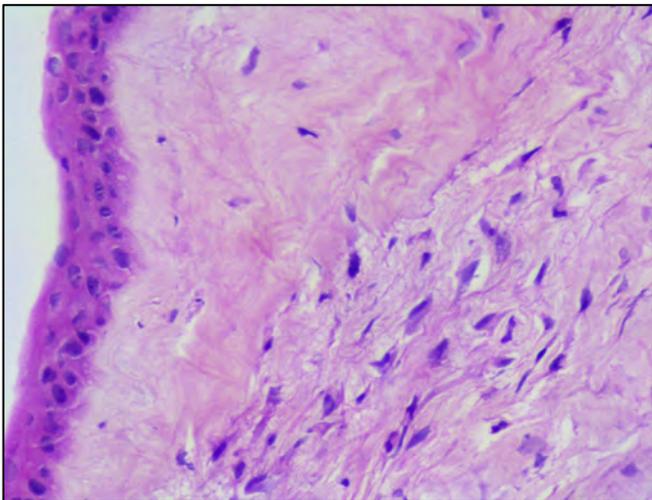
**Fig. 50.- 13OD.** Zona subepitelial con edema intersticial y queratocitos activos. Estroma subyacente, (margen inferior derecha) denso y maduro. X20.



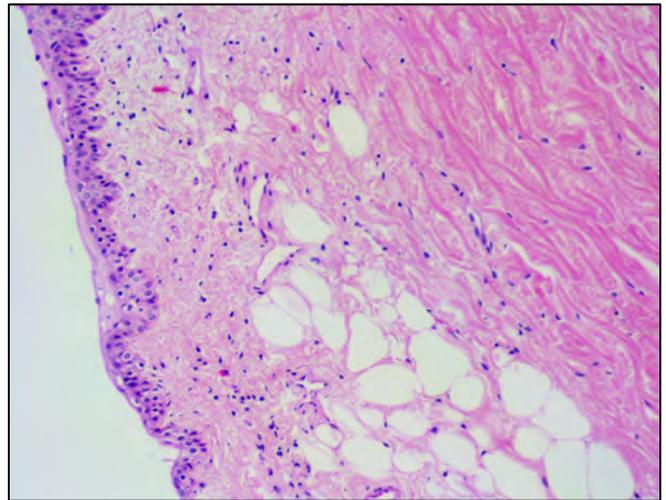
**Fig. 51.- 13OD.** Campo a bajo aumento de la zona limbal. Estroma denso con fibroblastos maduros y algunos capilares venulo-arteriolas normales. X10



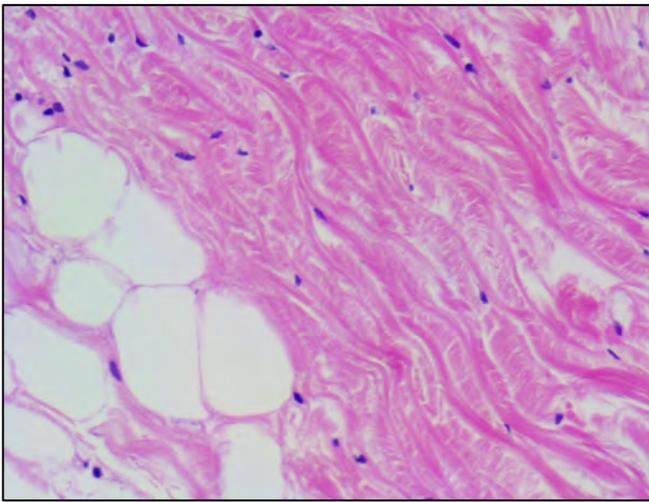
**Fig. 52.- 13OS.** Imagen a mayor aumento con epitelio de 2 capas, células basales y membrana basal irregular y festoneada. Área subepitelial con edema mixoide. X40



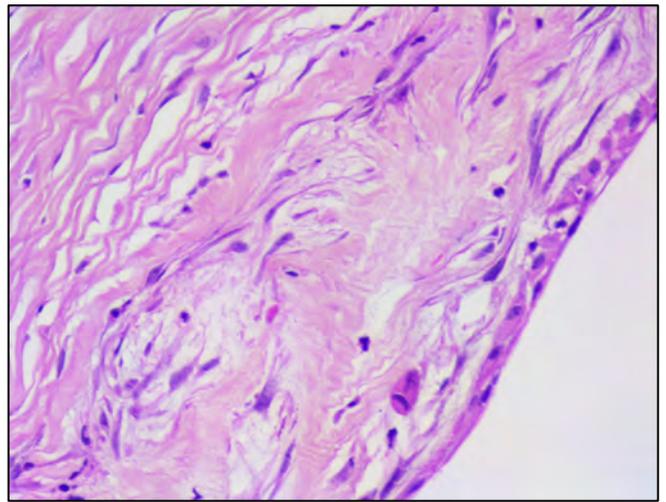
**Fig. 53.- 13OS.** Abajo derecha, se aprecia estroma edematoso y mixoide con queratocitos activos y tendencia a formas capilares. X20



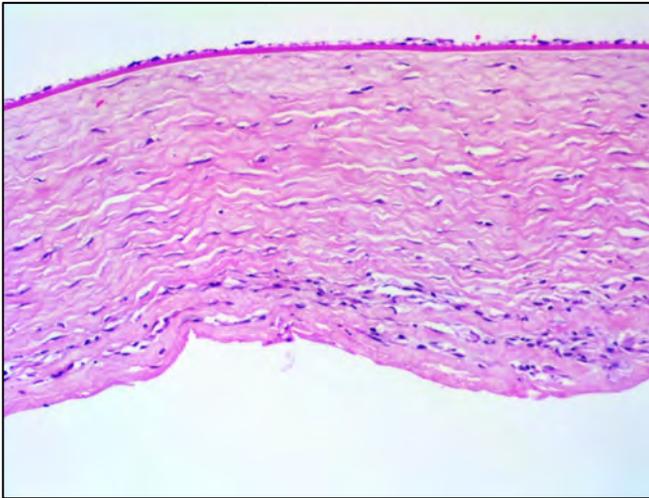
**Fig. 54.- 13OS.** Aspecto general del Limbo. Epitelio con 2-3 capas, infiltrado inflamatorio linfocitario leve y disperso con algún eosinófilo en el estroma con edema. Se aprecia infiltración grasa intersticial con grandes vacuolas. Arriba a la derecha, se observa tejido colágeno denso del Limbo. X4



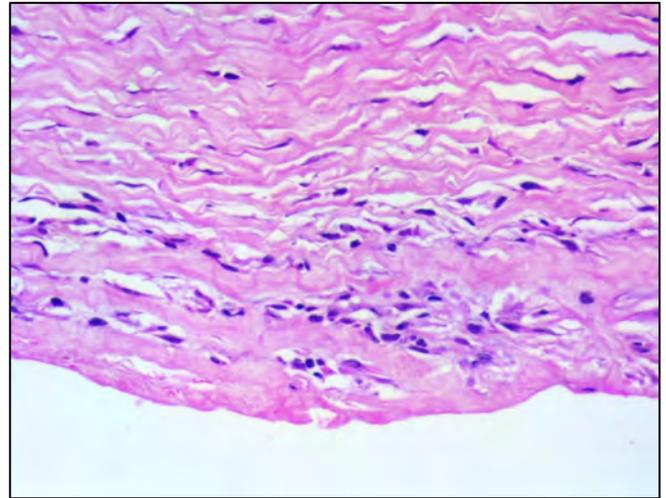
**Fig. 55.- 13OS. A mayor aumento. Tejido colágeno denso con sus bandas características onduladas. Izquierda, tejido con infiltración grasa. X20**



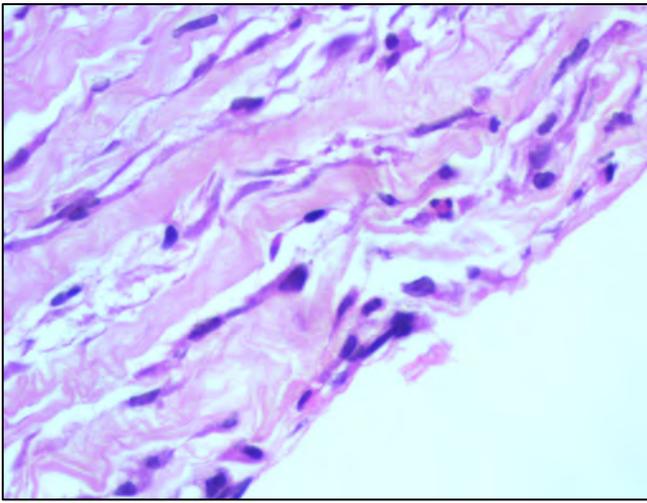
**Fig. 56.- 14OD. A mayor aumento y en zona subepitelial, se aprecia edema mixoide con queratocitos activos con tendencia a formar vasos. X20**



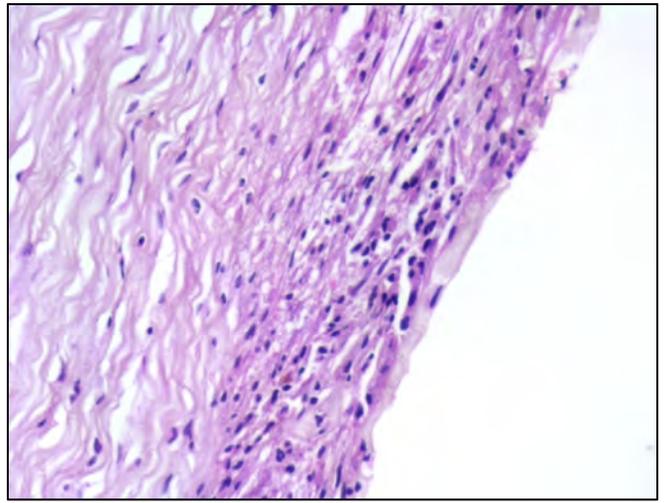
**Fig. 57.- 14OS. Estructura corneal con epitelio ausente y cambios reactivos en el estroma subepitelial con queratocitos activos e irregulares. Arriba el endotelio aparece dentro de los límites histológicos de la normalidad. X4**



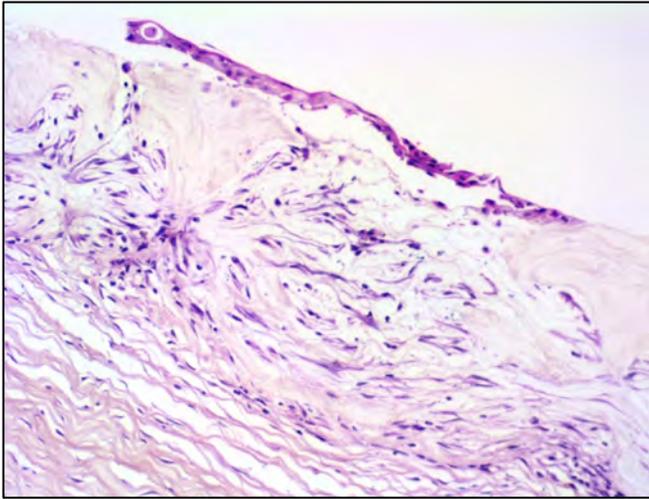
**Fig. 58.- 14OS. Mayor aumento de la foto 54. Estroma colagenizado, algo edematoso y mixoide. X20**



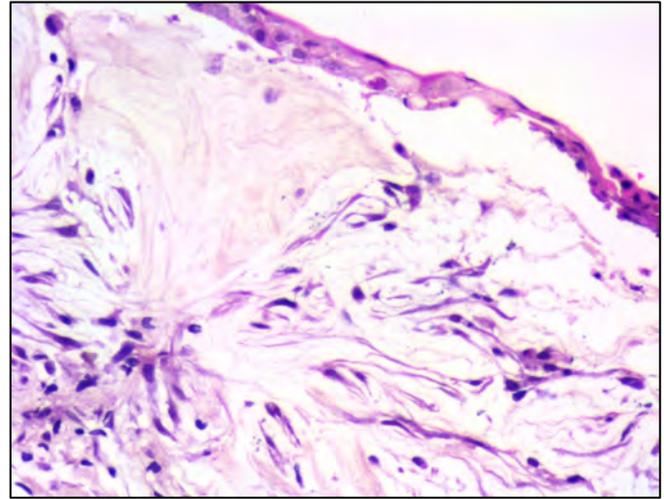
**Fig. 59.- 14OS.** Mayor resolución de la foto 55. Epitelio ausente, así como sin vestigios tampoco de la membrana basal. Colágeno subyacente estromal con signos laxos edematosos y queratocitos activos de apariencia “fibroblástica” con núcleos alargados. X40



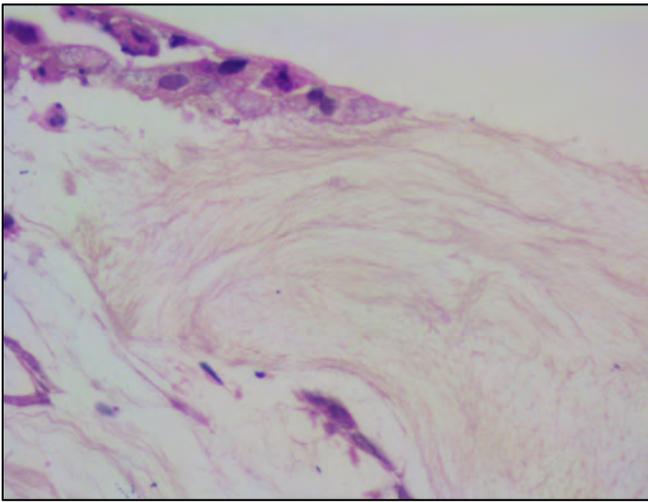
**Fig. 60.- 15OD.** Córnea con epitelio ausente, solo alguna célula basal residual. La membrana basal está ausente también, solo se observa alguna condensación proteica eosinófila en su lugar. Zona superficial estromal con células inflamatorias crónicas inespecíficas, linfocitos y monocitos. No hay evidencia de cambios mixoides. X10



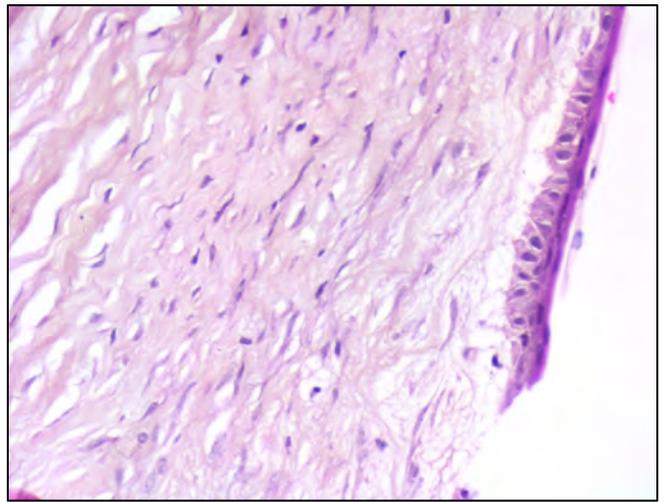
**Fig. 61.- 16OS.** Cornea con epitelio denudado, roto o ausente. Llama la atención el estroma laxo y mixoide en la casi totalidad del área superior estromal. Entre amplias zonas edematosas los queratocitos se disponen a modo de haces y remolinos. X20



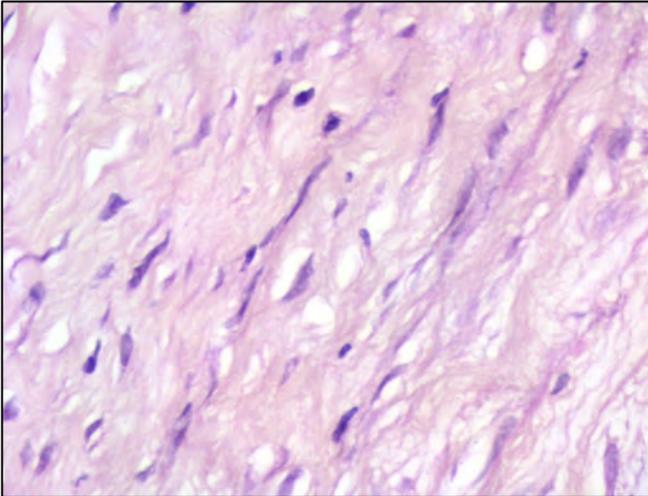
**Fig. 62.- 17OD.** Epitelio atrófico con solo dos capas, roto y con desprendimiento del mismo. Estroma laxo, edematoso y mixoide. X40



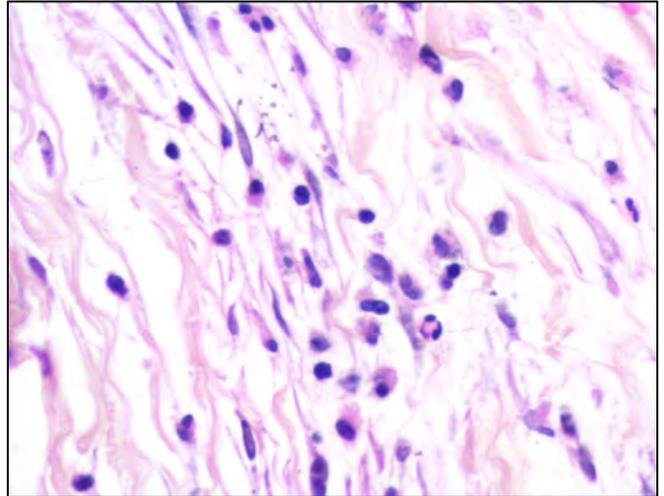
**Fig. 63.- 16OD. Detalle del campo anterior a x40. Obsérvese el epitelio en parte ausente con células con citoplasma edematoso y vesicular, así como, un estroma laxo, edematoso, mixoide y prácticamente acelular. X40**



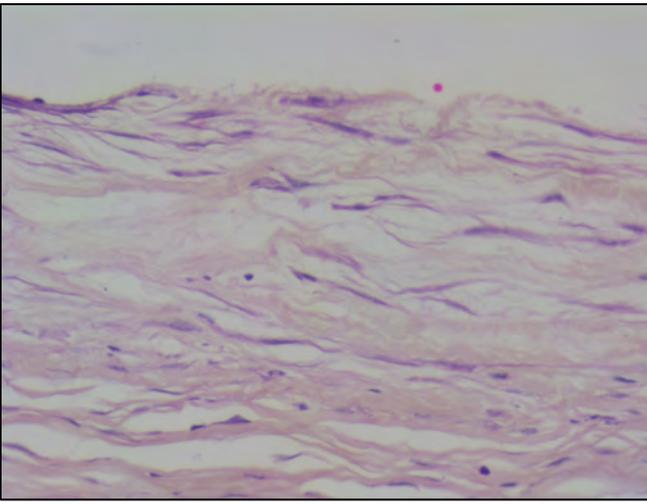
**64.- 17OD. Estroma corneal en area intermedia con edema intersticial subepitelial y queratocitos activos e inmaduros y estroma colagenotico denso. X20**



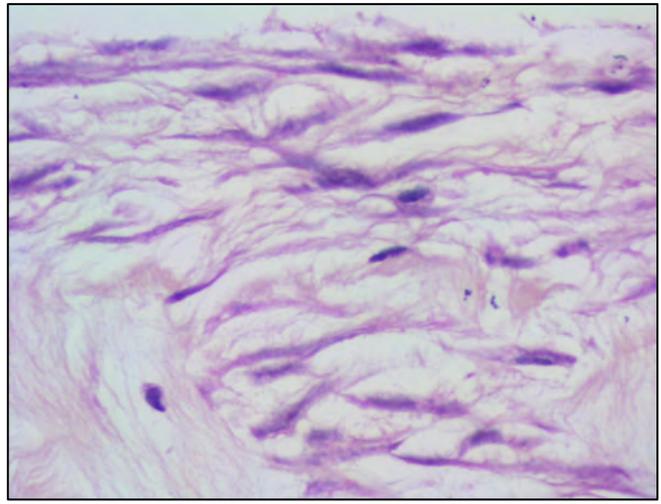
**Fig. 65.- 17OD. Detalle a mayor aumento de la imagen anterior del estroma con restos edematosos (margen inferior derecha) y estroma denso con queratocitos activos e inmaduros, con núcleos grandes, irregulares y alargados. X40**



**Fig. 66.- 18OD. Detalle a mayor aumento del área anterior. Obsérvese los queratocitos activos e inmaduros en un estroma edematoso y con algunas células inflamatorias acompañantes y eosinófilos. X40**



**Fig. 67.- 18OS. Estroma edematoso con queratocitos alargados y activos sin evidencia de capilares. X20**



**Fig. 68.- 18OS. Estroma a mayor aumento, queratocitos muy activos, edema intersticial con patrón mixoideo, sin evidencia de capilares detectables. Zona superior de la imagen sin epitelio. X40**

