

Trasplante de limbo corneal

Amparo Toro Fernández., Carlos Ruiz Lapuente, Luis Castellón Torres.
Servicio de Oftalmología. HH. UU. Virgen del Rocío. Sevilla.

Introducción

Una función esencial del epitelio corneal es actuar como barrera entre el medio externo e interno, de ahí la importancia de conservar su capacidad regenerativa. Aunque las células de la capa basal contribuyen al recambio fisiológico del epitelio corneal, no son la fuente primaria del mismo, ya que no se mantienen en ausencia de un limbo corneal funcionando. Se acepta que en el limbo están las células primordiales que mantienen la masa de células epiteliales con fenotipo corneal.

El limbo corneal está formado por un epitelio, diferente del conjuntival (sin células caliciformes) y del corneal. Son 12 capas de células epiteliales entre las que se encuentran células de Langerhans y melanocitos. Bajo las células epiteliales existen vasos sanguíneos y tejido conectivo similar al de la conjuntiva. El epitelio del limbo contiene las células madre (stem cells) del epitelio corneal. Son una pequeña subpoblación de todo el tejido epitelial corneal. Se trata de células indiferenciadas capaces de proliferar, automantenerse, producir un gran número de células diferenciadas, regenerar tejidos después de lesiones o traumas, y poseer flexibilidad en el uso de estas opciones.

Por mitosis de las células primordiales indiferenciadas se formarían células amplificadoras transitorias (CAT), con mayor capacidad de mitosis, y que migrarían hacia la córnea, dando lugar a las células basales bien diferenciadas. La proliferación y migración celular a nivel del limbo estaría regulada por factores vasculares presentes en la circulación limbar, mientras que la actividad de las CAT situadas sobre el estroma corneal avascular estaría modulada por factores de crecimiento locales procedentes del estroma subyacente y factores neurales.

Insuficiencia limbar. Causas. Clasificación

Si una cantidad suficiente de epitelio limbar es destruido, se origina un estado de déficit de células madre limbares o insuficiencia limbar. Éste se caracteriza por la pérdida de la capacidad regenerativa del epitelio corneal, favoreciendo el avance de un epitelio con fenotipo conjuntival sobre la córnea. El epitelio conjuntival es menos transparente que el corneal y menos adherente al estroma subyacente. Los defectos epiteliales persistentes resultantes se asocian a inflamación crónica, neovascularización superficial, cicatrización con aparición de leucomas, ulceración y queratolisis (melting). Aunque la causa más frecuente de insuficiencia limbar es la causticación; existe gran número causas que se engloban en dos categorías (Tabla 1):

- *Categoría I: Aplasia. Es la pérdida total de las células madre limbares debida a una destrucción primaria. Existe una causa patogénica clara, traumática o inflamatoria, de la destrucción. La destrucción traumática ocurre en quemaduras químicas y térmicas, múltiples cirugías sobre el área limbar, epitelio patía crónica asociada a lentes de contacto, y uso crónico de ciertas medicaciones (como 5-fluoruracilo). La destrucción inflamatoria acontece en el síndrome de Stevens-Johnson y la queratitis microbiana severa.*

- *Categoría II: Hipoplasia. La segunda categoría es la pérdida de las células stem debido a insuficiente soporte estromal. No tienen historia previa relevante, pero presentan una pérdida gradual de las células madre limbares. Esta situación se ve en la aniridia y en la queratitis asociada a neoplasia endocrina múltiple. El pterigium representa probablemente áreas localizadas de destrucción limbar debido a lesión ultravioleta. Estas enfermedades hacen pensar que la función de las células madre, que se va degradando gradualmente, está modulada por factores diversos, como los implicados en el desarrollo, factores hormonales, neuronales, vasculares e inflamatorios. Su alteración hace que el microambiente del estroma limbar sea insuficiente para mantener la función de las células madre, conduciendo a un déficit limbar.*

CAUSAS DE INSUFICIENCIA LIMBAR

- **Categoría I: Aplasia**
 - Pérdida total de células stem por destrucción primaria
 - Existe una causa patogénica clara que ha destruido las células madre limbares
 - Ocurre en:
 - Lesiones térmicas o químicas
 - Sd Stevens Johnson
 - Cirugías o crioterapias en región limbar
 - Toxicidad por antimetabolitos (5-FU)
 - Queratopatía por lentes de contacto
 - Queratitis microbiana grave

Clínica

Todas las enfermedades con déficit limbar se caracterizan por los siguientes signos y síntomas.

Signos:

1. *Invasión corneal por el epitelio conjuntival (conjuntivalización). Al ser más permeable el epitelio conjuntival, las superficies conjuntivalizadas tiñen anormalmente con fluoresceína.*
2. *Desaparición de la arquitectura limbar normal en empalizadas de Vogt.*
3. *Vascularización corneal superficial.*
4. *Inflamación e hiperemia crónicas.*
5. *Pérdida de la integridad epitelial corneal provocando irregularidad en la superficie, erosiones recurrentes, úlceras persistentes y destrucción de la membrana basal con fibrosis y cicatrización (leucomas). Si el proceso evolutivo continúa desemboca en la aparición de queratolisis o ablandamiento corneal (melting), seguido de perforación.*

Síntomas:

1. *Disminución de visión.*
2. *Fotofobia.*
3. *Lagrimeo.*
4. *Blefarospasmo.*
5. *Episodios recurrentes de dolor.*
6. *Hiperemia.*

Diagnóstico

El diagnóstico de la insuficiencia limbar es importante, porque los pacientes con estas anomalías son malos candidatos para trasplante corneal. En la córnea donante sólo van células amplificadoras de vida corta que proporcionan un reemplazamiento temporal del epitelio, pero en ningún caso reponen la función limbar, y además, debido a la vascularización previa

que existe en estos casos, se incrementa el riesgo de rechazo.

El diagnóstico se hace por la clínica, la exploración biomicroscópica incluida la tinción con fluoresceína, y la citología de impresión (Tabla 2). Ésta última confirma el diagnóstico, aunque no es práctico ni necesario realizarla en cada paciente con posible déficit limbar, siempre que exista una causa conocida y el paciente muestre los signos clínicos característicos.

- **Categoría II: Hipoplasia**

- Pérdida gradual de células stem por soporte estromal insuficiente
- No existe una causa patogénica clara
- Ocurre en:
 - Aniridia (hereditaria)
 - Queratitis asociada al Sd poliglandular endocrino (hereditaria)
 - Queratopatía neurotrófica (neuronal o isquémica)
 - Trastornos inflamatorios periféricos o limbitis (ej queratoconjuntivitis vernal)
 - Queratopatías idiopáticas
 - Pterigium o pseudopterigium

Tratamiento. Trasplante limbar

El tratamiento de todos estos trastornos es el trasplante limbar (Tabla 3). Básicamente la técnica consiste en obtener un segmento arciforme o bien un anillo de tejido limbar que incluya parénquima corneal superficial periférico, capas superficiales de la esclera perilimbar y conjuntiva limbar, y trasplantarlo sobre el limbo del ojo afecto al que previamente se ha preparado mediante una queratectomía superficial y una peritomía conjuntival o resección anular para eliminar todos los tejidos patológicos.

Los tipos de trasplante según la procedencia del injerto son:

1. *Autoinjerto*: del mismo individuo del mismo ojo o del ojo contralateral.
2. *Isoinjerto*: de otro individuo de igual especie e idéntica carga genética.
3. *Homoinjerto o Aloinjerto*: de igual especie pero de distinta carga genética.
 - Aloinjerto de cadáver
 - Aloinjerto de donante vivo

Antes de plantearse un trasplante de limbo deben tratarse todos los aspectos de la superficie ocular que pudieran afectar al resultado. Es necesario emplear un abordaje escalonado mediante la eliminación de los factores desencadenantes o agravantes (inflamación o infección), la lubricación, y el tratamiento quirúrgico de las anomalías palpebrales (triquiasis, simblefaron, ectropion, entropión, etc).

Diagnóstico del déficit limbar

- Signo más específico del déficit limbar:
conjuntivalización de la superficie corneal.
 - Biomicroscópicamente se detecta un reflejo mate o irregular de la superficie corneal
 - La tinción con fluoresceína produce un patrón punteado
- El diagnóstico definitivo del déficit limbar es la identificación de células caliciformes en la **citología de impresión.**

Autoinjerto de limbo

El trasplante de tejido limbar desde el ojo contralateral utiliza la conjuntiva adyacente como el

tejido de transporte. Publicado por primera vez por Kenyon y Tseng en 1989, el autoinjerto de limbo ha llegado a ser la opción más difundida en el tratamiento del déficit limbar unilateral.

El autoinjerto implica el trasplante de tejido limbar desde el ojo sano hasta el ojo afectado del paciente, y de este modo sólo se realiza en el contexto de una lesión unilateral. Hay que tener cuidado de que el ojo donante sea realmente sano, aspecto que en ocasiones es difícil de determinar. Un ojo puede parecer normal pero tener un recuento de células progenitoras en el límite. Los pacientes pueden olvidar una lesión previa o que una lesión fue realmente bilateral pero asimétrica. El procedimiento consiste en trasplantar 2 segmentos de tejido conjuntivo-limbar de unas 4 horas (máximo 6) en total obtenidos del ojo contralateral, a las posiciones 12 y 6 horas, principalmente porque estas áreas están protegidas por los párpados y son frecuentemente los focos de invasión conjuntival.

Ojo receptor (Figura 1)

- Se realiza una peritomía y recesión conjuntival de 360°, con disección de todo el tejido fibrovascular que cubre córnea, limbo y esclera perilímbica hasta unos 3-4 mm del limbo. Se reseca todo el tejido aberrante intentando regularizar al máximo toda la zona limbar y corneal. El tejido anormal es eliminado mediante disección roma utilizando pinzas y hemosteta, o es disecado superficialmente con un escarificador. Ocasionalmente es necesario un raspado o pulido adicional para regularizar la superficie estromal, sin embargo, una disección estromal lamelar afilada debe ser evitada porque conlleva riesgo de perforación corneal y de distorsión óptica postoperatoria.
- A continuación se pueden disecar dos lechos laminares de las mismas dimensiones y de 100 µm de profundidad para colocar los autoinjertos, bien en la zona más afectada o bien en las zonas superior e inferior. También se puede realizar una queratotomía para encajar el borde corneal de los injertos, o bien colocarlos encima de la zona superior o inferior limpia de tejido fibrovascular sin tallar lecho.

Ojo donante (Figura 2)

- Se obtienen dos segmentos de tejido limbar de las zonas superior e inferior de 2 (máximo 3) horas cada uno. Cada injerto se obtiene realizando una incisión en la conjuntiva paralela al limbo a unos 3-5 mm del mismo y disecando el plano inmediatamente subconjuntival hasta llegar al limbo, donde se desinserta la cápsula de Tenon reflejándola posteriormente. Se marcan con un cuchillete o trépano dos surcos arqueados paralelos al limbo, uno en la zona escleral a 2 mm y otro en la zona corneal a 0.5-1 mm del limbo. Se puede fijar la profundidad a 150 micras para evitar perforar. Ambos surcos se unen mediante dos incisiones radiales, para después realizar una disección lamelar de la pieza empleando un cuchillete acodado, manteniendo un plano poco profundo. Cada fragmento contendrá córnea periférica superficial, conjuntiva limbar y esclera limbar superficial. Los dos fragmentos se guardan sobre una placa metálica y se humedecen con suero salino balanceado.

Tras colocar los injertos en posición adecuada en el lecho receptor se fijan a la córneo-esclera con puntos sueltos de nylon 10-0, uno en cada vértice (Figura 3). La conjuntiva del receptor es suturada con polyglactin (vicryl) de 8-0 a la del donante en las zonas superior e inferior cogiendo un pellizco de epiesclera, y dejándola separada 3 mm del limbo en las zonas donde no hay autoinjerto. Al final del procedimiento se coloca una lente de contacto terapéutica hidrofílica, o como alternativa puede usarse un injerto de membrana amniótica.

Aloinjerto de limbo

Si ambos ojos están afectados es necesario un aloinjerto de limbo, en el que el tejido limbar es obtenido de un cadáver o de un familiar del paciente. No existe consenso sobre qué tipo de aloinjerto, de familiar vivo o de cadáver, es superior. Existen pros y contras en cada uno de ellos.

- *El uso de tejido de cadáver se asocia teóricamente a un mayor riesgo de rechazo porque, en general, no es práctico encontrar un tejido de cadáver que proporcione una compatibilidad HLA con el paciente. Sin embargo, el tejido de cadáver está disponible más fácilmente que el de un familiar vivo. Además, cuando se usa tejido de cadáver, pueden ser extraídos 360 grados de tejido limbar que son colocados en el lecho receptor. Esto proporciona más células progenitoras, y teóricamente se crea un efecto barrera a la migración de tejido conjuntival.*
- *El uso de un donante vivo necesita encontrar un familiar que tenga un razonable grado histocompatibilidad HLA con el paciente. El empleo de este tejido se asocia teóricamente a una menor incidencia de rechazo, así se reduce la dependencia de inmunosupresores sistémicos. Además el grado de células muertas es teóricamente limitado por la rapidez del trasplante del donante al receptor y por la pronta vascularización del material trasplantado. Sin embargo puede que no haya un familiar vivo disponible o no esté dispuesto a la donación. Por último, el hecho de intervenir el ojo de un individuo sano supone un inconveniente adicional.*

Preparación Preoperatoria:

- *Estudio de Histocompatibilidad. El área del limbo corneal contiene más células presentadoras de antígenos (células de Langerhans) que el centro de la córnea. De esta forma, el riesgo de rechazo del tejido es mayor que en la típica queratoplastia penetrante. En general se considera que la compatibilidad HLA del tejido disminuye las probabilidades de rechazo. Los criterios empleados en la correspondencia HLA son similares a los que se emplean para el trasplante de órganos sólidos; ed, no debería haber más de dos diferencias en los loci HLA A, B o C. En general, los hermanos son preferibles a los padres como donantes.*
- *Descartar enfermedades transmisibles como lúes, hepatitis B, hepatitis C y virus de inmunodeficiencia humana 1 y 2.*

Técnica quirúrgica:

La técnica quirúrgica para obtener tejido de un familiar vivo es idéntica a la del autoinjerto. Idealmente el donante se sitúa en un quirófano adyacente. Una vez obtenidos los injertos son inmediatamente colocados en solución salina balanceada y llevados al quirófano del receptor. Para aloinjertos de cadáver, el tejido donante córneo-escleral se obtiene de un globo fresco completo o de un botón córneo-escleral.

- *Si se emplea un globo completo, éste es envuelto en una gasa y sujetado por el muñón del nervio óptico. Con un trépano de diámetro 3 mm menor que el diámetro corneal se realiza una trepanación de espesor parcial de la córnea central. Con un cuchillete acodado se realiza una disección lamelar superficial de la córnea periférica sobrepasando el limbo y avanzando 1 mm hacia esclera. La eliminación del endotelio y del tejido córneo-escleral posterior resulta en la obtención de un anillo de epitelio limbar en un fino lecho estromal portador. Si está presente, aproximadamente*

1-2 mm de conjuntiva donante es preservada.

- Si se emplea un botón córneo-escleral, el anillo córneo-escleral es recortado del exceso de tejido escleral y la córnea central es eliminada con un trépano de gran diámetro. A continuación se realiza una disección lamelar superficial tal como se ha descrito previamente

Tratamiento postoperatorio

Variará en función del origen del tejido donante. En los autoinjertos únicamente será necesario administrar medicación tópica con corticoides y antibióticos (4 veces al día durante 2 semanas para después ir bajando la dosis rápidamente) y colirios humectantes. Se mantendrá un vendaje o una lente de contacto terapéutica hasta que se complete la reepitelización corneal.

En alotrasplantes de cadáver se puede esperar un alto grado de estímulo inmunogénico relacionado con la abundancia de células de Langerhans y de antígenos HLA-DR. Así pues la inmunosupresión es absolutamente necesaria y se debe mantener por largo tiempo o indefinida. Los aloinjertos de donante vivo con histocompatibilidad HLA parecen no necesitar una inmunosupresión tan intensa, y se cuestiona si es realmente necesaria. La respuesta parece ser afirmativa. Tseng y cols describen buenos resultados en aloinjertos de donante vivo con concordancia HLA sin utilizar inmunosupresión. Sin embargo, Rao y cols publicaron la serie más amplia hasta la fecha de trasplante de limbo de familiar vivo, y concluyen abogando por su utilización también en estos casos. Describen 7 pacientes en los que fue realizado el trasplante de limbo utilizando familiares con similitud HLA en los que no se instauró inmunosupresión. En 3 de los ojos se desarrollaron características de rechazo del injerto.

No existe consenso sobre el óptimo régimen de inmunosupresión, ni por cuanto tiempo debe ser mantenido. Un protocolo generalmente aceptado utiliza ciclosporina A oral a dosis de 5 mg/Kg/día, y corticoides sistémicos a dosis de 1 mg/kg/día. Como tratamiento tópico se emplea colirio de ciclosporina 2% cada 6 horas durante más de un año y corticoides tópicos cada 3 horas, disminuyéndolos con el tiempo hasta dejar una dosis de mantenimiento. Se han utilizado otros inmunosupresores sistémicos con buenos resultados. Dua y Azuara emplean FK 506 (Tacrolimus) observando ventajas sobre la ciclosporina A. Foster propone el uso de Mofetilmicofenolato (Cell Cept) de forma prolongada.

Seguimiento postoperatorio

Se realizará un seguimiento estrecho -diario- hasta que el injerto esté epitelizado y estemos seguros que el epitelio que cubre la córnea es epitelio corneal. La córnea empieza a epitelizar en los dos primeros días, prolongándose hasta 2 semanas, recobrando finalmente un aspecto de normalidad sin vasos, ni cicatrices, y mejorando la agudeza visual.

Complicaciones Postoperatorias:

- En el ojo donante no suelen aparecer complicaciones, aunque existe la posibilidad de infección, cambios refractivos, defectos epiteliales, o vascularización de la zona.
- Invasión conjuntival. Si en el proceso de epitelización observamos que el epitelio conjuntival avanza hacia la córnea hay que desbridarlo y retirarlo en la lámpara de hendidura las veces necesarias hasta que el epitelio corneal de los injertos migre y reepitelice toda la córnea. Resulta clave para el éxito del trasplante la vigilancia post-

peratoria y el reconocimiento precoz del avance de cualquier conjuntiva invasora. En caso contrario resultará un mosaico de células corneales y conjuntivales sobre la córnea y un fracaso del proceso.

- *Rechazo del Homoinjerto.* El rechazo de un trasplante de limbo es difícil de identificar. Teóricamente, el rechazo de las células progenitoras se manifiesta por un defecto epitelial persistente o una eventual conjuntivalización de la superficie corneal. Rao y cols describen vasos perilímbicos dilatados y aumento del edema tisular en el lugar del injerto de limbo como sugestivos de rechazo del injerto. Si se sospecha rechazo del injerto limbar, está justificado un aumento en la terapia inmunosupresora.

La tasa de rechazo en homoinjerto de cadáver es del 49% a los 3 años. Para evitarlo se pueden utilizar donantes con histocompatibilidad HLA/ABO bien sea cadáver o de algún familiar. Utilizando donantes con cierto grado de histocompatibilidad la tasa de rechazo es del 25-33%, y cuando la pareja receptor-donante es idéntica es del 12%.

- *Inflamación severa.* La inflamación severa es de mal pronóstico para la supervivencia del injerto, por lo que se debe tratar antes con esteroides sistémicos y trasplante de MA previos al TL para reducir la inflamación y el porcentaje de rechazo. Se ha observado que el rechazo es más frecuente en ojos con Sd Stevens Johnson o Lyell. Foster y cols demostraron en estos casos actividad inflamatoria inmunológicamente activa con preponderancia de linfocitos T, macrófagos y células de Langerhans en la conjuntiva, lo que habla a favor de que el rechazo sea más frecuente en estos casos.

Resultados

Las publicaciones continúan apoyando al autoinjerto de limbo como el tratamiento de elección en la enfermedad unilateral como las quemaduras químicas y térmicas. Los autores han encontrado que el autoinjerto tiene mayor tasa de éxito que el aloinjerto en estos pacientes, que generalmente tiene inflamación crónica de la superficie ocular.

El aloinjerto de limbo es el tratamiento de elección en enfermedades bilaterales, y de forma global puede restaurar un fenotipo epitelial corneal en el 50 - 70% de los casos. Numerosos estudios han estimado una tasa de éxito del 70% al 80% para un seguimiento medio de 1 a 2 años en causas no inflamatorias de déficit limbar. Sin embargo, ésta cae al 50% tras 5 años. Un seguimiento largo muestra que los pacientes graves (ej: los que sufren Sd Stevens Johnson o penfigoide ocular cicatricial) tienen riesgo de invasión vascular y conjuntivalización tras meses de un curso aparentemente favorable. El deterioro crónico de las células progenitoras donantes puede estar causado por numerosos factores. La interrupción de la inmunosupresión puede ser causa de rechazo del injerto. Las deformidades palpebrales y el ojo seco pueden ocasionar un daño mecánico crónico que conduzca a defectos epiteliales persistentes y depleción de células progenitoras. La recurrencia de la enfermedad de base puede causar inflamación no específica, activando ciertos fenómenos que conducen al fracaso del injerto.

Ingeniería tisular. Cultivos de tejidos

El siguiente paso en el tratamiento de estas patologías es indudablemente la identificación de las células madre epiteliales corneales y el trasplante de tejido obtenido a través de bioingeniería, incluidas células madre aisladas. Las cuestiones sobre su ubicación e identificación

han estado sin respuesta durante años. Recientemente han sido publicados potenciales marcadores de las células madre. El siguiente reto es aislar estas células y mantener cultivos celulares con potencial para proporcionar una reserva ilimitada de células indiferenciadas. Las condiciones de cultivo pueden ser modificadas para inducir que estas células se diferencien según sea necesario. Las células madre podrían adicionalmente ser manipuladas para tener una baja antigenicidad mediante la inducción de genes, y quizás la expresión de genes que ayudasen a estas células a proliferar.

Recientemente, Tsai y cols y Schwab y cols describen la obtención, mediante una biopsia de limbo, de un pequeño número de células progenitoras limbares del paciente o sus familiares, su expansión ex vivo, y subsecuente trasplante en un sustrato de membrana amniótica. Esta técnica necesita la extracción de sólo una pequeña cantidad de tejido limbar y, de este modo, permitiría el uso de tejido autólogo en situaciones en los que actualmente no es posible (es decir, cuando sólo persisten un pequeño número de células progenitoras viables). Además, con estos injertos se consigue la muerte de células de Langerhans que son realmente las portadoras de antígenos. Sin embargo, esta técnica no está aún ampliamente difundida y los resultados a largo plazo de estos procedimientos se desconocen.



Figura 1

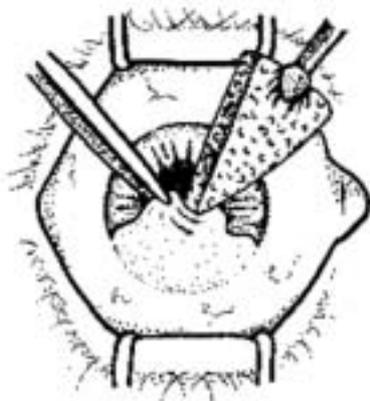


Figura 2

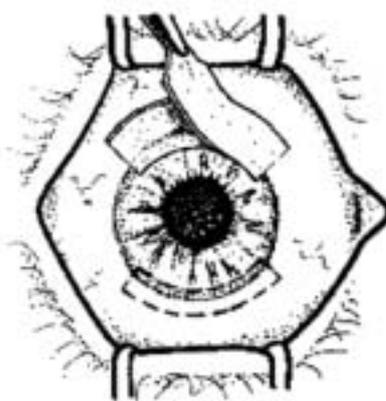
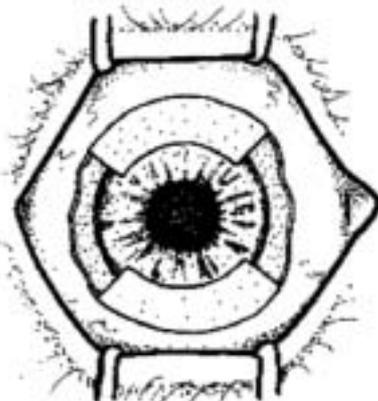


Figura 3



BIBLIOGRAFÍA.

- Daya SM, Bell RW,, Habib NE, et al. Clinical and pathologic findings in human keratolimbal allografts rejection. *Cornea* 2000; 19:443-450.
- Dua HS, Azuara-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2000; 84; 273-278.
- Gris O, Güel JL, del Campo Z. Limbal-conjunctival autograft transplantation for the treatment of recurrent pterygium. *Ophthalmology* 2000; 107:270-273.
- Holland E, Schwartz G. Changing concepts in the management of severe ocular surface diseases over twenty-five years. *Cornea* 2000; 19:688-698.
- Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989; 96:709-722.
- Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ et al. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000; 19:65-71.
- Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001; 108: 1569-1574.
- Rao SK, Rajagopal R, Sitalakshmi G, et al. Limbal autografting from related live donors for corneal surface reconstruction. *Ophthalmology* 1999; 106: 822-828.
- Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000; 19: 421-426.
- Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000; 343:86-93.
- Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000; 343:86-93.
- Tsubota K, Satake Y, Kaido M, et al.: Stem cell transplantation of corneal epithelium for the treatment of severe ocular surface disorders. *New Eng J Med* 1999; 340:1697-1703.