

11211  
Zej.  
18



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
División de Estudios de Postgrado  
Dirección General de Servicios Médicos del D. D. F.  
Dirección de Enseñanza e Investigación  
Curso Universitario de Especialización en  
Cirugía Plástica y Reconstructiva



## “LIOFILIZACION DE MEMBRANAS AMNIOTICAS”

TRABAJO DE INVESTIGACION

Presenta;

DR. JESUS LEONARDO SANCHEZ BUENDIA

Para obtener el grado de;

Especialista en Cirugía Plástica y Reconstructiva

Director de Tesis: Prof. Angel Pavón M.

1986

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**INDICE.**

	<b>PAGS.</b>
<b>INTRODUCCION . . . . .</b>	<b>6</b>
<b>HISTORIA . . . . .</b>	<b>8</b>
<b>¿QUE ES LA MEMBRANA AMNIOTICA? . . . . .</b>	<b>10</b>
<b>¿QUE ES LA LIOFILIZACION? . . . . .</b>	<b>14</b>
<b>MATERIAL . . . . .</b>	<b>19</b>
<b>METODOS . . . . .</b>	<b>20</b>
<b>RESULTADOS . . . . .</b>	<b>23</b>
<b>DISCUCION . . . . .</b>	<b>24</b>
<b>CONCLUSION . . . . .</b>	<b>25</b>
<b>BIBLIOGRAFIA . . . . .</b>	<b>27</b>

## INTRODUCCION.

El manejo de áreas cruentas y del paciente quemado en los servicios de Cirugía Plástica y Reconstructiva de nuestros hospitales del D.D.F., implica un gran reto, primeramente porque los pacientes tienen que ser manejados por equipos de salud multidisciplinarios, segundo porque el manejo de las áreas cruentas requiere de una gran cantidad de material de curación, áreas físicas y material humano y tercero, porque se requiere gran tiempo de hospitalización y varias intervenciones quirúrgicas para lograr cubrir estas áreas cruentas.

Nuestro país en vías de desarrollo se encuentra con el problema de brindar la mejor atención a este tipo de pacientes y por otro lado el período de recesión económica que afecta a la mayoría de la población, hace casi prohibitivo el tratamiento para este tipo de pacientes.

El médico tratando de acelerar la curación a diseñado diferentes maneras de tratarlos, que incluyen pastas, cremas, líquidos, polvos, aerosoles y apósitos biológicos, ya sean aloinjertos, xenoinjertos o piel sintética para manejar tópicamente estas áreas lesionadas y disminuir sus complicaciones.

En nuestros servicios se viene utilizando en forma rutinaria, las membranas amnióticas en estado fresco, para el tratamiento básicamente del paciente quemado, con excelentes resultados.

El manejo y preparación de las membranas es un poco labo-

rioso y su uso se limita a 21 días después de su obtención, y este colocando a las membranas en refrigeración a 4o C y con antibióticos. (1,8,11,12,13,15).

El presente trabajo de investigación, analiza la utilización actual de las membranas amnióticas y se desarrolla un método de liofilización, teniendo en cuenta que las membranas amnióticas es material biológico y por lo tanto susceptible de poder liofilizarse. (6,10)

Con esto trataremos de obtener un apósito biológico, que no sea caro, de fácil obtención, almacenable, que pueda usarse bajo cualquier circunstancia, en cualquier lugar y a bajo costo.

ANTECEDENTES HISTORICOS.

Se tiene conocimiento del uso de las membranas *amnióticas* desde 1910, con John Stage Davis, quien describe su uso.

1913.- Stern y Sabella, reportan el uso de la membrana *amniótica* para quemados y superficies de piel ulceradas. (18).

No se recopila información médica a cerca de las membranas hasta 22 años después.

Brindeau en 1935 y Burguer 1937, reportan el uso de *amnión* como un injerto para formar vagina artificial. (16).

1940.- De Roth reporta su uso con éxito en defectos conjuntivales (16)

1940.- Chao y Cols, usan el término "Amnioplastina" y la usan en prevención de adhesiones meningocerebrales en lesiones de cabeza, reportando que esta degenera en substancia mucóide y desaparece en 30 días (16).

1942.- Píkin, reporta la *amnioplastina* en la literatura rusa (16).

1941.- a 1948.- Kubanyi usa *amnión* en pacientes con quemaduras y heridas (16)

1953.- Douglas y otros autores describen *amnios* y *corión* microscópicamente (2,7,13,16).

1962.- Masec y Cols, usan membranas fetales para reconstruir piso pélvico después de su exéresis en perros (16.17).

1972.- Trelford y Cols, reportan sus estudios preliminares como

apósitos biológicos y su uso en heridas de espesor parcial. (16)

1975.- Robson y Cols, y Trelford y Cols. unen sus experiencias y recomiendan y expanden el uso de las membranas amnióticas. (14, 16, 17).

Actualmente es interesante los estudios que se llevan a cabo - sobre membranas amnióticas, ya que con esto se ha incrementado - los horizontes de su aplicación clínica. (7, 8, 11, 12, 13, 15, 19).

## ¿QUE ES LA MEMBRANA AMNIOTICA?

Cualquier material biológico que se pretenda llevar a un estado de liofilización nos obliga a estudiar detenidamente las características de dicho material biológico es por esto, que describiremos las cualidades embriológicas, histológicas, físicas, inmunológicas y los usos clínicos de las membranas amnióticas.

### EMBRIOLOGIA.

El Mesenquima amniótico es derivado de el mesodermo extraembriogénico primario de el blastocisto y es formado por delimitación de la superficie del trofoblasto.

Para el segundo mes de gestación las células mesenquimatosas son separadas de el epitelio por una capa de tejido que contiene moderada cantidad de fibras de colágena.

Las membranas fetales finales consisten de una sola capa de ectodermo firmemente ligadas a colágena mesenquimal de 6 a 8 células de espesor, y fijadas al corión (2,7,16).

### HISTOLOGIA

El microscopio de luz revela una sola capa de células cuboides semejante a las células de la epidermis en una base matriz de colágena. Las células del amnios varían en longitud desde un epitelio columnar al cuboide a aplanado.

El espesor de la capa mesenquima o celular es de aproximadamente 0.05 mm. y la del corión promedió de 0.04 a 0.12mm (2,9,16).

## INMUNOLOGIA.

El amnión (sin corión) puede ser un autoinjerto para el recién nacido y en otros huéspedes funciona como un aloinjerto, pero la antigénicidad del amnión parece estar disminuida y una respuesta violenta del huésped no ha sido demostrada. El corión cuando se coloca en el huésped provoca neovascularización y migración de células del huésped causando el clásico fenómeno de rechazo.

Este tejido ha sido recientemente estudiado y se establece que presenta considerable antigénicidad que provoca una fuerte respuesta celular antigénica. Un número de investigadores localizan los antígenos en el trofoblasto. Si el corión es separado del amnión y el lado mesemquimatoso es colocado al huésped, una menor reacción es observada. (7,13,14,15).

## CARACTERISTICAS FISICAS.

Machlan, usando membranas fetales intactas encontró presión de estallido de la membrana de 393mmHg con un máximo de 900 mmHg. Se encontró una fuerza tensil de 0.05 y 0.45 kg x cm. Se encontró que el amnión es considerablemente más fuerte que el corión esto debido a la colágena del amnión. Es posible que en vivo la membrana amniótica mantenga un fino balance entre fuerzas hidrostáticas y osmóticas controlando el movimiento de los fluidos. Los lípidos han sido identificados en el corión pero no en el amnión, y parecen ser influenciados por los lípidos maternos contenidos en la dieta materna.

Deshidrogenasa láctica puede ser aunada a respiración anaeróbica.

Inducciones experimentales recientes han revelado que el amnión humano es capaz de inducir formación de células epiteliales en la membrana corioalantoidea de huevos fertilizados de gallina. Estos experimentos recientes abren un nuevo camino a la investigación de tejidos. (7,12,13,15,16).

#### APLICACIONES CLINICAS.

La membrana amniótica es considerada como un apósito biológico, por lo que exponemos todos los posibles beneficios temporales de todo apósito biológico.

Beneficios metabólicos.- Reduce la evaporación de agua y calorías gastadas. Reduce el fluido, la pérdida de electrolitos y proteínas.

Cambios Bacterianos.- Reduce con cambios frecuente de membranas, cuentas bacterianas mayores de 10 a la 5 bacterias por gramo de tejido. Reduce posibilidades de contaminación extrínseca.

Beneficios en la cicatrización.- Reduce la inflamación asociada a una herida abierta. Reduce la contracción de la herida.

Beneficios clínicos.- Reduce el dolor. Reduce el tiempo necesario para preparar un área para el injerto definitivo. Reduce los cambios por pérdida de injertos a el tiempo de injertado definitivo.

Otros beneficios.- Reduce el tiempo de hospitalización. Reduce el costo de hospitalización. Reduce la morbilidad y mortalidad. Los resultados son igual o superiores que la piel porcina, y se reporta ligeramente menores que la piel de cadáver. (9,19).

## ¿ QUE ES LA LIOFILIZACION?

El objetivo primario de la liofilización es el de preservar los materiales biológicos por congelamiento de el agua contenida — y después remover el hielo contenido por sublimación.(10).

Sublimación.— Es un fenómeno de vaporización y condensación de una substancia solida sin pasar por el estado liquido(4).

Becquerel (1951) encontró que algunas esporas de bacteria de moho sobreviven justo en el tipo de condiciones que son impuestas por el congelamiento secado, incluyendo un congelamiento -- del zero absoluto. Estas observaciones han dado creencia al -- origen de la vida en la Tierra .

El sistema de liofilización es un procedimiento el cuál es aplicado a tres categorias de materiales biológicos.

- 1.- A materia no viva, tal como, sangre, plasma, sueros y ali— mentos.
- 2.- Transplantes quirúrgicos, tales como, arterias, hueso y — piel.
- 3.- Células vivas destinadas a permanecer viables largos perio— dos de tiempo. Se incluyen bacterias, virus, y semen. (6).

El clima frío-seco ha sido usado desde tiempos lejanos así -- tenemos que los Vikingos lo utilizaban para producir pescado -- seco. y los Incas para producir harina de papa llamado chuno -- en Sudamerica. Esta es la capacidad del aire frío-seco para -- evaporar la humedad de los materiales biológicos.

Tal aire produce desecación por sublimación, un cambio de estado de hielo a vapor sin disolverlo (6,10).

El rol de la desecación en el proceso de inoculación ha sido — conocido desde Tissot (1792) quien describe un método de preparación y empleo de una hebra de hilo impregnada de virus de — viruela. Sin embargo tuvo que pasar una centuria hasta Vansteenberghe (1903) quien produce desecación por liofilización de virus de rabia con ácido sulfurico bajo vacio. Arsonval (1906) — usa un refrigerador condensador en vez de ácido sulfurico para remover el vapor de agua, como hizo Shackell en (1909), quien — presenta las ventajas del precongiamiento como un paso anterior al secado. (10).

Altmann (1890) fué el primero en liofilizar organismos y — tejidos para examinación biológica bajo microscopio, su trabajo estableció la práctica de liofilización sistematica para especimenes biológicos (10).

Este patrón de liofilización fue llevado 50 años después a — la práctica por el método Altmann'S una teoria para la designación de el aparato de congelamiento y vacio centrífugo para suspensiones de bacteria. En 1944 Greaves, desarrolla temperaturas bajas para liofilización de arteria, hueso y piel para bancos. (5,6).

Actualmente se describen muchos usos del método de liofilización, en el área médica y de alimentos.

Congelamiento y congelamiento-secado habría sido imposible sin los avances de la bomba de vacío y máquinas de refrigeración. (10). La primera bomba de vacío fue construida por Guericke -- (1672). Temperaturas más bajas fueron obtenidas posteriormente por licuefacción de gases tales como aire y dióxido de carbono. Los primeros experimentos fueron confrontados por los problemas térmicos y choque osmótico y disrupción de células, todas causadas por el congelamiento, esto tuvo éxito gracias a dos soluciones, la primera un congelamiento rápido para obtener un estado amorfo y segundo propiedades protectoras a las células vivas por medio de Glycerol. El Glycerol es aún un método Standard de preservar el semen de toro para inseminación artificial. (4,6,10).

En el tiempo de la segunda Guerra Mundial el proceso de liofilización fue observada como una inmejorable herramienta y la oportunidad de su uso a larga escala, cuando Greaves en -- 1942 liofiliza plasma para uso humano, a partir de entonces -- se desarrolla gran variedad de patentes incluyendo la primera en 1941 para el jugo de naranja.(6).

La mira de la liofilización es la de preservar la humedad cargada de materiales en su parte de naturaleza biológica lábil, por congelamiento y sublimación y más tarde su rehidratación. El método requiere de pasos sucesivos.

1.- Precongelamiento.- Los materiales son preparados y congelados a temperaturas muy bajas.

2.- Secamiento primario.- Los cristales de hielo formado en el congelamiento son sublimados con vigor y gentilmente usando -- calor al vacio.

3.- Con la desaparición del hielo la humedad residual es absorvida a la temperatura ambiente y al vacio.

4.- Condiciones y rehidratación.- Se seca con un gas inerte y entonces es empacado y almacenado.(4,5,10).

#### TECNICA.

El procedimiento de congelamiento varia grandemente la -- elección entre congelamiento rápido y lento debe ser deter-- minado de acuerdo a las características del producto, usualmente el congelamiento es llevado fuera de la cámara de vacio, en un plato de refrigeración como un proceso lento, para congelamiento rápido de fluidos son empleados para inmersión directa - o Spary de nitrogeno líquido, el material es colocado en una cámara cerrada y la sublimación iniciada con una bomba de va-- cío, esto da como resultado la sublimación del hielo lentamente y la energía de calor es suministrada por la bomba.

El manejo de la fuerza de sublimación depende esencialmente de la diferencia de la presión de vapor entre la interface del - hielo y el condensador, la cámara de vacio asegura que la interface de temperatura sea siempre baja. El secado secundariocomienza cuando el último cristal de hielo ha sido sublimado- y la humedad absorbida de el material secado estuvo una vez en el sitio de los cristales de hielo. La temperatura es de 30g - para materiales biológicos y 50 g para alimentos, mientras -- que la presión de vacio en pascals es de 13.3. pascals a cerca

de 1.3 pascals, porque la inherente baja de presión de vapor obliga al cambio de este estado.

Rehidratación.- Es obligatorio de retener cierta cantidad de humedad residual para estos propositos, para productos biológicos tales como antibióticos y tejidos es de 0.1 a 1% para microorganismos y virus 1 a 3% y para alimentos de 2 a 10%. Muchas técnicas han sido desarrolladas con la ayuda del agua, el agua penetra en el producto y al mismo tiempo saca el aire de los poros, logrando con esto las cualidades primarias del producto liofilizado. (3,4,5,6,10).

MATERIAL.

Membranas amnióticas humanas frescas fueron obtenidas en el momento del parto y alumbramiento, sin datos previos de -- infección endometrial ó ruptura prematura de membranas de más de 12 horas de evolución, las membranas fueron separadas del corión en ese mismo momento y el material decidual fue re movido, la membrana fue lavada con hipoclorito de sodio al 0.025% por 45 a 50 segundos posteriormente fue pasada por -- solución salina esteril por tres ocasiones para remover re -- siduos de hipoclorito de sodio, posteriormente se coloca la membrana en una vasija con solución salina estéril y 1 gr. - de Neomicina para evitar posible contaminación, se escogió - este antibiótico porque no se absorbe y esta cualidad permiti ría que cause sensibilidad en el paciente, como cuando se usa antibiótico que se absorbe y desencadene fenómenos de sen sibilidad o anafilaxia. (1,8,11,13,15)

El material obtenido se coloca en ua vasija refracta ria previamente esterilizada en autoclave, guardandose a una temperatura de 4g. C., sin llegar a la congelación ya que -- esto puede alterar la arquitectura de las membranas. (15)

Las membranas obtenidas no fueron utilizadas cuando -- pasó más de una semana después de su obtención y solo fueron sacadas de su lugar de refrigeración cuando iban a ser utili zadas en el laboratorio.

Dado que no existe un proceso de liofilización especi fico para las membranas amnióticas, se ideó en el laboratorio-

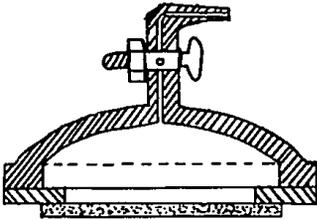
de investigaciones biomédicas de la UNAM., una cámara de vacío, de vidrio refractario PYREX de alta densidad, esta conectada a una trampa, que consistía en una cubeta con hielo y dentro de esta un recipiente sellado con dos salidas, una conectada a la cámara de vacío y la otra conectada a la bomba para dar el vacío. La bomba de vacío nos daba una presión negativa de -20 atmósferas. (vease figura).

#### METODO.

El estudio se realizó en los laboratorios de investigaciones biomédicas de la UNAM, bajo la supervisión de un bioquímico - investigador, en los meses de Junio, Julio y Agosto, los días - jueves por una hora.

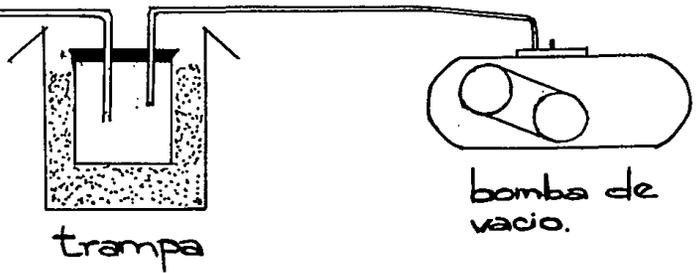
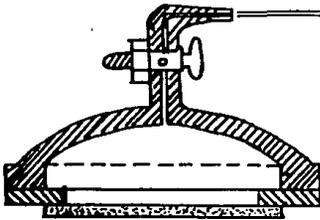
Las membranas amnióticas a liofilizarse eran sacadas de su recipiente donde se habían preparado previamente y eran -- llevadas a la congelación, la cual se llevaba a cabo colocando en un recipiente ácido carbonico y acetona, mediante este método se lograban temperaturas de - 70 g C., las membranas eran -- colocadas en cuadros de 10 x10 de vidrio refractario y eran -- introducidas a la solución referida, con esto las membranas -- sufrían una congelación a -70 g.C., posteriormente eran --- abiertas la cámara de congelación-vacío y las membranas ya --- congeladas eran introducidas en ella, se colocaba la trampa -- y se ponía a funcionar la bomba entre -15 y 20 atmósferas de -- presión, las membranas colocadas en la cámara eran vigiladas, bajo visión directa a través del cristal de la cámara y cuando se veían secas, eran sacadas de la cámara de vacío, anotando-

Liofilización de  
membranas am-  
nóticas.



cámara de  
congelación.

LIOFILIZADOR



trampa

bomba de  
vacío.

el tiempo el cuál estuvieron sometidas al vacío, en un principio se tenía el problema que la desecación de las membranas no era uniforme, ya que parte de la membrana quedaba sobre la placa de vidrio, por lo que la desecación no era uniforme, entonces se idearon marcos de alambre de 15x15, en los cuáles la membrana quedaba suspendida y entonces toda la presión de vacío era uniforme, con este método se obtuvieron mejores membranas desecadas. El método se llevó a cabo en los meses referidos obteniéndose 16 membranas liofilizadas. El siguiente paso era el de realizar cortes histológicos de la membrana desecada y posteriormente hidratada ya vistas al microscopio. para saber si las características de la membrana se habían preservado con este método.

R E S U L T A D O S .

Se lograron liofilizar 16 membranas en el tiempo mencionado, el metodo de liofilización fue el standar para cual —  
quier material biológico (arteria, hueso, piel). (3,5,6)

M	CONGELAMIENTO	SUBLIMACION	To.	DESCRIPCION MACROSCOPICA
1	-70 x 1 min	-20 atm	30'	HUMEDA
2	-70 x 1 min	-20 atm	30'	HUMEDA
3	-70 x 1 min	-20 atm	40'	HUMEDA
4	-70 x 1 min	-20 atm	40'	HUMEDA
5	-70 x 1 min	-15 atm	40'	HUMEDA
6	-70 x 1 min	-20 atm	45'	HUMEDA
7	-70 x 1 min	-15 atm	35'	HUMEDA
8	-70 x 1 min	-20 atm	40'	SECA
9	-70 x 1 min	-20 atm	35'	SECA
10	-70 x 1 min	-20 atm	30'	HUMEDA
11	-70 x 1 min	-20 atm	40'	SECA
12	-70 x 1 min	-20 atm	40'	SECA
13	-70 x 1 min	-20 atm	40'	SECA
14	-70 x 1 min	-20 atm	40'	SECA
15	-70 x 1 min	-20 atm	40'	SECA
16	-70 x 1 min	-20 atm	40'	SECA

\*M- Membrana

\*T- Tiempo

## D I S C U S I O N .

La investigación sobre un método de liofilización de las membranas amnióticas, se llevó a cabo teniendo en cuenta -- que las membranas amnióticas frescas, son usadas en nues -- tros servicios por más de tres años con excelentes resulta -- dos, sobre problemas de cubierta cutánea, pérdida de barre -- ra cutánea protectora contra germenés etc.

Del tal manera haciendo una comparación con otros estu -- dios en los que se usa aloinjerto de piel humana para el -- mismo fin (9), creemos que las membranas amnióticas son --- superiores.

Los xenoinjertos de piel de cerdo, de los cuales su -- costo es prohibitivo para nuestros pacientes y más si tales xenoinjertos son liofilizados e importados., también su --- acceso y costo son prohibitivos.

Por tal motivo nuestra inquietud fué la de establecer-- un método standar de liofilización, ya que las cualidades -- son igual o mayores que la piel de cerdo o piel de cadáver-- y se ha visto que las membranas son el mejor apósito biológi -- co temporal para establecer mejores condiciones locales y -- generales de los pacientes.

## C O N C L U S I O N E S .

Los resultados obtenidos macroscópicamente nos indican que las membranas amnióticas si son susceptibles de ser liofilizadas y al ser rehidratada en forma cualitativa mantiene su forma.

La segunda parte de nuestro estudio que correspondía a la comprobación histológica del marco celular de la membrana, liofilizada y ya hidratada, no fue posible llevarlo a cabo -- por falta de tiempo y recursos. (Microscópio, Laboratorio, tinciones etc.)

Al comprobar que las membranas amnióticas son susceptibles de liofilizarse, se puede inferir un método a gran escala, los beneficios que obtendremos de esto serán un apósito de excelente calidad, de fácil obtención y procesado, barato y que -- reduce la necesidad de importar material extranjero para este fin.

El precio actual de piel de cerdo liofilizado (CORE THUM I) de 15 x 10 con 10 sobres tiene un valor de 40 000 pesos -- m/n.

Creemos que se tiene que desarrollar la segunda parte de este estudio, porque nos brindara la oportunidad de conocer el resultado exacto de este estudio y de esta manera poder desarrollar un apósito biológica de excelente calidad.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Burgos, H. y W. Page. THE MAINTENANCE OF HUMAN AMNIOTIC MEMBRANES IN CULTURE. Brit. J. Obst and Gynecol. March 1981. Vol. 88. Pag. 294-300
- 2.- Danforth. D.N. and Hull. THE ANATOMY MICROSCOPIC OF THE FETAL MEMBRANES WITH PARTICULAR REFERENCE TO THE DETAILED -- STRUCTURE OF THE AMNION. Am. J. Obstet Gynecol. Vol. 75. -- 1958. Pag. 536-50.
- 3.- Dougherty. T.P. y Cols. REIMPLANTATION OF FRESH-TREATED BONE IN IMMEDIATE RECONSTRUCTION OF THE MANDIBULE. Am. J. - of Surgery. Vol. 144. Oct. 82. 463-65.
- 4.- Flondorf. E. W. Freeze- Drying-Drying by sublimation.
- 5.- Flondorf. E.W. THE PRESERVATION OF FREEZE-DRYING. (BONE-GRAPIS). Surgery. 31.716
- 6.- Greaves. FUNDAMENTAL ASPECTS OF FREEZE DRYING BACTERIA --- AND LIVING CELL.
- 7.- Hoyes. A.D. STRUCTURE AND FUNTION OF THE AMNION. Obst. -- Gynecol. Annu. 1-38. 1975.
- 8.- Kucan. J. O. AMNIOTIC MEMBRANES AS DRESSINGS FOLLOWING -- DERMOABRASION. Ann. Plastic. Surgery. 1981. Nov 7 (5) 354-56.
- 9.- Krizek. T. J. SYMPOSIUM ON BASIC SCIENCE IN PLASTIC SURGERY. Mosby Company. No. 25. 1976.
- 10.- Mellor J. D. FUNDAMENTAL OF FREEZE- DRYING.
- 11.- Quinby. W. C. CLINICAL TRIALS OF AMNIOTIC MEBRANES IN -- BURN WOUND CARE. Plastic Reconstructive Surg. Dic. 1982.
- 12.- Matthews. R. N. Wound HEALING USING AMNIOTIC MEMBRANES -- Brit. J. Plast. SURG; 34. 1981.
- 13.- Matthews. R. N. A REVIEW OF THE ROLE OF AMNIOTIC MEM -- BRANES IN SURGICAL PRACTICE. Obstet. Gynecol. Ann. 1982 11.- 31-58.

14.- Robson, M. C. THE EFFECT OF HUMAN AMNIOTIC MEMBRANES ON THE BACTERIAL POPULATION OF INFECTED RAT BURNS. Ann.-Surg. 1973. 136:787.

15.- Thompson. P. D. y Cols. MONITORING. BANKING, and -- CLINICAL USE OF AMNION AS A BURN WOUND DRESSING. Ann. Plastic Surgery. Vol. 7. No. 5 Nov. 81.

16.- TRELFOED. J. D. and Trelford. M. S. THE AMNION IN -- SUR GERY, PAST AND PRESENT. Am. J. Obstet. Gynecol. AG. - 1979.

17.- TRELFOED. M. S y Cols. REPLACEMENT OF THE PERITONEUM WITH AMNION FOLLOWING PELVIC EXENTERATION. Surg. Gynecol and Obst. 145. No. 1977.

18.- Sabellan. USE A FETAL MEMBRANES IN SKIN GRAFTING. -- Med. Rec. N. Y. 1913. 83:478.

19.- Wolf. D. L. EVALUATION OF BIOLOGICAL DRESSINGS. --- Plastic. Rec. Surg. Vol. 5. No. 3 Sept. 1980.