

11211



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

33

FACULTAD DE MEDICINA

2EJ

División de Estudios de Posgrado

Hospital Central Sur de Alta Especialidad

P E M E X

**ESTERILIZACION DE MEMBRANAS AMNIOTICAS COMO
APOSITOS BIOLÓGICOS MEDIANTE RADIACION GAMMA**

TESIS DE POSGRADO
Que para obtener la Especialidad en
CIRUGIA PLASTICA Y RECONSTRUCTIVA
p r e s e n t a

Dr. Manuel Fernando de la Tejera García

FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

1995



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD
PETRÓLEOS MEXICANOS**

**" ESTERILIZACION DE MEMBRANAS AMNIOTICAS
COMO APOSITOS BIOLÓGICOS
MEDIANTE RADIACION GAMMA "**

**Autor de la Tesis:
DR. MANUEL FERNANDO DE LA TEJERA GARCIA**

**Residente del tercer año de la Especialidad
CIRUGIA PLASTICA Y RECONSTRUCTIVA**

**Tutor:
DR. LUIS ERNESTO RAMOS DURON**

Dr. José de Jesús González Jasso Silva
Director del Hospital Central Sur de Alta
Especialidad PEMEX

Dr. Luis Ernesto Ramos Durón
Jefe del Servicio de Cirugía Plástica y Reconstructiva
y Tutor de Tesis

Dra. Laura Moreno Altamirano
Jefe del Departamento de Investigación

Dra. Judith López Zepeda
Jefe del Departamento de Enseñanza

H. C. ENSI ENZA
FEB. 17 1995

INTRODUCCION:

A través de la historia siempre ha existido un interés creciente, en la forma de cubrir temporalmente áreas desprovistas de piel como consecuencia de heridas o quemaduras. En estas áreas cruentas la pérdida de su capa protectora origina complicaciones tanto agudas como a largo plazo, que pueden desencadenar desde las pérdidas de algunas funciones (tras-tornos metabólicos como eliminación de líquidos, electrolitos, proteínas, termoregulación, etc.) hasta la muerte. Para dar cubierta a estas áreas con pérdida de la integridad de la piel, se han utilizado materiales sintéticos y biológicos, estos últimos son los que proporcionan mejor respuesta local, disminuyen la proliferación bacteriana, así como el dolor y favorecen la epitelización. Estos materiales biológicos pueden ser obtenidos de tejidos homólogos (de la misma especie) por ejemplo la piel de otro ser humano (homoinjerto), o bien obtenidos de otras especies por ejemplo la piel de cerdo (xenoinjertos). Estos materiales biológicos también llamados apósitos, conllevan el problema de ser de más difícil obtención y procesamiento mas costoso. La utilización de membranas amnióticas (44), ha solucionado parcialmente este problema, por ser de fácil obtención y procesamiento, pero tienen el inconveniente de ser una posible fuente de contaminación con bacterias, y hongos propios del canal del parto, así como otras enfermedades virales entre las que destaca el virus del VIH. Para la esterilización de las membranas amnióticas (MA), convencionalmente se utiliza el lavado de las mismas y su inmersión en solución con antimicrobianos, además de haber sido obtenidas de pacientes con prueba de VIH negativo. Hay antecedente del uso de rayos gamma a dosis de 25 kGy para esterilización de otros materiales (antibióticos, suturas, etc.) con aplicaciones en la industria farmacéutica y en cirugía. Con esto, en este estudio se pretende, establecer la utilidad de los rayos gamma para la esterilización de las MA de inicio en bacterias y hongos, buscar la dosis mínima de radiación para este propósito y si dicha forma de esterilización no trae cambios estructurales en las MA, que se traducirían en pérdida de su aplicación como apósitos biológicos.

ANTECEDENTES

En la búsqueda de materiales para el manejo de heridas cruentas y por quemaduras, se han utilizado apósitos biológicos (autoinjertos, homoinjertos y heteroinjertos) así como materiales sintéticos. Los aloinjertos humanos

representan el tejido mas efectivo actualmente disponible (8). Cuando se aplica en una área cruenta los aloinjertos se adhieren, vascularizan y mantiene viabilidad esto favorece la proliferación epitelial, entre los 9 a 12 días en que se presenta el fenómeno de rechazo, en caso de un segundo injerto del mismo donador se presenta un rechazo acelerado mas temprano (5). No obstante los aloinjertos forman una barrera protectora contra las bacterias, proporcionan un estado apropiado de hidratación y una pérdida disminuida de exudado proteinaceo en la herida, por lo que es utilizado como cubierta temporal de heridas como apósitos biológicos (4).

Hace un siglo, Pollock utilizó el primer homoinjerto en un paciente con quemaduras (19). Posteriormente Lee intento la aplicación del primer heteroinjerto en un paciente con quemaduras (5).

La utilización de las membranas amnióticas (**MA**) en pacientes con áreas cruentas por quemaduras y heridas se inicio hasta 1948 por Kubanyi (44). En 1953 Brown y Douglas y otros autores describieron microscópicamente el corion y el amnios e introdujeron el concepto de apósitos biológicos para las **MA** (5,40, 16, 28, 18). Pigeon en 1960, cita su experiencia en el uso de las **MA** en quemaduras de II grado superficial (11), Kirschbaum mencionó su aplicación en quemaduras extensas, Dino y cols. en 1966 proponen un método de conservación y las ventajas prácticas de establecer un banco de membranas amnióticas (42). En 1972 Trelford notificó sus estudios preliminares en **MA** como apósitos biológicos y su uso en heridas de espesor parcial (43). En 1975 Robson, Krisek y Trelford, recomendaron la utilización de **MA**, recalcando su fácil obtención sus efectos sobre la flora bacteriana y sus ventajas en relación con la utilización de otro tipo de apósitos temporales, tales como aloinjertos (injertos provenientes de otro ser humano), xenoinjertos (provenientes de otras especies) y sintéticos (34,35).

Mas recientemente Colucho, W.C. Quimby y otros corroboran los beneficios de las **MA**, proponiéndolas como el mejor apósito biológico (14).

Membranas amnióticas: aspectos anatómicos e histológicos.

La membrana amniótica resulta de la prolongación del ectodermo embrionario, envuelve inicialmente al embrión, para posteriormente ser distendida por la formación de líquido amniótico. Contiene una sola capa de ectodermo firmemente ligada a la colágena mesenquimal de 6 a 8 células de espesor y fijadas al corion (16,44).

El microscopio de luz revela una sola capa de células cuboides, semejantes a la célula de epidermis en una base de matriz colágena. dichas células varían en longitud desde un epitelio columnar al cuboide aplanado. El

espesor de la capa mesénquima o celular es de aproximadamente de **0,05mm** y la del corion es en promedio de **0.04 a 0.12mm** (16, 17,25, 31,44).

Dentro de sus aplicaciones clínicas destacan las siguientes:

a) Beneficios metabólicos: disminuye la evaporación y pérdida de agua, electrolitos, proteínas, y calorías (7).

b) Disminución de la cuenta bacteriana: con cambios frecuentes reducen la cuenta bacteriana de 105 bacterias por gramo de tejido, también reducen la contaminación extrínseca (14, 25,35).

c) Beneficios en la cicatrización: reducen la inflamación asociada a una herida abierta. Reduce la contracción de la herida. Facilita la epitelización de quemaduras superficiales (13,14, 28).

d) Beneficios clínicos: reduce la intensidad del dolor al proteger las terminaciones nerviosas expuestas en la herida, reduce el tiempo de preparación para la colocación de injertos definitivos, por su transparencia permite evaluar el área cubierta. disminuyen el número de curaciones al paciente, permitiéndole mayor movilidad y proporcionándole mayor comodidad (7, 43).

e) Otros beneficios: son fácilmente disponibles, tienen bajo costo, son de fácil preparación y almacenamiento, se pueden guardar hasta por dos años sin perder sus propiedades (42, 48, 55).

Existen antecedentes bibliográficos de esterilización de implantes aloplásticos de dacrón, teflón, silástico, etc., y de tejidos humanos utilizando radiación gamma y ultravioleta (47). En la industria farmacéutica y en cirugía se ha utilizado para la esterilización con radiación gamma la dosis de **25 kGy** como punto de partida o norma de referencia del organismo internacional de energía atómica (**OIEA**) para todos los países miembros.

Hay antecedentes de inactivación viral en plaquetas con la utilización de radiación Laser-UV, uso de acelerador de electrones y otras partículas, para la esterilización de diferentes tejidos aloplásticos y biológicos (46). Existen también publicaciones, sobre la esterilización de tejidos biológicos, usados como osteoconductores y esterilizados mediante radiación gamma (50,57,58,63), así como de la utilización de la radiación gamma en la esterilización y preservación de tejidos biológicos, y sobre el efecto de la radiación sobre los tejidos (56,59,60,62), y una publicación referente a la esterilización de membranas amnióticas mediante radiación gamma (65).

En el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (**ININ**) se dispone de un irradiador industrial de **Co-60 J-S. 6500 AECL** y otro de investigación **Gammacell 220 AECL de Co-60**, motivo por el cual se elaboró un proyecto

desde 1993 para la esterilización de diversos tejidos biológicos y aloplásticos, inicialmente se esterilizan membranas amnióticas, de ésta manera buscar que queden libres de bacterias y hongos, sin perder estructuralmente su capacidad como apósitos biológicos, con lo cual además se abreviaría el período de espera para su empleo y aumentaría el tiempo de preservación y almacenamiento en el banco.

Otras ventajas de la irradiación gamma, se refieren a la disminución de las propiedades antigénicas, al aumento de estabilidad de las matrices intercelulares y a la disminución de las reacciones de cuerpo extraño en los tejidos. (46)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

¿ Las radiaciones gamma de **Co-60**, son capaces de esterilizar las membranas amnióticas de los gérmenes contaminantes mas frecuentes (tanto del canal del parto como de las áreas cruentas o por quemadura) ?

¿ La dosis necesaria para esterilizar a las membranas altera estructuralmente a las membranas amnióticas ?

OBJETIVOS:

Corroborar que con el uso de radiación gamma se esterilizan las membranas amnióticas en un mínimo de tiempo.

Verificar histológicamente que las membranas amnióticas así esterilizadas, no se modifican estructuralmente, por lo que no pierden su utilidad como apósito biológico y puedan almacenarse durante períodos prolongados.

HIPOTESIS :

1° Las membranas amnióticas son esterilizadas a **5, 7.5, 10, 15, 25, 30 kilogray (kGy)**.

2° Las radiaciones gamma a **5, 7.5, 10, 15, 25, 30 kGy** no afectan la estructura celular de las MA.

METODOLOGIA :

Experimental, longitudinal, prospectivo, comparativo y abierto.

Grupos de estudio:

Se recolectarán placentas obtenidas de los partos atendidos en éste hospital, de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Criterios de inclusión:

- Placenta de madre sin proceso infeccioso durante su gestación, con VIH negativo: con el fin de evitar factores que alteren estructuralmente el amnios.
- Gestación a término: por presentar las condiciones histológicas adecuadas.
- Placenta recuperada con técnica aséptica de menos de 72 horas (48,49).
- Placenta con membrana amniótica con cultivo para bacterias y hongos negativo, conservada en solución salina al 9% estéril a 4 grados centígrados.

Criterios de exclusión:

- Infección sistémica materna ó de genitales.
- Ruptura prematura de membranas
- Condiciones sépticas del parto o parto fortuito (no atendido en quirófano).
- Sufrimiento fetal.
- Membrana amniótica obtenida asépticamente de más de 72 horas previas al estudio.

Criterios de eliminación:

- Las membranas amnióticas que durante el procedimiento sufrieron contaminación ajena a la estipulada en el presente estudio.
- Las membranas amnióticas expuestas radiación gamma fuera de las especificaciones indicadas en el presente estudio.
- Las membranas amnióticas que no tenían reporte histológico.

Técnica y procedimientos:

La obtención y preparación de las membranas amnióticas se realizó bajo condiciones asépticas, derivada de pacientes previamente seleccionadas de acuerdo a los criterios de inclusión (VIH negativas y sin hepatitis ni otras enfermedades infectocontagiosas) . Se tomó cultivo después del despegamiento y separación del resto de los tejidos placentarios, se tomó un fragmento de aprox. 1cm. el cual fue colocado en un tubo estéril con medio de cultivo (soya tripticaseína), en seguida se realizó lavado mecánico gentil con abundante agua estéril, hasta eliminar coágulos y gelatina de Warthon. Se almacenaron en frasco de vidrio estéril con 100cc de solución salina. Con la técnica convencional , se agregan **80 mg** de gentamicina para esterilizar a la **MA** de gérmenes sensibles mas comúnmente encontrados tanto en el canal de parto como en la flora del paciente quemado y otras áreas cruentas, como son los siguientes: pseudomonas aeruginosa, estafilococo coagulasa negativo, estreptococo alfa hemolítico, y cándida álbicans, enterobacter sp, escherichia coli. (49)

Después en el procedimiento convencional se espera el resultado del cultivo por un espacio mínimo de 48 hrs., y en caso de ser negativo dicha membrana se utiliza.

En todos los grupos se utilizó tubos estériles de **5cc** con medio de cultivo enriquecido de soya tripticaseína **3cc** en cada tubo y posteriormente para su cultivo, el medio utilizado fue agar sangre para bacterias y Sabouraud al **4%** para cándida álbicans.

La cuantificación del inóculo se realizó mediante el nefelometro de Mac Farlan a una concentración de **10⁷ - 10⁸ ufc/ ml.**

Se utilizó una membrana amniótica la que se fraccionó en porciones de **3 x 3 cm** e introducida en los tubos preparados en la forma descrita, y se formaron **7 grupos de 7 tubos cada uno.**

GRUPOS

	A	B	C	D	E	F	G
1	MEM+ STP S/RAD	MEM+ STP 5kGy	MEM+STP 7.5kGy	MEM+ STP 10kGy	MEM+STP 15 kGy	MEM+STP 25 kGy	MEM+STP 30 kGy
2	MEM+ STF S/RAD	MEM+ STF 5kGy	MEM+STF 7.5kGy	MEM+ STF 10kGy	MEM+STF 15 kGy	MEM+STF 25 kGy	MEM+STF 30kGy
3	MEM+ PSD S/RAD	MEM+PSD 5kGy	MEM+PSD 7.5kGy	MEM+PSD 10kGy	MEM+PSD 15 kGy	MEM+PSD 25 kGy	MEM+PSD 30 kGy
4	MEM+CD S/RAD	MEM+CD 5kGy	MEM+CD 7.5kGy	MEM+CD 10kGy	MEM+ CD 15 kGy	MEM+CD 25 kGy	MEM+CD 30 kGy
5	MEM+ECO S/RAD	MEM+ECO 5kGy	MEM+ECO 7.5kGy	MEM+ECO 10kGy	MEM+ECO 15 kGy	MEM+ECO 25 kGy	MEM+ECO 30 kGy
6	MEM+EB S/RAD	MEM+ EB 5 kGy	MEM+ EB 7.5kGy	MEM+ EB 10 kGy	MEM+ EB 15 kGy	MEM+ EB 25 kGy	MEM+ EB 30kGy
7	MEM+MCE S/RAD	MEM+MCE 5kGy	MEM+MCE 7.5kGy	MEM+MCE 10kGy	MEM+MCE 15 kGy	MEM+MCE 25 kGy	MEM+MCE 30 kGy

STP: estreptococo b hemolítico

STF: estafilococo aureus coagulasa negativo

PSD: pseudomonas sp

CD: cándida álbicans

E CO: escherichia coli

EB: enterobacter sp

MCE: medio de cultivo enriquecido (soya triticaseína)

MEM: membranas amnióticas

Dosis empleadas: 5,7.5,10, 15, 25 y 30 kgy. (1 gray = 1 j/kg = 100 rad)

S/RAD: sin irradiación

Posterior a la irradiación un fragmento de membrana de 0.5 cm de los tubos del grupo 7 se envió al departamento de patología para estudio histológico.

Los tubos "A" de cada grupo quedaron como control bacteriológico en membranas contaminadas; y los tubos b, c, d, e, f, g, de cada grupo, se expusieron a radiación gamma del Co-60 a 5, 7.5, 10, 15, 25 y 30 kGy, respectivamente.

Al término de la irradiación se tomaron controles de cultivo a cada uno de los tubos irradiados.

Al término de la irradiación un fragmento de 0.5 cm. de los tubos b,c, d, e, f,g, de cada grupo fue enviado nuevamente al servicio de patología para estudio histológico.

El presente estudio se realizó por triplicado.

En éste estudio ciego para los evaluadores de los servicios de bacteriología , como de patología y radiobiología los que no conocieron las especificaciones de las muestras.

RESULTADOS :

Los tubos **b,c,d,e,f,g**, fueron expuestos a la radiación a la dosis de **5,7.5,10,15,25 y 30 kGy** respectivamente, en serie de tres (3 tubos de cada uno).

Los cultivos de membranas con bacterias irradiadas fueron negativos aun con la dosis de **5kGy**, mientras los que contenian candida albicans, fueron positivos a las dosis de **5 y 7.5 kGy**, pero fueron negativos a las dosis mayores.

En el examen histopatológico se encontró tanto en uno de los tres tubos irradiados a la dosis mayor (**30kGy**) así como en uno de menor dosis (**15kGy**) alteraciones tales como necrosis celular (**70%**), cambios hialinos, edema y vacuolación del citoplasma. de igual forma en otros tubos de las mismas dosis se notificaron con estructura normal.

Otras alteraciones encontradas fueron desprendimiento de epitelio, cariorexis, y cariolisis hasta en un **20%**, sin relación directa con la dosis de irradiación.

CONCLUSIONES :

Las membranas amnióticas mediante radiación gamma son esterilizadas de bacterias a partir de la dosis de **5 kGy** y los hongos a dosis de **10 kGy**. Se encontró como dosis mínima la de **10 kGy** para la negativización de cultivos de bacterias y hongos de contaminación usual en el tracto vaginal.

A estas dosis de radiación la **MA** no pierde sus características estructurales y con esto su capacidad como apósitos biológicos.

La inconsistencia de los hallazgos histológicos en relación a la dosis de irradiación, probablemente son secundarios al manejo durante la técnica de preparación de la **MA** (barrido mecánico de sangre y gelatina de Warthon), y no a la radiación misma.

Tanto una prueba clínica de aplicación de estas **MA** radiadas así como la esterilización de **MA** de virus serán motivo de estudio ulterior.

BIBLIOGRAFIA :

- 1.- Achauer B.M. Tratamiento de las quemaduras en Achauer B.M. Atencion del paciente quemado. 1988 ed. el manual moderno; 92- 107.
- 2.- Alexander J.W. Craucraft t.k. Prolongation of allogenic skin survival by in vitro treatment wuith fluocinolone acetonide: effect of incubation time and length of storage. The Journal of trauma; 14:836.
- 3.- Akle CA Adinolfi M; mc coll i. permeability of the amniotic membrane and its potencial application for transplantation purposee. Int. biol. res pregnancy 1982;2 (1); 23-7.
- 4.- Artuson g. Pathophysiological aspects of the burns syndrome with special reference to liver injury and alterations of capillary permeability. Act chir scandinav suppl 1961; 274.
- 5.- Artz C.P. , Moncrief J.A., Pruitt b.a. in burns a tem approach. w. b. saunders 1979.
- 6.- Artz C.P. Improvin oral protein nutrition. Postgrad med. 1968;43:223.
- 7.- Benevides A. Perroni C. Vespesianti R. Beneficios de la utilizacion de membranas placentarias en quemaduras en niños. rev argentina quemaduras 1984;2;25.
- 8.- Brown J.B. Postmortem homografts as biologic dressing for extensive burns and denuded area. An Surg 1953;138;164.
- 9.- Burgos H. , page w. The maintenance of human amniotic membranes in culture. Brit J Obst and Ginecol 1981;88:294.
- 10.- Burke J.F. May J.W. Albrigh N., et al. Temporary skin transplantation and inmunosupresion for extensive burns. N. Engl J. Med 1974;290:269.
- 11.- Burke j.f., Constable j.d. systemic changes and replacement therapy in burns. J. Trauma 1965;5:242
- 12.- Carnes R. Sking banking in manual of burns therapeutics: an interdiciplinary approach de salisbury r.e. Newman N.M., Dingegeldein G.P. little, brown and Co. Boston 1986;273.
- 13.- Cannon B. Cope O. Rate of epithelial regeneration. a clinical method of measurement and the effect of varius agentes recommended in the treatment of burns. 1943;117:85.
- 14.- Colocho G., Graham W.P., Greene A.E., Matheson D.W., Lynch D. Human amniotin membranes as physiologic wond dressing. Arch Surg 1974;109:370.
- 15.- Cope O., Graham J.B., Morre., Ball. The redistribution of body water and fluid teraphy of the burned patient. Ann Surg 1947;126:1010.
- 16.- Danforth D.N., Hull. The microscopic anatomy of the fetal membranes with particular reference to the detailed structure of amnion. Am J. Obst Giynecol 1958;75:536.
- 17.- Dino B.R. Eufemio G.G. Devilla M.S. Human amnion. establishment of an amnion bank and its practical applications in surgery. J. Phillip Med Assoc 1966;42:357.
- 18.- Douglas B. Homografts of fetal membranes as covering for large wonds especiálly form burns. J. Tenn Med Asoc 1952;45:230.

- 19.- Freshwater M.F., Krizek T.J. Skin grafting of burns. a centennial. *J. Trauma* 1971;11:862.
- 20.- Gallico G.G. et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl J. Med* 1984;311:448.
- 21.- Galask R.P. Synder . Antimicrobial factors in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 23:503.
- 22.- Ham A.W. Sistema reproductor femenino en tratado de histologia. Nueva Editorial Interamericana 1975:814.
- 23.- Heimbach D.M. Excision e injerto temprano en quemaduras. *Clin Quir N A* 1987;1:103.
- 24.- Johnson C.L., O'Shaughnessy E.J., Ostergen G. Tratamiento de las quemaduras. Ed. el manual moderno 1983:20.
- 25.- Krizek T.J. Robson M.C. Kho e. Bacterial growth on skin graft survival surg forum 1967;18:518.
- 26.- Kucan J.O. Amniotic membranes as dressings following dermoabration. *Ann Plastic Surg* 1981;5:518.
- 27.- Mattews R.N. A review of the role of amniotic membranes in surgical practice. *Obst Gynecol Ann* 1982;11:31.
- 28.- Mattews R.N. Wound healing using amniotic membranes. *Brit J. Plast Surg* 1981;34:456.
- 29.- Pahamut N. The place of the amniotic membranes in treatment of burns in children. *Aust Nurses J.* 1982;2:21.
- 30.- Pery j., Tsur H., Horowitz A., Garit F. Enzymatic chemical modification of human amniotic and human skin as a means for the preparation of biological dressing. *burn ingl; ther inj* 1982;31:207.
- 31.- Pritchard J.A., Mac Donald P.C. La placenta y las membranas fetales. *Williams Obstetricia.* Salvat editores 1980:102-144.
- 32.- Quimby W.C. Hoover H.C., Scheffan M., et al. Clinical trial of amniotic membranes in burn wound care. *Plast Reconst Surg* 1982;70:711.
- 33.- Rappaport E., Pepino A.T., Dietrick W. Early use of xenografts as biological dressing in burn trauma . *Amm J. Surg* 1970;12:144.
- 34.- Robson M.C., Krizek T.J. Predicting skin graft survival. *J Trauma* 1973;13:213.
- 35.- Robson m.c. , Krizek T.J. The effect of the human amniotic membranes on the bacterial population of infection rat burns. *Ann Surg* 1973;144:177.
- 36.- Robson M.C., Samburg J.L., kKizek T.J. Quantitative comparison of biological dressing. *J. Surg Res* 1973;14:431.
- 37.- Salisbury J.S. et al. The use of amniotic membranes in acute masive full thickness loss of the abdominal wall from clostriak myonecrosis. *Ann Plast Surg* 1979;3:558.
- 38.- Song I.C., Bromberg B.E., Mohn M.P., Koehlin E. Heterografts as biological dressing for large wounds. *Surgery* 1966;59:576.
- 39.- Soff H.S., Person E., Artz C.P. An analisis of alterations in body compositing in burned patients. nitrogen balance in burned children. in wallace a.b. wilkinson ann research in burns edimburg e & s. livingston l.t.d. 1966;147.

- 40.- Sutherland A.B., Batchelor A.D.R. Nitrogen balance in burned children. *Surg Gynecol Obst* 1961;112:425.
- 41.- Thompson P.D., Parks D.H. Monitoring banking, and clinical use of amnion as a burn wound dressing. *Ann Plast Surg* 1981;5:354.
- 42.- Trelford J.D., Trelford M.S. The amnion in surgery past and present. *Am J. Obst gynecol* 1979;134:833.
- 43.- Trelford M.S. et al. Replacement of the peritoneum with amnion following pelvic exenteration. *Surg Gynecol Obst* 1977;145:699.
- 44.- Walker A.B., Cooney D.R. Allen J.E. Use of fresh amnion as a burn dressing. *J. Pediatric Surg* 1977;12:391.
- 45.- Prodros K.N., Lytle C.D. Effects of two viral inactivation methods on platelets laser-uv radiation and merocyanine 540-mediated photoinactivation. *blood-cells* 1992;18:101-16.
- 46.- Delgado A.A., Schaaf N.G., Dynamic ultraviolet sterilization of different implant types. *int-j oral-maxillofac-implants* 1990;5:117-25.
- 47.- Wright ka, trump jg "high energy electrons for the irradiation of blood derivatives". *proc. sixth cong. int. soc. blood transfusion, Bibl. Haemat.* 7, 1956, 230-39.
- 48.- Vilchis L.J. , Membranas amnióticas como apósitos biológicos: utilidad clínica después de un almacenaje prolongado, Tesis de posgrado, PEMEX, 1993.
- 49.- Maldonado A.H., Estudio bacteriológico de membranas amnióticas como apósito biológico en quemaduras, Tesis de posgrado, PEMEX, 1989.
- 50.- Turner TC, Bassett Cal. pate JW, Sawyer pn, Trump jg , Wright ka "sterilization of preserved bone grafts by high voltage cathode irradiation". *J. bone jt. Surg.* 38-a, n° 4, 1956, 862-84.
- 51.- Bassett cal; hurley ia, stinchfield fe "the fate of long term anorganic bone implants". *transplant. bull.* 29 n° 4, april 1962.
- 52.- Cohen j "Cathode ray sterilization of bone grafts". *a.m.a. Arch. Surg.* v 71, nov. 1955, 784-789.
- 53.- Meeker ia, gross re "low temperature sterilization of organic tissue by high voltage cathode ray irradiation". *science* 114, n° 2959, 1951, 283-85.
- 54.- Dunn CG, Campbell WL fram H., Hutchins. A "biological and photochemical effects of high energy, electrostatically produced, roentgen rays and cathode rays" *J. Appl. Phys.* 19. 1948, 605.
- 55.- Basset cal "Tissue banks", aspects theoriques et industriels de la lyophilisation, rey l ed. hermann, paris 1964, 433.
- 56.- Urist MR, Dowell TA, HAY PH, strates bs, *Clin. Orthop.* 59, 1968, 59.
- bailey aj, "Effects of ionizing radiation on connective tissue components", *int. rev. conn. tissue res.*, hall da ed., ap, new york, USA, 4, 1968, 233.
- 57.- Balint jb, "rRd. sterilization of impl. for rec. surg. of kinesthetic organs". in *steril. & preservation of biol. tissues by ionizing radiation. i.a.e.a. Ed. Publ.* 1970, Vienna, Aust. 43-45.
- 58.- Buring k "Ionizing radiation for sterilization of bone". in *steril. & preserv. of biol. tissues by ion. rad. i.a.e.a. Ed. Publ.* 1970, Vienna, Aust. 71-78.

- 59.- Barnard on "Experience with human heart transplantation". steril. & preserv. of biol. tissues by ion. rad. i.a.e.a. Ed. Publ. 1970, Vienna, Austria 79-94.
- 60.- Gibbons Jrp, Alladine fa "Homograft heart valve replacement". steril. & preserv. of biol. tissues by ion. rad. i.a.e.a. Ed. Publ. 1970, Vienna Austria, 95-105.
- 61.- Wright ka, Trump jg "Cooperative studies in the use of ionizing rad. for sterilization and preservation of biological tissues". steril. & preserv. of biol. tissues by ion. rad. i.a.e.a. Ed. Publ. 1970, Vienna, Aust. 107-118.
- 62.- Little k "Some effects of sterilizing doses of radiation on biological tissues". Steril. & preserv. of biol. tissues by ion. rad. i.a.e.a. Ed. Publ. 1970, Vienna, Aust. 37-41.
- 63.- Stachowicz W, Ostrwski K, Diedzic A.,Komender a."On free radicals evoked by radiosterilization in preserved bone grafts". steril. & preserv. of biol. tissues by ion. rad. i.a.e.a. Ed. Publ. 1970, Vienna Aust. 15-27.
- 64.- s. pellet jun., a gallyas and l. gazso, changes in biological properties of pigskin prepared as a biological dressing by preservation and radiation-sterilization, burns 1978; 7:49-51.
- 65.- Glyn O. Phillips, La tecnologia de las radiaciones en la cirugia y la industria farmaceutica , Boletin OIEA, Vol. 36, n° 1, 1994.