

Modelo experimental de brida amniótica en ratas: descripción del modelo y estudio morfológico inicial

S. López-Fernández, J.L. Encinas, S. Hernández-Martín, A. Vilanova, A. Sánchez, F. Hernández, M. López Santamaría, J.A. Tovar

Departamento de Cirugía Pediátrica. Hospital Universitario La Paz. Madrid

RESUMEN

Objetivo. Describir un nuevo modelo experimental de brida amniótica en ratas y mostrar los resultados morfológicos iniciales.

Material y métodos. El modelo se creó mediante ligadura con seda de una pata trasera de los fetos el día 17 de gestación; en determinados fetos la ligadura fue retirada el día 19 de gestación. Los fetos se extrajeron mediante cesárea el día 21 de gestación, analizando sus pesos y las características morfológicas de sus patas traseras.

Utilizamos 10 ratas SD gestantes, con un peso de 263 g (231-279). Se analizaron 113 fetos repartidos en 6 grupos: fetos de ratas control (n=28), apertura y cierre uterino (n=7), creación de brida (n=28), creación y retirada de la brida (n=14) y fetos a los que no se intervino pero formaban parte de las camadas de los grupos en que se creó la brida (n=19) y de los que se creó y se retiró (n=17). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante test paramétricos considerando significativas diferencias con $p < 0,05$.

Resultados. Los fetos intervenidos (ligadura y ligadura con retirada) mostraron diferencias estadísticamente significativas en el peso (medias=4,56 g y 4,4 g) y longitud de patas traseras (medias=3,97 mm y 5,34 mm) respecto al resto de grupos, no así el grupo de apertura y cierre uterino sin actuación sobre el feto. La tasa de abortos en fetos intervenidos fue del 16,6% y la de amputaciones del 8,3%.

Discusión. Se describe un modelo experimental viable y reproducible de bridas amnióticas, con posibles aplicaciones, tanto en el estudio de la enfermedad como en el papel de la cirugía fetal sobre la misma.

PALABRAS CLAVE: Modelo experimental; Brida amniótica; Ratas; Cirugía fetal.

Methods. The model was created by ligation of a hind limb with silk on day 17 of gestation; in selected fetuses ligation was withdrawn on day 19 of gestation. Fetuses were removed by cesarean section on day 21 of gestation, analyzing their weights and morphological characteristics of their hind legs.

We used 10 pregnant SD rats, weighing 263 g (231-279). One hundred and thirteen fetuses were analyzed divided into 6 groups: fetuses from control rats (n=28), uterine opening and closing (n=7), band creation (n=28), band creation and subsequent removal (n=14) and not intervened fetuses of the litters in which the band was created (n=19) and that the band was created and removed (n=17). Comparisons between groups were made using parametric tests considering $p < 0.05$ as a threshold for significance.

Results. Operated fetuses (band creation and band creation and removal) showed statistically significant differences in weight (mean=4.56 g and 4.4 g) and length of their hind limbs (mean=3.97 mm and 5.34 mm) compared to the rest of the groups.

The rate of abortions in operated fetuses was 16.6% and the rate of amputations was 8.3%.

Discussion. A viable and reproducible experimental model of amniotic band is described, with potential applications in both the study of the disease and the role of fetal surgery thereon.

KEY WORDS: Experimental model; Amniotic band; Rats; Fetal surgery.

EXPERIMENTAL MODEL OF AMNIOTIC BAND IN RATS: MODEL DESCRIPTION AND INITIAL MORPHOLOGICAL STUDY

ABSTRACT

Purpose. Our objective is to describe a new experimental model of amniotic band in rats and to show the initial morphological results.

Correspondencia: Dr. Sergio López Fernández. Departamento de Cirugía Pediátrica. Hospital Universitario La Paz. Pº de la Castellana 261. 28046 Madrid
E-mail: slopezf@salud.madrid.org

Presentado en el 52 Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica, 15-17 de Mayo de 2013. Palma de Mallorca. España

Recibido: Mayo 2013

Aceptado: Diciembre 2013

INTRODUCCIÓN

Las bridas amnióticas constituyen un conjunto de malformaciones congénitas que se caracterizan por una constricción anular de distintas partes del organismo, siendo las extremidades un lugar preferente de formación, con unos resultados variables como efecto de la estrangulación progresiva provocada por la brida⁽¹⁾ llevando, en casos severos, a la amputación de las estructuras involucradas⁽²⁾. Distintas teorías se han establecido acerca de su origen, conformándose básicamente en 2 modelos, el intrínseco y el extrínseco, en función de la posible etiopatogenia debida a factores embriogénicos (principalmente, daños vasculares) o a factores exógenos (incluyendo disrupciones amnióticas), respectivamente, siendo ambas teorías aceptadas en la actualidad^(3,4).

La principal opción terapéutica en los casos graves con alto riesgo de aparición de lesiones irreversibles o amputación es la cirugía fetal, cada vez más aceptada al reducirse la morbimortalidad asociada a la misma en función de la experiencia y los avances técnicos⁽⁵⁻⁹⁾.

Distintos modelos experimentales se han empleado en el estudio de esta patología, tanto de su etiopatogenia como del papel de la cirugía fetal sobre la misma, generalmente empleando animales relativamente grandes en los que la cirugía fetal experimental sobre los mismos está ampliamente descrita⁽¹⁰⁻¹²⁾ o con métodos de provocación que reproducen la patología en un número limitado de fetos⁽¹³⁾. Nuestro objetivo es describir un nuevo modelo experimental de brida amniótica en animales de experimentación relativamente económicos y de uso generalizado (ratas), con una alta efectividad patogénica mediante el empleo de técnicas quirúrgicas sencillas y mostrar los resultados morfológicos iniciales obtenidos en la creación de dicho modelo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de animales

Se utilizaron 10 ratas Sprague-Dawley gestantes de entre 231 y 279 g (mediana de 263 g). La gestación fue determinada mediante citología vaginal tras permanecer la noche junto a un macho de la misma raza, considerándose como resultado positivo la presencia de espermatozoides en la citología vaginal analizada en el microscopio óptico. El día de determinación se consideró día 0 de gestación.

Determinación de grupos

Se establecieron 3 grupos de ratas gestantes en función de las posteriores actuaciones sobre los fetos:

- Grupo control (n=2): ausencia de actuación sobre los fetos.
- Grupo 1 (n=5): creación de la brida mediante ligadura de pata trasera el día 17 de gestación. En este grupo también se realizó en determinados fetos apertura y cierre uterino sin actuación sobre el feto.
- Grupo 2 (n=3): creación de la brida el día 17 de gestación y retirada de la misma el día 19 de gestación.

Los fetos de las ratas gestantes se extrajeron en todos los casos mediante cesárea el día 21 de gestación.

De un total de 140 fetos obtenidos se analizaron 113 divididos en 6 grupos de estudio en función de las ratas gestantes a las que pertenecían y a las intervenciones previas realizadas sobre los mismos:

- Gestantes control:
 - Fetos control (n=28).
- Gestantes del grupo 1:
 - Fetos con apertura y cierre uterino (n=7).
 - Fetos con creación de brida (n=28).
 - Fetos control del grupo 1, en los que no se actuó sobre el feto ni sobre el útero (n=19).

- Gestantes del grupo 2:
 - Fetos con creación y retirada de brida (n=14).
 - Fetos control del grupo 2, en los que no se actuó sobre el feto ni sobre el útero (n=17).

Preparación preoperatoria

Los animales se alojaron en nuestras instalaciones, acreditadas por las autoridades sanitarias regionales de acuerdo con la actual regulación de la Unión Europea, como mínimo 1 semana antes de la intervención a fin de asegurar su aclimatación al centro. No hubo restricción de alimentos sólidos ni líquidos previa a la cirugía. En el momento de la intervención se controló la temperatura (entre 21 y 23°C) y bajo el campo quirúrgico se colocó una manta térmica para compensar la pérdida de calor durante la intervención. Como método anestésico utilizamos la inhalación de sevoflurano tanto para la inducción (4%) como para el mantenimiento (2%). Se rasuró el vientre de los animales desde el apéndice xifoides hasta la región inguinal, con posterior desinfección de la zona con povidona yodada y delimitación del campo quirúrgico con paño fenestrado estéril. Preoperatoriamente se administró subcutáneamente tratamiento antibiótico (cefazolina 15 mg/kg) y analgésico (meloxicam 0,4 mg/kg). La cirugía se llevó a cabo mediante una técnica quirúrgica limpia pero no estéril.

Procedimientos quirúrgicos

En todos los casos se realizó laparotomía media y exteriorización del útero de la rata gestante para actuar directamente sobre el mismo. La elección de los fetos a intervenir fue aleatoria, evitando intervenir a fetos contiguos de la misma camada. La apertura uterina se realizó en todos los casos mediante creación de una bolsa de tabaco con Prolene 5/0 y apertura hasta la cavidad amniótica, y finalizada la intervención el cierre uterino se llevó a cabo mediante cierre de la bolsa de tabaco. En los casos de pérdida abundante de líquido amniótico (>0,5 cc) se repuso con Ringer Lactato antes del cierre uterino. Tras la intervención el cierre de la pared abdominal se realizó mediante suturas continuas reabsorbibles (Vicryl 4/0) del plano muscular y de la piel.

Apertura y cierre uterino: histerotomía y cierre uterino según la técnica descrita sin actuación sobre el feto.

Creación de brida (Fig. 1): exteriorización de la pata trasera con extremo cuidado en su manipulación y colocación de ligadura de seda 5/0 en su parte proximal (entre la cadera y la rodilla) sin llegar a provocar signos de isquemia distal. Reintroducción de la pata en la cavidad amniótica y cierre uterino.

Retirada de brida: apertura uterina respetando la localización de la incisión uterina previa. Exteriorización de la pata trasera y retirada de la ligadura. Reintroducción de la pata en la cavidad amniótica y cierre uterino.

Cuidados postoperatorios

Tras la intervención los animales fueron acomodados en sus jaulas con disponibilidad inmediata de agua y alimento sólido. Se administró tratamiento antibiótico (cefazolina 15

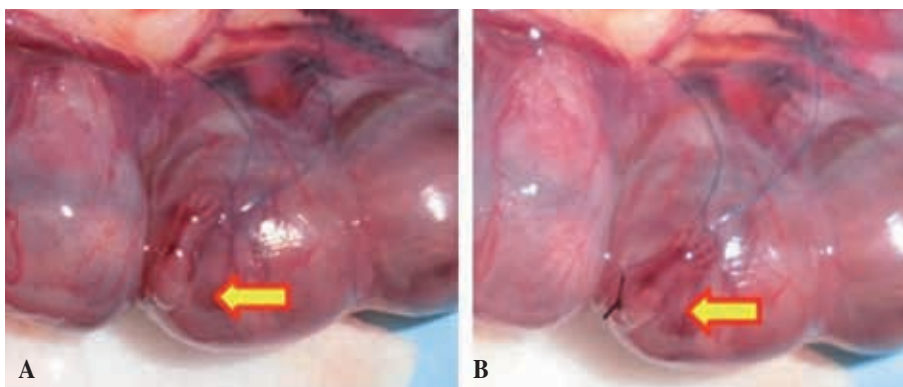


Figura 1. Exteriorización de pata trasera (a) y ligadura de la misma (b).

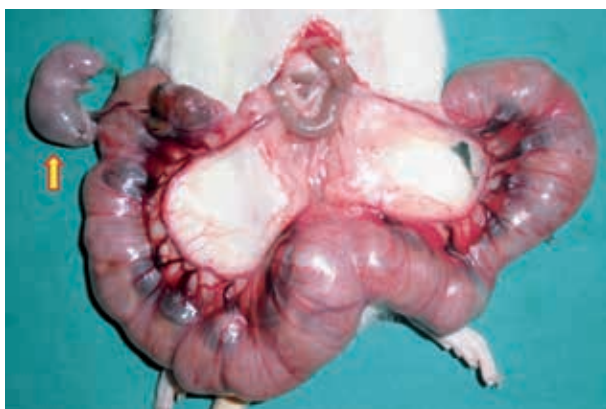


Figura 2. Extracción de feto.

mg/kg/24 h) y analgésico (meloxicam 0,4 mg/kg/24 h) subcutáneo durante las primeras 48 horas postoperatorias.

Extracción de muestras

La extracción de fetos se llevó a cabo en todas las ratas gestantes el día 21 de gestación, utilizando anestesia inhalatoria (sevoflurano). Mediante laparotomía media se exteriorizó el útero y los fetos se extrajeron mediante histerotomía (Fig. 2), con posterior sacrificio de los mismos por congelación. Tras la extracción las ratas gestantes fueron sacrificadas mediante esanguinación, permaneciendo anestesiadas hasta la constatación del fallecimiento.

Variables analizadas

En las ratas gestantes se compararon el peso durante la gestación (días 0 y 21 de gestación), la ganancia de peso, el número de fetos en cada camada y la relación entre las medidas anteriores. También se analizaron los tiempos quirúrgicos de las distintas intervenciones.

En los distintos grupos de fetos se compararon la tasa de abortos en cada grupo, el peso tras la extracción, la tasa de amputaciones de la extremidad intervenida y las características morfológicas de las patas traseras y la longitud distal de las mismas (desde la rodilla hasta la parte distal del pie), utili-

zando para la medición la documentación fotográfica junto con una regla.

Las comparaciones entre los distintos grupos se realizaron mediante test estadísticos paramétricos (ANOVA y procedimiento de Bonferroni para comparaciones múltiples). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

La ganancia de peso de las ratas gestantes entre los días 0 y 21 de gestación fue significativamente menor en el grupo 2 (ratas a las que se intervino en 2 ocasiones durante la gestación, los días 17 y 19) que en el grupo control ($p = 0,047$), no así en el grupo 1 (intervenidas sólo el día 17), aunque tras ponderar esta ganancia entre el número de fetos de cada camada y comparar los 3 grupos las diferencias no se mostraron estadísticamente significativas (Tabla I).

La mediana de tiempo empleado en la creación de la brida en las ratas gestantes fue de 52,5 minutos (40-70), mientras que en la retirada de las bridas se empleó una mediana de 35 minutos (30-40) por cada rata gestante intervenida.

El porcentaje de abortos en los fetos intervenidos fue del 11,7% en el grupo 1 (incluyendo el grupo de apertura y cierre uterino) y del 28,5% en el grupo 2, resultando un porcentaje total de abortos del 16,6% de los fetos sometidos a manipulación quirúrgica (Tabla II). El porcentaje de amputaciones de las extremidades intervenidas fue del 8,3%.

El peso tras la extracción de los fetos, excluyendo los abortos fue, significativamente, menor ($p < 0,05$) en el grupo de creación de brida ($4,56 \pm 0,43$ g) y en el de creación y retirada de brida ($4,4 \pm 0,7$ g) que el peso de los fetos del resto de grupos (control, apertura y cierre uterino y controles de las ratas gestantes 1 y 2). Del mismo modo la longitud de las patas traseras, excluyendo las amputaciones, fue significativamente menor ($p < 0,05$) en el grupo de creación de brida ($3,97 \pm 1,44$ mm) y en el de creación y retirada de brida ($5,34 \pm 1,15$ mm) que la longitud de las patas traseras de los fetos del resto de grupos. Los resultados se muestran en las tablas III y IV.

Tabla I. Análisis de peso de ratas gestantes.

Grupo	Media peso día 0 (g)	Media peso día 21 (g)	Ganancia de peso (g)	Nº fetos	G/Nº (g)
C	250	395	145	14	10,3
1	263	396	132	15,2	8,8
2	256	367	111*	12	9,4

C: grupo control; 1: grupo 1; 2: grupo 2; ganancia de peso: incremento medio de peso durante la gestación (gramos); Nº fetos: número medio de fetos por camada; G/Nº: ganancia media de peso entre el número medio de fetos por camada.

Tabla III. Análisis de peso de fetos (excluyendo abortos).

Grupo	Nº fetos	Media de pesos (g)
Control	28	5,07
Ligadura	23	4,56*
Apertura y cierre uterino	7	4,92
Control grupo ligadura	19	5
Ligadura + retirada	10	4,4*
Control grupo ligadura + retirada	17	4,76

Nº fetos: número total de fetos de cada grupo; media de pesos: media de los pesos de los fetos de cada grupo.

Comparando aisladamente los grupos de los fetos intervenidos entre sí, los fetos en los que se creó la brida el día 17 y se retiró el día 19 de gestación mostraron una mayor longitud de la pata trasera intervenida que los fetos en los que se creó la brida el día 17 y no se retiró ($5,34 \pm 1,15$ mm frente a $3,97 \pm 1,44$ mm), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,001$). La diferencia de peso entre ambos grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas.

En lo referente al análisis morfológico de las patas traseras de los fetos en los que se creó la brida, excluyendo los casos de abortos (Fig. 3a) y amputaciones (Fig. 3b), encontramos 2 patrones diferenciados en lo referente al desarrollo de la extremidad: en unos casos, la parte distal a la brida tiende a la atrofia, mostrando menor longitud y anchura que la pata contralateral no intervenida (Fig. 4a) mientras que, en otros casos, aun permaneciendo con menor longitud que la contralateral, la extremidad se muestra aumentada de grosor y de aspecto edematoso (Fig. 4b). En los fetos en los que se retiró la brida, el aspecto macroscópico muestra también ambos patrones morfológicos, si bien las diferencias son más atenuadas.

DISCUSIÓN

Se describe un nuevo modelo experimental de brida amniótica en ratas que reproduce la patología mediante la provo-

Tabla II. Análisis de abortos.

	Fetos			
	Nº fetos	intervenidos	Nº abortos	% abortos
Control	28	0	0	0%
Grupo 1	76	34	4	11,7%
Grupo 2	36	14	4	28,5%
Total	140	48	8	16,6%

Nº fetos: número total de fetos analizados en cada grupo; fetos intervenidos: número total de fetos intervenidos en cada grupo; Nº abortos: número total de abortos en cada grupo; % abortos: porcentaje de abortos respecto al número de fetos intervenidos.

Tabla IV. Análisis de longitud de patas traseras de fetos (excluyendo amputaciones).

Grupo	Nº fetos	Media de longitud (m)
Control	28	7,22
Ligadura	20	3,97*
Apertura y cierre uterino	7	7,04
Control grupo ligadura	19	6,88
Ligadura + retirada	9	5,34*
Control grupo ligadura + retirada	17	6,95

Nº fetos: número total de fetos de cada grupo; media de longitud: media de la longitud de la pata trasera de los fetos de cada grupo

cación extrínseca de compresión progresiva de la extremidad durante el desarrollo fetal.

Con el reciente desarrollo de la cirugía fetal mínimamente invasiva, el número de intervenciones prenatales ha aumentado⁽¹⁴⁻¹⁷⁾, pero aún no existe un consenso claro sobre la indicación ni sobre el momento idóneo de actuación prenatal sobre los fetos con bridas amnióticas^(5,18,19), lo cual hace de la investigación, y dentro ella el desarrollo de modelos experimentales, una parte fundamental en el estudio de esta patología.

En el presente estudio se describe la reproducción de alteraciones morfológicas provocadas por bridas amnióticas en un número relativamente elevado de animales. La tasa de abortos obtenida en los fetos intervenidos (16,6%) es justificable, tanto por la propia agresión quirúrgica, como por las dificultades técnicas al inicio del desarrollo del modelo, y la tasa de amputaciones (8,3%) puede estar en relación, tanto al efecto de la brida creada como a una incorrecta técnica quirúrgica inicial hasta el dominio de los distintos pasos de la intervención, siendo el momento de mayor riesgo de amputación iatrogénica la reintroducción de la extremidad exteriorizada a la cavidad amniótica, por lo tanto es esperable que, tanto la tasa de abortos como la de amputaciones, se vea reducida en el futuro en base a una mayor experiencia en la técnica quirúrgica. Las diferencias observadas en cuanto a los pesos de

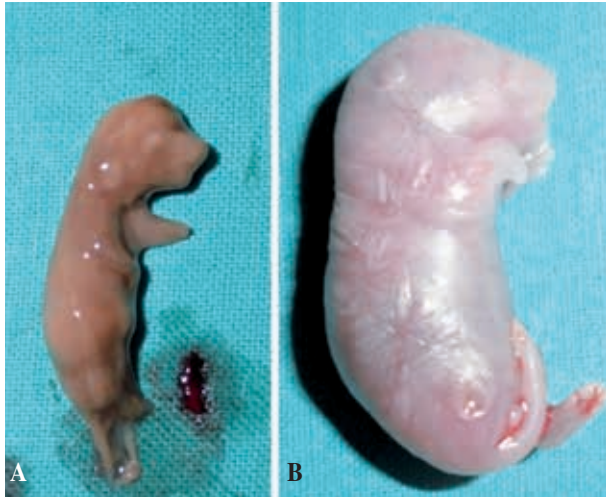


Figura 3. Aborto (A) y amputación de pata trasera (B).

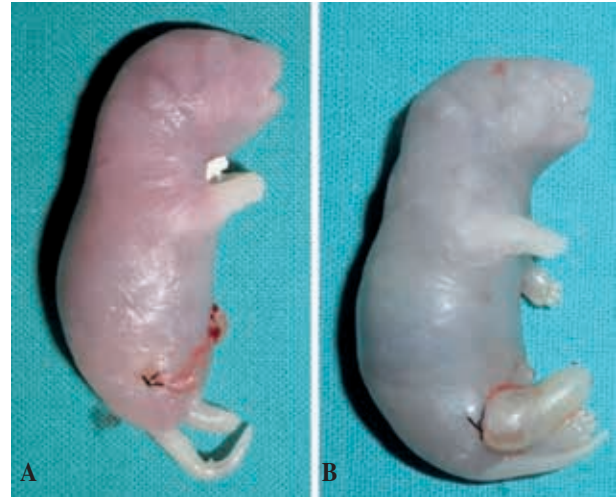


Figura 4. Pata atrófica (A) y pata edematosa (B).

los fetos llevan a concluir que la agresión quirúrgica sobre los mismos interfiere con su ganancia ponderal, si bien la agresión sobre la pared uterina y la membrana amniótica “per se” no produce el mismo efecto, ya que el peso se vio reducido sólo en los grupos en los que se manipuló el feto (creación de brida y creación y retirada); por otra parte, tanto la menor longitud de las patas intervenidas, como el incremento del desarrollo de las mismas tras la liberación de la brida respecto al grupo en que no se liberó eran efectos esperables y, en cierto modo, indispensables para la validación del modelo, ya que son hechos comprobados en la historia de la enfermedad.

Distintos modelos experimentales han sido descritos previamente en el estudio de esta patología. Dentro de las técnicas descritas para la reproducción de la patología, cabe destacar el modelo en conejos descrito por Galván y cols.⁽¹³⁾ en el que se provocan distintas alteraciones morfológicas (incluyendo bridas amnióticas) mediante punción uterina al provocar disrupciones de la membrana amniótica, aunque con escasa rentabilidad, ya que la proporción de fetos afectados es limitada. Otro modelo es el descrito por Crombleholme y cols. en ovejas⁽¹²⁾, posteriormente desarrollado por Soldado y cols.^(10,11) en el que se describe un modelo de brida amniótica mediante un procedimiento similar al descrito en el presente artículo, pero conlleva una gestación más prolongada, un número limitado de fetos por cada animal gestante, necesidad de instalaciones específicas, tanto para la cirugía como para la estabulación y, consecuentemente, una mayor inversión económica para la obtención de un determinado tamaño muestral. Nuestro modelo es fácilmente reproducible, económico, hace uso de animales de trato cotidiano en la experimentación, emplea una técnica microquirúrgica sencilla, el número de fetos en los que se produce la enfermedad es controlable por el experimentador en cada camada, la localización de la brida es electiva y el porcentaje de abortos descrito es aceptable, por lo tanto, se muestra *a priori* como un modelo adecuado, tanto para

el estudio de la enfermedad en sí como para la investigación del papel que desempeña la cirugía fetal sobre la misma. Los principales inconvenientes del modelo descrito son la creación de la brida de forma extrínseca, no pudiendo reproducir el modelo etiopatogénico intrínseco de formación de bridas⁽²⁰⁻²³⁾ y la necesidad de una mejor caracterización de las muestras obtenidas, principalmente en base al estudio anatomopatológico de las mismas, por lo que futuras investigaciones sobre el modelo son necesarias para un mejor desarrollo del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tadmor OP, Kreisberg GA, Achiron R, Porat S, Yagel S. Limb amputation in amniotic band syndrome: serial ultrasonographic and Doppler observations. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997; 10: 312-5.
2. Torpin R. Amniochorionic Mesoblastic Fibrous Strings and Amniotic Bands: Associated Constricting Fetal Malformations Or Fetal Death. *Am J Obstet Gynecol.* 1965; 91: 65-75.
3. Cignini P, Giorlandino C, Padula F, Dugo N, Cafà EV, Spata A. Epidemiology and risk factors of amniotic band syndrome, or ADAM sequence. *J Prenat Med.* 2012; 6: 59-63.
4. Kiehn M, Leshem D, Zuker R. Constriction rings: the missing link. *Eplasty.* 2007; 8: e4.
5. Husler MR, Wilson RD, Horii SC, Bebbington MW, Adzick NS, Johnson MP. When is fetoscopic release of amniotic bands indicated? Review of outcome of cases treated in utero and selection criteria for fetal surgery. *Prenat Diagn.* 2009; 29: 457-63.
6. Kawamura K, Chung KC. Constriction band syndrome. *Hand Clin.* 2009; 25: 257-64.
7. Keswani SG, Johnson MP, Adzick NS, Hori S, Howell LJ, Wilson RD, et al. In utero limb salvage: fetoscopic release of amniotic bands for threatened limb amputation. *J Pediatr Surg.* 2003; 38: 848-51.
8. Moran SL, Jensen M, Bravo C. Amniotic band syndrome of the upper extremity: diagnosis and management. *J Am Acad Orthop Surg.* 2007; 15: 397-407.

9. Ronderos-Dumit D, Briceno F, Navarro H, Sánchez N. Endoscopic release of limb constriction rings in utero. *Fetal Diagn Ther.* 2006; 21: 255-8.
10. Soldado F, Peiro JL, Aguirre M, Moll X, García-Fontecha C, Giné C, et al. Extremity amniotic band syndrome in fetal lamb. I: An experimental model of limb amputation. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195: 1607-10.
11. Soldado F, Aguirre M, Peiro JL, Fontecha CG, Esteves M, Velez R, et al. Fetal surgery of extremity amniotic bands: an experimental model of in utero limb salvage in fetal lamb. *J Pediatr Orthop.* 2009; 29: 98-102.
12. Crombleholme TM, Dirkes K, Whitney TM, Alman B, Garmel S, Connelly RJ: Amniotic band syndrome in fetal lambs. I: Fetoscopic release and morphometric outcome. *J Pediatr Surg.* 1995; 30: 974-8.
13. Galván A, Álvarez E, Parraguirre S, Suárez ML, Pérez A. Development of a fetal rabbit model to study amniotic band syndrome. *Fetal Pediatr Pathol.* 2012; 31: 300-8.
14. Watanabe M, Flake AW. Fetal surgery: progress and perspectives. *Adv Pediatr.* 2010; 57: 353-72.
15. Beck V, Lewi P, Gucciardo L, Devlieger R. Preterm prelabor rupture of membranes and fetal survival after minimally invasive fetal surgery: a systematic review of the literature. *Fetal Diagn Ther.* 2012; 31: 1-9.
16. Deprest JA, Flake AW, Gratacos E, Ville Y, Hecher K, Nicolaides K. The making of fetal surgery. *Prenat Diagn.* 2010; 30: 653-67.
17. Luks FI. New and/or improved aspects of fetal surgery. *Prenat Diagn.* 2011; 31: 252-8.
18. Peiro JL, Carreras E, Soldado F, Sánchez-Duran MA, Aguirre M, Barber I. Fetoscopic release of umbilical cord amniotic band in a human fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009; 33: 232-4.
19. Richter J, Wergeland H, DeKoninck P, De Catte L, Deprest JA. Fetoscopic release of an amniotic band with risk of amputation: case report and review of the literature. *Fetal Diagn Ther.* 2012; 31: 134-7.
20. Ross MG. Pathogenesis of amniotic band syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 197: 219-20; author reply 220.
21. Levy R, Lacombe D, Rougier Y, Camus E. Limb body wall complex and amniotic band sequence in sibs. *Am J Med Genet A.* 2007; 143A: 2682-7.
22. Dyer JA, Chamlin S. Acquired raised bands of infancy: association with amniotic bands. *Pediatr Dermatol.* 2005; 22: 346-9.
23. Daya M, Makakole M. Congenital vascular anomalies in amniotic band syndrome of the limbs. *J Pediatr Surg.* 2011; 46: 507-13.