

Experiencia nacional en la radioesterilización o radiodescontaminación de productos biológicos

E. Padrón, Z. Romay, I. Otero, A. Chávez, E. Prieto, D. Sainz, R. Rodríguez, D. Díaz.*

Introducción

La capacidad de las radiaciones ionizantes para destruir microorganismos está bien demostrada y se ha aplicado comercialmente con fines médicos. Este método es especialmente importante cuando otros métodos químicos y físicos no pueden utilizarse, o no dan el resultado requerido, por lo que el empleo de tecnologías de avanzada para la esterilización se encuentra en ascenso a nivel mundial. A tal efecto, el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), auspicia un programa coordinado para la radioesterilización de productos médicos y biológicos en América Latina, en el cual Cuba participa.

En los marcos de este programa, se desarrolló una tecnología para la radioesterilización de productos biológicos que se resume en:

- Determinación de la carga microbiana del producto y de la D_{10} de los contaminantes aislados;
- Determinación de las dosis mínima y máxima de esterilización sobre la base del contaminante más resistente; según [1]

- Determinación del rango de dosis y las condiciones en que el producto mantiene sus propiedades biológicas;
- Determinación de las condiciones adecuadas para el escalado industrial.

Durante varios años en el Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear se han realizado investigaciones con el fin de determinar la factibilidad del empleo de la radioesterilización y/o radiodescontaminación en productos biológicos con diferentes características, entre ellos nos referiremos a:

- Vacuna Antimeningocócica BC cubana [2]
- Suero de ternera (fetal y neonato) [3]
- Suero humano liofilizado [4]
- Biopreparado Hierro-Proteína (Trofín) [5]
- Tejido óseo humano liofilizado, para aloinjerto. Validación de la dosis según el Método 3 de la Norma ISO/DIS 11137 [6]

La irradiación de los diferentes productos estudiados, a nivel de laboratorio fueron realizadas en instalaciones autoblindadas que emplean como fuente de radiación ionizante el radionucleido

* Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear (CEADEN), La Habana, Cuba.

Cobalto-60 (MPX- γ -25 y PX- γ -30) y para garantizar el rango apropiado de temperatura durante el proceso de irradiación se utilizó un criostato MK-70. La calibración y controles de los procesos se hicieron con los dosímetros Fricke y Perspex (Red y Clear). El escalado en todos los casos, se efectuó en la Planta de Irradiación, ubicada en el Instituto de Investigaciones de la Industria Alimenticia, empleando el sistema dosimétrico cérico-ceroso para la calibración y el control de los procesos. Por la importancia que tiene la creación de condiciones apropiadas de baja temperatura durante el escalado, al final del trabajo nos referimos al estudio realizado para la evaluación del comportamiento de la mezcla refrigerante GELO-X en condiciones de irradiación.

Resultados y discusión

Vacuna Antimeningocócica BC cubana

Diferentes autores han explicado el uso de las radiaciones ionizantes para esterilizar vacunas. Tumenyan y col. [7] han recomendado 25 kGy para todo tipo de

Cuadro 1. Efectos de las radiaciones sobre el contenido de polisacáridos.

| Dosis (kGy) | Polisacáridos % del control | | |
|-------------|-----------------------------|---|-------|
| | x | ± | ds |
| 0 | 100 | | |
| 2,5 | 88,58 | ± | 4,897 |
| 5 | 84,24 | ± | 0,267 |
| 10 | 80,16 | ± | 4,882 |
| 15 | 81,11 | ± | 10,19 |
| 20 | 72,41 | ± | 1,767 |
| 25 | 65,89 | ± | 12,37 |
| 30 | 62,09 | ± | 5,840 |

vacuna antibacteriana, sin hacer estudios posteriores de los componentes ante las radiaciones ionizantes.

Dada la importancia social de la vacuna antimeningocócica, se realizó el estudio del efecto de cuantos gamma sobre este medicamento. Las pruebas para determinar la calidad de las vacunas irradiadas se hicieron según las normas cubanas [8,9]: esterilidad, concentración de proteínas y polisacáridos, inmunogenicidad, inocuidad inespecífica y porcentaje de adsorción de proteínas.

En los Cuadros [1-4] se resumen los resultados que demuestran que en el intervalo de dosis de 0 a 25 kGy no ocurren alteraciones significativas, incluso después de un año de almacenamiento. Sin embargo, dosis superiores (30 kGy) causan una disminución en la inmunogenicidad del medicamento.

A partir de los resultados obtenidos se realizó el escalado, lográndose la esterilidad de un lote experimental, contaminado artificialmente con un *Bacillus sp* aplicando una dosis adecuada según la carga microbiana inoculada, a una temperatura de 4°C.

Cuadro 2. Efectos de las radiaciones sobre el contenido de proteínas.

| Dosis (kGy) | Proteínas | | |
|-------------|-----------|---|--------|
| | x | ± | ds |
| 0 | 0,224 | ± | 0,013 |
| 2,5 | 0,2314 | ± | 0,0113 |
| 5 | 0,22953 | ± | 0,0124 |
| 10 | 0,2214 | ± | 0,0003 |
| 15 | 0,2323 | ± | 0,0186 |
| 20 | 0,233 | ± | 0,0264 |
| 25 | 0,24424 | ± | 0,0053 |
| 30 | 0,23267 | ± | 0,0165 |

Cuadro 3. Efecto de las radiaciones sobre la inmunogenicidad.

| Dosis (kGy) | Dilución | U/mL |
|-------------|----------|------|
| 15 | 1:200 | 2455 |
| 20 | | 1268 |
| 25 | | 3288 |
| 30 | | 565 |
| 15 | 1:400 | 3429 |
| 20 | | 2026 |
| 25 | | 4221 |
| 30 | | 1157 |
| 15 | 1:800 | 6046 |
| 20 | | 3358 |
| 25 | | 5119 |
| 30 | | 1600 |

Cuadro 4. Efecto de las radiaciones sobre la inmunogenicidad de la vacuna irradiada, al año de almacenada en frío y oscuridad.

| Dilución | Dosis (kGy) | U/ml |
|----------|-------------|------|
| 1:800 | 8 | 3591 |
| | 10 | 3150 |
| | 15 | 2228 |
| 1:1600 | 8 | 3783 |
| | 10 | 3311 |
| | 15 | 2106 |
| 1:9200 | 8 | 3767 |
| | 10 | 3540 |
| | 15 | 2053 |

Suero de ternera

Los sueros de mamíferos, incluyendo el humano, se emplean en el cultivo de células de origen animal o humano, hibridomas, fabricación de vacunas, medios diagnósticos y otros.

El suero de ternero (fetal o neonato) tiene una gran demanda en el país y su producción no tenía un nivel de calidad adecuado.

En este estudio se utilizaron 3 tipos de sueros tratados, recomendados para diferentes usos:

- a. filtrados por filtros de nitrocelulosa de 0,22 μ de poro e inactivado a 56°C.
- b. filtrados por filtros de nitrocelulosa de 0,22 μ de poro.
- c. filtrados por filtros de nitrocelulosa de 0,22 μ de poro y clarificado por centrifugación .

Se evaluó el efecto de las radiaciones según [10-12] en un rango de dosis entre 0

y 29 kGy a temperatura entre 0-4°C en frascos de 25 mL. La contaminación del producto se simuló utilizando cepas de *E. coli* y *Salmonella sp.* Para un SAL de 10^{-6} la dosis apropiada fue de 25 kGy, la misma garantiza la eliminación de otros elementos que no deben estar presentes en los hemoderivados como: virus, micoplasma, endotoxinas y pirógenos.

En el Cuadro 5 se muestran los resultados de las pruebas de toxicidad al producto irradiado.

En el Cuadro 6 se aprecian los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas. Los valores más elevados encontrados corresponden al suero clarificado.

El Cuadro 7 refleja los resultados de la promoción de crecimiento en las líneas celulares estudiadas, lo cual avala la calidad del producto irradiado.

El Cuadro 8 resume los resultados del escalado.

Cuadro 5. Pruebas de toxicidad

| Tratamiento | Endotoxinas bacterianas ng/mL | Pirógenos | Citotoxinas en cultivo [1] | Residual celular cel/mL [2] | Viabilidad celular residual % |
|--|-------------------------------|-----------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Filtrado e inactivado | 2-10 | negativo | hasta 50 % | 0 | 0 |
| Filtrado | 2-10 | negativo | hasta 50 % | 0 | 0 |
| Clarificado | 10-15 | negativo | hasta 50 % | (1,3-1,4) x 10 ⁶ | 0 |
| Control Irradiado, Firma SIGMA item 4087 | 10 | negativo | hasta 50 % | 0 | 0 |

[1] % en que puede incluirse en el medio de cultivo sin causar citotoxicidad.

[2] Conteo electrónico y técnica de exclusión con trypan blue.

Cuadro 6. Características bioquímicas (Suero Neonato).

| Tratamiento | Proteínas totales g /% | Albúmina g/% | Globulina g/% | Igs U | Hb mg/% | Osmol mOsmol/Kg | pH |
|-------------------------|------------------------|--------------|---------------|-----------|---------|-----------------|---------|
| Filtrado e inactivado | 4-6,45 | 2,5 - 4,31 | 2,15-3,23 | 7,6 - 9,5 | 15-30 | 240-340 | 7,1-7,4 |
| Filtrado | 4-6,45 | 3,01-3,44 | 2,15-3,20 | 7,9 - 8,6 | 15-20 | 240-340 | 7,0-7,5 |
| Clarificado | 7,4-8,1 | 3,0 - 4,5 | 2,5 - 3,0 | 9,4-11,0 | 50-100 | 260-340 | 7,2-7,6 |
| Control SIGMA irradiado | 3,98 | 2,19 | 1,79 | 7,9 | 20 | 240 | 7,1 |

Cuadro 7. Promoción del crecimiento celular*.

| Tratamiento | Eficiencia del anclaje, %. [1] | Tiempo de duplicación, horas. [2] | Conteo celular (a los 7 días) |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Filtrado e inactivado | 70 - 95 | 24 - 36 | (60 - 120) x 10 ⁵ |
| Filtrado | 75 - 98 | 12 - 24 | (70 - 150) x 10 ⁵ |
| Clarificado | 60 - 90 | 24 - 48 | (50 - 95) x 10 ⁵ |
| Control SIGMA irradiado | 70 - 95 | 24 - 36 | (60 - 140) x 10 ⁵ |

* No incluye cultivos primarios.

[1] Dependiente del tipo celular.

[2] En fase de crecimiento exponencial.

Se puede apreciar que el producto irradiado no se diferenció en su calidad biológica con una similar de la firma Sigma.

Cuadro 8. Resultados del escalado en la planta de irradiación "Producto I".

| Parámetro | Resultado | Parámetro | Resultado |
|------------------------|-------------|------------------------------|-----------|
| Proteínas totales | 4,7 g / % | Agentes adventicios: | |
| Proteínas fraccionadas | 3,5 g / % | BVD | Negativo |
| Globulinas | 1,9 g / % | ecp viral | Negativo |
| Hemoglobina | 7,0 u | hemoads, IF | Negativo |
| Osmolaridad | 20,0 mg / % | inmuno peroxidasa | Negativo |
| pH | 7,2 | Cuerpos de inclusión | Negativo |
| Endotoxinas | 4,2 ng / mL | Esterilidad a más de 30 días | Negativo |
| Citotoxicidad | 20 - 50 % | Micoplasma | Negativo |
| Pirógenos | Negativo | Viabilidad celular residual | Negativo |
| Residualidad celular | Negativo | | |

Suero humano liofilizado

En las áreas de producción no asépticas se aisló un microorganismo, identificado como *Flavobacterium sp.*, con el microsistema OXI-FERM (Bio Merieux, Francia). Este microorganismo se utilizó para simular la contaminación del producto.

El valor de D_0 se determinó en 0,088 kGy, mientras que D_{10} se calculó en 0,60 kGy. La carga bacteriana fue del orden de 10^3 . La dosis esterilizante calculada fue 8,5 kGy (dosis esterilizante I).

Para esa misma carga empleamos también una dosis de 25 kGy (dosis esterilizante II), considerada como dosis esterilizante por diferentes farmacopeas. La irradiación se realizó a 4°C.

EL Cuadro 9 muestra los resultados del efecto de las radiaciones gamma sobre algunos parámetros del suero. Los resultados de la prueba de esterilidad fueron satisfactorios de acuerdo con [13-15]. La concentración de proteínas totales y enzimas se alteran a la dosis esterilizante II. Es conocido que la radiosensibilidad de

las proteínas depende de su estructura y grado de complejidad.

En el Cuadro 10, se presenta la influencia de la radiación gamma sobre la concentración de diferentes fracciones proteicas del suero.

Solo las fracciones α_1 , α_2 y β tienden a crecer, mientras que la $IG\gamma$ disminuye ligeramente, similar a [16-18].

Para la prueba del efecto estimulador del crecimiento celular se utilizó la línea celular humana Jurkat/IL 2 mantenida en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado al 10 % con los sueros irradiados y con el suero control. La proliferación celular y la velocidad de crecimiento en el medio con suero irradiado a la dosis esterilizante I no se diferenció del control no irradiado.

Esta dosis estimuló una mayor multiplicación celular. El irradiado con la dosis I disminuyó la velocidad de crecimiento celular durante los primeros 7 días, e indujo un crecimiento más lento. La viabilidad del suero irradiado con 8,5 kGy fue de 98,5 %, superior al irradiado con la dosis II.

Cuadro 9. Efectos de los cuantos gamma sobre algunos componentes del suero liofilizado.

| Tipo de suero | pH | Proteínas totales | ALAT | ASAT | Fosfatasa alcalina |
|---------------------------|-----|-------------------|------------|------------|--------------------|
| Sin irradiar | 8,5 | 67,0 ± 6,0 | 14,5 ± 2,5 | 4,7 ± 0,44 | 44,0 ± 4,67 |
| Irradiado (dosis est, I) | 8,5 | 66,7 ± 3,6 | 17,0 ± 1,0 | 4,8 ± 1,6 | 37,67 ± 6,22 |
| Irradiado (dosis est, II) | 8,4 | 57,3 ± 3,4 | 3,0 ± 1,0 | 2,5 ± 0,5 | 32,3 ± 4,1 |

Cuadro 10. Efectos de los cuantos gamma sobre el contenido de diferentes fracciones proteicas. Electroforesis.

| Tipo de suero | Albúmina, % | α_1 % | α_2 % | β % | γ % |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Sin irradiar | 64,56 ± 1,34 | 2,0 ± 0,20 | 6,36 ± 0,31 | 9,97 ± 0,37 | 16,73 ± 0,99 |
| Irradiado (I) | 61,53 ± 0,22 | 5,6 ± 0,29 | 8,20 ± 0,07 | 10,30 ± 0,33 | 14,70 ± 0,53 |
| Irradiado (II) | 56,90 ± 1,36 | 6,8 ± 0,29 | 9,50 ± 0,20 | 11,60 ± 0,29 | 15,10 ± 0,16 |

El suero esterilizado a 8,5 kGy no presentó efecto citotóxico ni alteraciones morfológicas en la población.

La dosis esterilizante para la carga simulada fue adecuada y garantizó la esterilidad del suero sin provocar efectos nocivos al cultivo celular empleado. La dosis de 25 kGy no se recomienda, por cuanto provocó efectos nocivos sobre esa línea celular.

Biopreparado Hierro-Proteína (Trofín)

El Trofín es un reconstituyente, de administración oral muy demandado por su eficacia en el tratamiento de pacientes con anemia severa, ancianos, niños desnutridos, quemados, etc. Su elevado contenido de aminoácidos es muy susceptible de contaminarse, por ello el empleo de las radiaciones ionizantes podría significar una garantía de calidad para este biopreparado.

Una cepa de *Bacillus brevis*, aislada de las áreas de producción, se empleó para inocular artificialmente el producto.

Se realizaron estudios físicos, químicos y microbiológicos al producto antes y después de irradiado a diferentes dosis en un rango desde 4,7 hasta 25 kGy, la temperatura se mantuvo a 4°C.

El estudio radiobiológico de la cepa empleada de *B. brevis* mostró valores de:

$D_0 = 0,663$ kGy y $D_{10} = 2,1 \pm 0,0152$ kGy

Los límites de aceptación de cada ensayo se comportaron según lo establecido en [19].

Se determinó que dosis entre 7 y 8 kGy son apropiadas para lograr la descontaminación del Trofín sin alterar sus parámetros de calidad.

Tejido óseo liofilizado para aloinjerto. Validación de la dosis

La radioesterilización de huesos liofilizados es una práctica generalizada en los bancos de tejidos. Este producto de amplio uso en la cirugía ortopédica mantiene sus propiedades una vez irradiado a 25 kGy [20].

Cuadro 11. Parámetros bioquímicos y microbiológicos de muestras sometidas a diferentes dosis.

| Dosis (kGy) | pH | sólidos totales g/100 mL | nitrógeno total g/100 mL | nitrógeno amínico g/100 mL | hierro ferroso mg/100 mL | conteo microbiológico ufc/ U |
|-------------|------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|
| 0 | 6,05 | 31,60 | 0,740 | 0,079 | 447,55 | > 5000 |
| 4,7 | 6,07 | 31,80 | 0,732 | 0,081 | 438,38 | 2500 |
| 5,9 | 6,03 | 31,86 | 0,730 | 0,080 | 439,18 | 1000 |
| 7,1 | 6,06 | 31,56 | 0,751 | 0,081 | 437,37 | 250 |
| 8,1 | 6,11 | 31,78 | 0,695 | 0,085 | 433,48 | 150 |
| 10 | 6,06 | 31,73 | 0,729 | 0,085 | 445,55 | 7 |
| 25 | 6,02 | 31,69 | 0,740 | 0,080 | 437,47 | 0 |

El objetivo de este trabajo fue validar la dosis esterilizante de 25 kGy a lotes producidos en el banco de tejidos *ORTOP* del Complejo Científico Ortopédico "Frank País", aplicando para ello el Método 3 incluido en el anteproyecto de la norma ISO /DIS 11137 (1991) *Esterilización de Productos de Uso Médico. Validación y Control de rutina. Esterilización Gamma y con Acelerador de Electrones.*

Para ello fue necesario a la vez validar el cálculo de la carga microbiana (bioburden) y la prueba de esterilidad.

a. Validación del cálculo de la carga microbiana.

1. Selección del medio de cultivo:

En la Tabla B4 del anexo B (ISO/DIS 11137 (1991)) se recomiendan 4 medios para bacterias aerobias y 2 para hongos. En este estudio nosotros utilizamos 2 de ellos para bacterias y uno para hongos.

Se utilizó una SIP = 0,5. Cada SIP se sumergió en 50 mL de una solución de agua peptonada al 0,1 % y Tween 80 al 2% estéril. Los frascos se agitan en una zaranda orbital a 100 rpm durante 30 minutos.

Las suspensiones así obtenidas se filtran a través de membranas de acetato de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0,45 µm, se lavan con 50 mL de suero fisiológico estéril y se depositan sobre los diferentes medios.

En el Cuadro 12 se presentan los valores promedios del bioburden en los diferentes medios de cultivo estudiados.

Se seleccionó el medio TSA como el más adecuado para el cálculo del bioburden en lotes de huesos liofilizados.

2. Validación del método de recobrado de la carga microbiana

El método de recobrado empleado fue el de repetidas extracciones según el

Cuadro 12. Valores promedios del bioburden en los medios de cultivo.

| Medio de cultivo | Bioburden promedio /SIP | Bioburden promedio/ Unidad de producto |
|------------------|-------------------------|--|
| PCA | 2,4 | 7,3 |
| TSA | 8,6 | 13,7 |
| SDA | 1,8 | 4,5 |

protocolo antes descrito, obteniéndose un 85,8 % de eficiencia.

b. Validación de la prueba de esterilidad

Se siguió la metodología recomendada por la ISO/DIS y se logró la validación de la prueba.

c. Validación de la dosis esterilizante de 25 kGy

El lote utilizado para el estudio contaba de 65 unidades, de las cuales 10 fueron utilizadas para la determinación de la carga microbiana (según Tabla C8 (ISO/DIS 11137)). La carga microbiana promedio (BP) obtenida fue de 2 ufc/U, esto permite emplear el Método 3.

Para el experimento de dosis de verificación fueron empleadas 10 unidades (según Tabla C8 (ISO/DIS 11137)). La dosis de verificación calculada fue de $1,7 \pm 10\%$ kGy (según Tabla C10, donde se obtienen los valores de I y S para sustituir en la ecuación: $D_v = [I + (S \times \log BP)]$). La prueba de esterilidad fue satisfactoria, lo que confirma la dosis de verificación. El nivel de aseguramiento de la esterilidad (SAL) aplicable a este producto, para uso interno, es de 10^{-6} y por tanto le corresponde una dosis esterilizante de 25 kGy (según Tabla C9 (ISO/DIS 11137)). La validación de la dosis a través del Método 3B, asegura que los lotes de producción presenten la calidad requerida para esta clase de producto.

Estudio del comportamiento de las propiedades refrigerantes de la mezcla GELO-X en condiciones de irradiación con co-60

Para crear las condiciones de temperatura de 2°C a 8°C a escala de planta industrial para la radioesterilización de biopreparados, se requiere utilizar un refrigerante que mantenga sus propiedades de conservación de temperatura en el

proceso de irradiación. En este sentido, se le dio una dosis de 30 kGy a la mezcla refrigerante comercial GELO-X, en la Planta de Irradiación PRODUCTO-1. Dos muestras de refrigerante irradiado y no irradiado se analizaron por RMN ^1H , en un espectrómetro BRUKE modelo CXP-90, notándose la desaparición en la muestra irradiada de un triplete y un singlete; esto hace pensar que ocurren cambios en la estructura de la mezcla.

Se evaluó comparativamente el comportamiento interno de la temperatura de 2 contenedores de transportación de biopreparados (dimensiones 45 x 45 x 60 cm, aislamiento de poliespuma de 5 cm, 7 recipientes con 1 kg de refrigerante y un botellón de cristal con 20 litros de biopreparado), uno con refrigerante sin irradiar y el otro irradiado a 30 kGy

Se evidenció que hay una disminución de las propiedades refrigerantes del GELOX irradiado. Sin embargo, puede emplearse el refrigerante en condiciones de irradiación industrial porque hay una estabilización de la temperatura de 5°C a 7°C, para un intervalo de tiempo de 40 horas. Para realizar una comprobación real se sometió un contenedor de transportación de biopreparados (con refrigerante y biopreparado) a un proceso de irradiación industrial de 30 kGy. Se comprobó que durante el proceso la temperatura no excedió los 8°C y el producto conservó sus propiedades. Estos resultados actualmente están introducidos en la práctica industrial en nuestro país.

Bibliografía

- [1] Osipov, B.C.; Razhitstaya, G.A.; Trofimov, V.I. (1984). Centro de Información de la Industria Médica. Moscú.
- [2] Padrón, E. y col. (1994) Nucleus (17). Cuba
- [3] Padrón, E. y col. Informe Técnico (1992). CEADEN. Agencia Nuclear, Cuba.

- [4] Padrón, E. y col.(1995) *Nucleus* (18). Cuba
- [5] Otero, I. y col . *Nucleus* (en prensa). Cuba.
- [6] Romay, Z. y col. (1995). VIII Congreso Latinoamericano de Transplantes de Organos y Tejidos. 24-28 / abril, Ciudad Habana.
- [7] Tumenyán, M.A. y col. INIS-mf-5673 (1978), 42-44.
- [8] Norma Cubana NC-26-12, 1981.
- [9] Norma Cubana NC 26-201, 1990.
- [10] Método de ensayo de diagnóstico viral, enfermedades bovinas, 711-712 / 88. Norma Ramal. MINAGRI, Cuba.
- [11] Norma USP XII. 1990. Pruebas para biológicos.
- [12] Norma Cubana NC 26-17, 1991.
- [13] Norma Cubana NC 9204-79, 1979.
- [14] Norma Cubana NC 26-6, 1991.
- [15] Farmacopea USA XXIII, 1990.
- [16] Gergely, J. y col. *Symposium STI / PUB* 157. IAEA Vienna (1967) 115-124.
- [17] Antoni, F. y col. *Symposium STI / PUB* 157. IAEA Vienna (1967) 107-114.
- [18] López, L. y col. *Symposium STI / PUB* 157. IAEA Vienna (1967) 125-135.
- [19] Aznar, E. y col (1993) Documento de información técnica para el registro del Trofín, Registro No.0888.
- [20] Anderson M.J. y col. (1992) *J. Bone Joint Surg.* 74: 747.