

# Procesamiento y esterilización de tejido óseo para su uso terapéutico: bases preclínicas desde una universidad tecnológica

## Bone tissue processing and sterilization for therapeutic use: preclinical experiments from a technological university

Carolina Centeno-Cerdas<sup>1</sup>, Fabián Somarribas-Brenes<sup>2</sup>,  
Walter Vargas-Segura<sup>3</sup>, Montserrat Jarquín-Cordero<sup>4</sup>,  
Andrea Ulloa-Fernández<sup>5</sup>, Laura A. Calvo-Castro<sup>6</sup>

Centeno-Cerdas, C; Somarribas-Brenes, F; Vargas-Segura, W; Jarquín-Cordero, M; Ulloa-Fernández, A; Calvo-Castro, L.A. Procesamiento y esterilización de tejido óseo para su uso terapéutico: bases preclínicas desde una universidad tecnológica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 215-228.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7625>

1 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 [cccenteno@itcr.ac.cr](mailto:ccenteno@itcr.ac.cr)

 <https://orcid.org/0000-0003-4600-8887>

2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 [somarribas.bio@gmail.com](mailto:somarribas.bio@gmail.com)

 <https://orcid.org/0009-0000-7899-4429>

3 Escuela de Física. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 [walvargas@itcr.ac.cr](mailto:walvargas@itcr.ac.cr)

 <https://orcid.org/0000-0003-2434-1945>

4 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 [mocordero@itcr.ac.cr](mailto:mocordero@itcr.ac.cr)

 <https://orcid.org/0000-0001-7926-7290>

5 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 [andreguf@gmail.com](mailto:andreguf@gmail.com)

 <https://orcid.org/0000-0002-3071-9564>

6 Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 [ancalvo@itcr.ac.cr](mailto:ancalvo@itcr.ac.cr)

 <https://orcid.org/0000-0001-5101-9105>

## Palabras clave

Hueso; irradiación gamma; banco de tejidos; peróxido de hidrógeno.

## Resumen

Entre los métodos más utilizados de esterilización de hueso se encuentra la irradiación gamma. La dosis considerada estándar para alcanzar la esterilidad es de 25 kGy. Los estándares internacionales recomiendan la validación de los procedimientos a nivel local, de forma que sean factibles con el personal y las capacidades técnicas del país. En este estudio, se trataron muestras de tejido óseo porcino mediante desinfección química y esterilización con irradiación gamma, reduciendo la carga microbiana a niveles no detectables, sin afectar de manera significativa las propiedades deseables de la matriz tisular, lo cual se comprobó mediante caracterización de proteínas como el colágeno y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y microscopía electrónica de barrido. Esta investigación demuestra la capacidad del Instituto Tecnológico de Costa Rica de contribuir con la formación de profesionales y de acceso a equipo especializado que permiten el fortalecimiento de los bancos de tejidos en el país, y con ello continuar contribuyendo al desarrollo de nuevas estrategias tecnológicas que aporten a la salud humana.

## Keywords

Bone; gamma irradiation; tissue banking; hydrogen peroxide.

## Abstract

Gamma irradiation is among the most widely used methods of bone sterilization. The usual standard dose for achieving sterilization is 25 kGy. Although there are international standards for the main procedures, the general recommendation is to validate them at the local level, so that they are feasible with the personnel and technical capacities of the country. In this study, porcine bone tissue samples were treated by chemical disinfection and by sterilization with gamma irradiation, reducing the microbial load to non-detectable levels, without significantly affecting the desirable properties of the tissue matrix, which was verified by protein characterization of collagen and bone morphogenetic proteins (BMPs) and by scanning electron microscopy. This research demonstrates the ability of Costa Rica Institute of Technology (ITCR) to contribute to the training of professionals and to provide access to specialized equipment, which allows the strengthening of tissue banks in the country, and thereby contributing to the development of new technological strategies for human health.

## Introducción

El aumento en la expectativa de vida, el concomitante incremento de las enfermedades crónico-degenerativas, y las actividades que llevan a lesiones extensas y traumas, hacen que la demanda de aloinjertos con fines terapéuticos se proyecte como una tendencia en franco crecimiento. Anualmente se realizan en el mundo más de 2.5 millones de trasplantes de tejidos procedentes de 58.000 donantes, y sólo en 2020 se trasplantaron 129.681 órganos [1]. Este escenario lleva a priorizar el diseño de estrategias exitosas capaces de fortalecer las actividades de donación y recuperación de múltiples tejidos y órganos en las instituciones especializadas para ello.

Los bancos de tejidos son instalaciones donde se recuperan, procesan, almacenan y distribuyen tejidos para que se apliquen a pacientes que requieren el reemplazo de grandes áreas de tejido, lo cual también implica el desarrollo paralelo de procesos médicos y tecnológicos relacionados,

así como de su regulación y homogenización internacional [1], [2]. El uso de estándares internacionales permite garantizar la seguridad y eficacia de los aloinjertos y xenoinjertos [3], [4], y fortalece la colaboración científica y promoción de las donaciones. Los bancos de tejidos no sólo proporcionan material biológico para trasplantes, sino que también favorecen el desarrollo de técnicas quirúrgicas, y habilitan nuevos usos de los injertos, contribuyendo a atender la creciente necesidad de tejidos [5], [6] y repercuten favorablemente en la calidad de la atención sanitaria. En Costa Rica existen varios bancos de tejidos para trasplante, incluyendo el Banco de Córneas y el Banco Nacional de Sangre, ambos de la Caja Costarricense de Seguro Social; el banco de tejidos perteneciente al Hospital Nacional de Niños; y el Banco de Tejidos del Servicio Quirúrgico del Hospital del Trauma del Instituto Nacional de Seguros de Costa Rica.

El tejido óseo constituye uno de los tejidos humanos de trasplante más frecuente [7]. En el pasado, la principal fuente de obtención de hueso era el mismo paciente mediante el uso de autoinjertos [8]. Con el avance de las técnicas de procesamiento se posibilitó el uso de donante cadavérico y remoción de miembros por amputación o procedimientos reconstructivos, lo que conlleva a un aumento en la disponibilidad de aloinjertos disponibles para la reconstrucción de tejidos dañados por traumas ortopédicos, tumores, artroplastias, u otras causas y, en todos los casos, convirtiéndose en un importante recurso médico al mejorar la calidad o incluso salvar la vida de los receptores [8], [9].

Para una adecuada distribución y disponibilidad de tejidos, la esterilidad y la conservación de su composición son aspectos vitales para tomar en cuenta en la gestión de un banco de tejidos [10]. El riesgo de contaminación es innegable y puede ser causa de infección, rechazo, o incluso muerte del receptor [7], [9]. La contaminación puede venir del donante, de los procedimientos relacionados a la procuración, procesamiento, almacenamiento, transporte y empaque del tejido, o incluso del mismo procedimiento de implantación [11]. Debido a esto, es de suma importancia aplicar las condiciones asépticas más estrictas en cada una de las etapas del proceso, así como optimizar los protocolos necesarios para la desinfección y esterilización del tejido para asegurar la bioseguridad en términos de carga microbiana y de propiedades físicas y biológicas, para así garantizar el éxito del trasplante [7].

La selección del método de esterilización más adecuado depende de la naturaleza y del estado físico del material a esterilizar (tejido sólido, blando, dispositivo, u otro); de la influencia del método de esterilización en las propiedades del material; del tipo de contaminante potencial; y del precio y acceso a la tecnología requerida; sin embargo, todos los métodos de esterilización presentan ventajas y riesgos; por ejemplo, los métodos químicos están asociados con riesgo de citotoxicidad, mientras que los métodos físicos pueden conllevar degradación de moléculas importantes para la función biológica del implante [12]. Los métodos de conservación (liofilización, criopreservación) también inciden en las características biológicas y fisicoquímicas del tejido (índice de viabilidad celular, pérdida de agua, de elasticidad y resistencia), influyendo en su posterior uso [13], [14].

Los métodos de esterilización química de tejidos incluyen el uso de diversas sustancias tales como antibióticos, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido peracético, etanol, óxido de etileno y otros biocidas de amplio espectro. Sin embargo, estas sustancias pueden ser corrosivas, lo cual puede afectar las propiedades biomecánicas del injerto [15], y pueden dejar residuos tóxicos [11].

El  $H_2O_2$  es un método de esterilización química relativamente accesible, ampliamente utilizado, y efectivo para reducir cargas biológicas (*bioburdens*, en inglés); sin embargo, en concentraciones mayores al 30% y tiempos mayores a 15 minutos de exposición, su uso se ha relacionado con alteraciones histológicas y mecánicas, y puede causar la degradación de proteínas, incluyendo BMP-2 (*bone morphogenetic protein*, por sus siglas en inglés), un factor

de crecimiento indispensable para el desarrollo del hueso [11], [16]. No obstante, el  $H_2O_2$  permite la remoción de células del donante, antígenos y agentes citotóxicos de la matriz, con lo cual se reduce el riesgo de rechazo al implante, y se estima que tiene un menor impacto en la integridad del tejido en relación con otros agentes químicos [11].

Por su parte, la esterilización por irradiación se trata de un proceso con mayor capacidad de penetración que los esterilizantes químicos (líquidos y gaseosos), lo cual es deseable para el proceso de esterilización. Las técnicas de irradiación utilizadas se basan en radiaciones ionizantes. El término radiación ionizante abarca todas las radiaciones con exceso de energía (rayos X y gamma, electrones de alta velocidad) capaces de producir cascadas de ionización en la materia. La energía de todas las radiaciones ionizantes se expresa como electronvoltios (eV) y se define como la energía ganada por un electrón que se mueve a través de una diferencia de potencial de 1 volt. La energía absorbida, es decir, la dosis absorbida, se mide en Greys (Gy):  $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1}$ . La unidad utilizada en el pasado fue rad, donde  $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$  [17].

Se ha documentado que la radiación gamma presenta capacidad esterilizante tanto de manera directa a través del contacto con partículas, como de manera indirecta, por la generación de radicales libres; en ambos escenarios presentando gran poder de penetración e induciendo la muerte celular [18]. Además de eliminar poblaciones microbianas, la irradiación inactiva virus, micoplasmas y reduce el contenido de endotoxinas [8]. Desde mediados de la década de 1950 se registran ensayos clínicos sobre la eficacia de los injertos óseos humanos esterilizados mediante irradiación [17].

La eficiencia de la esterilización mediante radiación ionizante radica en su buena penetrabilidad dentro de la materia (especialmente rayos gamma) y en su alta efectividad en la inactivación de microorganismos patógenos sin incurrir en los problemas asociados de intercambio de calor, diferencia de presión u obstáculos por barreras de difusión. La radiación ionizante provoca un moderado aumento de temperatura que puede ser compensado para materiales biológicos sensibles, y es eficiente a temperatura ambiente e incluso a temperaturas bajo cero. La radiación ionizante también permite la esterilización de materiales en envoltorios previamente cerrados, evitando la re-contaminación durante el embalaje y posterior manipulación del tejido previa a la implantación [17].

El Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) ha dedicado esfuerzos a iniciativas que apoyen el establecimiento y diversificación de bancos de tejidos en el país [19], [20]. En el presente trabajo, se implementaron y validaron en el Instituto Tecnológico de Costa Rica procedimientos internacionalmente avalados para la procuración, esterilización y almacenamiento de tejido óseo, evidenciando con esto las capacidades técnicas en el país para la instalación, diversificación y fortalecimiento de bancos de este y otros tipos de materiales biológicos.

## **Materiales y métodos**

Modelo de estudio y ablación de la muestra. Se utilizó hueso de origen porcino (*Sus scrofa*) proveniente de animales utilizados en entrenamientos quirúrgicos en el Centro de Investigación y Cirugía en Cáncer (CICICA), perteneciente a la Universidad de Costa Rica (UCR), quienes contaron con aprobación por parte del Comité Institucional para el Cuido y Uso de los Animales (CICUA-17-2018) para el procedimiento quirúrgico y eutanasia de los animales. El tejido óseo se extrajo retrayendo el glúteo profundo e incidiendo a través de su tendón, y se trasladó a las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) donde se removieron restos de sangre, grasa, cartílago y otras estructuras.

Desinfección superficial. El tejido óseo se cortó con una sierra para realizar la molienda de la cabeza femoral y se eliminó tejido blando y grasa, y los fragmentos (de 1 pulgada) se repartieron (en triplicados) en frascos de 250 mL, donde se sumergieron en suero fisiológico. Los frascos se colocaron en una bolsa estéril y se calentaron a 60 °C durante 50 minutos. Posteriormente, el suero de los frascos se eliminó utilizando un tamiz de filtración y se realizaron dos lavados adicionales con suero fisiológico en agitación por 10 minutos, eliminando el suero en cada cambio. Se eliminó el líquido remanente y los tejidos se almacenaron a -80 °C hasta los siguientes pasos de esterilización o análisis.

Esterilización química (EQ). Luego de la desinfección superficial, los fragmentos óseos se lavaron dos veces con peróxido de hidrógeno al 3% en agitación por 10 minutos, seguido por un lavado con suero fisiológico en agitación por 5 minutos. Se incubó el tejido óseo en suero con antibiótico (80 mg gentamicina y 1 g cefalotina en 100 ml de suero) en agitación por 20 minutos. Se agregó peróxido de hidrógeno al 3% y se dejó en agitación durante 18 horas, envueltos en una bolsa estéril. Finalmente, se agregó etanol 95% y se dejó en agitación durante 20 minutos.

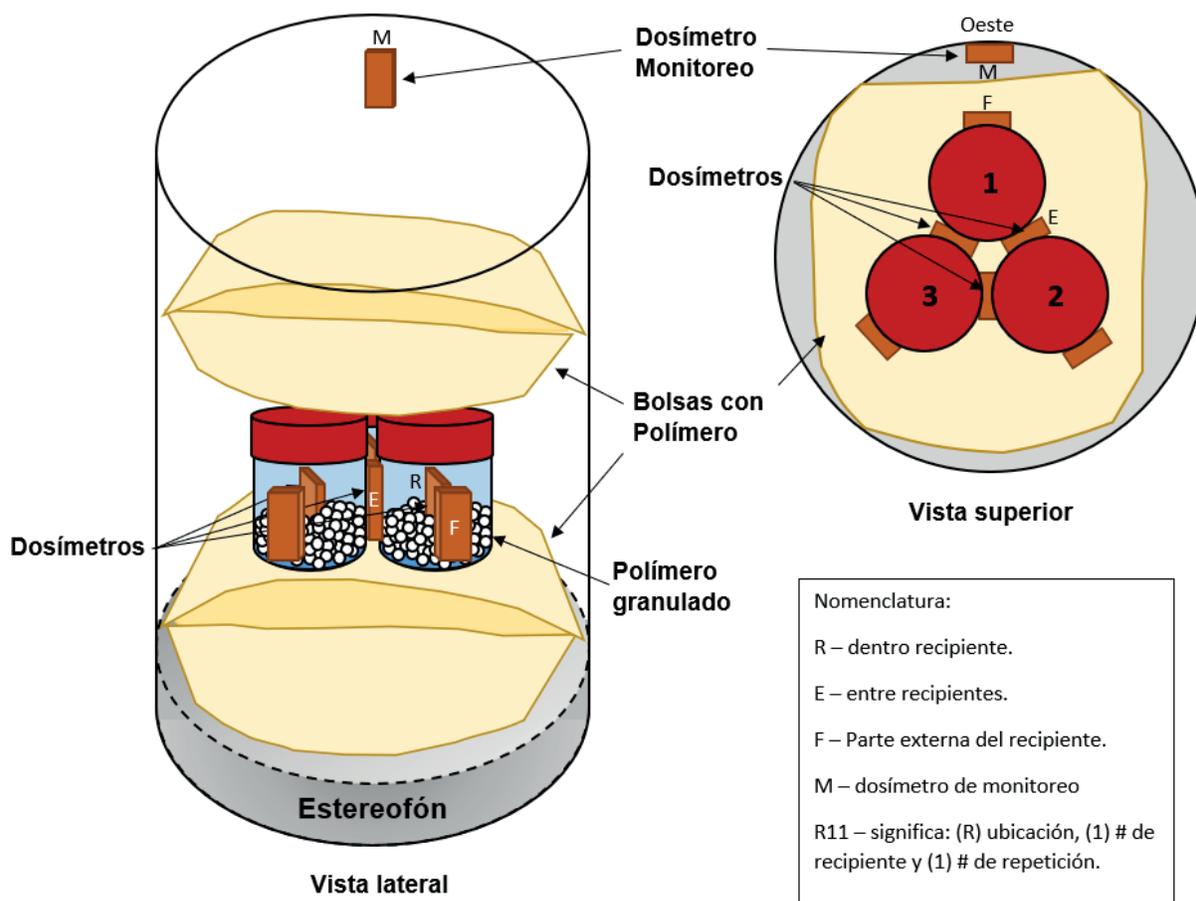
Esterilización por irradiación (EI). Para el proceso de irradiación se utilizó un irradiador autoblandado de la marca Izotop, modelo Ob-Servo Ignis (Izotop, Hungary), que cuenta con 24 fuentes de Co-60. La cámara de irradiación es cilíndrica con 15 cm de diámetro interno y 27 cm de alto, fabricado en acero con un espesor de 2 mm. Para la verificación dosimétrica del material irradiado se utilizaron dosímetros Perspex RED tipo 4034 (batch PS), fabricados a partir de polimetilmetacrilato (Harwell Dosimeters, UK) que fueron calibrados siguiendo la recomendación de Sharpe & Miller [21].

Los valores de dosis límite para garantizar la esterilización y evitar la alteración del material en el proceso de irradiación se implementaron siguiendo la norma ISO 11137-3:2013 (Cuadro 1) [22]. Para determinar la incertidumbre del proceso de irradiación de las muestras, se acató lo establecido en la norma ISO 11137-4 [23], relacionado con el mapeo de dosis, datos requeridos para determinar las dosis: máxima, mínima y de monitoreo.

**Cuadro 1.** Dosis de radiación gamma establecidas para el proceso de esterilización de hueso.

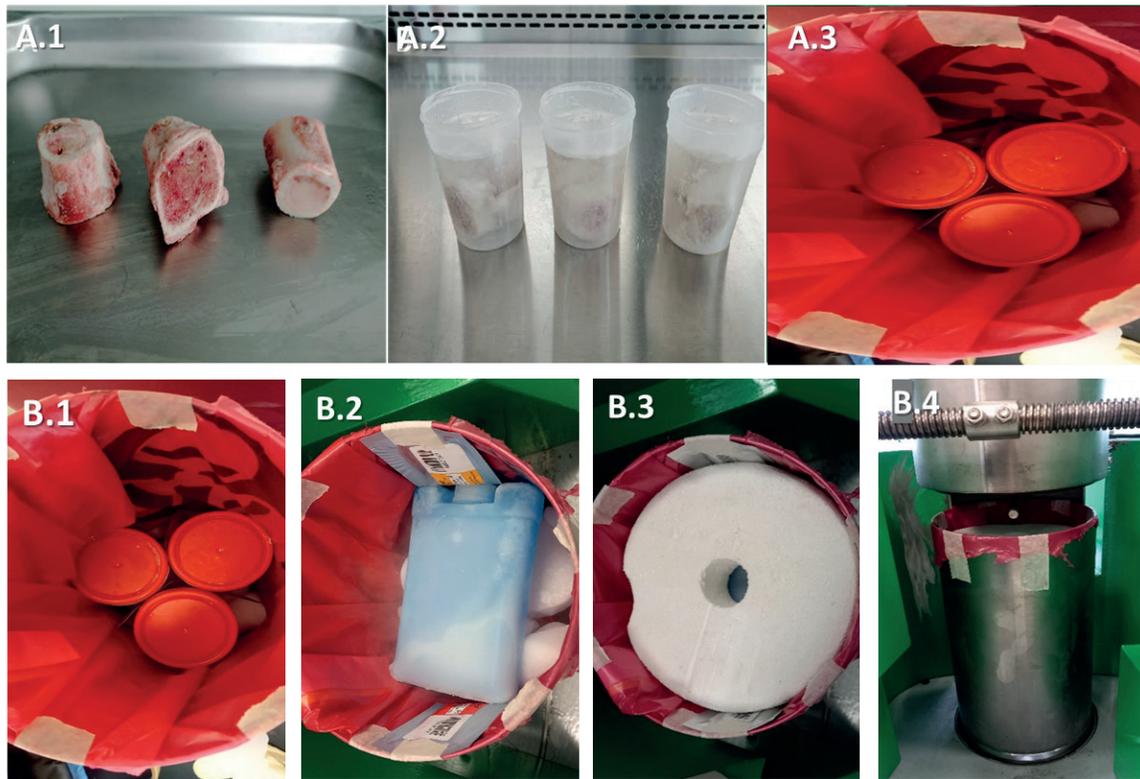
Tipo	Dosis (kGy)	Detalle
$D_{est}$	25	Dosis de esterilización.
$D_{max, acc}$	35	Debe ser la máxima aceptable que no afecte las propiedades del material (basado en ISO 11137-4 [23], y [4]).

Para determinar la dosis máxima, mínima y de monitoreo en el proceso de mapeo, se utilizó un polímero granulado o en pellets de densidad de 1.25 g cm<sup>-3</sup> para simular el hueso y hielo seco para mantener las muestras congeladas. Para la simulación de hueso, tres recipientes similares a los utilizados para colocar las muestras de hueso a irradiar fueron llenados aproximadamente a la mitad de su capacidad con el polímero y en medio se colocó un dosímetro. Además, se utilizó este polímero para simular los bloques de hielo seco, colocados en la parte inferior y superior de los recipientes. La Figura 1 muestra el patrón de carga de las muestras y la posición de los dosímetros para cuantificar la distribución de dosis y con esto la determinación de la dosis máxima ( $D_{max}$ ), mínima ( $D_{min}$ ) y de monitoreo ( $D_{mon}$ ). Este proceso fue repetido en tres ocasiones como se recomienda en la norma ISO/TS 11137-4 [23].



**Figura 1.** Patrón de carga utilizado en el mapeo de dosis de radiación (Co-60) para tejido óseo en el irradiador marca Izotop, modelo Ob-Servo Ignis, del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Debido al tiempo de exposición necesario para alcanzar la dosis requerida en el irradiador, para la irradiación de hueso (Figura 2) se utilizó hielo seco para mantener las muestras congeladas. Las muestras óseas fueron colocadas según el patrón de carga definido en el mapeo de dosis, colocando también el dosímetro de monitoreo para el control dosimétrico y el control microbiológico (ATCC 27142) para su verificación. Para el control de la temperatura dentro de la cámara de irradiación mientras las muestras fueron irradiadas se utilizó una termocupla.



**Figura 2.** Desinfección del material óseo (A). Los huesos se sometieron a un lavado general con suero fisiológico (A.1, control), seguido de esterilización química (A.2) con peróxido de hidrógeno y suero fisiológico con antibiótico, o de esterilización por irradiación con rayos gamma utilizando una dosis de 25 kGy (A.3). Proceso de irradiación de hueso (B). Las muestras, dosímetros y control microbiológico (B.1) se cubrieron con hielo seco (B.2) y estereofón (B.3) para mantenerlas en congelación; se incluyó una termocupla para monitorear la temperatura durante el proceso, y se colocaron en la cámara del irradiador (B.4).

Control microbiológico. Los fragmentos óseos se lavaron con suero fisiológico estéril durante 5 minutos en agitación. El suero se filtró con el tamiz de filtrado utilizando filtros de  $0.22 \mu\text{m}$  en condiciones de esterilidad. Los filtros se incubaron en agar de recuento estándar (ARE) a  $37^\circ\text{C}$  y en agar papa dextrosa (PDA) a temperatura ambiente durante 7 días, al cabo de los cuales se tomaron fotografías y se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC).

Se utilizaron esporas del microorganismo *Bacillus pumilus* (ATCC 27142) en su presentación en tiras reactivas con un millón de esporas cada una como indicador biológico para la confirmación del proceso de esterilización por irradiación (Sigma-Aldrich Sterility Indicator). Los indicadores se colocaron junto con las muestras durante el proceso de irradiación. Las tiras irradiadas y sin irradiar se inocularon en tubos con caldo CASO estéril (Sigma-Aldrich) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 7 días. Adicionalmente, las tiras incubadas en el medio CASO se utilizaron para inocular placas de agar sangre que se incubaron a  $35\text{-}37^\circ\text{C}$  durante 7 días, a partir de las cuales se determinó el número de UFC.

Extracción de proteínas. Los fragmentos de hueso se molieron en un mortero hasta obtener fragmentos finos. Se pesó 200 mg de hueso molido en tubos de muestra de 2 mL. Se realizaron tres réplicas y un control por tratamiento. A los controles se les agregó 1 mL de agua destilada estéril mientras al resto de las muestras se les agregó 1 mL de HCl 1.2 M y se incubaron durante 24 h a  $4^\circ\text{C}$  [24]. Las muestras se centrifugaron a 15000 rpm a  $4^\circ\text{C}$  durante 20 min y se recogió el sobrenadante (denominado extracto 1). Los residuos de tejido óseo desmineralizado presente en los tubos de muestra se incubaron con 1 mL de amortiguador de lisis Gu-HCl (guanidina-HCl

6 M, Tris 100 mM, pH 7.4) durante 72 horas a 4 °C. Nuevamente, se centrifugaron las muestras en las mismas condiciones y se recogieron los sobrenadantes (extracto 2). Los residuos de tejidos óseos se incubaron con 1 mL amortiguador de lisis Gu-HCl con EDTA tetrasódico 0.5 M durante 72 horas a 4 °C. Se centrifugaron las muestras y se recogieron los sobrenadantes (extracto 3). Por último, los residuos de tejidos óseos se incubaron con 1 mL HCl 6 M a 4 °C durante 24 horas. Se centrifugaron las muestras y se recogieron los sobrenadantes (extracto 4). Todos los extractos y controles de proteína cruda se precipitaron en 1 mL de acetona a -20 °C durante 24 horas. Las muestras de proteína precipitada se resuspendieron en 1 mL de amortiguador Gu-HCl a pH 8.1.

Cuantificación de proteína total mediante el ensayo de BCA. Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó el kit BCA Protein Assay (Santa Cruz Biotechnology Inc.) según las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) a 570 nm y la concentración de proteínas totales en las muestras se calculó comparando con una curva estándar externa de albúmina sérica bovina (BSA) (0 - 2 mg ml<sup>-1</sup>).

Cuantificación de proteína BMP-2 mediante ELISA. La cuantificación de la proteína BMP-2 (*bone morphogenetic protein*, por sus siglas en inglés) se realizó utilizando el kit de ELISA BMP-2 Quantikine Kit (R&D Systems) según las instrucciones del fabricante. Se determinó la densidad óptica de cada muestra utilizando un lector de microplacas (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) ajustado a 450 nm. Se realizó una corrección de longitud de onda restando lecturas de las muestras a 570 nm.

Tinción histológica con hematoxilina-eosina. Los fragmentos de hueso se quebraron utilizando nitrógeno líquido y un mortero. Las muestras fueron sumergidas en distintas soluciones en el siguiente orden y periodos de tiempo: hematoxilina durante 2 minutos, agua destilada durante 2 minutos, carbonato de litio durante 15 segundos, agua destilada 5 minutos, eosina durante 35 segundos y finalmente agua durante 5 segundos. Para la deshidratación y aclaramiento de las muestras óseas se realizaron lavados seriados de etanol graduado y xilol [25].

Microscopía electrónica. Las muestras óseas de cada tratamiento se quebraron utilizando nitrógeno líquido y un mortero; posteriormente se fijaron utilizando solución de Karnovsky y se deshidrataron con lavados seriados en etanol graduado [26]. Las muestras se secaron al aire y mantuvieron en un desecador hasta su recubrimiento con oro de aproximadamente 10 nm (EMS 150R ES; Electron Microscopy Sciences). Se utilizó una corriente de 20 mA para el análisis de microscopía electrónica de barrido (Hitachi TM-3000, Japón).

## Resultados y discusión

Modelo de estudio y ablación de la muestra. El procedimiento de ablación del tejido se realizó de la forma más semejante posible a la extracción que se haría en un paciente humano con respecto a la extracción quirúrgica y el manejo aséptico de las muestras. El modelo experimental porcino resultó apropiado puesto que simula fielmente diferentes sistemas humanos tanto desde el punto de vista fisiológico como anatómico, dado que es similar en tamaño, distribución de la anatomía y valores fisiológicos y bioquímicos [27].

Mapeo de dosis e irradiación de muestras. La dosis utilizada de 25 kGy corresponde a la dosis recomendada internacionalmente por el Organismo Internacional de Energía Atómica para la esterilización de tejidos con fines terapéuticos [21]. Los tejidos (en este caso congelados) se pueden calentar (y, por lo tanto, descongelar) durante el proceso de alcanzar la dosis de 25 kGy, lo cual se buscó subsanar con el uso de hielo seco en la cámara de irradiación y su monitoreo mediante una termocupla.

Seguendo la norma ISO/TS 11137-4 [23], la incertidumbre del proceso de irradiación ( $\sigma_{proc}$ ) está dada por la ecuación:

$$\sigma_{proc} = \sqrt{\sigma_{cal}^2 + \sigma_{rep}^2 + \sigma_{maq}^2 + \sigma_{map}^2}$$

donde  $\sigma_{cal}$  se refiere a la incertidumbre debida a la calibración de los dosímetros RED. Las restantes fuentes de incertidumbre son resultado del proceso de mapeo y fueron calculadas como tipo A, incluyendo:  $\sigma_{rep}$ , es la incertidumbre por reproducibilidad determinada por la variabilidad en la lectura del dosímetro de monitoreo;  $\sigma_{maq}$ , se debe a variaciones del irradiador en el proceso de irradiación; y  $\sigma_{map}$  es la incertidumbre del mapeo, y depende de los valores de dosis mínima ( $D_{min}$ ) y máxima ( $D_{max}$ ), como también del número de repeticiones ( $n$ ) realizadas, que en este estudio fueron tres. A pesar de que en el patrón de carga se ha indicado la dirección en que debe ser colocado el cilindro en la zona de carga en el irradiador, puede ocurrir que en la práctica esto no suceda y la orientación del dosímetro de monitoreo sea otra. Esta variación en la dosis por la colocación del portamuestras se debe a que las fuentes que rodean a este cilindro no tienen la misma actividad. Los resultados del proceso se resumen en el presupuesto de incertidumbre mostrado en el Cuadro 2.

El índice de conformidad indica la variación entre la dosis máxima y mínima, y se calcula mediante la razón entre ellas. El resultado obtenido fue de 1.1119, lo cual indica una diferencia del 11.19 % entre ambas dosis. Esta diferencia se debe a las dimensiones de la muestra y a cómo se encuentran distribuidas dentro de la cámara de irradiación. En el Cuadro 3 se presenta el rango de aceptación para el dosímetro de monitoreo para el control de rutina en la irradiación de hueso, donde  $D_{obj,min}$  y  $D_{obj,max}$  se refieren a las dosis objetivo mínima y máxima, respectivamente. Es decir, para las condiciones de irradiación de hueso en el irradiador Izotop del Instituto Tecnológico de Costa Rica, el resultado de la medida de la dosis registrada por el dosímetro de monitoreo (que siempre debe colocarse al momento de realizar la irradiación), debe estar entre las dosis indicadas en el Cuadro 3, para garantizar que el material irradiado se encuentra entre las dosis indicadas por el Cuadro 1.

**Cuadro 2.** Presupuesto de incertidumbre en dosis del proceso de irradiación (Co-60) para tejido óseo en el irradiador Izotop del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Fuentes	Tipo	Incertidumbre típica	Distribución de probabilidad	Coefficiente de sensibilidad	Contribución a la incertidumbre
<b>Calibración dosímetros</b>					
Determinación de la dosis	B	1.95	Normal	1	1.95
Calibración dosímetros	A	1.41	Normal	1	1.41
<b>Variaciones en el producto y su ubicación</b>					
Reproducibilidad	A	0.38	Normal	1	0.38
Mapeo: Máxima/Mínima	A	1.41 / 0.37	Normal	1	1.41 / 0.37
Máquina	A	0.53	Normal	1	0.53
<b>Suma cuadrática</b>					<b>8.20 / 6.35</b>
<b>Incertidumbre combinada (k=1)</b>					<b>2.86 / 2.52</b>
<b>Incertidumbre expandida (k=2)</b>					<b>5.73 / 5.04</b>

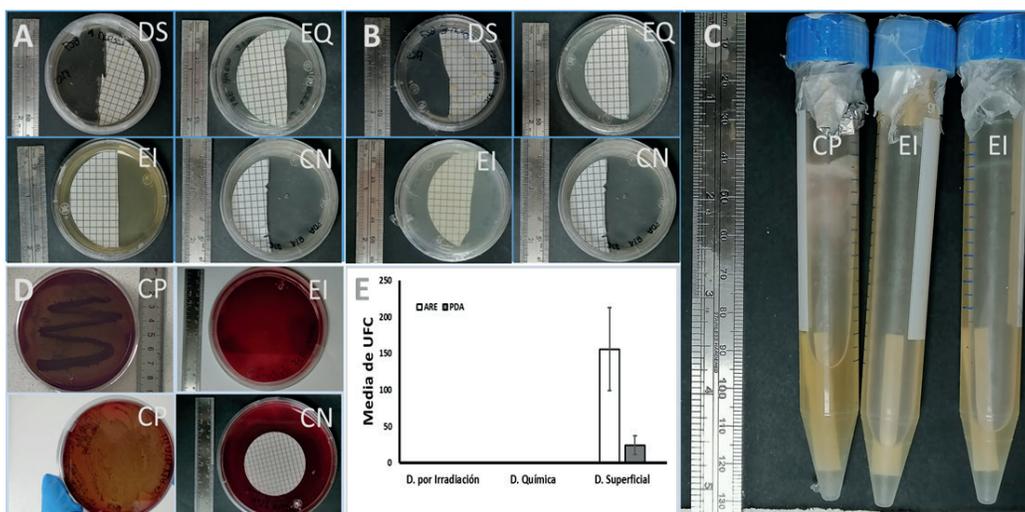
**Cuadro 3.** Rango de dosis para el dosímetro de monitoreo para el control de rutina, en el proceso de irradiación de hueso en el irradiador marca Izotop del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

	$D_{obj,min}$	$D_{obj,max}$
$D_{mon}$ (kGy)	25.01	32.45

Del proceso de mapeo también se determinó la razón entre la dosis mínima y de monitoreo, la cual fue de 1.0503, lo cual indica una diferencia en dosis del 5.03%. Además, se determinó una diferencia entre la dosis mínima y la dosis nominal del 4.5%. Estos resultados, permitieron el ajuste del tiempo de irradiación para cumplir con la dosis establecida en el Cuadro 1.

Esterilización de las muestras. A todas las muestras se les removió de manera mecánica restos de tejido muscular y adiposo, y se les aplicó inicialmente una desinfección superficial, seguido por el proceso de esterilización química o física (irradiación). En las muestras con desinfección superficial utilizadas como control se detectó la presencia de bacterias y de hongos en los medios de cultivo semisólidos, con un número muy elevado de unidades formadoras de colonias (UFC) en la placa de ARE (Figura 3E). Por su parte, los tratamientos de esterilización química (EQ) e irradiación (EI) no presentaron formación de UFC en las placas de PDA y ARE, indicando el éxito del proceso de esterilización de estos tratamientos (Figura 3A y 3B).

Control microbiológico. Un procedimiento de esterilización aceptable para cualquier producto, incluidos los tejidos biológicos utilizados como injerto, depende de definir los microorganismos más resistentes que podrían estar presentes y su densidad. En este caso, no hubo crecimiento de las esporas de *B. pumilus* expuestas a irradiación (EI), mientras que las tiras con esporas no irradiadas sí presentaron crecimiento (control positivo), lo cual se confirma por la formación de turbidez en la parte superior del tubo con medio CASO (Figura 3C). Asimismo, se observó crecimiento de esporas no irradiadas (control positivo) en placas de agar sangre, mientras que las placas con esporas irradiadas (EI) dieron negativo (Figura 3D y 3E), demostrando que la dosis de 25 kGy fue suficiente para alcanzar el nivel de garantía de esterilidad aceptable (SAL, del inglés *sterility assurance level*) [17].

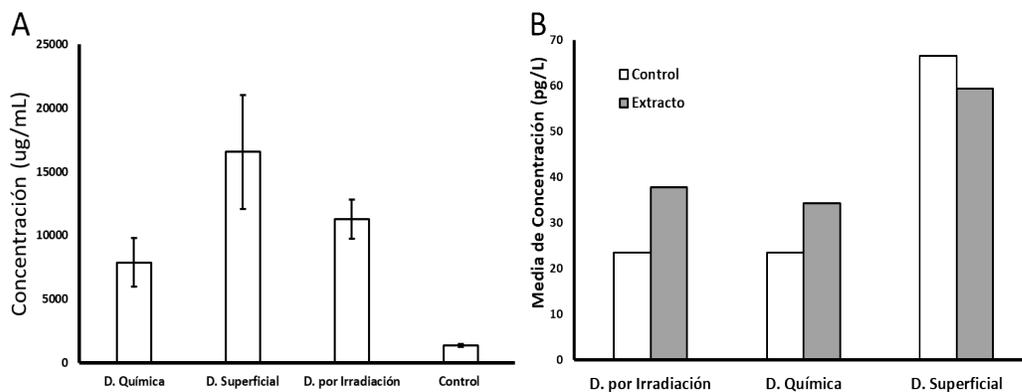


**Figura 3.** Controles microbiológicos realizados a tejido óseo porcino ( $n = 3$ ) sometido a esterilización química (EQ) con antibióticos y peróxido de hidrógeno al 3% y esterilización por irradiación (EI) con una dosis de 25 kGy. Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en cuatro diferentes medios de cultivo microbiológico: (A) Agar papa dextrosa (PDA); (B) Agar de recuento estándar (ARE); (C) Medio CASO; y (D) Agar sangre, en donde se inocularon esporas del microorganismo *Bacillus pumilus* (ATCC 27142) como indicador biológico para la confirmación del proceso de esterilización por irradiación. (E) Comparación cuantitativa de las UFC según el tratamiento de esterilización. De acuerdo con lo esperado, tanto la irradiación como el tratamiento químico bajaron la carga microbiana a niveles no detectables. DS; desinfección superficial; CN, control negativo; CP, control positivo.

Contenido proteico. Los métodos de esterilización pueden causar numerosos cambios físicos y químicos que afectan la calidad biológica de los aloinjertos. Los procedimientos de conservación, desinfección y esterilización pueden resultar agresivos con el tejido, afectando su estructura molecular, incluyendo la desnaturalización de proteínas importantes para el mantenimiento de las propiedades biomecánicas y de promover la regeneración del hueso durante procesos de reparación, tales como BMP-2. El potencial osteoinductivo de los injertos óseos, causado por proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) presentes en la matriz orgánica ósea, es de gran importancia clínica puesto que es responsable de la capacidad de inducir la formación de hueso nuevo en el sitio de trasplante. Por lo tanto, resulta importante proteger la propiedad osteoinductora del hueso durante su procesamiento, conservación y esterilización [17]. Consecuentemente, se estudiaron los efectos de la desinfección química y de la esterilización por irradiación en la degradación de proteínas en general, y se comparó el contenido de BMP-2 y de colágeno.

En cuanto a la cuantificación de proteínas totales, las muestras tratadas con irradiación presentaron un contenido proteico comparable al de los controles que recibieron solamente desinfección superficial (Figura 4A). Los tejidos de la desinfección superficial presentaron los niveles de proteína total más altos mientras que el hueso sometido a la esterilización química presentó la menor cantidad de proteína. Esto sugiere que esta última causó mayor degradación proteica que los otros tratamientos.

Respecto al contenido de BMP-2 en los fragmentos óseos, se encontró que tanto las muestras tratadas con desinfección química como con esterilización física presentaron cantidades similares de esta molécula entre sí y con respecto al control (Figura 4B). Considerando que BMP-2 es un factor de crecimiento con propiedades morfogénicas, requerido para mejorar la diferenciación osteoblástica de las células progenitoras, así como el apropiado desarrollo de hueso y cartílago [28], este resultado sugiere que los tejidos mantendrían la capacidad de apoyar procesos de regeneración luego de su implantación.

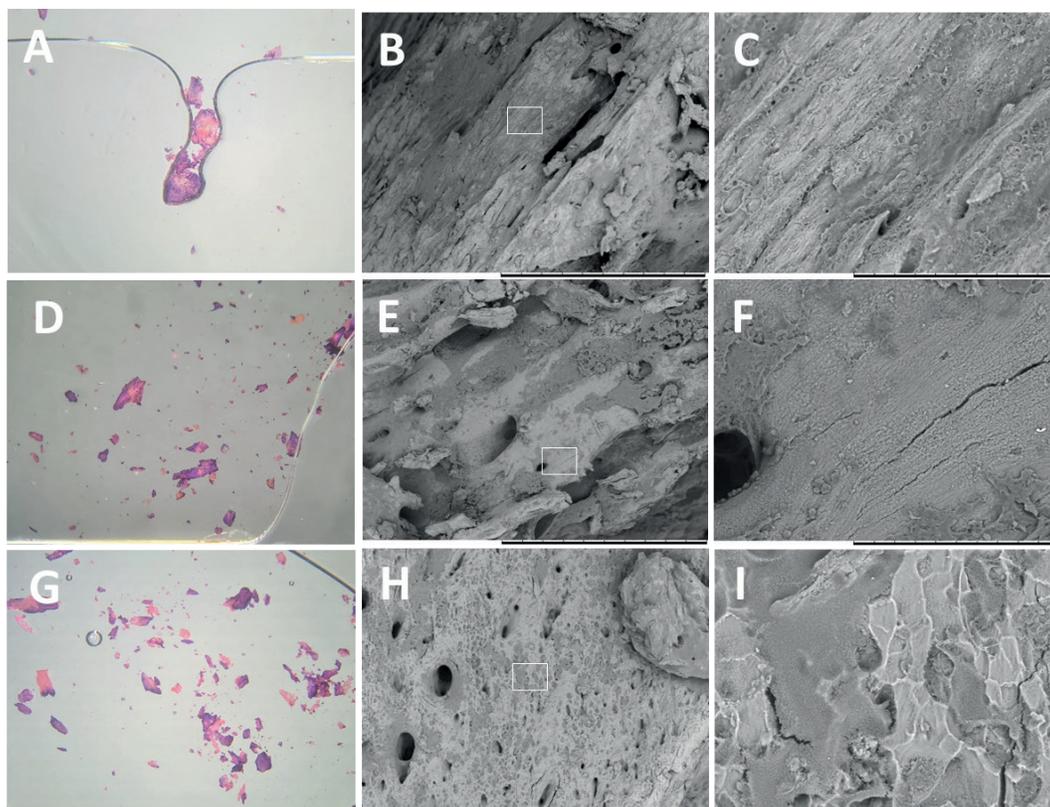


**Figura 4.** Recuperación y cuantificación de proteínas totales (promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n = 3$ ) mediante el método BCA (A) y cuantificación de la proteína BMP-2 mediante ELISA (B) a partir de tejido óseo porcino tratado con desinfección superficial, desinfección química y esterilización por irradiación. El control corresponde a proteína cruda no sometida al proceso de extracción de proteínas.

Evaluación de propiedades estructurales. El colágeno es un constituyente primordial de la matriz extracelular de todos los injertos de tejido conectivo. La matriz extracelular es particularmente importante para el tejido óseo debido a que determina sus propiedades biomecánicas, lo que a la vez se relaciona directamente con su función de sostén y movimiento. Se realizó una tinción de hematoxilina-eosina, la cual permite la detección de fibras de colágeno, las cuales

se esperan de manera abundante en diferentes áreas del tejido óseo. Se detectó que los pequeños fragmentos se tiñeron de manera homogénea, sugiriendo la presencia de colágeno en todas las muestras (Figura 5).

Adicionalmente, se realizó un análisis cualitativo de la ultraestructura de los fragmentos óseos mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 5). No se encontraron diferencias estructurales evidentes entre los tres tratamientos de esterilización, excepto algunas microfisuras que se sugiere son producto del procedimiento de fragmentación con el nitrógeno líquido y acción mecánica con el mortero.



**Figura 5.** Caracterización estructural de tejido óseo mediante tinción histológica con hematoxilina-eosina (A, D, G) y visualización de la ultraestructura ósea mediante microscopía electrónica de barrido (B, C, E, F, H, I), de muestras tratadas con desinfección superficial (A, B, C), esterilización química (D, E, F) y esterilización por irradiación (G, H, I). La barra de escala corresponde a 2 mm en B, E y H, y a 200 µm en C, F e I.

## Conclusiones

El Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), mediante el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología de la Escuela de Biología, desarrolla actividades relacionadas a bancos de tejidos con el objetivo de promover el ambiente favorable en términos técnicos, normativos, de equipamiento y oferta para la instauración y diversificación de este tipo de establecimientos en Costa Rica. Desde décadas atrás, el ITCR ha colaborado con el Organismo Internacional de Energía Atómica en la elaboración de “Guías para la operación de bancos de tejidos” [29] y “Códigos de prácticas para la esterilización por irradiación de tejidos humanos para uso clínico” [4]. El TEC realiza este tipo de esfuerzos con el fin de apoyar a los

bancos de tejidos en el país, de manera que puedan diversificar sus técnicas e inventario de tejidos. Se aspira además a promover la creación de nuevos establecimientos de este tipo en Costa Rica y la región centroamericana.

Este trabajo utilizó muestras porcinas y ejecutó procedimientos para la esterilización de tejido óseo que son aplicables a muestras provenientes de diferentes especies, incluyendo muestras de tejido humano, lo cual permitiría ampliar o diversificar la oferta de tejidos disponibles en bancos de tejidos del país ante la creciente demanda de material biológico. Se demostró la efectividad de los métodos de desinfección química y esterilización por irradiación utilizando las capacidades del irradiador Izotop del Instituto Tecnológico de Costa Rica para tratar la contaminación biológica sin afectar propiedades deseables en la matriz de las muestras óseas. Además, se validó el patrón de carga y se establecieron los parámetros dosimétricos para el control de rutina en este equipo de irradiación, generando mayor confianza y homogeneidad en el proceso de irradiación de muestras. Si bien el irradiador del ITCR tiene capacidad limitada, es un ejemplo del uso efectivo y seguro de este tipo de radiación para permitir avances tecnológicos y de salud en Costa Rica, demostrando con esto la capacidad en el país para la ejecución de las guías y prácticas mencionadas.

## Agradecimientos

La investigación contó con apoyo económico de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica (VIE CF 1510101). Los autores agradecen a la Lic. N. Chaves Solano y al OIEA por el apoyo logístico en la implementación y difusión de la investigación. Se agradece además a B. Jiménez, M.I. Chaves y M. Rojas Chaves por su colaboración durante la ejecución de este trabajo.

## Referencias

- [1] J. Sánchez-Ibañez *et al.*, "Tissue and Cell Donation: Recommendations From an International Consensus Forum," in *Transplantation Direct*, Apr. 2023, vol. 9, no. 5, p. e1466. doi: 10.1097/TXD.0000000000001466.
- [2] I. A. Kirilova *et al.*, "Terminology and conceptual apparatus of tissue donation and tissue banking: interdisciplinary expert consensus (Part 1)," *Hirurgia Pozvonocchnika*, vol. 20, no. 4, pp. 92–98, 2023, doi: 10.14531/ss2023.4.92-98.
- [3] M. Manyalich *et al.*, "European Quality System for Tissue Banking," *Transplant Proc*, vol. 41, no. 6, pp. 2035–2043, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.transproceed.2009.06.157.
- [4] Eulogia Kairiyama, *Código de prácticas para la esterilización por irradiación de tejidos humanos para uso clínico*. Editorial Tecnológica de Costa Rica, 2013.
- [5] P. G. Cimalista de Alencar and I. F. Ventura Vieira, "Bone Banks," *Rev Bras Ortop (Sao Paulo)*, vol. 45, no. 6, pp. 524–528, 2010.
- [6] N. Chaves-Solano, "Comunicación breve Living donor bone bank: Costa Rican experience (Banco de huesos a partir de donantes vivos: experiencia costarricense)," vol. 61, n. 2, p. 77-80. 2019 . En línea: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022019000200077&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022019000200077&lng=en&nrm=iso).
- [7] N. Baseri, A. Meysamie, F. Campanile, A. A. Hamidieh, and A. Jafarian, "Bacterial contamination of bone allografts in the tissue banks: a systematic review and meta-analysis," vol 123, pp. 156-173, 2022. doi: 10.1016/j.jhin.2021.10.020.
- [8] R. Singh and A. Singh, "The potential of radiation sterilized and banked tissue allografts for management of nuclear casualties," *Cell Tissue Bank*, vol. 23, no. 2, pp. 325–334, Jun. 2022, doi: 10.1007/s10561-021-09946-4.
- [9] I. Ilays, S. A. Alsakran, A. B. Fallatah, M. Alyateem, and O. A. Al-Mohrej, "The contamination of allografts in multi-organ donors: a bone bank experience," *Cell Tissue Bank*, vol. 22, no. 3, pp. 499–504, Sep. 2021, doi: 10.1007/s10561-020-09899-0.



- [10] E. Tam, M. McGrath, M. Sladkova, A. AlManaie, A. Alostaad, and G. M. de Peppo, "Hypothermic and cryogenic preservation of tissue-engineered human bone," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1460, no. 1, pp. 77–87, Jan. 2020, doi: 10.1111/nyas.14264.
- [11] L. R. Dantas, L. C. Wollmann, P. H. Suss, L. Kraft, V. S. T. Ribeiro, and F. F. Tuon, "Disinfection protocol for human musculoskeletal allografts in tissue banking using hydrogen peroxide 30%," *Cell Tissue Bank*, vol. 22, no. 4, pp. 643–649, Dec. 2021, doi: 10.1007/s10561-021-09938-4.
- [12] L. M. Delgado, A. Pandit, and D. I. Zeugolis, "Influence of sterilisation methods on collagen-based devices stability and properties," *Expert Review of Medical Devices*, vol. 11, no. 3, pp. 305–314. 2014. doi: 10.1586/17434440.2014.900436.
- [13] F. Martínez-Flores, H. Sandoval-Zamora, C. Machuca-Rodríguez, A. Barrera-López, R. García-Cavazos, and J. A. Madinaveitia-Villanueva, "Banco de piel y tejidos: un modelo operativo para la recuperación y preservación de aloinjertos de piel y tejidos," *Cir Cir*, vol. 84, no. 1, pp. 85–92, 2016, doi: 10.1016/j.circir.2015.06.021.
- [14] N. Daras, G. N. Nurick, and T. J. Cloete, "Degradation of the mechanical properties of cortical bone due to long duration storage," *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 157, Sep. 2024, doi: 10.1016/j.jmbbm.2024.106632.
- [15] S. Haimi, A. Vienonen, M. Hirn, M. Pelto, V. Virtanen, and R. Suuronen, "The effect of chemical cleansing procedures combined with peracetic acid-ethanol sterilization on biomechanical properties of cortical bone," *Biologicals*, vol. 36, no. 2, pp. 99–104, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.biologicals.2007.06.001.
- [16] Q. Qing *et al.*, "Effects of hydrogen peroxide on biological characteristics and osteoinductivity of decellularized and demineralized bone matrices," *J Biomed Mater Res A*, vol. 107, no. 7, pp. 1476–1490, Jul. 2019, doi: 10.1002/jbm.a.36662.
- [17] A. Dziejcz-Goclawska, A. Kaminski, I. Uhrynowska-Tyszkiewicz, and W. Stachowicz, "Irradiation as a safety procedure in tissue banking," *Cell Tissue Bank*, vol. 6, no. 3, pp. 201–219, Sep. 2005, doi: 10.1007/s10561-005-0338-x.
- [18] N. Yusof, "Advances of radiation sterilisation in tissue banking," *Cell Tissue Bank*, vol. 19, no. 2, pp. 175–186, Jun. 2018, doi: 10.1007/s10561-017-9651-4.
- [19] L. A. Calvo-Castro, M. Guerrero-Barrantes, A. Ulloa-Fernández, R. Portuguese-Barboza, C. Centeno-Cerdas, and M. R. Chaves, "Evaluación de técnicas de procesamiento y almacenamiento de piel cadavérica para bancos de tejidos", *Revista Tecnología En Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 69–82. <https://doi.org/10.18845/tm.v28i5.2221>
- [20] J. Morales-Sánchez, A. Ulloa-Fernández, S. Castro-Piedra, C. Centeno-Cerdas, and L. A. Calvo-Castro, "Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina," *Revista Tecnología en Marcha*, Sep. 2019, doi: 10.18845/tm.v32i9.4628.
- [21] P. Sharpe and A. Miller, "Guidelines for the Calibration of Dosimeters for use in Radiation Processing. NPL REPORT CIRM 29," National Physical Lab., Teddington (United Kingdom). Centre for Ionising Radiation Metrology. 1999.
- [22] ISO 11137-2, "Esterilización de productos para asistencia sanitaria. Parte 3: Establecimiento de la dosis de esterilización," 2013.
- [23] ISO/TS 11137-4, "Sterilization of health care products -Radiation- Part 4: Guidance on process control," 2020.
- [24] X. Jiang *et al.*, "Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis," *J Proteome Res*, vol. 6, no. 6, pp. 2287–2294, Jun. 2007, doi: 10.1021/pr070056t.
- [25] M. Megías, P. Molist, and M. Pombal, " Atlas de histología vegetal y animal," <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>.
- [26] D. Marshall, M. H. Helfrich, and R. M. Aspden, "Scanning Electron Microscopy of Bone.," in *Bone Research Protocols. Methods in Molecular Medicine*, vol. 80, M. H. Helfrich and S. H. Ralston, Eds., 2003. <https://doi.org/10.1385/1-59259-366-6:311>
- [27] J. Sáenz Medina *et al.*, "Modelos experimentales para la investigación y el entrenamiento en trasplante renal," *Actas Urol Esp*, vol. 32, no. 1, pp. 83–90, 2008. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0210-48062008000100009&lng=es&nrm=iso](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062008000100009&lng=es&nrm=iso)
- [28] J. Park, S. Kim, and K. Kim, "Bone morphogenetic protein-2 associated multiple growth factor delivery for bone tissue regeneration," *Journal of Pharmaceutical Investigation*, vol. 48, pp. 187–197, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40005-017-0382-0>
- [29] I. Álvarez Saldías, *Guía para la operación de bancos de tejidos*. Editorial Tecnológica de Costa Rica, 2013.