

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN  
DIRECCIÓN DE PROYECTOS

**INFORME FINAL DE PROYECTO VIE**

Código del Proyecto: **Centro Funcional 1510101 y 1510150**

Nombre del proyecto: **Tratamiento y validación pre-clínica de tejido óseo para uso terapéutico**

Departamento Académico responsable: **Escuela de Biología**

Investigador(a) responsable: **Dra. Carolina Centeno**

Otros investigadores:

**Laura Calvo Castro, Dra.**

**Andrea Ulloa Fernández, M.Sc.**

**Walter Vargas Segura, M. Sc.**

**Miguel Rojas Chaves, Ph.D.**

**Montserrat Jarquín Cordero, Dra. (julio 2019 – diciembre 2021)**

**Johan Carvajal Godínez, Dr. (enero 2021 a diciembre 2021)**

**María Inés Chaves, Ing. (salió de la institución)**

## Tratamiento y validación pre-clínica de tejido óseo para uso terapéutico

A continuación, se presenta el informe que contiene la información de un artículo científico que está en proceso de ser sometido para su publicación en la revista Tecnología en Marcha, la cual se encuentra en las bases de datos de indexación de Scielo, Latindex, DOAJ, Dialnet, Emerging sources citation index, y varios repositorios.

Posteriormente, se presentan varios apéndices, que corresponden a otros artículos ya publicados en que participan investigadores de este proyecto y que se generaron en el contexto de la presente investigación.

### Tabla de contenidos

Información administrativa del proyecto	3
<hr/>	
Procesamiento y esterilización de tejido óseo para su uso terapéutico: bases preclínicas desde una universidad tecnológica	4
Resumen	4
Palabras clave	4
Abstract	4
Key words	5
Introducción	5
Marco teórico	5
Metodología	7
Resultados y discusión	11
Conclusiones	19
Agradecimientos	19
Literatura citada	20
<hr/>	
Apéndices	22
Informe complementario sobre aspectos de irradiación, preparado por el M.Sc. Walter Vargas	22
Artículo científico “Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina” (Cell Culture and Tissue Engineering: Biomedical Applications) (DOI: <a href="https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4628">https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4628</a> )	30
Artículo científico “Dosimetría absoluta mediante película radiocrómica en un sistema de irradiación gamma, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS” (DOI: <a href="https://doi.org/10.18845/tm.v33i1.5019">https://doi.org/10.18845/tm.v33i1.5019</a> )	40
Procedimientos Operativos Estándar (SOPs) sobre el proceso de desinfección química y extracción de proteínas	48

## **Tratamiento y validación pre-clínica de tejido óseo para uso terapéutico**

### **Información administrativa del proyecto**

- Código del proyecto: 1510101 y posteriormente 1510150
- Nombre del proyecto: Tratamiento y validación pre-clínica de tejido óseo para uso terapéutico
- Escuela responsable: Escuela de Biología
- Otras escuelas participantes: Escuela de Ingeniería Electrónica y Escuela de Física
- Instituciones participantes externas: Hospital del Trauma, INS
- Investigador coordinador: Dra. Carolina Centeno-Cerdas
- Investigadores colaboradores:
  - Laura Calvo Castro, Dra. (ancalvo@itcr.ac.cr)
  - Andrea Ulloa Fernández, M.Sc. (aulloa@itcr.ac.cr)
  - Miguel Rojas Chaves, Ph.D. (mirojas@itcr.ac.cr)
  - Walter Vargas Segura, M. Sc. (walvargas@itcr.ac.cr)
  - María Inés Chaves, Ing. (salió de la institución)
  - Montserrat Jarquín C., Dra. (Julio, 2019) (mocordero@itcr.ac.cr)
  - Johan Carvajal G., Dr. (Enero, 2021) (johcarvajal@itcr.ac.cr)
- Periodo de ejecución: Enero 2018 a Diciembre 2021

# **PROCESAMIENTO Y ESTERILIZACIÓN DE TEJIDO ÓSEO PARA SU USO TERAPÉUTICO: Bases preclínicas desde una universidad tecnológica**

## **RESUMEN**

*Entre los métodos más utilizados de esterilización de hueso se encuentra la irradiación gamma. La dosis considerada estándar de oro es de 25kGy. A pesar de existir estándares internacionales para varios de procedimientos, la recomendación general es validarlos a nivel local. Son procedimientos factibles con el personal y las capacidades técnicas del país, pero que aún no se encuentran disponibles en Costa Rica, por lo que, con un enfoque interdisciplinario, esta propuesta brinda evidencia de la factibilidad de realizar estos procedimientos de ablación de hueso y su procesamiento para eventual uso clínico, fomentando a la vez el uso del equipo de irradiación gamma en el área de salud y procurando el traslado de los resultados al sector salud.*

*Se trató muestras porcinas con desinfección química y otras con irradiación gamma, encontrando que efectivamente se logró bajar la carga microbiana a niveles no detectables. Además, la apariencia de su ultraestructura es comparable entre sí y con la del control. A nivel bioquímico, se encontró que las muestras conservaban la presencia de proteínas como colágeno y BMP-2.*

*Esta investigación demuestra además la capacidad del ITCR de contribuir a disminuir la demanda de personal capacitado, acceso a equipo especializado, y otros aspectos que permitan 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.*

## **PALABRAS CLAVE**

Hueso, Irradiación gamma, Banco de Tejidos, BMP-2

## **ABSTRACT**

*Gamma irradiation is among the most widely used methods of bone sterilization. The dose considered gold standard is 25kGy. Although there are international standards for the main procedures, the general recommendation is to validate them at the local level. They are feasible procedures with the personnel and technique capacities of the country, but they are not yet available in Costa Rica. Therefore, with an interdisciplinary approach, our work provides evidence of the feasibility of performing such bone ablation and processing procedures for their eventual clinical use, at the time of promoting the use of gamma irradiation equipment for health services and ensuring the transfer of the results to the health sector.*

*We treated pig samples with chemical disinfection and with gamma irradiation, finding that they were effective in lowering the microbial load to non-detectable levels. Furthermore, the appearance of their ultrastructure is comparable with each other and with the negative control. At a biochemical level, the samples were found to retain the presence of proteins such as collagen and BMP-2.*

*This research also demonstrates the ITCR's ability to help reduce the demand for trained personnel, access to specialized equipment, and other aspects that allow the*

*strengthening of tissue banks in the country, and thereby, continue to contribute to the development of new technological strategies that contribute to human health.*

## **KEY WORDS**

Bone, Gamma irradiation, Tissue banking, BMP-2

## **INTRODUCCIÓN**

El tejido óseo constituye uno de los tejidos humanos de trasplante más frecuente y que tiene la particularidad de ser uno de los pocos tejidos naturalmente estéril (Baseri et al., 2021). En el pasado, la principal fuente de obtención era el mismo paciente mediante el uso de autoinjertos (Singh & Singh, 2021). Posteriormente, 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 miembros 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 (Ilays et al., 2021; Singh & Singh, 2021)

No obstante, para una adecuada distribución y disponibilidad de tejidos, la esterilidad y la conservación de su composición según sea el caso, son aspectos vitales para tomar en cuenta en la gestión de un banco de tejidos (Tam et al., 2020). El riesgo de contaminación es innegable, y en ocasiones es causa de infección, rechazo o incluso muerte del receptor (Baseri et al., 2021; Ilays et al., 2021). La contaminación puede venir del donante, de los procedimientos relacionados a la procuración, procesamiento y empaque del tejido o incluso del mismo procedimiento de implantación (Dantas et al., 2021). Por lo anterior, 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 del hueso y con ello, el éxito del trasplante (Baseri et al., 2021).

Por esta razón, el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Instituto Tecnológico de Costa Rica ha dedicado esfuerzos a iniciativas que apoyen el establecimiento y diversificación de bancos de tejidos en el país (Morales-Sánchez, 2019). Con este trabajo, se pretende establecer y validar en Costa Rica procedimientos internacionalmente avalados para la ablación y procuración de tejido óseo, evidenciando con esto las capacidades técnicas en el país para la instalación de bancos de este y otros tipos de material biológico.

## **MARCO TEÓRICO**

Los bancos de tejidos se refieren a instalaciones donde se recuperan, procesan, almacenan y distribuyen tejidos para que se apliquen a pacientes que requieren el reemplazo de grandes áreas de tejido. El almacenamiento de material biológico en dichos bancos es un proceso médico y tecnológico en fase de regulación y homogenización científica alrededor el mundo. Su homogenización es importante pues el uso de estándares

internacionales permite garantizar la seguridad y eficacia de los aloinjertos humanos o de otras especies (Manyalich et al., 2009; Kairiyama, 2013).

Tanto la procuración como la preservación de tejidos son actividades en acelerado proceso de desarrollo y en general, la actividad de los bancos de tejidos se correlaciona positivamente con los avances tecnológicos y científicos presentes en las ciencias biomédicas actuales (Martínez-Flores et al., 2016). Sin embargo, el aumento en la expectativa de vida, el concomitante incremento de las enfermedades crónico-degenerativas de la población 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. Este escenario lleva a priorizar el diseño de estrategias institucionales exitosas, capaces de fortalecer las actividades de donación y recuperación de múltiples tejidos en las instituciones especializadas para ello.

Los bancos de huesos son necesarios para proporcionar material biológico para una serie de procedimientos ortopédicos. El desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas, habilita nuevos usos de los injertos, contribuyendo a la creciente necesidad de tejidos musculoesqueléticos para trasplante, llevado a una situación en la que mayor cantidad de servicios hospitalarios requieren acceso a los tejidos (de Alencar & Vieira, 2015; Chaves-Solano, 2019).

Históricamente, los bancos de huesos han existido en países como Brasil desde la década de 1950. A mediados de la década de 1990 se reglamentaron las prácticas seguidas por los bancos de tejidos, lo que dio lugar a una serie de restricciones que limitaron el número de bancos y de profesionales autorizados a utilizar este tipo de material.

Como se mencionó, existen normas y recomendaciones internacionales para el funcionamiento de los bancos de huesos que buscan aumentar la seguridad de los tejidos trasplantados, sin embargo, esto ha limitado el número de instituciones autorizadas. El buen desempeño de un banco de huesos depende del control estricto de todas las etapas, que incluyen, principalmente: la formación de equipos de ablación y recolección bien capacitados; selección de donantes; pruebas de calidad y esterilidad sobre los tejidos obtenidos; y un estricto control sobre las técnicas de procesamiento utilizadas, así como de trazabilidad de los tejidos. La combinación de estos factores permite un mayor alcance de uso y un mayor número de pacientes receptores, mientras que la incidencia de contaminación de tejidos se vuelve estadísticamente insignificante y existe trazabilidad entre donantes y receptores (de Alencar & Vieira, 2015).

La presencia de un banco de tejido óseo repercute favorablemente en la calidad de la atención sanitaria por la disponibilidad de trasplantes óseos, así como en el papel científico de una institución altamente especializada que examina las propiedades del tejido óseo (Ostojic et al., 2019).

Garantizar un nivel de esterilidad del material biológico es indispensable para su utilización en trasplantes, para lo cual se cuenta con varias opciones, principalmente basadas en métodos químicos o físicos (de irradiación). Los métodos de conservación también pueden variar entre liofilización, criopreservación u otros. Cada método (descontaminación química, liofilización, esterilización física) incide de manera diferente en las características biológicas y fisicoquímicas del tejido (índice de viabilidad celular, pérdida de agua, de elasticidad y resistencia) y, con esto, influyen además en su posterior uso (Martínez-Flores et al., 2016).

La eficiencia de esterilización de la radiación ionizante radica en su buena penetrabilidad dentro de la materia (especialmente rayos gamma) y 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 provoca un moderado aumento de temperatura que puede ser compensado para materiales biológicos sensibles a cambios de temperatura, y es eficiente a temperatura ambiente e incluso a temperaturas bajo cero. Permite la esterilización de materiales en envoltorios previamente cerrados y, de esta forma, evita la recontaminación durante embalaje y posterior manipulación previa a la implantación (Dziedzic-Goclawska, 2005).

Este trabajo considera aspectos técnicos relacionadas con el funcionamiento de un banco de huesos, las cuestiones éticas y los principales obstáculos encontrados. En este sentido, puede mencionarse inclusive, la colaboración interinstitucional, la sensibilización de sectores gubernamentales y entes normativos, así como la concientización a la población general sobre la importancia de donación de órganos, tomando en cuenta la posibilidad de recurrir a donantes vivos en el país (Chaves-Solano, 2019; Morales-Sánchez, 2019).

## **METODOLOGÍA**

- **Objetivo 1**

### **Modelo de estudio y ablación de la muestra.**

Se obtuvieron las muestras por medio del Centro de Investigación y Cirugía en Cáncer (CICICA), perteneciente a la Universidad de Costa Rica. Se utilizó hueso de origen porcino (*Sus scrofa*), de individuos jóvenes utilizados en entrenamientos quirúrgicos. Para esto, se obtuvo la aprobación por parte del Comité Institucional para el Cuido y Uso de los Animales (CICUA) de la Universidad de Costa Rica. Para extraer la pieza de hueso, los animales se anestesiaron con Ketamina 20 mg/kg IM y Xilacina 1 mg/kg IM y una vez alcanzado este estado, se realizó la ablación de los tejidos.

- **Objetivo 2**

### **Desinfección Superficial**

Los huesos se colocaron a 4°C durante 48 horas antes de realizar el procesamiento. Luego, fueron cortados con una sierra para realizar la molienda de la cabeza femoral y se eliminó tejido blando.

Se rotuló nueve frascos de 250 ml de la siguiente manera: tres como “Esterilización química”, tres como “Desinfección superficial” y tres como “Irradiación”. En cada frasco se colocó 3 fragmentos de hueso y se les agregó suero fisiológico hasta cubrir la totalidad de los huesos. Luego, 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 les realizó dos lavados con suero en agitación por 10 minutos, eliminando el suero en cada cambio. Se eliminó el líquido remanente y se almacenó los tejidos a -80°C hasta los siguientes pasos de esterilización o análisis. Este y los siguientes procedimientos se realizaron por triplicado.

## **Esterilización química**

Los huesos rotulados como “Desinfección química” se lavaron dos veces con Peróxido de hidrógeno al 3% y en agitación por 10 minutos. El Peróxido de hidrógeno se eliminó en cada cambio utilizando un tamiz para filtración. Posteriormente, los huesos se lavaron con suero fisiológico en agitación por 5 minutos y se eliminó el suero fisiológico con el tamiz de filtrado. Posteriormente, se les agregó suero con antibiótico (una ampolla de 80 mg de Gentamicina y una ampolla de 1g de Cefalotina en 100 ml de suero), se dejaron en agitación por 20 minutos y se eliminó el suero con antibiótico por filtración. Se agregó peróxido de hidrógeno al 3% y se dejó en agitación durante 18 horas. Los frascos fueron envueltos en una bolsa estéril. Finalmente, se les eliminó el peróxido de hidrógeno mediante filtrado, se agregó etanol 95% y se dejó en agitación durante 20 minutos.

## **Calibración de los dosímetros y mapeo de dosis**

Se utilizó dosímetros Perspex RED tipo 4034 (batch PS), fabricados a partir de polimetilmetacrilato (Harwell Dosimeters, UK). Para la irradiación se utilizó un sistema de irradiación autoblandado de la marca Isotop, 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. Las dosis de irradiación fueron: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 kGy, Sharpe.

Se utilizaron 4 dosímetros por dosis para la curva de calibración colocados en puntos específicos de la cámara de irradiación. La lectura de los dosímetros se realizó con un espectrofotómetro UV-Visible Evolution 220 marca Thermo (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), en modo absorbancia en la longitud de onda de 640 nm y se realizó una medida por dosímetro. Para este proceso se siguió con lo establecido en la norma ISO 11137 parte 4 (ISO/ASTM 51276:2019), para la determinación de la incertidumbre del proceso de irradiación y establecer el rango de dosis del dosímetro de monitoreo, en el control de rutina del producto irradiado.

## **Irradiación**

En la irradiación de hueso se utilizó hielo seco para mantener las muestras congeladas. Las muestras óseas fueron colocadas según el patrón de carga definido durante la calibración y mapeo de dosis, colocando además el dosímetro de monitoreo para el control dosimétrico y el control microbiológico para su verificación. Para el control de la temperatura dentro de la cámara de irradiación mientras las muestras fueron irradiadas, se utilizó una termocupla. La dosis utilizada para la esterilización de los tejidos fue de 25kGy.

## **Control microbiológico**

A todos los huesos se les realizó un lavado con solución salina durante 5 minutos en agitación. El suero se filtró con el tamiz de filtrado utilizando filtros de 0,22 µm en cámara de flujo laminar. Los filtros se cortaron a la mitad, una mitad se colocó en una placa ARE y la otra en una placa de PDA. Las placas fueron incubadas a 37 °C y a temperatura

ambiente respectivamente durante 7 días. Finalmente, se tomaron fotos y se contó el número de UFC.

Se utilizaron esporas del microorganismo *Bacillus pumilus* (ATCC 27142) como indicador biológico para la confirmación del proceso de esterilización por irradiación (Sigma-Aldrich 05290 Sterility Indicator). Los indicadores se colocaron junto con las muestras durante el proceso de irradiación. Se inocularon las tiras irradiadas y sin irradiar en tubos con caldo CASO estéril (Sigma-Aldrich 22098) e incubaron a 37 °C durante 7 días. Adicionalmente, se inocularon placas de agar sangre con las tiras irradiadas y sin irradiar incubadas en el medio CASO, se incubaron a 35-37 °C durante 7 días y se determinó el número de UFC.

- **Objetivo 3**

### **Biocompatibilidad**

Fragmentos de las piezas óseas desinfectadas o esterilizadas fueron inoculadas con la línea celular mc-3T3 ( $1 \times 10^5$  células por fragmento de aproximadamente  $1 \text{ cm}^3$  en placas de 24 pozos). La línea mc-3T3 consiste en una línea celular precursora de osteoblastos derivada de *Mus musculus* calvaria. Para su inoculación y mantenimiento, se utilizó medio de cultivo alfa-MEM suplementado con ácido aspártico y 10% de suero fetal bovino.

### **Extracción de proteínas.**

Los fragmentos de huesos se molieron en un mortero hasta obtener fragmentos finos. Se pesaron 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 24h a 4 °C. Luego, las muestras se centrifugaron a 15000 rpm a 4°C durante 20 min, se recogió el sobrenadante y se les rotuló como extracto 1 y control 1 respectivamente. Los residuos de tejido óseo desmineralizado presente en los tubos de muestra se incubaron con 1 mL de buffer 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 que se realizó anteriormente, se recogieron los sobrenadantes y se les rotuló como extracto 2 y control 2 respectivamente.

Los residuos de tejidos óseos se incubaron con 1 mL buffer de lisis utilizado anteriormente (Gu-HCl) más EDTA tetrasódico 0,5 M durante 72 horas a 4 °C. Se centrifugaron las muestras en las mismas condiciones, se recogieron los sobrenadantes y se les rotuló como extracto 3 y control 3 respectivamente. 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, se recogió el sobrenadante y se les rotuló como extracto 4 y control 4 respectivamente. Todos los extractos y controles de proteína cruda se precipitaron en 1mL de acetona a -20 °C durante 24 horas. Las muestras de proteína precipitada se resuspendieron en 1 mL de buffer con Tris 100 mM, guanidina-HCl 6 M, pH 8.1.

## **Cuantificación de proteína total mediante el ensayo de BCA**

Para la cuantificación de proteína total se preparó una solución estándar de BSA pesando 2.00 mg de BSA en balanza analítica y disolviendo en 1 mL de PBS. Para la curva patrón se prepararon soluciones de BSA mediante diluciones seriadas a partir de la solución estándar con las siguientes concentraciones: 2,000  $\mu\text{g/mL}$ , 1,500  $\mu\text{g/mL}$ , 1,000  $\mu\text{g/mL}$ , 750  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 125  $\mu\text{g/mL}$  y 0  $\mu\text{g/mL}$ . Las soluciones de la curva patrón se montaron por duplicado en placas de 96 agregando 50  $\mu\text{L}$ . Luego, se cargaron por duplicado 50  $\mu\text{L}$  de las muestras óseas (extractos y control de cada tratamiento) en las placas de 96 pozos. Se utilizó el kit BCA Protein Assay (Santa Cruz Biotechnology Inc., número de catálogo SC-202389). Las placas se leyeron en un espectrofotómetro (FLUOstar Optima, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Se determinó la concentración de las muestras mediante la ley de Beer y se realizó un análisis estadístico.

## **Cuantificación de proteína BMP-2 mediante ELISA**

La cuantificación de proteínas BMP-2 se realizó utilizando el BMP-2 Quantiquine Kit (R&D Systems, número de catálogo DBP200) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de diluyente de ensayo RD1-19 a cada pocillo, se agregó 50  $\mu\text{L}$  de estándar, control o muestra por pocillo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador de microplacas orbital horizontal. Posteriormente, se aspiró cada pozo y se lavaron con buffer de lavado, repitiendo el proceso tres veces para un total de cuatro lavados. Después del último lavado, se eliminó cualquier resto de tampón de lavado. Se agregó 200  $\mu\text{L}$  de conjugado BMP-2 a cada pocillo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en agitador. Nuevamente, se aspiró cada pozo y se realizaron 4 lavados con buffer de lavado. Se agregó 200  $\mu\text{L}$  de solución de sustrato a cada pocillo y se incubó en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 50  $\mu\text{L}$  de solución de parada a cada pocillo. Se determinó la densidad óptica de cada pozo utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm y a 570 nm. Se realizó una corrección de longitud de onda restando las lecturas de 540 nm y de 450 nm. Se determinó la concentración de proteína mediante la ley de Beer y se realizó un análisis estadístico.

## **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 de etanol graduado. Las muestras se secaron al aire y mantuvieron en un desecador hasta su recubrimiento con oro de aproximadamente 10nm (EMS 150R ES). Se utilizó una corriente de 20 mA para el análisis de microscopía electrónica de barrido (Hitachi TM-3000, Japón).

## **Tinción histológica de hematoxilina-eosina**

Las muestras óseas de cada tratamiento se quebraron utilizando nitrógeno líquido y un mortero. Posteriormente las muestras fueron sumergidas en distintas soluciones en el siguiente orden y periodos de tiempo: hematoxilina durante 2 minutos, agua 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 realizó lavados seriados de etanol graduado y xilol. Por último, se realizó el montaje con medio de montaje Dako CS703 y se observó las muestras al estereoscopio.

- **Objetivo 4**

Se participó en la organización de varios eventos científicos de alcance internacional en colaboración con entidades reconocidas como la “Society for Muscle Biology” y el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). Se participó además con ponencias orales y de poster en estos y otros eventos científicos, según se describe en el documento II.

Adicionalmente, se preparó artículos científicos y se mencionó la metodología y alcances del proyecto en actividades docentes como en el curso de “Ingeniería tisular”, que es parte de la carrera de Histocitotecnología, impartida en la Universidad de Costa Rica, y el curso “Fundamentos del cultivo de células animales”, que corresponde a una materia electiva de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del TEC.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

- **Objetivo 1**

### **Modelo de estudio y ablación de la muestra.**

Se intentó realizar el procedimiento de ablación de la forma más semejante posible, en cuanto a las condiciones quirúrgicas y asépticas, a la extracción que se haría en un paciente humano. El manejo aséptico resulta importante puesto que entre más baja se mantenga la carga microbiana (contaminación inicial o “bioburden”), más certeza se tiene de que los procesos de desinfección o esterilización serán suficientes para contrarrestarlos. Se extrajo los tejidos de forma exitosa, retrayendo el glúteo profundo e incidiendo a través de su tendón.

Una vez extraído el tejido, este se trasladó a las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), donde se procedió a su procesamiento, que consistió de limpiar el tejido de restos de sangre, grasa, cartílago y otras estructuras.

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 de fisiológicos y bioquímicos como la presión arterial e índice cardíaco (Sáenz Medina et al., 2008).

- **Objetivo 2**

### **Esterilización de las muestras**

A todas las muestras se les removió de manera mecánica restos de tejido muscular y adiposo remanente, y se les aplicó inicialmente un lavado superficial. Posteriormente se les realizó el proceso de esterilización química o física (irradiación) según correspondiera. Entre las opciones que se han desarrollado para asegurar la asepsia del tejido, se encuentran métodos de desinfección química y métodos de esterilización por irradiación. La desinfección química se ha desarrollado a través del uso de antibióticos o de sustancias como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los cuales, si bien no aseguran la esterilidad absoluta, alcanzan un nivel de limpieza aceptable. En el caso del uso de  $H_2O_2$ , la remoción de células del donante, antígenos y agentes citotóxicos de la matriz reduce el rechazo a la vez que tienen un menor impacto en la integridad del tejido. Sin embargo, existe controversia sobre su uso, pues se les ha relacionado a alteraciones histológicas y en las propiedades mecánicas del tejido cuando se utilizan concentraciones mayores al 30% de  $H_2O_2$  durante tiempos mayores a 15 minutos de exposición (Dantas et al., 2021).

En este caso, para la esterilización química, se hizo uso de antibióticos de amplio espectro que actúan principalmente sobre organismos gram negativos como la gentamicina (aminoglucósido) y la cefalotina (cefalosporina de primera generación). Adicionalmente, el ácido peracético ( $CH_3CO_3H$ ) es un biocida de amplio espectro y bajo residuo que, sin embargo, resulta altamente corrosivo, lo cual es un aspecto a tomar en cuenta con respecto a la integridad de las muestras biológicas.

Respecto a los métodos de esterilización, se han desarrollado métodos basados en el uso de óxido de etileno, tratamientos con calor y la irradiación de tejidos. El uso de estos métodos reduce la carga microbiana más profunda a niveles sumamente bajos por lo que se considera que esterilizan el tejido. No obstante, la aparición de residuos tóxicos ha hecho que algunas de las técnicas pierdan vigencia (Dantas et al., 2021).

En el caso de la esterilización por irradiación, se trata de un proceso con mayor capacidad de penetración que los electrones y los esterilizantes químicos (líquidos y gaseosos), lo cual es deseable para el proceso de esterilización, pero un aspecto a considerar con respecto a la integridad de la muestra.

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) capaz 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):  $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$ . La unidad utilizada anteriormente fue rad:  $1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ J/kg}$ , por lo tanto  $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$ , o  $25 \text{ kGy} = 2,5 \text{ Mrad}$  (Dziedzic-Goclawska, 2005).

En el caso particular de la irradiación gamma, se ha documentado que presenta poder 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 (Yusof, 2018).

Desde mediados de la década de 1950 se registraron ensayos clínicos sobre la eficacia de los injertos óseos humanos esterilizados mediante irradiación (Dziedzic-Gocławska, et al., 2005). Lotty et al. (1990) encontró que la eficacia clínica de los aloinjertos sometidos a 25 kGy fue comparable con injertos óseos no-irradiados. En nuestros ensayos, se encontró que la dosis de 25 kGy fue suficiente para alcanzar el nivel de garantía de esterilidad aceptable (SAL, del inglés “sterility assurance level”) (Dziedzic-Gocławska, 2005). Además de eliminar poblaciones microbianas, la irradiación inactiva virus, micoplasmas y reduce el contenido de endotoxinas (Singh & Singh, 2021).

### **Calibración de los dosímetros y mapeo de dosis**

La dosis utilizada de 25kGy corresponde a la internacionalmente recomendada por el Organismo Internacional de Energía Atómica para la esterilización de tejidos con fines terapéuticos (Sharpe & Miller, 2009) (figura 1).

En el proceso de alcanzar la dosis de 25kGy, los tejidos tienden a elevar la temperatura, lo que se buscó subsanar con el uso de hielo seco en la cámara de irradiación.

Como fuentes de incertidumbre en dosis para el proceso de calibración de los dosímetros se consideró las variables de: determinación de la dosis de irradiación, la dispersión dosímetro-dosímetro, por la curva de calibración, el efecto de la temperatura y la influencia del espectrofotómetro en la lectura del dosímetro (repetibilidad y variación por la longitud de onda), esta información se encuentra resumida en el cuadro 1.

Cuadro 1. Fuentes de incertidumbre del proceso de calibración de los dosímetros PERSPEX RED.

<b>Fuente</b>	<b>Tipo</b>	<b>Distribución de probabilidad</b>
Determinación dosis	B	Normal
Dispersión dosímetro-dosímetro	A	Normal
Curva de calibración	A	Normal
Efecto de la temperatura	B	Normal
Espectrofotómetro	A	Normal

Las incertidumbres asociadas a la curva de calibración y a la dispersión dosímetro-dosímetro se determinaron mediante análisis de residuo. Para el caso de la curva de calibración, se refiere a la variación en dosis entre el valor promedio que registraron los dosímetros y la dosis a la que fueron irradiados. La incertidumbre en la determinación de

la dosis fue del 1.95 %. En la dispersión dosímetro-dosímetro, también se incluye la reproducibilidad.

El cuadro 2 muestra los valores de dosis límite establecidos para el proceso de irradiación, para cumplir con la esterilización y evitar la alteración del material (ISO 11137-2:2013).

Cuadro 2. Dosis establecidas para el proceso de esterilización de hueso.

Tipo	Dosis (kGy)	Detalle
	25	Dosis de esterilización
	35	Debe ser la máxima aceptable, en que el material no se vea afectada sus propiedades



**Figura 1. Desinfección del material óseo.** Los huesos, una vez cortados en fragmentos de 1cm de largo, se sometieron a un lavado general con suero fisiológico, y posteriormente al proceso de esterilización según correspondiera, a saber: (A) Ninguna adicional, de forma que funcionaran como control; (B) Esterilización química, consistente de peróxido de hidrógeno y suero fisiológico con antibiótico y (C) Esterilización por irradiación con rayos gamma utilizando una dosis de 25kGy.

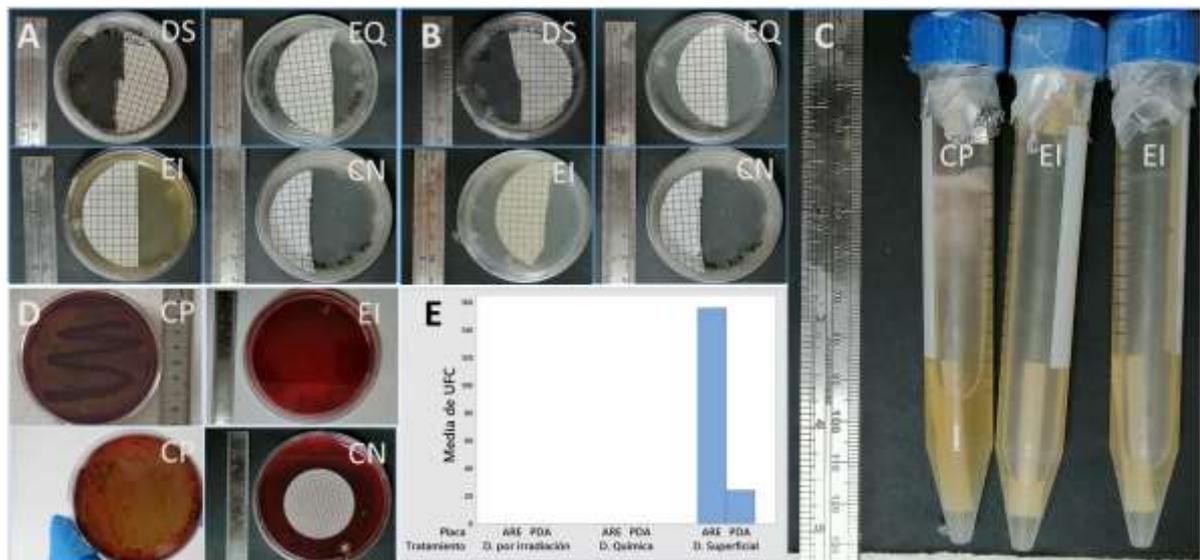
### Control microbiológico

Al realizar los controles microbiológicos se encontró que efectivamente, las muestras con desinfección superficial mantenían la presencia tanto de bacterias como de hongos, según se detecta con el crecimiento de microorganismos en medio de cultivo semisólido (agar ARE y PDA). Adicionalmente, para verificar el proceso de esterilización por medio de irradiación se utilizó esporas del indicador biológico *B. pumilus*, las cuales se caracterizan por ser altamente resistentes, por lo que se utilizan para monitorear la efectividad de los procesos de esterilización por radiación.

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. (figuras 2a y 2b), mientras que, como se mencionó,

el tratamiento de desinfección superficial fue el único en que se obtuvo un resultado positivo para los controles de PDA y ARE, con un número muy elevado de UFC en la placa ARE. La gráfica en la figura 2e refleja este comportamiento.

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. Es por esto que se recurrió al uso de esporas de *Bacillus pumilus*. Se recurrió específicamente al uso de su presentación en tiras reactivas con un millón de esporas cada una. Al respecto, en la figura 2c se observa que no hubo crecimiento de las esporas *B. pumilus* expuestas a irradiación (EI), mientras que las tiras con esporas no irradiadas dieron positivo (CP), ello se confirma por la formación de en grumos lechos en la parte superior del tubo. Asimismo, en la figura 2d se observa crecimiento de esporas no irradiadas (CP) en placas de agar sangre, mientras que las placas con esporas irradiadas (EI) dieron negativo.



**Figura 2. Verificación de la esterilidad.** 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, donde se utilizaron con 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. CN: Control negativo, CP: Control positivo, EC: Control de preservación proteica, EQ: Esterilización química, y EI: Esterilización por irradiación.

- **Objetivo 3**

### **Biocompatibilidad y contenido proteico**

Los procedimientos de conservación, desinfección y esterilización pueden resultar agresivos con el tejido, afectando su estructura molecular como, por ejemplo,

desnaturalizando proteínas importantes para el mantenimiento de las propiedades biomecánicas y promover la regeneración del hueso durante procesos de reparación.

Por esta razón, se evaluó la biocompatibilidad de las muestras inoculándolas directamente con células mc-3T3. Esto se realizó con el fin de evaluar la compatibilidad y citotoxicidad del material, así como su capacidad de estimular el potencial osteogénico de las células. Los cultivos se mantuvieron durante una semana, y se registró el aumento de la población celular creciendo sobre todas las muestras como sobre andamios 3D, sin embargo los resultados de las pruebas de Alamar Blue y cuantificación de LHD no son concluyentes (datos no mostrados) y las muestras se descartaron por sospecha de contaminación durante la fragmentación de los tejidos, pues de los análisis microbiológicos se conoce que antes de los pasos de fragmentación e inoculación las muestras se encontraban estériles.

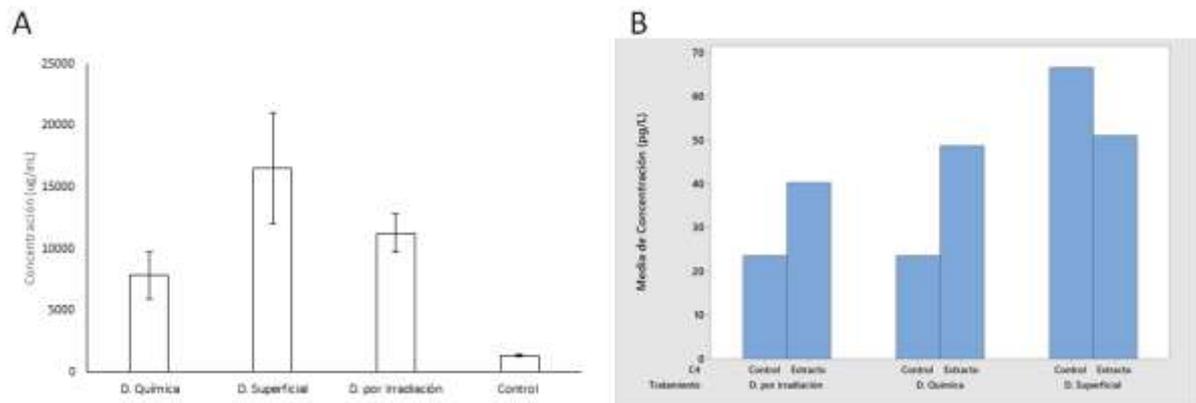
En cuanto a la cuantificación de proteínas totales, se encontró que las muestras tratadas con irradiación presentan un contenido proteico comparable al de los controles que recibieron solamente un lavado superficial (Fig. 4A).

El potencial osteoinductivo de los injertos óseos, causada 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 (Dziedzic-Goclawska, 2005).

En este sentido, al cuantificar específicamente el contenido de BMP-2 en los fragmentos óseos, se encontró que tanto las muestras tratadas con desinfección química como la esterilización física presentan cantidades similares de esta molécula entre sí y con respecto al control (Fig. 4B). Considerando que el BMP-2 es un factor de crecimiento con propiedades morfogénicas, requerido para el apropiado desarrollo de hueso y cartílago, este resultado es importante puesto que sugiere que los tejidos mantendrían la capacidad de apoyar procesos de regeneración luego de su implantación.

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.

Resulta importante considerar que una alta dosis de radiación ionizante puede evocar numerosos cambios físicos y químicos que pueden afectar la calidad biológica de los aloinjertos de tejido. Por lo tanto, en esta investigación interdisciplinaria se estudió los efectos de la desinfección química y la esterilización por radiación en la degradación de proteínas en general, y particularmente del colágeno, al ser un constituyente primordial de todos injertos de tejido conectivo.



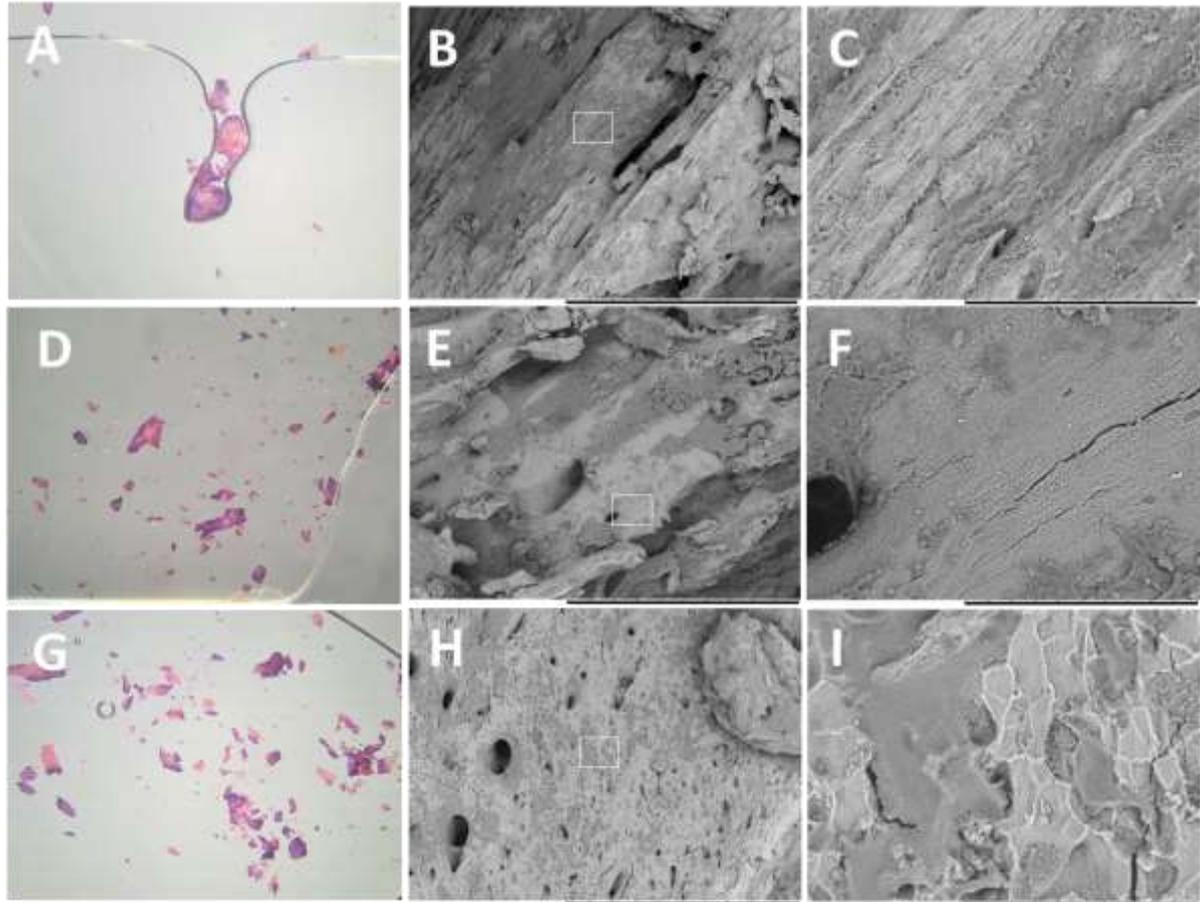
**Figura 3. Recuperación y cuantificación de proteínas.** Se realizó una extracción de proteínas a partir del material óseo y se cuantificaron mediante el método de BCA para proteínas totales (A) y ELISA para la proteína BMP-2 (B). Se encontró que los huesos de la desinfección superficial presentan los niveles de proteína total más altos mientras que los huesos sometidos a la esterilización química presentaron la menor cantidad de proteína. Adicionalmente, mediante la técnica de ELISA en Sándwich, se cuantificó la recuperación del BMP-2 en 200mg de muestra.

### Evaluación de propiedades biomecánicas

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.

Se realizó además pruebas de compresión que, sin embargo, se sugiere repetir debido a la presencia de variaciones en el ángulo de corte de las muestras, afectando su homogeneidad previa a la ejecución de la prueba (datos no mostrados).

Adicionalmente, se realizó un análisis cualitativo de la ultraestructura de los fragmentos óseos mediante microscopía electrónica de barrido. No se encontraron diferencias evidentes entre los tres tratamientos, observándose algunas microfracturas que se asumen producto del procedimiento de fragmentación con el nitrógeno líquido y acción mecánica con el mortero.



**Figura 4. Tinción histológica de hematoxilina-eosina.** (A) Enjuagues. (D) Esterilización química. (G) Esterilización por irradiación. **Visualización de la ultraestructura del hueso mediante SEM.** Se realizó la comparación de la estructura del hueso luego de haber sido sometido al procedimiento de esterilización respectivo, la comparación se realizó de forma cualitativa a nivel microscópico mediante SEM a diferentes aumentos. (B-C) Enjuagues (E-F) Esterilización química (H-I) Esterilización por irradiación. La barra de escala corresponde a 2 mm en B, E y H, y a 200  $\mu$ m en C, F e I.

- **Objetivo 4**

Este trabajo utilizó muestras porcinas y ejecutó procedimientos que son aplicables a muestras provenientes de diferentes especies, incluyendo los humanos, lo cual permite ampliar o diversificar la oferta que pueda tenerse en casos de demanda elevada de material biológico. En Costa Rica existen actualmente tres bancos de tejidos, saber: el banco de córneas de la Caja Costarricense de Seguro Social, el de tejidos, perteneciente al Hospital Nacional de Niños, también estatal, y el Banco de Tejidos del Servicio Quirúrgico del Hospital del Trauma, Instituto Nacional de Seguros de Costa Rica, que opera bajo una modalidad privada, manteniendo la pertenencia a una entidad estatal.

El Tecnológico de Costa Rica, mediante el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos 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. Desde varias décadas atrás ha colaborado con el Organismo Internacional de Energía Atómica en la elaboración de “Guías para la operación de bancos de tejidos” y “Códigos de prácticas para la esterilización por irradiación de tejidos humanos para uso clínico” (Álvarez, 2013; y Kairiyama, 2013). Con este trabajo, por ejemplo, se logró una esterilización apropiada del hueso mediante radiación gamma sin afectar de manera significativa propiedades deseables de la matriz tisular. Si bien el irradiador del TEC 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; queda aún trabajo por realizar, sin embargo, representa un primer paso exitoso. Se debe continuar además el trabajo y concientización en aspectos normativos, administrativos, y de logística implicados en el proceso, como la importación y acceso a algunos insumos y equipamientos clave. Por lo anterior, se invita a sectores gubernamentales, médicos, importadores, académicos y otros involucrados a continuar colaborando a este objetivo, con el beneficio para el país, su avance tecnológico y la calidad de vida de sus habitantes.

## **CONCLUSIONES**

Se realizó una curva de calibración y mapeo de dosis en la cámara del irradiador, generando mayor confianza y homogeneidad en el proceso de irradiación de muestras.

Se sometió muestras óseas a procedimientos para contrarrestar su carga microbiana tanto químicos como físicos (radiación gamma). Ambos procedimientos son ampliamente utilizados a nivel internacional. En las pruebas realizadas se observó que efectivamente ambos métodos cumplen el objetivo de reducir la contaminación sin afectar propiedades deseables en la matriz de las muestras óseas. Se observó que en ambos casos se sigue detectando la presencia de proteínas, particularmente colágeno y factores de crecimiento como el BMP-2.

El TEC realiza este tipo de trabajos 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.

## **AGRADECIMIENTOS**

La investigación contó con apoyo económico de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica (VIE CF 1510101). Se agradece además a la lic. Nefertiti Chaves y al OIEA por el apoyo logístico en la implementación y difusión de la investigación.

## LITERATURA CITADA

- Álvarez Saldías, I. (comp.). Guías para la operación de bancos de tejidos. 1era Edición. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 70 págs. URI: <https://hdl.handle.net/2238/12441>
- Baseri, N., Meysamie, A., Campanile, F., Hamidieh, A. A., & Jafarian, A. (2021). Bacterial contamination of bone allografts in the tissue banks: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Hospital Infection*, 50195-6701(21), 00384–4. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.10.020>
- Chaves-Solano, Nefertiti. (2019). Living donor bone bank: Costa Rican experience. *Acta Médica Costarricense*, 61(2), 77-80. Retrieved March 04, 2022, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-60022019000200077&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022019000200077&lng=en&tlng=es).
- de Alencar, P. G., & Vieira, I. F. (2015). BONE BANKS. *Revista brasileira de ortopedia*, 45(6), 524–528. [https://doi.org/10.1016/S2255-4971\(15\)30297-4](https://doi.org/10.1016/S2255-4971(15)30297-4)
- Dantas, L. R., Wollmann, L. C., Suss, P. H., Kraft, L., Ribeiro, V. S. T., & Tuon, F. F. (2021). Disinfection protocol for human musculoskeletal allografts in tissue banking using hydrogen peroxide 30%. *Cell and Tissue Banking*, 22(4), 643–649. <https://doi.org/10.1007/s10561-021-09938-4>
- Dziedzic-Goclawska, A., Kaminski, A., Uhrynowska-Tyszkiewicz, I. *et al.* Irradiation as a Safety Procedure in Tissue Banking. *Cell Tissue Banking* 6, 201–219 (2005). <https://doi.org/10.1007/s10561-005-0338-x>
- Ilyas, I., Alsakran, S. A., Fallatah, A. B., Alyateem, M., & Al-Mohrej, O. A. (2021). The contamination of allografts in multi-organ donors: a bone bank experience. *Cell and Tissue Banking*, 22(3), 499–504. <https://doi.org/10.1007/s10561-020-09899-0>
- ISO/ASTM 51276:2019. Standard Practice for Use of a Polymethylmethacrylate Dosimetry System.
- ISO 11137-2:2013. Esterilización de productos para asistencia sanitaria. Parte 3: Establecimiento de la dosis de esterilización.
- ISO/TS 11137-4 (2020). Sterilization of health care products -Radiation- Part 4: Guidance on process control. First edition.
- Kairiyama, E. (comp.). 2013. Código de prácticas para la esterilización por irradiación de tejidos humanos para uso clínico. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 78 págs. URI: <https://hdl.handle.net/2238/12440>
- Loty B., Courpied J.P., Tomeno B., Postel M., Forest M. and Abelanet R. 1990. Bone allografts sterilised by irradiation. Biological properties, procurement and results of 150 massive allografts. *Int. Orthop.* 14(3): 237–242.

- Manyalich M, Navarro A, Koller J, et al. European Quality System for Tissue Banking. *Transplantation Proceedings* 2009;41:2035-43.
- Martínez-Flores, F., Sandoval-Zamora, H., Machuca-Rodríguez, C., Barrera-López, A., García-Cavazos, R., & Madinaveitia-Villanueva, J. A. (2016). Banco de piel y tejidos: un modelo operativo para la recuperación y preservación de aloinjertos de piel y tejidos. *Cirugía y Cirujanos*, 84(1), 85-92.
- Morales-Sánchez J., Ulloa-Fernández A., Castro-Piedra, S., Centeno-Cerdas, C., & Calvo-Castro, L. A. (2019). Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina. *Revista Tecnología En Marcha*, 32(9), Pág 56–65. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4628>
- Ostojić, M., Bulj, Z., Kordić, D., Šunjić, D., Buntić, A., Juka, K., Bliznac, I., Topić, A., Ostojić, Z., Rotim, K., & Bekić, M. (2019). ESTABLISHMENT OF THE BONE TISSUE BANK AT MOSTAR UNIVERSITY CLINICAL HOSPITAL. *Acta clinica Croatica*, 58(4), 571–575. <https://doi.org/10.20471/acc.2019.58.04.01>
- Sáenz Medina, J., Asuero de Lis, M.S., Correa Gorospe, C., Cuevas, B., Gómez Dos Santos, V., Linares Quevedo, A.I., Páez Borda, A., Castellón Vela, I., Marcén Letosa, R., Pascual Santos, J., & Burgos Revilla, F.J.. (2008). Modelos experimentales para la investigación y el entrenamiento en trasplante renal. *Actas Urológicas Españolas*, 32(1), 83-90.
- Sharpe, P.; Miller, A. (2009). NPL Report CIRM 29: Guidelines for the calibration of routine dosimetry systems for use in radiation processing. Teddington: National Physical Laboratory. [https://www.researchgate.net/publication/242694706\\_Guidelines\\_for\\_the\\_Calibration\\_of\\_Dosimeters\\_for\\_use\\_in\\_Radiation\\_Processing/link/5779578708aeb9427e2bfea6/download](https://www.researchgate.net/publication/242694706_Guidelines_for_the_Calibration_of_Dosimeters_for_use_in_Radiation_Processing/link/5779578708aeb9427e2bfea6/download)
- Singh, R., & Singh, A. (2021). The potential of radiation sterilized and banked tissue allografts for management of nuclear casualties. *Cell and Tissue Banking*, 4. <https://doi.org/10.1007/s10561-021-09946-4>
- Tam, E., McGrath, M., Sladkova, M., AlManaie, A., Alostaad, A., & de Peppo, G. M. (2020). Hypothermic and cryogenic preservation of tissue-engineered human bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1460(1), 77–87. <https://doi.org/10.1111/nyas.14264>
- Yusof, N. (2018). Advances of radiation sterilisation in tissue banking. *Cell and Tissue Banking*, 19(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9651-4>

## Apéndices:

### Informe complementario sobre aspectos de irradiación, preparado por el M.Sc. Walter Vargas

#### Calibración de los dosímetros

Los dosímetros utilizados fueron Perspex RED tipo 4034 (batch PS), fabricados a partir de polimetilmetacrilato (Harwell Dosimeters, UK). Para la irradiación de los dosímetros se utilizó un sistema de irradiación autoblandado de la marca Isotop, modelo Ob-Servo Ignis (Izotop, Hungary), que cuenta con 24 fuentes de Co-60. La cámara de irradiación es de forma cilíndrica con 15 cm de diámetro interno y 27 cm de alto, fabricado en acero con un espesor de 2 mm. Las dosis de irradiación fueron: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 kGy, Sharpe, P. et al [1], propone que se deben de utilizar al menos 5 puntos para construir la curva de calibración. La incertidumbre en la determinación de la dosis fue del 1.95 %.

Para la irradiación de los dosímetros se utilizó un maniquí fabricado de PMMA, de forma cilíndrica con 1.26 cm de radio externo, 0.86 cm de radio interno y 6.82 cm de alto, colocado en el centro de la cámara de irradiación. La capacidad del maniquí es de 2 dosímetros, por lo que se realizaron dos rondas de irradiación, ya que se utilizaron 4 dosímetros por dosis (figura 1). La lectura de los dosímetros se realizó con un espectrofotómetro UV-Visible Evolution 220 marca Thermo (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), en modo absorbancia en la longitud de onda ( $\lambda$ ) de 640 nm y se realizó una medida por dosímetro.



Figura 1. a) Posición de los dosímetros dentro del maniquí y b) posición del maniquí dentro del porta muestras.

Los dosímetros Red tienen un espesor de 3 mm, pero debido a la variación de este espesor de  $\pm 0.55 \text{ mm}$  [2], que influye en las lecturas de la absorbancia, se utilizó la cantidad llamada absorbancia específica  $A_\lambda$ , que es calculada mediante la ecuación [3]:

$$A_\lambda = \frac{(Abs)_\lambda}{e} \quad (1)$$

Donde,  $Abs$  es la absorbancia a una longitud de onda definida,  $e$  es el espesor del dosímetro en milímetros.

Para la construcción de la curva de calibración se grafica  $A_\lambda$  en función de la dosis, realizando un ajuste polinomial. Se grafican todos los valores de  $A_\lambda$  obtenidos, para que el ajuste de la gráfica considere la variación entre dosímetros irradiados a una misma dosis [1]. Se verifica la normalidad de los residuos mediante el método Anderson-Darling [4].

### Incertidumbre del proceso de calibración

Se estudiaron las siguientes fuentes de incertidumbre en dosis para el proceso de calibración de los dosímetros: determinación de la dosis de irradiación, la dispersión dosímetro-dosímetro, por la curva de calibración, el efecto de la temperatura y la influencia del espectrofotómetro en la lectura del dosímetro (repetibilidad y variación por la longitud de onda), esta información se encuentra resumida en el cuadro 1.

Cuadro 1. Fuentes de incertidumbre del proceso de calibración de los dosímetros PERSPEX RED.

Fuente	Tipo	Distribución de probabilidad
Determinación dosis	B	Normal
Dispersión dosímetro-dosímetro	A	Normal
Curva de calibración	A	Normal
Efecto de la temperatura	B	Normal
Espectrofotómetro	A	Normal

Las incertidumbres asociadas a la curva de calibración y a la dispersión dosímetro-dosímetro se determinó mediante análisis de residuo. Para el caso de la curva de calibración, se refiere a la variación en dosis entre el valor promedio que registraron los dosímetros y la dosis a la que fueron irradiados. Esta componente se calculó mediante la ecuación [1]:

$$\sigma_{curva}(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left( \frac{\bar{D}_i - D_i}{D_i} * 100 \right)^2}{n}} \quad (2)$$

Donde,  $\bar{D}$  es la dosis promedio medida con los dosímetros,  $D$  es la dosis a la que fueron irradiados los dosímetros y  $n$  es el número de puntos graficados, que fueron 8. Para la determinación de la incertidumbre por la dispersión dosímetro-dosímetro se calculó mediante la ecuación [1]:

$$\sigma_{dosim}(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{med}} \left( \frac{D_{d,i} - D_i}{D_i} * 100 \right)^2}{n_{med} - n_{ajus}}} \quad (3)$$

Donde,  $D_d$  es la dosis reportada por cada dosímetro,  $D$  es la dosis a la cual fue irradiado el dosímetro,  $n_{med}$  es el número total de dosímetros utilizados y  $n_{ajus}$  es el número de parámetros del ajuste. En la dispersión dosímetro-dosímetro, también se incluye la reproducibilidad. Como se indicó en el proceso de irradiación de los dosímetros, debido a las dimensiones del maniquí fue necesario hacer 2 rondas por dosis de irradiación.

Para el caso de la influencia del espectrofotómetro se tomaron 5 medidas de la absorbancia a un mismo dosímetro. Además, el espectrofotómetro tiene una resolución de 0.1 nm, por lo que se midió la variación de la absorbancia debido a este cambio. Las incertidumbres por el espectrofotómetro se estimaron como incertidumbres tipo A [5].

### Mapeo de dosis

El cuadro 2 muestra los valores de dosis límite establecidos para el proceso de irradiación, para cumplir con la esterilización y evitar la alteración del material. [6]

Cuadro 2. Dosis 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, en que el material no se vea afectada sus propiedades

En la irradiación de hueso se utilizó hielo seco para mantener las muestras congeladas. En el proceso de mapeo de dosis para determinar las dosis: máxima, mínima y de monitoreo, se utilizó un polímero granulado o en pellets de densidad de  $1.25 \text{ g/cm}^3$  para simular al hielo seco y hueso. Para la simulación de hueso, 3 recipientes fueron llenados aproximadamente a la mitad de su capacidad 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 ( $D_{max}$ ) y mínima ( $D_{min}$ ). Este proceso fue repetido en 3 ocasiones [7].

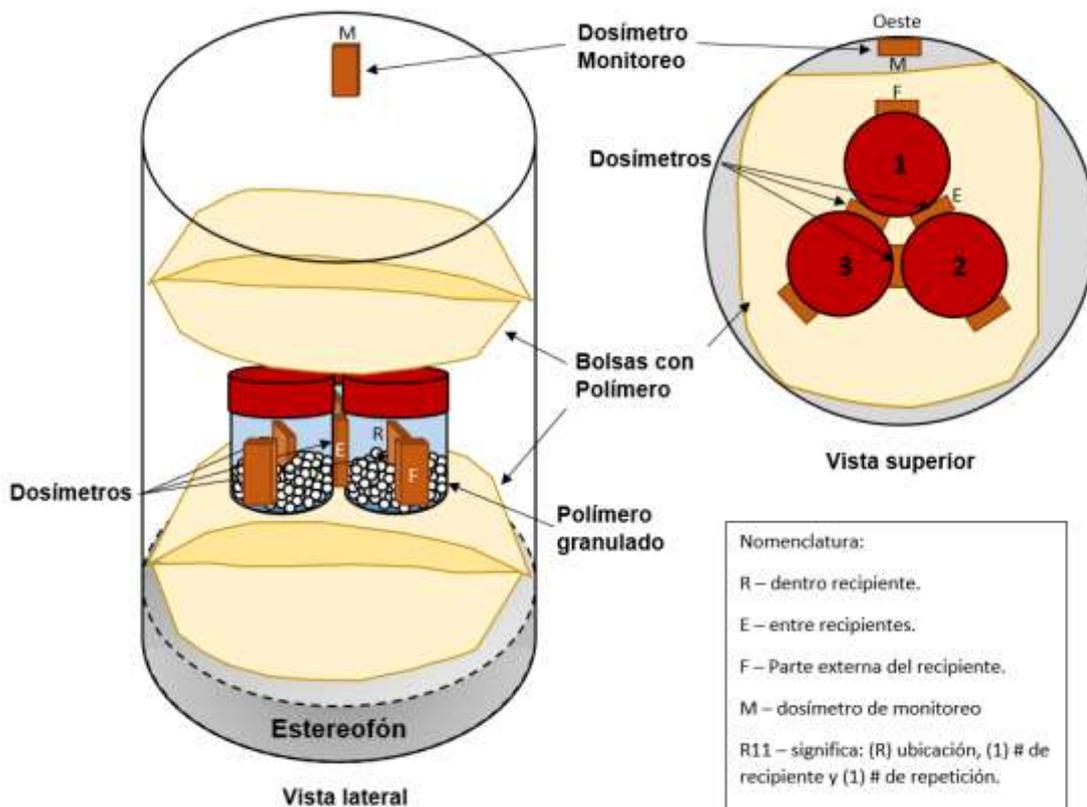


Figura 2. Patrón de carga y posición de los dosímetros.

### Incertidumbre del proceso de irradiación

Para esta parte, se siguió con lo establecido en la norma ISO 11137 parte 4 [7], para la determinación de la incertidumbre del proceso de irradiación y establecer el rango de dosis del dosímetro de monitoreo ( $D_{mon}$ ), en el control de rutina del producto irradiado. La incertidumbre del proceso de irradiación ( $\sigma_{proc}$ ) está dada por la ecuación:

$$\sigma_{proc} = \sqrt{\sigma_{cal}^2 + \sigma_{rep}^2 + \sigma_{maq}^2 + \sigma_{map}^2} \quad (4)$$

$\sigma_{cal}$  se refiere a la calibración de los dosímetros RED. Las restantes fuentes de incertidumbres fueron calculadas como tipo A y a continuación se detallan cada una de ellas:  $\sigma_{rep}$ , 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. 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 porta muestras, se debe a que las fuentes que rodean a este cilindro no tienen la misma actividad.  $\sigma_{map}$ , es la incertidumbre del mapeo, y dependerá de los valores de dosis mínima ( $D_{min}$ ) y máxima ( $D_{max}$ ), como también del número de repeticiones ( $n$ ) realizadas.

Como  $\sigma_{rep}$  y  $\sigma_{maq}$  están relacionadas con el dosímetro de monitoreo, estas dos fuentes de incertidumbre se agrupan en:

$$\sigma_{maq,comb}^2 = \sigma_{rep}^2 + \sigma_{maq}^2 \quad (5)$$

La incertidumbre del proceso se divide en mínima y máxima, quedando de la forma:

$$\begin{aligned} \sigma_{proc,min}(\%) &= \sqrt{\sigma_{cal}^2 + \sigma_{maq,comb}^2 + \sigma_{map,min}^2} \\ \sigma_{proc,max}(\%) &= \sqrt{\sigma_{cal}^2 + \sigma_{maq,comb}^2 + \sigma_{map,max}^2} \end{aligned} \quad (6)$$

Obtenidas las incertidumbres del proceso, se establecieron los valores límite del dosímetro de monitoreo: dosis objetivo mínima ( $D_{Obj,min}$ ) y dosis objetivo máxima ( $D_{Obj,max}$ ), los cuales se calculan mediante las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} D_{Obj,min} &= \frac{D_{est}}{R_{min/mon}} \cdot \frac{1}{\left(1 - k \cdot \frac{\sigma_{proc,min}}{100}\right)} \\ D_{Obj,max} &= \frac{D_{max,acc}}{R_{max/mon}} \cdot \frac{1}{\left(1 + k \cdot \frac{\sigma_{proc,max}}{100}\right)} \end{aligned} \quad (7)$$

Donde,  $R_{min/mon}$  y  $R_{max/mon}$  son las razones de  $D_{min}$  entre  $D_{mon}$  y  $D_{max}$  entre  $D_{mon}$ , respectivamente. El valor de  $k$  es el factor de cobertura, que es igual a 2, para un nivel de confianza del 98 % para un solo lado o cola de la distribución. Definidas estas dosis objetivo, se espera que los valores de dosis de los dosímetros de monitoreo se encuentren entre  $D_{Obj,min}$  y  $D_{Obj,max}$  en el proceso de irradiación de rutina.

### Irradiación de indicadores microbiológicos

Indicadores microbiológicos para evaluar la efectividad de la dosis de esterilización fueron colocados dentro de los recipientes que contienen el polímero, manteniendo las condiciones de irradiación propuestas en el mapeo de dosis (figura 3).

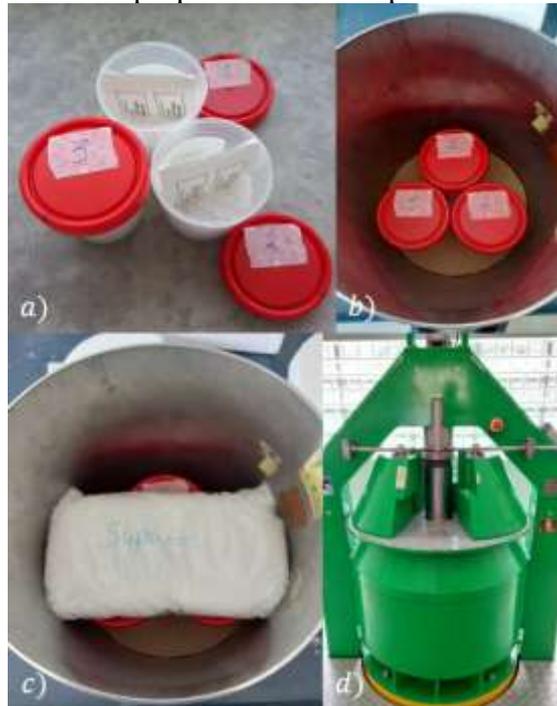


Figura 3. Proceso de irradiación de los indicadores microbiológicos para la evaluación de la dosis de esterilización. a) Colocación de los indicadores dentro de los recipientes, b) posición de los recipientes dentro del porta muestras, c) colocación de la bolsa con polímero que simula el hielo seco y d) colocación del porta muestras en el irradiador.

### **Irradiación de hueso**

Las muestras de hueso fueron colocadas según el patrón de carga mostrado en la figura 2, pero solo colocando el dosímetro de monitoreo para el control dosimétrico. El control de la temperatura dentro de la cámara de irradiación mientras las muestras fueron irradiadas, se utilizó una termocupla. La figura 4 muestra el proceso de irradiación.



Figura 4. Proceso de irradiación de hueso. Los números indican la secuencia del proceso.

## 1. Resultados

La figura 5 se presenta la curva de calibración obtenida de la irradiación de los dosímetros según la metodología planteada. El ajuste propuesto fue polinomial de tercer grado y se determinó que los residuos son normales. Además, se obtuvo que la precisión en la medida de la absorbancia específica promedio por dosis de irradiación, las incertidumbres estuvieron por debajo del 2 %, con un factor de cobertura  $k = 2$ .

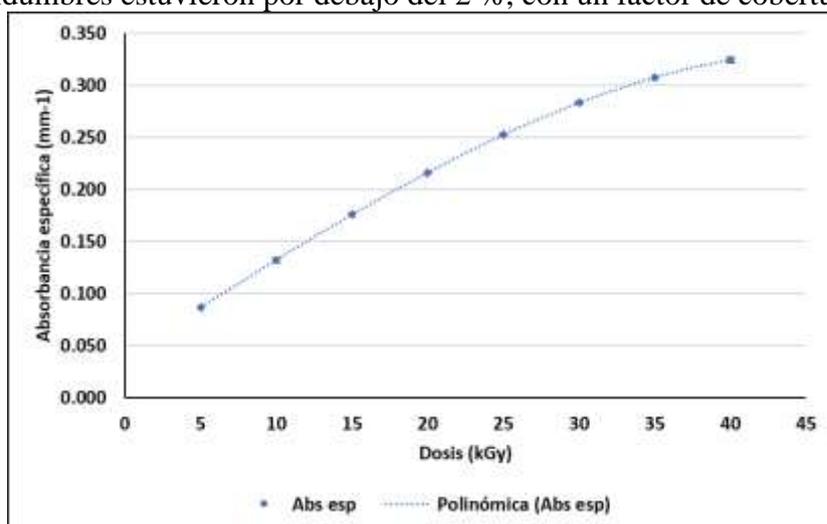


Figura 5. Curva de calibración de los dosímetros Perspex RED.

Del estudio de las fuentes de incertidumbre en el proceso de calibración de los dosímetros, se determinó que la incertidumbre por el espectrofotómetro en la medida de la absorbancia por repetibilidad a un mismo dosímetro fue del 0.03 % y su influencia en la incertidumbre en dosis fue del 0.04 %, este mismo resultado se obtuvo por la variación en la longitud de onda de 0.1 nm, por lo que ambas, no fueron

consideradas en el presupuesto de incertidumbre total de la dosis. Para el caso de la influencia por temperatura, Whittaker B. et al [8], en su estudio sobre la influencia de la temperatura en la absorbancia específica en este tipo de dosímetros, determinó que no es significativa a 30 °C. Esta fue la temperatura máxima a que fueron expuestos los dosímetros, y fue dentro del irradiador. Por lo que, las fuentes de incertidumbre en dosis por calibración de los dosímetros se redujeron a: influencia por la curva de calibración, dispersión dosímetro-dosímetro y por la determinación de la dosis. En el cuadro 3 se resume esta información en que también se incluyen los resultados del proceso de mapeo de dosis.

Cuadro 3. Presupuesto de incertidumbre en dosis del proceso de irradiación de hueso.

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		N	1	1.95		
Incertidumbre por Curvas de Calibración		A	0.22		N	1	0.22		
Dispersión dosímetro-dosímetro		A	1.39		N	1	1.39		
<b>Variaciones en el producto y su ubicación</b>									
Reproducibilidad		A	0.38		N	1	0.38		
Mapeo:	Máxima	Mínima	A	1.41	0.37	N	1	1.41	0.37
Máquina		A	0.53		N	1	0.53		
Suma cuadrática							8.20	6.35	
Incertidumbre combinada (k=1)							2.86	2.52	
Incertidumbre expandida (k=2)							5.73	5.04	

El índice de conformidad indica la variación entre la dosis máxima y mínima, y se calcula mediante la razón entre ellas ( $R_{max/min}$ ). El resultado obtenido fue 1.1119, lo cual indica una diferencia del 11.19 % entre ambas dosis, esta diferencia se debe a las dimensiones de la muestra y como se encuentran distribuidas dentro de la cámara de irradiación. En el cuadro 4 se presenta el rango de aceptación para el dosímetro de monitoreo para el control de rutina en la irradiación de hueso.

Cuadro 4. Rango de dosis para el dosímetro de monitoreo para el control de rutina, en el proceso de irradiación de hueso.

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

\*\*\*Continúa el resultado con los indicadores microbiológicos.

Del proceso de mapeo también se determinó que la razón entre la dosis mínima y de monitoreo ( $R_{min/mon}$ ) 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 %. De los anteriores resultados, se realizó el ajuste del tiempo de irradiación para cumplir con lo establecido en el cuadro 2.

## Referencias

- [1] Sharpe, P.; Miller, A. (2009). NPL Report CIRM 29: Guidelines for the calibration of routine dosimetry systems for use in radiation processing. Teddington: National Physical Laboratory. [https://www.researchgate.net/publication/242694706\\_Guidelines\\_for\\_the\\_Calibration\\_of\\_Dosimeters\\_for\\_use\\_in\\_Radiation\\_Processing/link/5779578708aeb9427e2bfea6/download](https://www.researchgate.net/publication/242694706_Guidelines_for_the_Calibration_of_Dosimeters_for_use_in_Radiation_Processing/link/5779578708aeb9427e2bfea6/download)
- [2] Harwell dosimeters (2022). Harwell Red 4034 Dosimeters. <https://www.harwell-dosimeters.co.uk/harwell-red-4034/>
- [3] ISO/ASTM 51276:2019. Standard Practice for Use of a Polymethylmethacrylate Dosimetry System.
- [4] D. Montgomery (2012). “Design and analysis of experiments”. John Wiley & Sons, Eighth edition, New York.
- [5] Joint Committee for Guides in Metrology. (2008). “Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement”. [https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf/cb0ef43f-baa5-11cf-3f85-4dcd86f77bd6](https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_100_2008_E.pdf/cb0ef43f-baa5-11cf-3f85-4dcd86f77bd6)
- [6] ISO 11137-2:2013. Esterilización de productos para asistencia sanitaria. Parte 3: Establecimiento de la dosis de esterilización.
- [7] ISO/TS 11137-4 (2020). Sterilization of health care products -Radiation- Part 4: Guidance on process control. First edition.
- [8] Whittaker B & Watts M F (1998). The influence of ambient temperature and time on the radiation response of Harwell Red 4034 PMMA Dosimeters. IAEA-SM-356/51.

# Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina

## Cell Culture and Tissue Engineering: Biomedical Applications

Johan Morales-Sánchez<sup>1</sup>, Andrea Ulloa-Fernández<sup>2</sup>, Silvia Castro-Piedra<sup>3</sup>, Carolina Centeno-Cerdas<sup>4</sup>, Laura A. Calvo-Castro<sup>5</sup>

Morales-Sánchez, J; Ulloa-Fernández, A; Castro-Piedra, S; Centeno-Cerdas, C; Calvo-Castro, L. Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina. *Tecnología en Marcha*. Especial 2019. 25 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Pág 56-65.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4628>

1 Ingeniero en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [jmorales@tec.ac.cr](mailto:jmorales@tec.ac.cr).  <https://orcid.org/0000-0003-2383-5516>

2 Ingeniera en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [aulloa@tec.ac.cr](mailto:aulloa@tec.ac.cr).  <https://orcid.org/0000-0003-3071-9584>

3 Ingeniera en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [scastro@tec.ac.cr](mailto:scastro@tec.ac.cr).  <https://orcid.org/0000-0003-0689-8336>

4 Ingeniera en Biotecnología. [ccenteno@tec.ac.cr](mailto:ccenteno@tec.ac.cr). Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

5 Ingeniera en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: [alcalvo@tec.ac.cr](mailto:alcalvo@tec.ac.cr).  <https://orcid.org/0000-0001-6101-9106>



### Palabras clave

Medicina regenerativa; piel; músculo; células madre mesenquimales de tejido adiposo; cáncer; fitoquímicos.

### Resumen

El Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEO) del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) nació en el 2006 con el objetivo de desarrollar terapias celulares para aplicaciones en medicina regenerativa. Actualmente, el LAINTEO aloja más de una decena de proyectos multidisciplinarios, realizados en colaboración con otros centros de investigación y con otras universidades a nivel nacional e internacional. Estas investigaciones se enfocan en el desarrollo y evaluación de implantes, biomateriales y terapias regenerativas de piel, músculo y hueso, incluyendo el aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de tejido adiposo. Además, se han establecido modelos celulares y tisulares para la evaluación del potencial bioactivo de distintos agentes con potenciales aplicaciones en biomedicina.

### Keywords

Regenerative medicine; skin; muscle; mesenchymal adipose stem cells; cancer; phytochemicals.

### Abstract

The Tissue Engineering Laboratory (LAINTEO) at the Biotechnology Research Center (CIB) of the Biology School at Costa Rica Institute of Technology (TEC) began in 2006, aiming towards the development of cell-based therapies for applications in regenerative medicine. Currently, LAINTEO accommodates more than a dozen multidisciplinary research projects, carried out in collaboration with other research centers as well as with other national and international universities. These investigations focus on the development and evaluation of implants, biomaterials and regenerative therapies of skin, muscle and bone tissues, including the isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adipose tissue. In addition, cellular and tissue models are used for the evaluation of the bioactive potential of natural and synthetic agents with potential applications in biomedicine.

### Introducción

El cultivo celular es la técnica mediante la cual una muestra de algún tejido es procesada para extraer las células que lo componen y se colocan en un medio de alimentación bajo las condiciones ambientales adecuadas que les permiten sobrevivir e incluso dividirse. Además de dividirse (usualmente por mitosis), las células cultivadas pueden especializarse en otros tipos celulares con funciones específicas (proceso conocido como diferenciación), con lo cual son capaces de desempeñar funciones análogas a las que tendrían en distintos tejidos u órganos del cuerpo [1].

El cultivo y propagación de células animales son fundamentales para diversos ensayos en la investigación biomédica y preclínica. El rápido crecimiento en áreas como la terapia génica, la genómica y la proteómica ha dado lugar a un aumento notable en las actividades de cultivo celular [2]. Las técnicas de cultivo celular pueden ser utilizadas para estudiar el impacto biológico de sustancias químicas en condiciones controladas de laboratorio y así determinar

efectos tales como citotoxicidad, genotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis en tipos específicos de células. Además, los cultivos celulares se pueden usar como hospederos de virus y bacterias para estudiar su mecanismo de infección o bien, para buscar posibles agentes antivirales o antibacterianos. Los cultivos celulares también pueden ser utilizados como modelos para el estudio de diversas enfermedades y su desarrollo, y son base para la elaboración de vacunas, desarrollo de medicamentos, terapias celulares y otros [2]. De interés para este artículo, destaca la *Ingeniería de Tejidos*, un área directamente relacionada al desarrollo que se ha dado en medicina y biología durante las últimas décadas [3].

El término "ingeniería de tejidos", fue creado para representar un campo de la ciencia enfocado en la regeneración de tejidos, utilizando células en conjunto con biomateriales, andamios y factores de crecimiento [4]. Hasta mediados de la década de 1980, ese término fue utilizado de manera regular para describir únicamente el uso de dispositivos protéticos y biomateriales; a partir de 1987 se utiliza la definición actual, refiriéndose de manera más clara, a la aplicación de principios y métodos de la ingeniería y de ciencias de la vida, hacia la comprensión fundamental de las relaciones estructura-función en mamíferos, y al desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren esa función [3]. Por el tipo de aplicaciones de la Ingeniería de Tejidos, esta disciplina a su vez está enlazada con la cirugía reconstructiva, trasplantes, microcirugía, biología celular, bioquímica, genética, entre otros [5].

#### Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología

El Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEO) del Centro de Investigación en Biotecnología (OIB) de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEO) inició en el 2006 con el proyecto "Implementación de un sistema de producción de piel humana *in vitro* para mejorar la recuperación de pacientes con afecciones epidérmicas en Costa Rica", el cual fue financiado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y el TEO, e implementado por el Dr. Miguel Rojas Ohaves, la M.Sc. Maritza Guerrero Barrantes y la M.Sc. Silvana Alvarenga Venutolo. Esta iniciativa permitió construir y equipar un espacio de laboratorio especializado para el cultivo celular en el OIB, el cual fue inaugurado en el 2006 y donde se iniciaron los primeros cultivos de células humanas con el objetivo de desarrollar terapias celulares para afecciones de la piel. Otros seis proyectos, desarrollados de forma consecutiva entre el 2006 y el 2014, permitieron establecer, optimizar y evaluar, mediante marcadores moleculares y en modelos animales, el cultivo de piel humana con fines regenerativos [5]-[7].

De forma complementaria, se realizaron dos proyectos (2007-2011) en conjunto con la Universidad Nacional (UNA), donde se evaluó el uso de membranas de biomateriales (elaboradas a partir de desechos de quitosano de camarón y colágeno de tilapia) como andamio para el cultivo de células de piel y con miras a desarrollar apósitos biológicos con potencial regenerativo [8]. Además, se ejecutaron dos proyectos (2009-2014) para el establecimiento de procedimientos e instalaciones de irradiación con miras a la creación de Bancos de Tejidos en la región, también con apoyo del OIEA y como parte de un programa de colaboración latinoamericano [9].

El desarrollo de estos proyectos impulsó la consolidación del área de investigación "Área de Biomedicina" en el OIB, la cual se transformó en el área de "Aplicaciones Biomédicas" (2014), enmarcada dentro del eje de conocimiento estratégico "Salud" del TEO y una de las tres áreas formales de investigación del OIB (junto con Biotecnología Vegetal y Biotecnología Ambiental).

A partir del 2012, las áreas de investigación en el LAINTEO se han diversificado considerablemente, incluyendo proyectos multidisciplinarios con otros centros de investigación del TEO y con otras universidades a nivel nacional e internacional. Estas iniciativas se han enfocado en proyectos de ingeniería de tejidos, con miras al desarrollo de implantes, biomateriales y terapias regenerativas.

de piel, músculo y hueso en humanos, además de continuar con estudios en regeneración de heridas, incorporando el aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de tejido adiposo y la evaluación de distintos agentes con potenciales aplicaciones en biomedicina.

En el LAINTEO también se cuenta con un pequeño banco de líneas celulares de distintos tipos de cáncer y algunas líneas de tejidos normales, y se han establecido modelos de cultivos tisulares tridimensionales de piel humana, los cuales se utilizan como modelos de estudio para realizar ensayos de citotoxicidad y de determinación de la actividad biológica (basado en marcadores moleculares de proliferación, viabilidad y muerte celular) de sustancias de origen natural. En estos modelos se ha evaluado –mayoritariamente– el potencial anticancerígeno de diversos extractos de plantas, incluyendo plantas medicinales (moringa, tempate, chillillo) y especies frutales (mora, mango, manzana, guayaba) [10]–[17]. En el caso de los modelos tisulares, al tratarse de reconstrucciones 3D, los constructos de piel recrean de forma más cercana el tejido *in vivo*, por lo que permiten generar información pre-clínica de alta calidad y de mayor potencial predictivo.

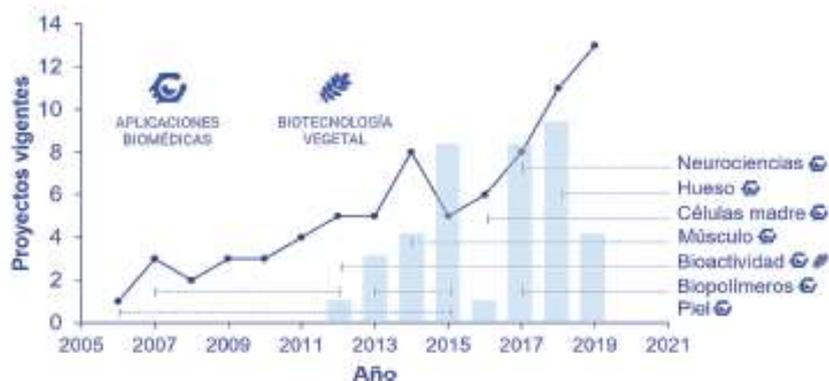
A la fecha, estos proyectos han permitido capacitar a más de diez investigadores, quienes han recibido entrenamiento con expertos en centros médicos y de investigación especializados en Argentina, Uruguay, España, Estados Unidos, Inglaterra y Alemania. Gracias a esto, el equipo de trabajo ha crecido para incorporar a la Dra. Laura A. Oaño Castro (Ingeniería de Tejidos y Biología Celular y Molecular, 2008), M.Sc. Carolina Centeno Oerdas (Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa, 2009), M.Sc. Montserrat Jarquín Cordero (Mejoramiento genético y Biotecnología, 2012), Ing. María Inés Ohaves Rodríguez (Biotecnología, 2013-2018), M.Sc. Andrea Ulloa Fernández (Ingeniería de Tejidos, 2014), Ing. Johan Morales Sánchez (Ingeniería de Tejidos, 2014), M.Sc. Silvia Oaño Fiedra (Ingeniería de Tejidos, 2014), y María Olara Soto Bernardini (Neurociencias, 2017). El LAINTEO también ha alojado numerosos trabajos de graduación de estudiantes de la carrera de Bachillerato en Ingeniería en Biotecnología (TEO), varios proyectos y pasantías de estudiantes nacionales e internacionales, así como tesis de maestría.

En la actualidad, el LAINTEO cuenta con tres laboratorios especializados: un laboratorio dedicado para la docencia –debido al incremento en la demanda de personal científico calificado con experiencia en el manejo de cultivo de células humanas y animales *in vitro*–, y dos laboratorios utilizados para actividades de investigación, en donde se desarrollan 12 proyectos (figura 1) relacionados con Ingeniería de tejidos y bioactividad, en los que se utilizan cultivos celulares de piel, células madre mesenquimales, músculo, hueso, y líneas celulares de distintos tipos de cáncer, y experimentos con biomateriales como insumos primarios.

### Cultivo de piel *in vitro*

Las experiencias de cultivo de piel humana *in vitro* y de Ingeniería de tejidos de piel realizadas en el LAINTEO, así como recomendaciones para la criopreservación de piel cadavérica, fueron reportadas previamente en esta misma revista [5]–[9]. Estas prácticas permitieron establecer las condiciones y técnicas generales para el cultivo primario de células de piel de origen humano y animal, escalando hacia la reconstrucción de modelos tridimensionales de este tejido. Actualmente, en el LAINTEO se estudia el potencial quimioterapéutico de diversos agentes bioactivos en modelos de piel *in vitro*.

Por otro lado, mediante colaboraciones internacionales (Universidad Técnica de Múnich, y Universidad Ludwig Maximilian, Alemania), se han estudiado métodos alternativos para la regeneración de la piel, garantizando su apropiada oxigenación y promoviendo su vascularización mediante el uso de microalgas genéticamente modificadas para la liberación de oxígeno y factores de crecimiento humano como VEGF, PDGF y SDF-1 alfa [18], [19].



**Figura 1.** Cantidad de proyectos por año (línea continua) realizados en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEC) del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) desde su creación (2006) a la actualidad (2019). La línea punteada indica el área de investigación de los proyectos vigentes por periodo. Las columnas indican la cantidad de publicaciones científicas por año. El área de neurociencias se describe en otro artículo de esta misma edición.

### Células madre mesenquimales

Otra de las líneas de Investigación del LAINTECO está relacionada al uso de células madre. En las últimas dos décadas, el tejido adiposo ha pasado de ser considerado un tejido de reserva energética, a uno mucho más dinámico con numerosas cualidades, entre las que destaca el ser materia prima para determinadas terapias celulares [1].

Cuando el tejido adiposo es disgregado en el laboratorio, libera una mezcla de células que se conocen como la Fracción Estromal Vasculosa (FEV) [2]. Este coctel de células incluye células madre mesenquimales (OMM), células precursoras endoteliales, células endoteliales, macrófagos, células de músculo liso, linfocitos, pericitos y preadipocitos. Bajo las condiciones adecuadas, las OMM son capaces de adherirse y proliferar en condiciones de cultivo celular [20].

Tanto la FEV como las OMM han mostrado tener gran potencial en la regeneración de heridas cutáneas, por lo que están siendo estudiados a nivel internacional con el fin de obtener todas las evidencias científicas necesarias para demostrar su inocuidad y eficacia [21]. Costa Rica no es la excepción, ya que desde el 2015 en el TEC, se ha venido estableciendo el aislamiento y caracterización molecular de estas células, con miras a ofrecer opciones terapéuticas alternativas a quienes sufran de heridas agudas o crónicas en la piel y otras patologías.

A la fecha, se ha logrado exitosamente establecer los protocolos que permiten obtener tanto la FEV como las OMM y se ha demostrado su potencial de diferenciación en varios tipos celulares. Por otro lado, se han realizado pruebas en animales con el fin de observar su efecto regenerativo *in vivo*. El próximo paso consiste en realizar pruebas en seres humanos, para lo cual el TEC busca alianzas estratégicas con el sector salud, que permitan desarrollar de forma responsable y ética cada una de las fases de Investigación correspondientes, de manera que se pueda transferir estas estrategias como una terapia para atender diversas afecciones de la piel.

## Músculo Esquelético

El músculo esquelético estriado es el tejido más abundante del cuerpo y presenta el potencial de ser regenerado tras una herida o enfermedad [22]. Sin embargo, la pérdida masiva de tejido muscular, así como el padecimiento de diferentes distrofias, hace que esta regeneración se vea comprometida, pues se requiere de técnicas especializadas para su reconstrucción, muchas de ellas basadas en terapia celular e ingeniería de tejidos [23]. No obstante, los tratamientos actuales basados en trasplante autólogo de músculo esquelético o la inyección de células en suspensión o vía intravenosa han sido poco exitosos [24].

Las células encargadas de la regeneración muscular reciben el nombre de células satélite. A partir del año 2014, se inició la investigación en el OIB para establecer el aislamiento de este tipo de células, a través de técnicas de cultivo celular. El objetivo que se busca es la creación de modelos tridimensionales *in vitro* de las distrofias musculares más comunes en el país, así como mejorar la calidad de vida de pacientes con grandes pérdidas de tejido muscular a través de terapia celular. La recreación *in vitro* de tejido muscular requiere de un esfuerzo multidisciplinario y la utilización de biomateriales que simulen la arquitectura del tejido, además de la generación de estímulos mecánicos y eléctricos, lo cual es fundamental para lograr el desarrollo de fibras musculares funcionales [24].

De esta manera, se ha trabajado en conjunto con el Centro de Investigación y Extensión de Ingeniería de los Materiales (CIEMTEO) y las escuelas de Física y Química del TEO, así como con otros centros de investigación nacionales como el Instituto Clodomiro Picado (ICP) y el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA). Estas colaboraciones se han enfocado en diferentes factores que contribuirán a reproducir en el laboratorio las condiciones bajo las cuales este tejido se regenera *in vivo*. Dentro del trabajo actualmente en desarrollo, se incluye un biorreactor que realiza estímulos mecánicos a cultivos celulares inoculados sobre matrices de polycaprolactona (PCL) y un sistema de generación de impulsos eléctricos; ambos permitirían incrementar la diferenciación muscular sobre andamios tridimensionales.

Estos proyectos se desarrollan con miras a generar constructos de músculo esquelético tridimensionales que permitan el estudio del mecanismo de acción y reparación del tejido muscular ante la exposición a toxinas que destruyen el músculo esquelético, así como para modelar las distrofias musculares más comunes en Costa Rica, y su uso como modelo de estudio para generar terapias que mejoren la calidad de vida de los pacientes con distintas afecciones del tejido músculo esquelético.

## Hueso

El tejido óseo comprende cerca del 15% del peso corporal y es el responsable de brindarle estructura al cuerpo y proteger los órganos internos, además de almacenar nutrientes y producir otros tejidos como la sangre [25]. Al igual que el resto del cuerpo, este tejido puede sufrir lesiones, fracturas, enfermedades que dificulten la movilidad e incluso conlleven a la pérdida de un segmento óseo. Tradicionalmente, cuando algún segmento es severamente dañado, este se reemplaza por algún material que simule la estructura perdida, pero no los componentes biológicos. En la actualidad, se tiende a la utilización de materiales más bioactivos y reabsorbibles que puedan ser recolonizados por las células que componen el tejido óseo y reestablecer la funcionalidad completa de la zona dañada [25], [26].

En conjunto con instituciones del campo de la Salud como el Hospital del Trauma del Instituto Nacional de Seguros, el Laboratorio de Entrenamiento e Investigación en Cirugía Minimamente Invasiva (LEICIMI), la Universidad Técnica de Múnich y la Escuela de Física, el TEO está desarrollando el área de investigación en tejido óseo. A la fecha, se trabaja en la validación

preclínica de las condiciones de irradiación y esterilización de tejido óseo para su uso en banco de tejidos, así como en el desarrollo de andamios hechos a partir de biomateriales reabsorbibles, que permitan simular la biología celular del tejido óseo bajo condiciones *in vitro*.

El desarrollo de la Ingeniería de tejidos de hueso conlleva un proceso altamente dinámico y complejo que implica el reclutamiento, proliferación, migración y diferenciación de células osteoprogenitoras, las cuales, además de estar embebidas en un material poroso, este debe tener las propiedades mecánicas adecuadas que permitan un comportamiento lo más similar al hueso real [27]. Debido a lo anterior, junto con el OIEMTEO, se están desarrollando diferentes mezclas de biomateriales y recubrimientos para la creación de estructuras porosas por medio de impresión 3D, que permitan simular la estructura tridimensional de tejido óseo.

Una de las premisas para el correcto desarrollo de andamios biocompatibles para la regeneración ósea, como se menciona anteriormente, es que el material debe poseer propiedades mecánicas altamente equivalentes al hueso nativo [27]. Con este fin, en el mismo biorreactor mencionado en la sección anterior, se pretende inocular células osteogénicas embebidas en andamios que simulen la estructura porosa del hueso, a fin de estudiar las propiedades mecánicas del material bajo condiciones similares a lo que ocurre *in vivo*, además de estudiar el comportamiento celular ante diferentes estímulos mecánicos y cómo estos inciden este sobre la diferenciación celular.

### Biocompatibilidad con otros materiales

Se denomina biomateriales a aquellas sustancias que han sido diseñadas como estructura de soporte o como intermediarios para mediar la Interacción con componentes de sistemas vivos en procedimientos terapéuticos o de diagnóstico [28]. Los andamios generados con biomateriales deben de cumplir una serie de propiedades mecánicas, tales como biodegradabilidad controlada y la habilidad de imitar las estructuras biológicas y la función de la matriz extracelular [29].

En Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, los andamios juegan un papel crítico, por lo que son diseñados para ser biocompatibles con cierto grado de porosidad y una superficie que permita la adhesión, migración, proliferación, diferenciación e infiltración de las células [29]. Mediante diferentes técnicas biomecánicas, de microscopía, de cultivo celular y biología molecular, todas estas características son analizadas en los diferentes biomateriales que se estudian en el laboratorio.

En el pasado, se realizaron en el OIB pruebas con quitosano (obtenido a partir de exoesqueleto de camarón) y colágeno (obtenido de piel de tilapia), para generar un apósito con miras a su aplicación clínica en afecciones de la piel, por lo que fue necesario asegurarse de que tuviera las características necesarias para que células epiteliales pudieran interactuar con él [8]. De la misma manera, se ha trabajado además una serie de materiales de origen biológico que funcionan como soporte para el crecimiento de queratinocitos y fibroblastos (células de la piel) o bien OMM, todos ellos con miras a la aplicación clínica.

Actualmente, tanto en los estudios que se realizan a nivel de tejido óseo como en los estudios que utilizan células musculares, LAINTEO realiza ensayos de biocompatibilidad para verificar la interacción que se da entre los materiales y el componente biológico. Otro de los biomateriales que se encuentra en estudio es una aleación metálica nanoestructurada con recubrimientos biofuncionales, producida por OIEMTEO, y con la cual se busca generar dispositivos médicos o parte de ellos.

### Modelos celulares y tisulares para análisis de actividad biológica

Los cultivos de piel humana *in vitro*, tanto a nivel de monocapa como en constructos tridimensionales de piel completa (dermis-epidermis), han resultado útiles como modelo en pequeña escala para el estudio del efecto de sustancias naturales y de materiales con características bioactivas, con miras al desarrollo de alimentos funcionales, nutraceuticos y fitofármacos. Los análisis realizados incluyen: determinación de efecto antioxidante (método de DPPH), concentración de polifenoles totales (método de Folin-Ciocalteu), citotoxicidad en líneas celulares de distintos tipos de cáncer en humanos (cuantificación de viabilidad celular por medio del reactivo MTT y de células totales por tinción de DAPI), evaluación del potencial regenerativo (ensayo de migración celular), y análisis de marcadores moleculares de proliferación, viabilidad y muerte celular (mediante Western Blot, Inmunocitoquímica, e Inmunofluorescencia). Esto permite proporcionar herramientas clave para facilitar la medicina personalizada, al tiempo que ahorra dinero y reduce la cantidad de animales utilizados para la investigación. A la fecha, estos estudios han permitido confirmar el potencial biomédico de sustancias bioactivas presentes en extractos de diversas plantas en Costa Rica, tales como la mora [10], manzana, anona y ciruelo [13]–[15], [30], guayaba [11] y varias plantas medicinales (*Phyllanthus*, *Senna reticulata*, *Pectiveria alliacea*, *Moringa*) [12], [16], [17], [31], [32].

### Conclusión

La investigación en Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa ofrece soluciones novedosas en el área de Biomedicina, tanto para la generación de evidencia preclínica, así como para la creación de nuevas estrategias diagnósticas, preventivas y terapéuticas. Con una trayectoria de más de 10 años, los proyectos desarrollados en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del OIB en el TEO han contribuido a la capacitación de recurso humano en técnicas de cultivo y expansión de células humanas y reconstrucción de tejidos humanos *in vitro*, con miras a aplicaciones prácticas en el área de la salud. La perspectiva a futuro que se ha planteado el LAINTEO es contribuir además al establecimiento y desarrollo en el país de la medicina traduccional, un concepto reciente que busca el traslado de los avances alcanzados en el laboratorio a la práctica clínica diaria, con el beneficio directo para los pacientes y la sociedad en general.

### Referencias

- [1] D. E. Lynn, "Cell culture" in *Encyclopedia of Insects*, Segunda ed. Burlington: Academic Press, 2009.
- [2] C. Helgason and C. Miller, Eds., *Basic Cell Culture Protocols*. Totowa: Humana Press, 2013.
- [3] U. Meyer, T. Meyer, J. Handschel, and H. P. Wiesmann, Eds., *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
- [4] F. Akter, *What is tissue engineering? in Tissue Engineering Made Easy*. Cambridge, UK: Academic Press Inc. (London) Limited, 2016.
- [5] L. A. Calvo-Castro, M. Guerrero-Barrantes, C. Centeno-Cerdas, M. I. Chaves-Rodríguez, N. Chaves-Solano, and M. Rojas-Chaves, "Cultivo *in vitro* de autoinjertos epiteliales para el tratamiento de lesiones en la piel," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 33–45, 2015.
- [6] M. I. Chaves-Rodríguez, L. A. Calvo-Castro, R. Alvarado-Meza, O. Madrigal-Monge, A. Ulloa-Fernández, and C. Centeno-Cerdas, "Sustitutos e injertos de piel desarrollados por ingeniería de tejidos," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 46–57, 2015.
- [7] A. Ramírez-Téllez, C. Centeno-Cerdas, M. Conejo-Solis, and L. A. Calvo-Castro, "Irradiación subletal de fibroblastos murinos 3T3 con rayos X para su utilización como capa celular alimentadora," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 15–26, 2015.

- [8] S. E. Castro-Piedra *et al.*, "Membranas de colágeno y quitosano de fuentes alternativas : evaluación para su uso potencial en ingeniería de tejidos," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 58-68, 2015.
- [9] L. A. Calvo-Castro, M. Guerrero-Barrantes, A. Ulloa-Fernández, R. Portuguez-Barboza, C. Centeno-Cerdas, and M. Rojas-Chaves, "Evaluación de técnicas de procesamiento y almacenamiento de piel cadavérica para bancos de tejidos," *Tecnol. en Marcha*, vol. 28, no. 5, pp. 62-82, 2015.
- [10] L. Calvo-Castro *et al.*, "Protective effect of tropical highland blackberry juice (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) against UVB-mediated damage in human epidermal keratinocytes and in a reconstituted skin equivalent model," *Photochem. Photobiol.*, vol. 89, no. 5, pp. 1199-1207, Sep. 2013.
- [11] K. Sánchez-zúñiga, S. Castro-piedra, I. Moreira, E. Arnáez-serrano, and M. Navarro-hoyos, "Evaluación de las propiedades citotóxicas de un extracto de frutos de guayaba ( *Psidium* Cytotoxic evaluation of properties in guava fruit," 2017.
- [12] I. Moreira-González *et al.*, "Estudio de cuatro plantas con uso medicinal tradicional cultivadas en las regiones Huetar Norte y Atlántica de Costa Rica," *Rev. Tecnol. en Marcha*, pp. 69-77, 2014.
- [13] M. Navarro *et al.*, "Polyphenolic Characterization and Antioxidant Activity of *Malus domestica* and *Prunus domestica* Cultivars from Costa Rica," *Food*, vol. 7, p. 15, 2018.
- [14] M. Mirna Navarro *et al.*, "Estudio preliminar del potencial bioactivo de la *Annona cherimola* (anóna) y *Prunus domestica* (ciruelo) cultivadas en Costa Rica," *Rev. en Marcha*, vol. 27, no. 2, pp. 37-44, 2014.
- [15] M. Navarro *et al.*, "Chemical Profiling of Polyphenolic Compounds in the Fruit Skin of *Prunus Domestica* Plums from Costa Rica," *J. Res. Anal.*, vol. 3, pp. 42-51, 2017.
- [16] M. Navarro *et al.*, "Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd.," *Plants*, vol. 6, p. 50, 2017.
- [17] M. Navarro *et al.*, "Flavonoids and Ellagitannins Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Phyllanthus acuminatus* Vahl," *Plants (Basel, Switzerland)*, vol. 6, p. 62, 2017.
- [18] T. Ludwig *et al.*, "Biomaterials Towards autotrophic tissue engineering : Photosynthetic gene therapy for regeneration Tom a," vol. 75, pp. 25-36, 2016.
- [19] C. Centeno-cerdas *et al.*, "Acta Biomaterialia Development of photosynthetic sutures for the local delivery of oxygen and recombinant growth factors in wounds," *Acta Biomater.*, vol. 81, pp. 184-194, 2018.
- [20] C. Tremolada, V. Colombo, and C. Ventura, "Adipose Tissue and Mesenchymal Stem Cells : State of the Art and Lipogems ® Technology Development," *Curr. Stem Cell Reports*, vol. 2, pp. 304-312, 2016.
- [21] P. Bora and A. S. Majumdar, "Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine : a brief review on biology and translation," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 8, p. 145, 2017.
- [22] F. S. Todesco, A. Dellavalle, J. Diaz-manera, G. Messina, and G. Cossu, "Repairing skeletal muscle : regenerative potential of skeletal muscle stem cells," *J. Clin. Invest.*, vol. 120, no. 1, pp. 11-19, 2010.
- [23] M. Juhas *et al.*, "Incorporation of macrophages into engineered skeletal muscle enables enhanced muscle regeneration," *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 2, pp. 942-954, 2018.
- [24] B. J. Kwee and D. J. Mooney, "Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 47, pp. 16-22, 2017.
- [25] T. T. Madanagopal, S. V. Agarwalla, and V. Rosa, *Carbon nanocomposites for implant dentistry and bone tissue engineering*. Elsevier Inc., 2019.
- [26] P. Wolff *et al.*, "Oxygen-distribution within 3-D collagen I hydrogels for bone tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 96, pp. 422-427, 2019.
- [27] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, "Recent advances in bone tissue engineering scaffolds," *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 546-554, 2012.
- [28] D. F. Williams, "On the nature of biomaterials," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5897-5909, 2009.
- [29] Y. H. Murugan Ramalingam, Ziyad Haidar, Seeram Ramakrishna, Hisatoshi Kobayashi, Ed., *Integrated Biomaterials in Tissue Engineering*. Scrivener Publishing LLC, 2012.
- [30] M. Navarro-Hoyos *et al.*, "Estudio preliminar del contenido polifenólico y capacidad antioxidante de la especie *Malus domestica* cultivada en Costa Rica," *Rev. Tecnol. en Marcha*, vol. 30, no. 1, pp. 3-13, 2017.

- [31] M. Sequeira-Obando, L. Ca, Ivo-Castro, I. Moreira-González, E. Améz-Serrano, and M. Navarro, "Cytotoxic effect of an ethanol extract of *Phyllanthus accuminatus* leaves on human epithelial cancer cells," *Pharmacol. Online*, vol. 12, p. 22, 2014.
- [32] K. Sánchez-Zúñiga, L. Calvo-Castro, I. Moreira-González, M. Sequeira-Obando, E. Améz-Serrano, and M. Navarro, "Preliminary evaluation of the cytotoxic capacity of an ethanol extract from *Moringa oleifera* leaves," *Pharmacol. Online*, vol. 12, p. 103, 2014.

## Dosimetría absoluta mediante película radiocrómica en un sistema de irradiación gamma, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS

Absolute dosimetry through radiochromic film in gamma irradiation system using a spectrophotometer UV-VIS

Walter Vargas-Segura<sup>1</sup>

---

Vargas-Segura, W. Dosimetría absoluta mediante película radiocrómica en un sistema de irradiación gamma, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS. *Tecnología en Marcha*. Vol. 33-1. Enero-Marzo. Pág 36-43.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v33i1.5019>

<sup>1</sup> Máster en Física Médica, Escuela de Física, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Servicio de Radioterapia, Hospital México, Caja Costarricense de Seguro Social, Costa Rica. Correo electrónico: wlvargas@tec.ac.cr.  
 <https://orcid.org/0000-0008-2634-1945>



### Palabras clave

Gafchromic HD-V2; calibración películas radiocromicas; espectro absorbancia; irradiador gamma; densidad óptica.

### Resumen

El propósito de este trabajo fue la calibración de las películas Gafchromic HD-V2 mediante la adaptación de los procedimientos de calibración de películas utilizados en dosis bajas. Las películas se irradiaron en 11 valores de dosis en el rango de 0 a 106,28 Gy en un sistema de irradiación gamma y utilizando un espectrofotómetro UV-VIS para medir la densidad óptica. Se obtuvieron los espectros de absorbancia para varias dosis y el pico de máxima absorbancia se ubicó en la longitud de onda de 677 nm. Esta longitud de onda se utilizó para realizar las medidas de la densidad óptica (OD), y estos resultados se utilizaron para realizar el gráfico de dosis en función a la densidad óptica neta (ODn). Se obtuvieron la curva de calibración de las películas y la incertidumbre en la dosis, con valores inferiores al 4% en dosis entre 10 a 20 Gy, e incertidumbres inferiores al 3% para dosis superiores a 20 Gy hasta completar el rango de la curva. La calibración del sistema película radiocromica-espectrofotómetro se obtuvo para el rango de dosis y el sistema de irradiación gamma empleado.

### Keywords

Gafchromic HD-V2; radiochromic film calibration; absorbance spectrum; gamma irradiator; optical density.

### Abstract

The propose of this work was the Gafchromic HD-V2 film calibration, though adapting film calibration procedures applied in low dose. The films were irradiated in 11 dose values within of the range from 0 to 106,28 Gy in a gamma irradiation system, and using a spectrophotometer for the optical density measure. The absorbance spectrum were obtained for several dose, and the maximum absorbance peak was located in the wavelength of 677 nm. This wavelength was used for make the measurements of the optical density (OD), and these results were used for make the dose versus net optical density (ODn) graph. The calibration curve of the films and uncertainty in the dose were obtained, with values under 4% in dose between 10 to 20 Gy, and uncertainties under 3% for dose up from 20 Gy until complete the range of the curve. The calibration of the radiochromic film-spectrophotometer system was obtained for dose range and gamma irradiation system employed.

### Introducción

Las películas radiocromicas Gafchromic HD-V2 cuenta con una capa activa de 8  $\mu\text{m}$  de espesor que se encuentra sobre una capa de poliéster de 97  $\mu\text{m}$  de espesor [1]. La sensibilidad a la radiación de la capa activa depende de su espesor, que al ser expuesta se genera un proceso de polimerización, el cual produce un cambio en las propiedades ópticas de la película, es por esta razón que se establece una relación entre la densidad óptica (OD) de la película y la dosis recibida [2].

El rango de dosis para la película HD-V2 es de 10 a 1000 Gy, por lo que su uso no suele ser en el ámbito médico, sino más bien en el Industrial o Investigación a altas dosis [3]-[5]. Se

han realizado muchos estudios de los instrumentos utilizados para la medida de la OD de las películas, incluso trabajos comparativos entre distintos dispositivos, pero, en la gran mayoría se hace referencia a las películas radiocrómicas utilizadas en el ámbito médico [6]-[9]. Además, se han publicado procedimientos para el proceso de calibración de las películas radiocrómicas [10], [11].

Uno de estos instrumentos utilizados para la medida de la OD es un espectrofotómetro, pero este equipo suele usarse para el análisis del espectro de absorbancia de la película y en pocas ocasiones para realizar dosimetría absoluta [5], [12]-[15].

El propósito de este trabajo es la calibración de las películas radiocrómicas HD-V2, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS como instrumento para la medida de la OD, basándose en los estudios realizados en la calibración de películas radiocrómicas utilizadas en el ámbito médico.

### Materiales y métodos

Las películas Gafchromic HD-V2 (lote#: 11171601) utilizadas en este trabajo, vienen en láminas de 8"x10". Esta lámina fue cortada en piezas de 1,6 cm x 2,6 cm. Se agruparon 3 piezas por dosis de irradiación, para un total de 33 piezas utilizadas en este estudio. Para ser irradiadas, cada grupo de 3 piezas fueron colocadas en un maniquí de forma cilíndrica, fabricado de polimetilmetacrilato (PMMA) con dimensiones de 0,8 cm de radio interno, 1,2 cm de radio externo y 6,6 cm de altura.

Las películas fueron irradiadas en un sistema de irradiación gamma de la marca Izotop, modelo Servo-Ignis de fabricación húngara, que cuenta con 24 láminas de cobalto 60. La cámara de irradiación es de forma cilíndrica de dimensiones de 15 cm de diámetro, por 27 cm de alto, para una capacidad de 6 litros. Para el momento de este estudio, la tasa de dosis en el centro de la cámara era de 61 Gy/min. Se tomaron 11 de valores de dosis para irradiar las películas en el rango de 0 a 106,26 Gy, colocando el maniquí con las 3 películas en el centro de la cámara de irradiación.

El proceso de lectura de las películas radiocrómicas se realizó 24 horas después de haber sido irradiadas, este periodo de tiempo es necesario para que se establezca el proceso de polimerización [11]. Para medir el grado de oscurecimiento de las películas debido a la dosis recibida, se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS Evolution 220 marca Thermo (Thermo Fisher), en modo absorbancia. Primero, a las películas irradiadas a distintas dosis se les tomaron los espectros de absorbancia en la región visible del espectro electromagnético (400 nm a 760 nm), con el fin de determinar la longitud de onda del pico de mayor absorbancia. Además, para observar posibles distorsiones en el espectro (ruido), así como la capacidad del espectrofotómetro para medir el grado de oscurecimiento de la película, dada por la limitación indicada por el fabricante de 3,0 en la medida de la absorbancia.

Hallada la longitud de onda del pico de mayor absorbancia, se realizaron las medidas de las películas tomando la densidad óptica igual a la absorbancia. En este procedimiento se realizaron 3 medidas por películas, manteniendo la misma orientación de las películas para evitar el efecto de la polarización [16], [17]. Por lo que, por dosis de irradiación, se tomó el valor promedio de las nueve medidas de OD realizadas, calculando además, la incertidumbre asociada a este valor promedio [18]. Pero, para la construcción de la curva de calibración, se calculó la densidad óptica neta (OD<sub>n</sub>), mediante la siguiente ecuación:

$$OD_n = OD_{ir} - OD_{an}$$

Donde:

OD<sub>ir</sub> es la densidad óptica de la película irradiada.

$OD_{0Gy}$ , es la densidad óptica de la película sin irradiar (0 Gy).

Para la construcción de la curva de calibración de las películas, se graficó la dosis en función de la ODn. El ajuste propuesto para esta curva y la incertidumbre asociada a los valores de dosis que se deriven de esta calibración, se siguió con lo establecido por Devlo et al [16]. El cual menciona en su trabajo, una ecuación para el ajuste de la curva, de la forma:

$$D_{Ajuste} = a \cdot ODn + b \cdot ODn^n$$

Donde:

ODn, es la densidad óptica neta.

$D_{Ajuste}$ , es la dosis calculada a partir del valor de ODn medido.

a y b, son los parámetros del ajuste y n es un valor constante determinado por el usuario.

Además, en su trabajo se establece la expresión para la incertidumbre de la dosis, de la forma:

$$\sigma_D (\%) = \frac{\sqrt{ODn^2 \cdot \sigma_a^2 + ODn^{2n} \cdot \sigma_b^2 + (a + n \cdot b \cdot ODn^{n-1})^2 \cdot \sigma_{ODn}^2}}{D_{Ajuste}} \cdot 100$$

Donde:

$\sigma_D$ ,  $\sigma_{ODn}$ ,  $\sigma_a$  y  $\sigma_b$  son las incertidumbres asociadas: a la dosis, a la ODn y a los parámetros del ajuste a y b, respectivamente.

$D_{Ajuste}$  es la dosis calculada mediante la curva de calibración.

Para el tratamiento de los datos y la elaboración de las gráficas se utilizaron los programas Excel y GNUPlot.

## Resultados

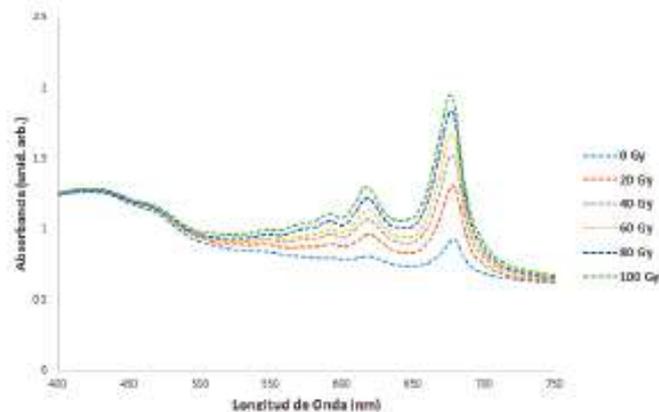
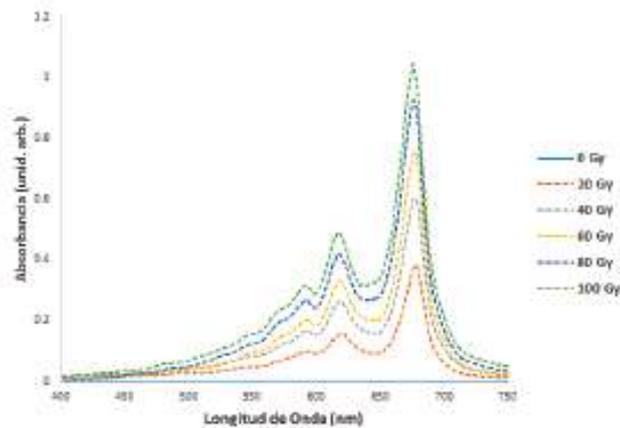
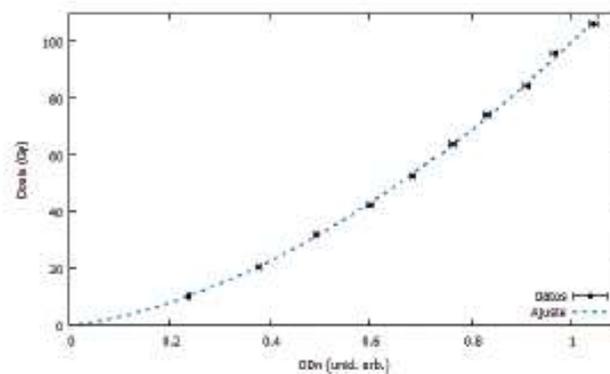


Figura 1. Espectros de absorción a distintas dosis.



**Figura 2.** Espectros de absorbanza neta. Es el resultado de la diferencia entre la absorbanza a una dosis determinada menos la absorbanza de la película sin irradiar (0 Gy).

En la figura 1 se muestran los espectros de absorbanza a distintas dosis. Donde se puede localizar el pico de mayor absorbanza en la longitud de onda de 677 nm. De esta figura se puede apreciar que la absorbanza aumenta con la dosis y también que no existen distorsiones en el espectro, ni cortes en los picos de absorbanza. La figura 2 muestra el espectro de absorbanza neta, que es el resultado de la resta del espectro de la película irradiada, menos el espectro de la película sin irradiar (0 Gy), procedimiento que fue utilizado para obtener la ODn.



**Figura 3.** Curva de calibración de las películas HD-V2.

La figura 3 presenta la curva de calibración con el ajuste propuesto. Se obtuvo una correlación por encima del 0,999.

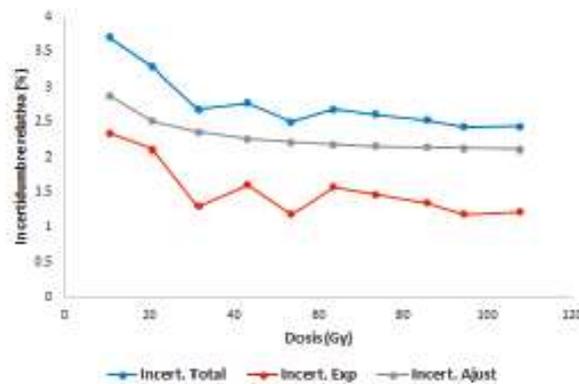


Figura 4. Variación de la incertidumbre en función de la dosis.

La variación de la incertidumbre en la dosis calculada a partir de la curva de calibración se muestra en la figura 4. La cual presenta una disminución de la incertidumbre al aumentar la dosis.

### Discusión

En este estudio se toman procedimientos empleados en la calibración de películas radiocrómicas utilizadas a bajas dosis y son aplicados en el proceso de calibración espectrofotómetro-película radiocrómica HD-V2, que serán utilizados como sistema de dosimetría de rutina a material irradiado en un sistema de irradiación gamma.

Los espectros presentados muestran el pico de mayor absorbancia localizado en la longitud de onda de 677 nm y un comportamiento creciente de la OD al aumentar la dosis, ya que es en esta región donde se presentan las mayores diferencias de OD entre dosis, lo cual reduce la posibilidad que exista superposición de espectros y el error en la determinación de la dosis, este resultado concuerda con otros estudios [8], [6]. Además, los valores máximos de OD no sobrepasaron la tolerancia del detector dada por el fabricante, lo que no generó distorsiones en los espectros de absorbancia medidos. El sobrepasar el límite genera un corte en el pico de absorbancia y un aumento en el ruido, lo anterior debido a la capacidad del detector, ya que la cantidad de luz que atraviesa la película y llega al detector es menor a su límite de detección [5], [13]. Yiwei Feng et al. [6] presenta esta limitación en su estudio del espectro de absorbancia para estas películas al ser irradiadas con protones a altas dosis y sugiere el uso de otras longitudes de onda para la determinación de la OD.

Hay varios estudios en que el uso del espectrofotómetro se limita al análisis del espectro absorbancia de las películas [12]-[16], y la dosimetría absoluta es realizada mediante otro tipo de equipos como los escáner de mesa [19], [20], tal es el caso de S. N. Ohen et al [4], que en su estudio las películas radiocrómicas utilizadas (entre ellas la HD-V2), fueron medidas mediante diversos escáneres de mesa en modo RGB y en escala de grises, presentado las curvas de calibración para cada canal y propone ajustes polinomiales de segundo y tercer grado para las curvas. Respecto a la ecuación de ajuste, se observa en la literatura la aplicación de diversas funciones, quedando la elección a criterio del investigador [4], [9], [10], [16]. Para el caso

de este trabajo, se inclinó por el ajuste planteado en la metodología debido a que los valores calculados de ODn permitieron construir la curva de calibración, obteniendo como resultado un ajuste aceptable, al igual que las incertidumbres obtenidas. Que relacionado a este último aspecto, no fue posible encontrar en la literatura un tratamiento detallado de la incertidumbre asociada a la dosis calculada mediante la curva de calibración, tanto para este tipo de películas [3], [4], como en estudios en que se utiliza un espectrofotómetro como instrumento de lectura de la OD [3], [5], [12]. Como se indicó anteriormente, esto motivó a que se utilizara el procedimiento planteado por Devic et al. [15] para el tratamiento de la incertidumbre asociada a la dosis y al tipo de ajuste propuesto, que al comparar el resultado obtenido con su estudio, se observa un comportamiento similar en la incertidumbre, que tiende a ser mayor a bajas dosis (cerca del límite inferior de detección de la película), y luego se reduce al aumentar la dosis. Este comportamiento también lo presenta E. Marroquin et al. [21] en su estudio acerca de la incertidumbre de las películas EBT3, que en el límite inferior de dosis, esta incertidumbre llega aproximadamente al 7% en el canal rojo, que es el utilizado para bajas dosis, hasta llegar a valores cercanos al 1% a dosis más altas. Un detalle importante es que el resultado obtenido en el límite inferior de detección para la película HD-V2 fue por debajo del 4%, que es considerablemente menor al comparar con los estudios mencionados, además, el rango de dosis utilizado es un 10% del rango total de detección de las películas HD-V2 (de 10 a 1000 Gy). Este resultado abre la interrogante para un posterior trabajo, que si lo anterior es debido al instrumento utilizado en la medida DO o es producto del comportamiento de la película, para ello se debe hacer un análisis comparativo entre un escáner de mesa de alta resolución y el espectrofotómetro.

La curva de calibración encontrada es válida para el sistema de dosimetría empleado (espectrofotómetro-película radiocromática HD-V2) y para el irradiador gamma utilizado.

### Conclusión

Por los resultados obtenidos se logra adaptar el proceso de calibración de las películas radiocromáticas utilizadas a bajas dosis, a las condiciones de irradiación y de lectura de las películas utilizadas en este estudio, lo que habilita al sistema espectrofotómetro-película radiocromática HD-V2, para ser utilizado en el control dosimétrico de rutina del material irradiado en el sistema de irradiación gamma.

### Referencias

- [1] Ashland dosimetry systems. Gafchromic dosimetry media, type HD-V2, 2012.
- [2] S. Devic et al. "Absorption spectroscopy of EBT model Gafchromic™ film", *Med. Phys.*, vol. 34, n° 1, pp: 112-118, 2007. DOI: 10.1118/1.2400615
- [3] A. Aydarous et al. "The effects of electrons and photons irradiation on the optical and thermophysical properties of Gafchromic HD-V2 films", *Results in Physics*, vol. 6, pp: 962-966, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rinp.2016.11.025>
- [4] S. N. Chen et al. "Absolute dosimetric characterization of Gafchromic EBT3 and HDv2 films using commercial flat-bed scanners and evaluation of the scanner response function variability", *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 87, pp: 073301-1 a 073301-6, 2016. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4964921>
- [5] Y. Feng et al. "Spectral calibration of EBT3 and HD-V2 radiochromic film response at high dose using 20 MeV proton beams", *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 89, pp: 043511-1 a 043511-12, 2018. <https://doi.org/10.1063/1.4996022>
- [6] J. E. Matney et al. "Evaluation of a commercial flatbed document scanner and radiographic film scanner for radiochromic EBT film dosimetry", *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, vol. 11, n° 2, pp: 198-208, 2010
- [7] S. Devic et al. "Dosimetric properties of improved Gafchromic films for seven different digitizers", *Med. Phys.*, vol. 31, n° 9, pp: 2392-2401, 2004. DOI: 10.1118/1.1776691

- [8] H. Alnawaf et al. "Comparison of Epson scanner quality for radiochromic film evaluation", *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, vol. 13, n.º 5, pp: 314-321, 2012.
- [9] G. R. Gluckman and L. E. Reinstein. "Comparison of three high-resolution digitizers for radiochromic film dosimetry", *Med. Phys.*, vol. 29, n.º 8, pp: 1839-1846, 2002. <http://dx.doi.org/10.1118/1.1485056>
- [10] S. Devic et al. "Reference radiochromic film dosimetry. Review of technical aspects", *Physica Medica*, vol. 32, pp: 541-556, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmp.2016.02.008>
- [11] A. Niroomand-Rad et al. "Radiochromic film dosimetry. Recommendation of AAPM Radiation Therapy Committee Task Group 55", *Med. Phys.*, vol. 25, n.º 11, pp: 2093-2115, 1998. <http://dx.doi.org/10.1118/1.598407>
- [12] H. Alnawaf et al. "Absorption spectra response of XRQA radiochromic film to x-ray radiation", *Radiation Measurements*, vol. 45, pp: 129-132, 2010.
- [13] M. B. Callens et al. "Modeling the dose dependence of the vis-absorption spectrum of EBT3 Gafchromic™ films", *Med. Phys.*, vol. 44, n.º 5, pp: 2532-2543, 2017. <https://doi.org/10.1002/mp.12246>
- [14] E. Y. Marroquín et al. "Análisis de los espectros de absorción de las películas EBT2 y EBT3", *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, vol. 38, n.º 1, pp: 363-371, 2017. <dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.32>
- [15] S. Devic et al. "Precise radiochromic film dosimetry using a flat-bed document scanner", *Med. Phys.*, vol. 32, n.º 7, pp: 2245-2253, 2005. DOI: 10.1118/1.1629253
- [16] M. J. Butson et al. "Polarization effects on a high-sensitivity radiochromic film", *Phys. Med. Biol.*, vol. 48, pp: N207-N211, 2003. <stacks.iop.org/PMB/48/N207>
- [17] H. Alnawaf et al. "Scanning orientation and polarization effects for XRQA radiochromic film", *Physica Medica*, vol. 26, pp: 216-219, 2010. doi:10.1016/j.ejmp.2010.01.003
- [18] JCGM. "Evaluación de datos de medición-Guía para la expresión de la incertidumbre de medida", 3ª edición en español, 2009.
- [19] V. Casanova et al. "Dosimetric characterization and use of Gafchromic EBT3 film for IMRT dose verification", *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, vol. 14, n.º 2, pp: 158-171, 2013.
- [20] J. Lárraga-Gutiérrez et al. "Evaluation of a LED-based flatbed document scanner for radiochromic film dosimetry in transmission mode", *Physica Medica*, vol. 47, pp: 86-91, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2018.02.010>
- [21] E. Y. Marroquín et al. "Evaluation of the uncertainty in an EBT3 film dosimetry system utilizing net optical density", *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, vol. 17, n.º 5, pp: 466-481, 2016.

## PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA: PROCESAMIENTO Y ESTERILIZACIÓN DE TEJIDO ÓSEO

**Consideraciones de seguridad:** Se deben usar guantes y ropa protectora en todo momento.

### Medidas de control de peligros

Seleccione qué tipo de bata de laboratorio, protección para los ojos y protección para las manos se utilizará.

<input type="checkbox"/> Guantes de látex	<input type="checkbox"/> Guantes aislantes	<input type="checkbox"/> Careta	<input type="checkbox"/> Respirador
<input type="checkbox"/> Guantes de nitrilo	<input type="checkbox"/> Lentes de seguridad	<input type="checkbox"/> Bata de laboratorio	<input type="checkbox"/> Campana extractora
<input type="checkbox"/> Guantes de neopreno	<input type="checkbox"/> Gafas ventiladas	<input type="checkbox"/> Delantal	<input type="checkbox"/> Cabina de bioseguridad
<input type="checkbox"/> Guantes de vinilo	<input type="checkbox"/> Gafas contra salpicaduras	<input type="checkbox"/> Mascarilla antipolvo	<input type="checkbox"/> Caja de guantes
<input type="checkbox"/> Zapatos cerrados		<input type="checkbox"/> Bata resistente al fuego	

**Realizado por:** \_\_\_\_\_

**Supervisado por:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_\_

### MATERIALES

Suero fisiológico

Peróxido de hidrógeno al 3%

Gentamicina 80mg

Cefalotina 1g

Etanol al 95%

Solución salina

Placa Petri con PDA

Placa Petri con caldo CASO

### EQUIPO

Sierra para molienda, incubadora, agitador, tamiz para filtración, beaker, viales.

### PROCEDIMIENTO

**Día 1) Esterilización. Colocar un ✓ en cada paso una vez realizado.**

1. Colocar el hueso a 4°C 24-48 horas antes de realizar el procesamiento.
2. Cortar los huesos con una sierra para realizar la molienda de la cabeza Femoral.
3. Eliminar tejido blando.
4. Colocar cada fragmento en el molidor y realizar la molienda.
5. Colocar hueso molido en un frasco de 250ml.
6. Agregar suero fisiológico hasta que cubra la totalidad del hueso. Colocar el frasco con el hueso a 60 °C durante 50 minutos. El frasco deberá estar envuelto en una bolsa estéril. Rotular lo siguiente en el frasco:  
Hora inicio: \_\_\_\_\_ Hora finalización \_\_\_\_\_
7. Eliminar el suero utilizando un tamiz para filtración.
8. Lavar dos veces con suero en agitación por 10 minutos. Eliminar el suero en cada cambio utilizando el tamiz para filtración. Anotar lo siguiente:  
Hora inicio: \_\_\_\_\_ Hora finalización \_\_\_\_\_  
Hora inicio: \_\_\_\_\_ Hora finalización \_\_\_\_\_
9. Lavar dos veces en agitación por 10 minutos con Peróxido de hidrógeno al 3%. Eliminar el Peróxido de hidrógeno en cada cambio utilizando un tamiz para filtración. Anotar lo siguiente:

Hora inicio: \_\_\_\_\_ Hora finalización \_\_\_\_\_

Hora inicio: \_\_\_\_\_ Hora finalización \_\_\_\_\_

10. Lavar una vez con suero en agitación por 5 minutos.
11. Disolver los antibióticos (una ampolla de 80 mg de Gentamicina y una ampolla de 1g de Cefalotina) en 100 ml de suero y agregarlos al beaker con el hueso granulado.
12. Adicionar suero hasta cubrir el contenido de hueso y agitar durante 20 minutos.  
Hora inicio: \_\_\_\_\_ Hora finalización \_\_\_\_\_
13. Eliminar el suero con antibióticos mediante filtrado.
14. Agregar Peróxido de hidrógeno al 3% y dejarlo en agitación durante 18 horas. El frasco deberá estar envuelto en una bolsa estéril.
15. Realizar etiquetas y autoclavar las muestras.

**Día 2) Control microbiológico 1. Colocar un ✓ en cada paso una vez realizado.**

Verificación y control de esterilidad de materiales y suministros

Sí	No

**Temperatura de la sala de procesamiento \_\_\_\_\_**

**Limpieza de equipos utilizados:**

Equipo	Cumple	No cumple
Cámara de flujo laminar		
Agitador calentador magnético		

**Realizado por:** \_\_\_\_\_

**Verificado por:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_\_

1. Quitar peróxido al hueso mediante filtrado.
2. Agregar alcohol al 95% y agitar durante 20 minutos. Anotar:  
Hora inicio: \_\_\_\_\_ Hora finalización \_\_\_\_\_
3. Lavar con solución salina durante 5 minutos. Anotar:  
Hora inicio: \_\_\_\_\_ Hora finalización \_\_\_\_\_
4. Dispensar en viales en 1, 5 y 10cc y anotar:

Cantidad de viales	Cantidad de hueso/vial (g)

--	--

**Realizado por:** \_\_\_\_\_

**Verificado por:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_\_

5. Tomar muestra de solución de último lavado y de hueso para **\*microbiología**.
6. Empacar en doble bolsa y congelar a -80°C en zona de cuarentena.

**3) \*Control microbiológico 1.2. Colocar un ✓ en cada paso una vez realizado.**

1. Tome 1 ml de los eluidos finales e inocule una placa Petri con PDA. Incube de 3 a 7 a 28 °C para observar crecimiento de hongos.
2. Tome 1 ml de los eluidos finales e inocule en caldo CASO, incube durante un máximo de 3 días a 30-35 °C en el caso de cepas bacterianas y 22,5 °C en el caso de los hongos durante un máximo de 5 días.

**REFERENCIAS**

Nevalainen H., Kautto L., Te'o J. (2014) Methods for Isolation and Cultivation of Filamentous Fungi. In: Paulsen I., Holmes A. (eds) Environmental Microbiology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1096. Humana Press, Totowa, NJ.

**PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA: EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDO ÓSEO CON BUFFER DE GUANIDINA-HCl**

**Resumen:** El siguiente protocolo describe el procedimiento de extracción de proteínas de hueso. La calidad de las muestras de tejido óseo se examina mediante control microbiológico previo con el protocolo de Procesamiento y Esterilización de Tejido Óseo. A esto le sigue la extracción de proteínas, utilizando tampón que contiene guanidina y ácido clorhídrico y precipitación con acetona, posteriormente se realiza una medición de la concentración de proteínas mediante ensayo de Bradford.

**Consideraciones de seguridad:** Se deben usar guantes y ropa protectora en todo momento.

**Medidas de control de peligros**

Seleccione qué tipo de bata de laboratorio, protección para los ojos y protección para las manos se utilizará.

<input type="checkbox"/> Guantes de látex	<input type="checkbox"/> Guantes aislantes	<input type="checkbox"/> Careta	<input type="checkbox"/> Respirador
<input type="checkbox"/> Guantes de nitrilo	<input type="checkbox"/> Lentes de seguridad	<input type="checkbox"/> Bata de laboratorio	<input type="checkbox"/> Campana extractora
<input type="checkbox"/> Guantes de neopreno	<input type="checkbox"/> Gafas ventiladas	<input type="checkbox"/> Delantal	<input type="checkbox"/> Cabina de bioseguridad
<input type="checkbox"/> Guantes de vinilo	<input type="checkbox"/> Gafas contra salpicaduras	<input type="checkbox"/> Mascarilla antipolvo	<input type="checkbox"/> Caja de guantes
<input type="checkbox"/> Zapatos cerrados		<input type="checkbox"/> Bata resistente al fuego	

**Realizado por:** \_\_\_\_\_

**Supervisado por:** \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

### MATERIALES

Buffer de lisis Gu-HCl (Guanidina-HCl 6 M, Tris 100 mM (pH 7,4) y cóctel de inhibidores de proteasa)

HCl 1,2 M

Agua destilada

EDTA tetrasódico 0,5 M

HCl 6 M

### EQUIPO

Incubadora, centrífuga, tubos Eppendorf, tubos Falcon.

### PROCEDIMIENTO

a) **Extracción de las proteínas. Colocar un  $\checkmark$  en cada paso una vez realizado.**

Verificación y control de esterilidad de materiales y suministros

Sí	No

### Limpieza de equipos utilizados:

Equipo	Cumple	No cumple
Cámara de flujo laminar		
Agitador calentador magnético		

Realizado por: \_\_\_\_\_

Verificado por: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

1. Incubar la muestra de hueso (0,2 g de tejido óseo / mL de solución) durante toda la noche a 4 °C en HCl 1,2 M (excluir el control de este paso).

**Hora inicio:** \_\_\_\_\_ **Hora finalización:** \_\_\_\_\_

2. Centrifugar y recoger el sobrenadante, rotular como Extracto 1.
3. Lavar con agua destilada el residuo de tejido óseo desmineralizado y el control e incubarlos en el buffer de lisis Gu-HCl durante 72 horas a 4 °C.

**Día y Hora inicio:** \_\_\_\_\_ **Día y Hora finalización:** \_\_\_\_\_

4. Centrifugar y recoger el sobrenadante de ambas muestras, rotular como Extracto 2 y Control 2 respectivamente.
5. Incubar los residuos de muestra desmineralizada y control en el buffer de lisis utilizado anteriormente más EDTA tetrasódico 0,5 M durante 72 horas a 4 °C.

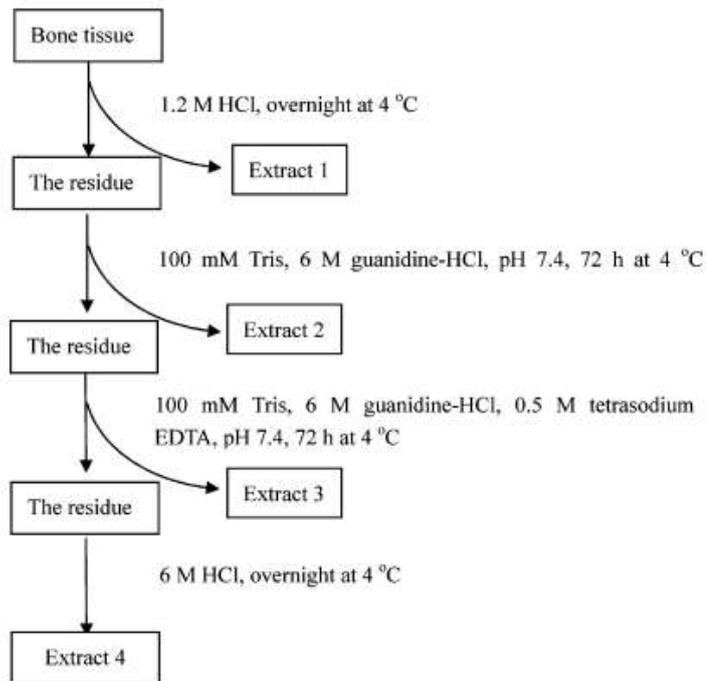
**Día y Hora inicio:** \_\_\_\_\_ **Día y Hora finalización:** \_\_\_\_\_

- Centrifugar y recoger el sobrenadante de ambas muestras, rotular como Extracto 3 y Control 3 respectivamente.
- Incubar los residuos de muestra desmineralizada y control en HCl 6 M a 4 °C durante toda la noche.

**Hora inicio:** \_\_\_\_\_ **Hora finalización:** \_\_\_\_\_

- Finalmente, centrifugar y recoger el sobrenadante de ambas muestras, rotular como Extracto 4 y Control 4 respectivamente.

El proceso se ilustra en la siguiente figura:



**Figura 1.** Resumen del método de extracción secuencial de proteínas para tejido óseo (Jiang *et al.*, 2007).

**b) Precipitación de las proteínas. Colocar un ✓ en cada paso una vez realizado.**

- Precipitar todos los extractos y controles de proteína cruda en acetona a -20 °C durante la noche.

**Hora inicio:** \_\_\_\_\_ **Hora finalización:** \_\_\_\_\_

- Redisolver las muestras de proteína precipitada en un buffer con Tris 100 mM, guanidina-HCl 6 M, pH 8.1.
- Determinar la concentración de proteína mediante el ensayo de Bradford con BSA como estándar de proteína.

**REFERENCIAS**

Jiang, X., Ye, M., Jiang, X., Liu, G., Feng, S., Cui, L., & Zou, H. (2007). Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis. *Journal of proteome research*, 6(6), 2287-2294.