

# Esterilización mediante radiación gamma de un extracto liofilizado de placenta humana: Reporte preliminar

Emma Castro<sup>1,\*</sup>, Nohemí Ticona<sup>3</sup>, Marco Linares<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Irradiación de Productos Médicos (LIPM), Dirección General de Investigación y Desarrollo Tecnológico, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

<sup>2</sup> Laboratorio de Irradiación (LI), Dirección de Aplicaciones, Dirección General de Seguridad Radiológica, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

<sup>3</sup> Facultad de Odontología, Universidad Nacional Federico Villarreal, Calle San Marcos 351, Lima 21, Perú

## Resumen

En la práctica odontológica, la hemostasia quirúrgica debe tenerse en cuenta durante el acto operatorio, porque accidentalmente puede provocarse hemorragia. Para el control del sangrado son muy útiles agentes hemostáticos. El factor tisular (FT) es una glicoproteína que participa activamente en la formación del coágulo lo que lo convierte en un potencial hemostático. La placenta humana es un órgano muy rico en FT, a partir de la cual, éste puede ser extraído. El proceso de procuración de las placentas humanas, la extracción del extracto así como la aplicación de un método de preservación hacen necesario que el extracto de placenta se deba someter a un agente esterilizante. La radiación gamma proveniente del Cobalto-60 es un método eficaz para esterilizar productos médicos y materiales biológicos. El propósito de este estudio preliminar es evaluar la factibilidad de que un extracto de placenta liofilizado pueda ser esterilizado por radiación gamma, manteniendo sus propiedades. Se realizaron ensayos dosimétricos y se irradiaron muestras del extracto de placenta liofilizado. Se llevaron a cabo pruebas microbiológicas, organolépticas y hemostáticas en las muestras irradiadas y sin irradiar. Los resultados de las pruebas fueron comparados, demostrándose que es posible aplicar la radiación gamma para la esterilización del extracto de placenta.

## Abstract

In odontological practice while performing operator procedures, surgical haemostasis must be considered. In controlling accidentally produced bleeding, haemostatic agents are very useful. Tissue Factor (TF) is a glycoprotein that actively participates in clot formation, for this it can be considered as a potential haemostatic agent. TF can be extracted from human placenta, as this organ is very rich in TF. Procurement of human placentae, TF extraction process as well as preservation procedures applied could make necessary that the placental extract so obtained, should need for a sterilizing process. Gamma radiation from Co-60 is an efficient agent for sterilizing biological and medical products. The purpose of this preliminary study is to verify the feasibility that a human lyophilized placental extract could be sterilized by gamma radiation maintaining its properties. Dosimetric assays and irradiation of extract samples were performed. Microbiological, organoleptic and hemostatic tests on irradiated and non irradiated samples were also performed. Tests results were compared and the feasibility of sterilizing of this placental extract through gamma radiation was proven.

## 1. Introducción

En la práctica odontológica, al aplicar procedimientos quirúrgicos, se puede activar el sistema hemostático de los pacientes. El sistema hemostático es el conjunto de mecanismos fisiológicos en defensa del organismo. Tiene como propósito evitar la hemorragia, mantener la integridad así como la permeabilidad del sistema circulatorio [1,2].

La hemostasia puede ser considerada en su aspecto espontáneo o bien desde el punto de

vista de la técnica quirúrgica. La hemostasia espontánea se define como el conjunto de procesos biológicos, precisamente integrados, cuya finalidad es conseguir que la sangre se mantenga dentro del sistema vascular, mientras que la hemostasia quirúrgica agrupa todos los procedimientos técnicos que el acto operatorio [3]. En este último caso, son de gran utilidad agentes hemostáticos.

---

\* Correspondencia autor: ecastro@ipen.gob.pe

cirujano emplea para controlar la hemorragia que se produce accidentalmente o durante el

Mediante un mecanismo complejo se forma el coágulo y en el proceso participan los 13 factores de coagulación [4], entre ellos el factor tisular (FT), conocido también como tromboplastina o Factor III de coagulación. El FT es una glicoproteína de membrana que inicia el mecanismo de coagulación de la sangre mediante la vía extrínseca. La placenta, el cerebro y los pulmones son tejidos muy ricos en FT. Los extractos de tromboplastina a partir de estos órganos son utilizados en pruebas clínicas de laboratorio *in vitro* para la evaluación de los tiempos de coagulación de la sangre de pacientes con trastornos de la hemostasia [5]. Por otro lado, se reconoce la función hemostática de los extractos de FT [6].

El FT se puede extraer de placenta humana y para su conservación se puede liofilizar. El proceso de procuración de las placentas humanas, la extracción del extracto así como su liofilización hacen necesario que el extracto de placenta se deba someter a un método de esterilización, el mismo que no debe dañar su propiedades. La radiación gamma, proveniente del Cobalto-60 es un método eficaz para esterilizar productos médicos y materiales biológicos [7] y su aplicación está normada [8, 9,10].

Previa determinación de la dosis de esterilización de productos médicos o tejidos biológicos es necesario llevar a cabo el proceso de calificación del producto, que consiste en verificar las propiedades del producto y su empaque aplicando diferentes dosis de irradiación, de modo que se asegure que es factible aplicar la radiación gamma sin disminuir la performance y calidad del producto.

Así, el propósito de este estudio preliminar es efectuar el proceso de calificación del producto, en un extracto de placenta liofilizado, para determinar su factibilidad de ser esterilizado por radiación gamma, para luego aplicar la norma correspondiente para su esterilización.

No se tiene información previa sobre trabajos referentes a la irradiación gamma de extractos de placenta humana liofilizados, si bien, en la bibliografía se encuentran diversos trabajos sobre irradiación de amnios, parte estructural de la placenta [11].

Finalmente, este trabajo guarda relación con las investigaciones que en la actualidad se están llevando a cabo en IPEN, sobre materiales biológicos para uso quirúrgico.

## 2. Metodología

Se trabajó con un extracto de placenta humana, liofilizado, el mismo que fue preparado en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Marcos (UNMSM) y liofilizado en la Facultad de Medicina de la UMSM.

La cantidad de unidades con la que se realizó este estudio, las mismas que estaban envasadas en viales de polietileno de baja densidad, fue de 60 viales, los que contenían 0,1 g por unidad de producto.



**Figura 1.** Unidad de Producto empacada.

A continuación se describen las pruebas, actividades, equipos, materiales y medios de cultivo utilizados en este estudio.

### 2.1 Dosimetría e irradiación de las muestras

Las técnicas dosimétricas utilizadas para el mapeo de las dosis en la cámara de irradiación así como para medir las dosis absorbidas por el producto fueron Fricke como referencia [12] y el Etanol Clorobenceno (ECB) [13], como rutina. Se trabajó con una muestra compuesta por 12 viales para cada dosis con extracto de placenta, además se trabajó con un fantomas haciendo un peso total de 1 200 g, con una densidad aparente en la cámara de irradiación de 0,340 g/cc.

Los equipos utilizados para esta prueba fueron: un irradiador, modelo Gammacell 220 Excel, de la Nordion Inc. de Canadá, con fuentes de Co-60 y con una actividad de 12 546 Ci al 18 de julio del 2007, donde se llevaron a cabo las irradiaciones y un Espectrofotómetro Perkin Elmer Modelo, UV

VIS, Lambda 2, donde se llevaron a cabo las lecturas de la absorbancia de los dosímetros Fricke irradiados, a una longitud de onda  $\lambda$  de 303.00 nm. A modo de control, durante la irradiación se colocaron con la muestra, dosímetros de etanol clorobenceno cuya conductividad luego de irradiados, se midió en el Oscilotrator/TRIEM. Las muestras se irradiaron a las dosis de 5, 10, 15 y 25 kGy.

## 2.2 Pruebas microbiológicas

Las pruebas que se realizaron incluyeron el recuento total de microorganismos mesófilos en las muestras no irradiadas y esterilidad en las muestras tratadas con radiación gamma.

Los equipos que se utilizaron para la realización de estas pruebas fueron: Autoclave Raypa AES-75 Dry, Estufa Incubadora VWR Scientific, Balanza toploading Mettler 682B, Agitador magnético Stuart Scientific, Baño maría Tecam, Shaker Orbital Labline, Agitador de tubos Fisher y Flujo Laminar Envair. Los medios de cultivo que se utilizaron fueron: Caldo Casoy, Agar Plate Count, Caldo Tioglicolato, todos productos Merck.

Los ensayos se realizaron según la norma ISO 11737-1 1995 [14] y la US Pharmacopea [15].

## 2.3 Pruebas hemostáticas

Estas pruebas se realizaron *in vitro*, utilizando el método de Lee-White, que consiste en la evaluación del tiempo de coagulación en 1 ml de sangre de pacientes voluntarios.

Los materiales y equipos utilizados fueron: tubos de ensayo, jeringas hipodérmicas de 5 ml; Baño María HumAqua 5, con un rango de temperatura hasta 80 °C, digital y con termómetro programado a una temperatura constante de 37 °C. Para registrar los tiempos de coagulación se utilizó un cronómetro.

Se trabajó con 12 pacientes, 3 individuos por dosis. Las muestras examinadas fueron aquellas tratadas a 0, 10, 15 y 25 kGy.

Se extrajo la sangre de los pacientes con jeringas hipodérmicas y se colocó 1 ml de sangre en cada tubo de ensayo, el que inmediatamente se colocó en baño maría. Se enfrentó la sangre con las muestras del extracto irradiadas a la dosis de 0, 10, 15 y 25 kGy. Se evaluó el tiempo de coagulación de

la sangre con un cronómetro, a intervalos de 30 s. Los tiempos de coagulación obtenidos fueron comparados con el tiempo de coagulación del grupo control, es decir, de las muestras de sangre sin extracto de placenta.

## 2.4 Características organolépticas

Por el método visual se observó la apariencia, color, así como el olor de todas las muestras, irradiadas y el control, para determinar variaciones en sus características físicas.

## 3. Discusión de Resultados

### 3.1 Resultados

En lo que se refiere a las pruebas dosimétricas, los resultados fueron los siguientes, en aire el valor de la tasa de dosis fue de  $11,5019 \pm 0,03328$  kGy/h siendo el error de 0,61866 % comparado con la tasa de dosis de la MDS Nordion de Canada. (Tabla N° 1).

**Tabla 1:** Estadística de la regresión para la dosimetría fricke en aire.

Tiempo (s)	Dosis (kGy)
15	0.06190
25	0.09395
35	0.12571
45	0.15785
55	0.18970
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.99999876
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.99999752
R <sup>2</sup> ajustado	0.99999669
Error típico	9.1864E-05
Observaciones	5
Coeficientes	
Intercepción	0.01399702
Variable X 1	0.00319497

El mapeo de la dosis del producto en la cámara de irradiación determinó una tasa de dosis mínima de 8,2567 kGy/h y una tasa dosis máxima de 13,966 kGy/h. (Tabla N° 2).

La uniformidad de dosis hallada fue de 1,69154, valor dentro del rango esperado para el equipo de irradiación y el peso del producto. La lectura del dosímetro de etanol clorobenceno, colocado en el sitio de dosis mínima al irradiar las muestras a 5 kGy, indicó variaciones menores al 6 %.

**Tabla 2:** Estadística de la regresión para la dosimetría fricke en el producto.

Tiempo [s]	Dosis mínima	Dosis máxima
20	0.05334	0.09756
30	0.07731	0.13407
40	0.10041	0.17373
50	0.12209	0.21338
60	0.14919	0.25189
<i>Estadísticas de la regresión para la Dosis Mínima</i>		
Coefficiente de correlación múltiple	0.9994279	
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.9988562	
R <sup>2</sup> ajustado	0.9984749	
Error típico	0.0014611	
Observaciones	5	
<i>Coefficientes</i>		
Intercepción	0.0058765	
Variable X 1 (min)	0.0023649	
<i>Estadísticas de la regresión para la Dosis Máxima</i>		
Coefficiente de correlación múltiple	0.999899453	
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.999798916	
R <sup>2</sup> ajustado	0.999731888	
Error típico	0.001004523	
Observaciones	5	
<i>Coefficientes</i>		
Intercepción	0.018941622	
Variable X 2 (Max)	0.003879609	

En lo que respecta a las pruebas microbiológicas, los resultados se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Pruebas microbiológicas en extracto de placenta liofilizado e irradiado.

Prueba	Dosis[kGy]				
	0	5	10	15	25
Recuento Total Microorganismos [UFC/g]	11x 10 <sup>7</sup>	--	--	--	--
Esterilidad	--	P.E.	P.E.	P.E.	P.E.

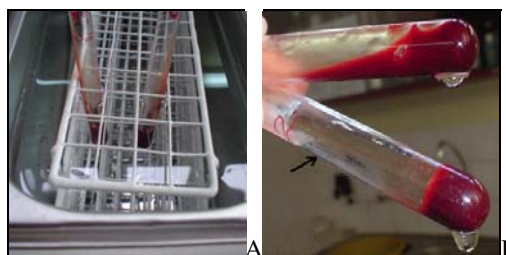
P.E.: Producto Estéril

Los resultados de la prueba hemostática, se observan en el Tabla 4.

**Tabla 4:** Comparación de tiempos de coagulación de muestras de sangre estudiadas; irradiadas, sin irradiar y sin extracto de placenta (Método Lee-White).

Muestra	Rango de Tiempo de Coagulación [minutos]
Control (sin extracto)	6.00 - 6.66
0 kGy	2.66 - 3.33
10 kGy	2.83 - 3.50
15 kGy	3.00 - 3.33
25 kGy	3.00 - 3.50

En la Figura 2a se observa que el tubo con el extracto de placenta humana liofilizado (flecha) coagula con mayor rapidez que el tubo control en baño maría.



**Figura 2:** a) Tubos en Baño María a 37°C. b) Coagulación de la Sangre en tubos con extracto y sin extracto de placenta.

En lo referente a las características organolépticas, en la Figura 2b, se aprecia que no hubo cambio de color en las muestras con respecto al control no irradiado y el olor se mantuvo similar al control.



**Figura 3:** Extracto de placenta liofilizado e irradiado a 0, 5, 10, 15 y 25 kGy.

En la Figura 3 se observa que el material de empaque irradiado a 25 kGy no presenta cambios significativos con respecto al no irradiado. Esto concuerda con la bibliografía sobre materiales de empaque y radiación, que estipula que la estabilidad del polietileno frente a la radiación gamma es excelente [8].

#### 4. Conclusiones

- Las pruebas dosimétricas permitieron aplicar dosis exactas de manera precisa y segura al producto con una uniformidad de dosis de 1,69154.

- Si bien el producto presentaba una carga microbiana muy elevada, se observa que los microorganismos presentes eran sensibles a la radiación gamma.

- A la dosis de 5 kGy, aparentemente se logra la esterilización del producto, sin embargo este valor solo es referencial, puesto que no se ha tenido en cuenta el SAL de 10<sup>-6</sup>.

- El tiempo de coagulación de la muestra control es mayor que los tiempos de

coagulación de las muestras con extracto ya sea irradiado o sin irradiar, por lo que pareciera que la radiación no altera las propiedades hemostáticas del extracto de placenta.

- No se observa diferencia significativa entre los tiempos de coagulación de las muestras de sangre con extracto de placenta irradiado a diferentes dosis.

- La apariencia, color y olor de las muestras del extracto de placenta liofilizado e irradiado, incluso a la dosis de 25 kGy, no presentan variaciones significativas con respecto al control.

- La dosis de 25 kGy no afecta al material de empaque.

- El extracto de placenta podría esterilizarse por radiación gamma si la carga microbiana en el producto final, es decir luego de liofilizado, disminuyera a los valores indicados por la norma.

## 5. Recomendaciones

- Optimizar el procesamiento del extracto de placenta, tanto durante su extracción como en su liofilización para disminuir la carga microbiana y poder aplicar la norma vigente para la determinación de la dosis de esterilización.

- Irradiar muestras a dosis mayores de 25 kGy y evaluar la performance del producto y su empaque.

- Determinar el contenido de humedad en el extracto de placenta liofilizado irradiado y sin irradiar.

- Realizar pruebas físico-químicas en el extracto de placenta para conocer con mayor detalle el efecto de la radiación gamma en el producto. Estas pruebas pueden ser: determinación de proteínas, espectros FT-IR, UV, etc.

## 6. Bibliografía

[1] McKenzie S. Hematología Clínica. México: El Manual Moderno; 2000.

[2] Vélez A, Rojas W, Borrero R, Restrepo J. Fundamentos de Medicina. Hematología. España: Reverté; 1994.

[3] Cirugest. [homepage Internet]. Disponible en: [www.cirugest.com/htm/revisiones/cir01](http://www.cirugest.com/htm/revisiones/cir01)

[4] Gillian Pocock G, Richards, C. Fisiología humana: La base de la Medicina. 2da ed. Editorial Masson; 2005.

[5] Pérez Ruíz AO, *et al.* Estudio de los factores endoteliales protrombóticos. Rev. Cubana Invest. Biomed. 1997;16(2):140-143.

[6] US Patent 5017556. Treatment of bleeding disorders using lipid-free tissue factor protein. US Patent Issued on may 21, 1991.

[7] Castro E. Aplicación del código de práctica del OIEA para la validación de la dosis de esterilización por radiación gamma en aloinjertos de hueso. En: Instituto Peruano de Energía Nuclear. Informe Científico Tecnológico 2006. Lima, Perú; 2007. p. 269-274.

[8] ISO 11137:1995. Sterilization of Health Care Products - Requirements for Validation and Routine Control – Radiation Sterilization.

[9] Code of Practice for the Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control. Boston, USA 2002.

[10] ISO/TS 13409:2002. Sterilization of health care products - Radiation sterilization - Substantiation of 25 kGy as a sterilization dose for small or infrequent production batches.

[11] Aziz Nather, *et al.* The scientific basis of tissue trasplantation, Advances on tissue banking. World Scientific 2001.

[12] Norma ASTM E 1026-04. Using the Fricke Reference Standard Dosimetry System.

[13] Norma ASTM 51538:2002 (E) “Standard Practice for Use of the Ethanol-Chlorobenzene Dosimetry System”.

[14] ISO 11737-1 1995 Sterilization of Medical Devices – Microbiological Methods – Part 1: Estimation of Populations of Microorganisms on Products.

[15] US Pharmacopea 30 (61), 2007.