

## Artículo original

## Protección de los tejidos cadavéricos expuestos a alta radiación gamma

Matus-Jiménez J,\* Flores-Fletes JR,\*\* Carrillo A\*\*\*

Hospital General Xoco

**RESUMEN.** El tejido óseo es el tejido más utilizado en el tratamiento de diversos padecimientos, esto ha provocado que la utilización de aloinjertos sea cada vez más común y por esto se han estado mejorando los procesos para su obtención, conservación y esterilización. El método para esterilizar que tiene un aseguramiento de esterilización mayor, es la radiación gamma a altas dosis, ya que de esa manera alcanza a destruir los priones y cualquier microorganismo y con esto, asegura que el paciente no va a sufrir alguna infección. Pero la utilización de la radiación se ha comprobado que tiene efectos que deterioran el tejido óseo y tendinoso, por lo que se ha buscado la manera de protegerlo. Una forma es la utilización de una sustancia que comercialmente se llama *Clearant*; se han hecho estudios fuera de México y se ha encontrado que sí protege al tejido óseo y tendinoso, por lo que se realizó este trabajo con muestras de aloinjertos sometidos a radiación a alta dosis para valorar por medio de microscopía fotónica, con diversas tinciones y electrónica, determinando si había cambios de coloración, así como destrucción de la estructura anatómica, haciendo un seguimiento del mismo tejido durante todo el proceso hasta antes de colocarlo en el paciente. Después de hacer la revisión se encontró que no hay cambios estructurales en los tejidos óseos y tendinosos expuestos a altas dosis de radiación (60 kilograys) con la utilización del proceso *Clearant* y que se pueden utilizar en los padecimientos ortopédicos o traumatológicos con seguridad.

**Palabras clave:** tejidos, tendón, hueso, injerto, radiación gamma.

**ABSTRACT.** Bone tissue is the most widely used tissue for the treatment of various conditions. As a result of this, allografts are used at an increasing frequency and processes for their harvest, preservation and sterilization have improved. The sterilization method that grants the greatest sterilization is high-dose gamma radiation, which destroys prions and any microorganism thus assuring that patients will not experience any infection. But given that radiation use has proven to deteriorate bone and tendon tissue, efforts have been made to protect the latter. One way to do this is a commercially available substance called *Clearant*. Studies conducted elsewhere have found that it does protect bone and tendon tissue. This study was therefore conducted with allograft samples exposed to high-dose radiation. Its purpose was to assess, with photon microscopy using various dyes and electron microscopy, the presence of color changes as well as the destruction of the anatomical structure. The same tissue was followed-up throughout the process until it was placed in the patient. The review found no structural changes in bone and tendon tissues exposed to high radiation doses (60 kilograys) when the *Clearant* process was used, and concluded that the former may be used safely in orthopedic or traumatologic diseases.

**Key words:** tissue, tendon, bone, graft, gamma radiation.

## Nivel de evidencia: III

\* Ortopedista, Traumatólogo y Médico del deporte, adscrito al Hospital General Xoco.

\*\* Director General de Novoinjertos.

\*\*\* Gerente de Control de Calidad de Novoinjertos.

Dirección para correspondencia:  
Juan Matus Jiménez

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/actaortopedica>

## Introducción

El hueso es el segundo tejido más trasplantado después de la sangre.<sup>1</sup> La utilización de los injertos óseos tiene una larga historia, sobre todo porque no se había estudiado los diferentes tipos de metales («edad metalúrgica para la ortopedia») que se pudieran utilizar para resolver los problemas de las fracturas de los huesos.<sup>2</sup>

En un inicio la indicación fue la fijación con clavijas y alambre, hasta que se empezaron a usar metales para mantener firmes los huesos (placas, tornillos, clavos), pero existía la desventaja de que se necesitaba realizar otro procedimiento quirúrgico para la obtención del injerto óseo autólogo, ya que su utilización es el estándar de oro en la reparación de las lesiones del tejido óseo,<sup>1</sup> el volumen o el tamaño del injerto estaba limitado también, se pone en peligro de sufrir fatiga y ruptura del hueso donante o desarrollar algún proceso infeccioso, no se obtiene la forma adecuada o apropiada del lugar en donde se va a colocar, la cantidad insuficiente ya que en ocasiones se requiere gran cantidad, dependiendo la patología que se trate y no se puede conseguir tal cantidad,<sup>1</sup> por lo que al formarse los banco de huesos estos vinieron a colaborar en el desarrollo de la utilización de injertos óseos para ayudar a la osteoconducción y osteoinducción y de esta manera aumentar la velocidad y la certeza de que las fracturas consolidaran adecuadamente.<sup>2</sup>

Los injertos óseos tienen las siguientes indicaciones:<sup>1,2,3,4,5</sup>

- Rellenar cavidades o defectos resultantes de quistes, tumores o al realizar tratamiento de infecciones.
- Ser como puente en las articulaciones en las artrodesis.
- Cuando hay defectos importantes de huesos en fracturas conminutas.
- Como limitante a la movilidad articular (artrorrrisis).
- Ayudar a consolidar en retardos de consolidación, consolidación viciosa, pseudoartrosis u osteotomías.

Los injertos se clasifican en:

- Cortical.
- Esponjoso.

Los injertos corticales son para dar soporte estructural y osteoinductor, el esponjoso como osteoinductor y osteoconductor, no sirve para soportar presión por lo que se utiliza como relleno de las cavidades. Hablamos de osteoinductor porque el injerto provoca que las células mesenquimatosas del lugar en donde se colocó se diferencien hacia células formadoras de hueso y de osteoconducción en donde el injerto sirve como estructura de andamiaje para el crecimiento del nuevo tejido óseo.<sup>4</sup>

También se clasifican dependiendo su origen en:<sup>1,2,3,4,5</sup>

- Autólogo: cuando el injerto procede del paciente, generalmente se utiliza la tibia, el peroné o el ilion; estos huesos proporcionan injertos corticales, trasplantes de hueso completo y hueso esponjoso.
- Alogénico: cuando se obtiene de una persona distinta del paciente, antes del desarrollo de los bancos la forma como se obtenían era el de obtener las cabezas femorales de las cirugías de cadera que se desarrollan en los quirófanos alejados y en forma «estéril» se cambiaba de sala y se utilizaba.
- Heterólogos: cuando se obtiene de otra especie, generalmente de caballo, cerdo, etc. pero provocaban en ocasiones reacciones indeseables a cuerpo extraño.<sup>2</sup>
- Sustitutos: material sintético y natural como la hidroxiapatita, fosfato tricálcico, cerámica bifásica (60% de hidroxiapatita y 40% de fosfato tricálcico) más colágeno bovino y otras presentaciones pero que debido al potencial de reacciones a cuerpo extraño no son tan utilizados.

Se ha estado investigando para disminuir los tiempos de regeneración ósea por lo que se encontraron las BMP's (proteínas morfogenéticas óseas, por sus siglas en inglés) que provocan la osteoinducción y con esto la formación acelerada del tejido óseo, en éstas están incluidas la BMP1, BMP2, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el factor b de crecimiento transformante, factor de crecimiento endotelial, factor de crecimiento de fibroblastos entre otros.<sup>3</sup> Esto es la tecnología de los «ortobiológicos» que se ha incrementado su utilización para mejorar los tiempos de consolidación del tejido óseo lesionado.

Actualmente se están realizando ya trabajos con matriz ósea desmineralizada (DBM) que es el aloinjerto descalcificado y se está usando como un elemento de soporte, con un potencial de osteoinducción y osteoconducción muy alto por lo que su utilización se está ampliando a diversos usos<sup>6</sup> ya que cuenta con varias presentaciones, desde una masa sin forma hasta placas de varias longitudes y grosores.

Debido al incremento en la utilización de los aloinjertos se requiere la ayuda de los bancos de tejido óseo por lo que actualmente se están realizando las regulaciones de estos para que los productos y servicios que se otorguen sean de muy buena calidad.

En México existen alrededor de 53 licencias de bancos de tejidos hasta el 2001 según Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA) pero haciendo un análisis de estos se encuentra que 36 tienen la licencia activa y seis inactiva (esto para el 2010).<sup>7</sup>

Dentro de los bancos con licencia activa se encuentra Novoinjertos que cumple con los registros sanitarios correspondientes, así como los requerimientos para una buena práctica de manufactura y fabricación.

Este banco de tejidos óseo es el primer banco de tejidos de América Latina que realiza preparación, esterilización de productos derivados de tejido cadavérico humano bajo el proceso *Clearant*.

Este proceso es una transferencia de tecnología de un banco de tejidos ubicado en los Ángeles California, Estados Unidos de donde se obtuvieron los métodos y procedimientos que se aplican en la preparación de los tejidos humanos de cadáver y con la finalidad de disminuir los daños que causa la alta radiación gamma a los tejidos.

Realizan una selección rigurosa de los donadores (evaluando la historia clínico social, expediente clínico del hospital, estudios serológicos avalados por un laboratorio con certificado *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA) en Estados Unidos, ya que en México no se cuenta con ningún laboratorio certificado y con métodos validados, que realice estos estudios en sangre cadavérica, estudios de cultivos bacteriológicos, fúngicos y virales) y si se determina que el donador cumple con los criterios de selección y especificaciones, se aprueba para su proceso de preparación de los diversos aloinjertos que se pueden obtener del mismo.

Esto se realiza en áreas de preparación en cuartos limpios con clasificación 100 (100 partículas de 0.5 micras o mayores en un pie cúbico de aire), con técnica aséptica los siguientes procedimientos:

- Corte y limpieza.
- Incubación (proceso *Clearant*).
- Medición y selección.
- Liofilizado (hueso).
- Esterilizado final con radiación gamma a 60 kilograys (60,000 Gys).

Estos procedimientos y la utilización de la sustancia *Clearant* ya está estudiado y avalado en bancos de tejidos de Estados Unidos por lo que para validar sus procesos se realizó este estudio para determinar el grado de protección que existía al utilizar esta sustancia.

## Material y métodos

Estudio longitudinal, cuasi-experimental, triple ciego, descriptivo en donde se tomaron muestras de tendones, hueso cortical y hueso esponjoso durante cada uno de los procesos (corte, incubación, liofilizado o congelación, pos radiación) en tres donadores, se conservaron en un frasco dentro de una hielera a  $-4$  o  $-7^{\circ}$  con hielo seco, se llevó a cabo la preparación de los tejidos para su observación tanto en microscopía óptica y electrónica, tomando microfotografías de los tejidos para su análisis, realizando tinciones como Hematoxilina-Eosina (para valorar los núcleos celulares y el citoplasma), rojo congo (para valorar cambios en el citoplasma y la elastina), Masson (tinción para valorar la colágena tipo I) y corroborar las modificaciones que presentan los tejidos durante el proceso de preparación de los tejidos antes de la distribución de los mismos para la colocación en los pacientes.

## Estudio de microscopía óptica

Se tomaron muestras de tres donadores desde el primer proceso hasta el último, se conservaron en un frasco cerrado dentro de una hielera a  $-4$  o a  $-7^{\circ}$  con hielo seco, para su transportación al laboratorio de patología y se realizaron los siguientes procedimientos:

- Hueso esponjoso, cortical y tendones: unas muestras para observación de cambios microscópicos.
  - Los cambios que buscaron y/o descartaron fueron los siguientes:
    - En el hueso el porcentaje de calcio dentro de la muestra (se determinó de acuerdo al tiempo que tardaban en desmineralizarse) y si se modifica durante el proceso.
    - La calidad de los sistemas de Havers, destrucción o modificación del hueso esponjoso:
      - Tamaño de espacios entre las trabéculas.
      - La destrucción de trabéculas.
      - La celularidad.
    - Concentración de calcio.
    - La grado de captación o adquisición (índice de tinción) de los diferentes colorantes: H-E, Masson y rojo congo
  - En los tendones sus propiedades estructurales:
    - Tamaño de las fibras.
    - Adelgazamiento de las fibras.
    - Separación de las fibras.
    - Destrucción de la colágena.
    - Destrucción o modificación de la elastina.
    - Modificaciones de la celularidad.
    - La grado de captación o adquisición (índice de tinción) de los diferentes colorantes: H-E, Masson y rojo congo.

Este estudio se realizó en el laboratorio de patología del Dr. Posternak, ubicado en el Distrito Federal, el cual cuenta con un amplio prestigio en las investigaciones de alteraciones patológicas de los diferentes tejidos humanos. Se utilizó un microscopio óptico marca Nikono Alphaphot.

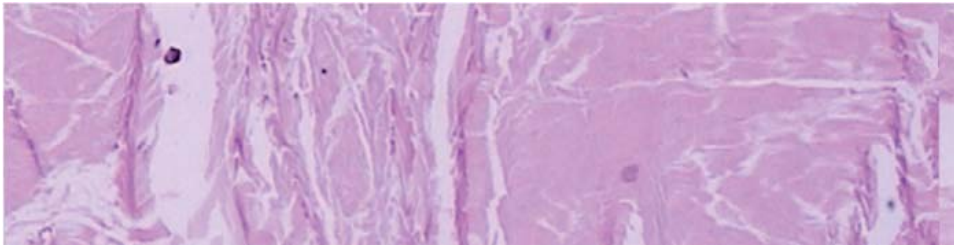
Entregaron microfotografías y laminillas donde se encuentran los diferentes resultados e interpretaciones del patólogo.

El estudio de microscopía electrónica de barrido:

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido HITACHI TM-100 operado a 15 KV. Para el microanálisis se usó un equipo de espectroscopía de emisión de energía (EDS) Oxford TM XSTREAM acoplado al microscopio. Las muestras se observaron directamente al microscopio en su sección longitudinal y en la zona porosa.

Se tomaron microfotografías a las magnificaciones 50X, 250X, 1000X, 2500X y 5000X para todas las muestras. Se realizó una medición de las distancias que existían entre las trabéculas del tejido óseo (según el protocolo de medición de los espacios trabeculares).<sup>8</sup>





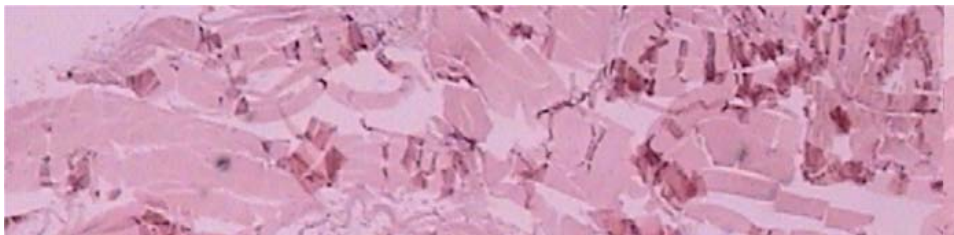
**Figura 1.**

Microfotografía a 4X con tinción H-E de la primera etapa, tamaño de las microfibrillas 26 micras, índice de tinción +++.



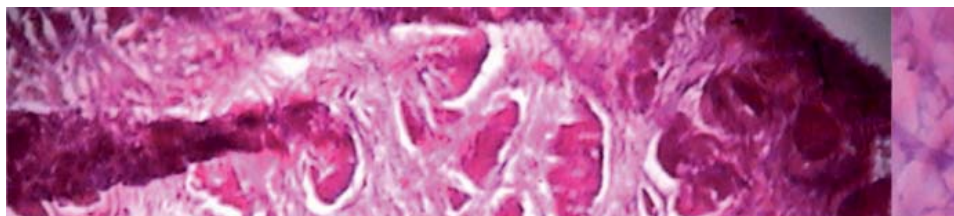
**Figura 2.**

Microfotografía a 10X con tinción Masson primera etapa, tamaño de las microfibrillas 12 micras, índice de tinción +++.



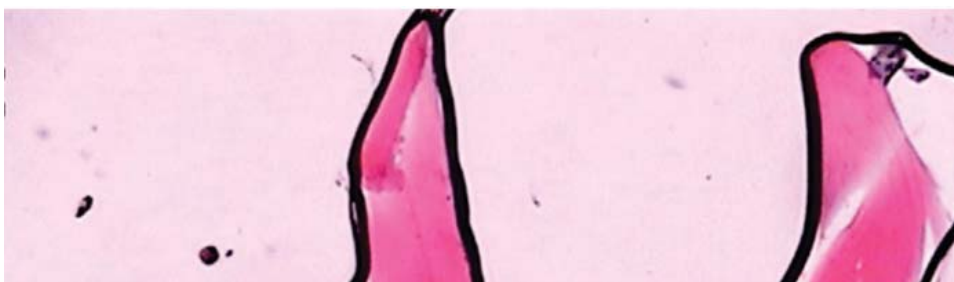
**Figura 3.**

Microfotografía a 4X con tinción rojo congo primera etapa, tamaño de las microfibrillas 24 micras, índice de tinción ++.



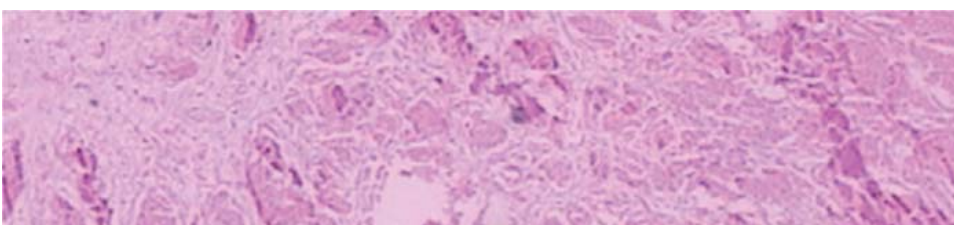
**Figura 4.**

Microfotografía a 10X con tinción H-E de la segunda etapa, tamaño de las microfibrillas 26 micras, índice de tinción +++.



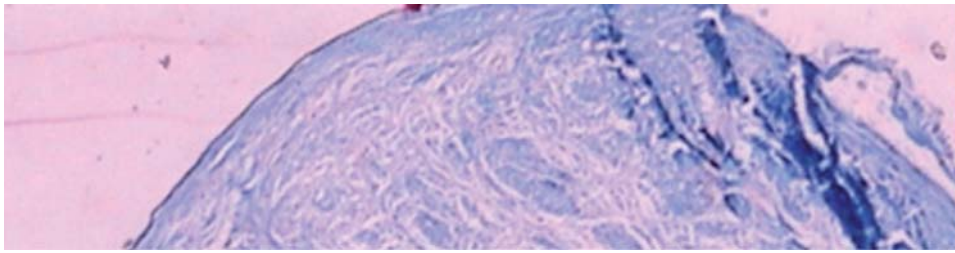
**Figura 5.**

Microfotografía a 4X con tinción H-E de la tercera etapa, tamaño de las microfibrillas 26 micras, índice de tinción +++.



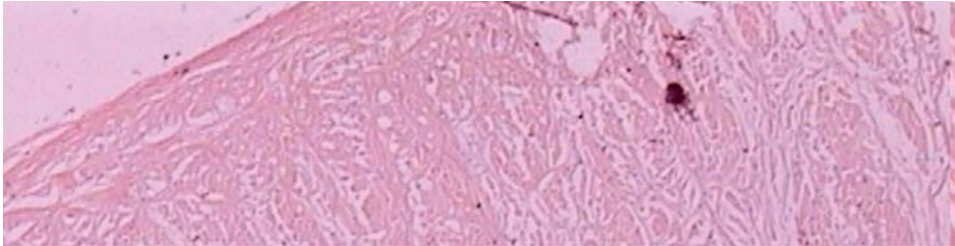
**Figura 6.**

Microfotografía a 4X con tinción H-E de la cuarta etapa, tamaño de las microfibrillas 26 micras, índice de tinción +++.



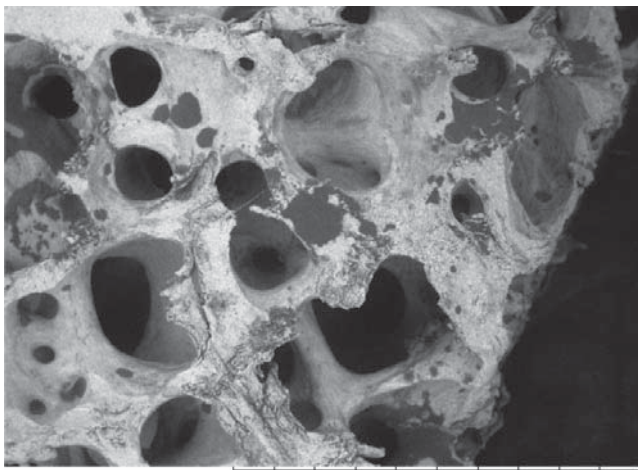
**Figura 7.**

Microfotografía a 4X con tinción Masson cuarta etapa, tamaño de las microfibrillas 24 micras, índice de tinción ++.



**Figura 8.**

Microfotografía a 4X con tinción rojo congo de la cuarta etapa, tamaño de las microfibrillas 24 micras, índice de tinción ++.



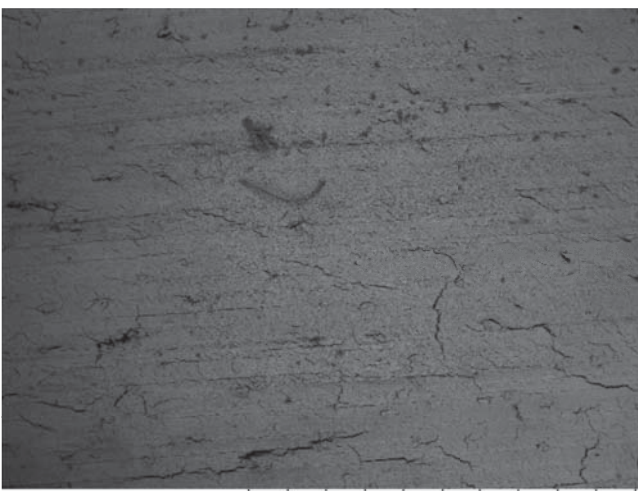
CC L D2.9 x50 2 mm

**Figura 9.** Microfotografías del corte histológico de hueso esponjoso a un aumento de 50X en la primera etapa.



T1CC1 L D3.1 x50 2 mm

**Figura 11.** Microfotografías del corte histológico de tendón a un aumento de 50X en la primera etapa.



C1CC1 L D2.9 x50 2 mm

**Figura 10.** Microfotografías del corte histológico de hueso cortical a un aumento de 50X en la primera etapa.

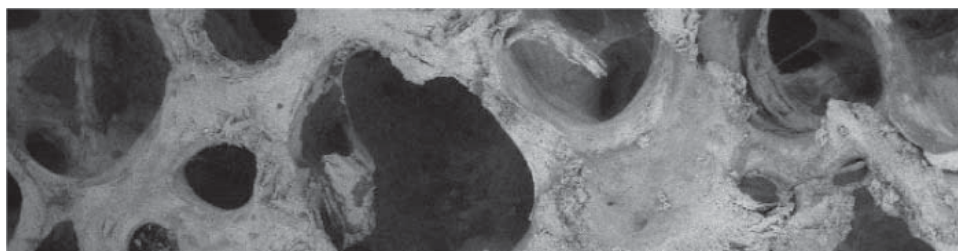
Se llenaron tablas con concentrado de datos (*Anexo 1*) y se analizaron los resultados.

## Resultados

Se hicieron los estudios de microscopía óptica con tinciones de hematoxilina y eosina, rojo congo y Masson de las muestras de tendones, hueso cortical y esponjosa (previo descalcificado e inclusión en cera), se observaron a diferentes aumentos (4, 20 y 40X), se midieron las microfibrillas y el índice de tinción.

No se observaron modificaciones en la medición de las microfibrillas y el índice de tinción en las muestras de las diferentes etapas (*Figuras 1 a 8*), el período de descalcificación no se alteró durante las diferentes muestras de los procesos. La tinción de Masson y de rojo congo no hubo modificaciones en su índice de tinción y la presencia y formas de las fibras de colágena y elastina.





**Figura 12.**

Microfotografías del corte histológico de hueso esponjoso a un aumento de 50X en la segunda etapa.



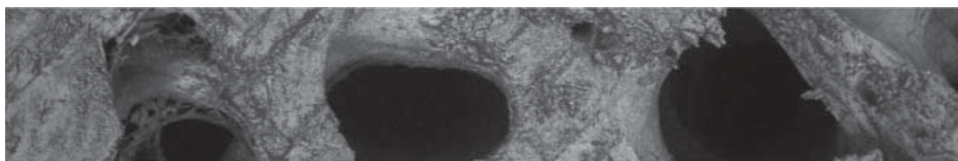
**Figura 13.**

Microfotografías del corte histológico de hueso cortical a un aumento de 50X en la segunda etapa.



**Figura 14.**

Microfotografías del corte histológico de tendón a un aumento de 50X en la segunda etapa.



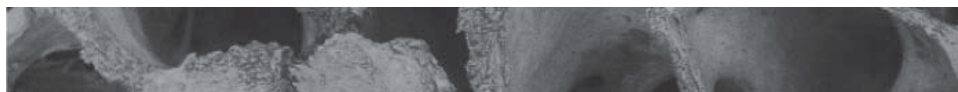
**Figura 15.**

Microfotografías del corte histológico de hueso esponjoso a un aumento de 50X en la tercera etapa.



**Figura 16.**

Microfotografías del corte histológico de hueso cortical a un aumento de 50X en la tercera etapa.



**Figura 17.**

Microfotografías del corte histológico de hueso esponjoso a un aumento de 50X en la cuarta etapa.



**Figura 18.**

Microfotografías del corte histológico de hueso cortical a un aumento de 50X en la cuarta etapa.



**Figura 19.**

Microfotografías del corte histológico de tendón a un aumento de 50X en la cuarta etapa.

En el estudio de microscopía electrónica se hicieron varios cortes y observaciones en varias partes de las muestras, a diferentes aumentos (50X, 250X, 1000X, 2500X y 5000X) encontrando que no hubo modificaciones en las diferentes etapas y en los diferentes tejidos (*Figuras 9 a 19*), se midieron los espacios intertrabeculares encontrando lo siguiente (*Ta-bla 1, Figura 20*).

De los diferentes tejidos (cortical y esponjoso) no hubo cambios significativos entre la distancia intertrabecular en-

tre cada uno de los procesos, ni comparando la medición del inicio y al final.

### Discusión

Se han utilizado diversas formas de lograr que los aloinjertos estén completamente estériles, ya que uno de los graves problemas es la transmisión de enfermedades por bacterias, hongos y virus, es decir, el no crear anticuerpos antígenos.

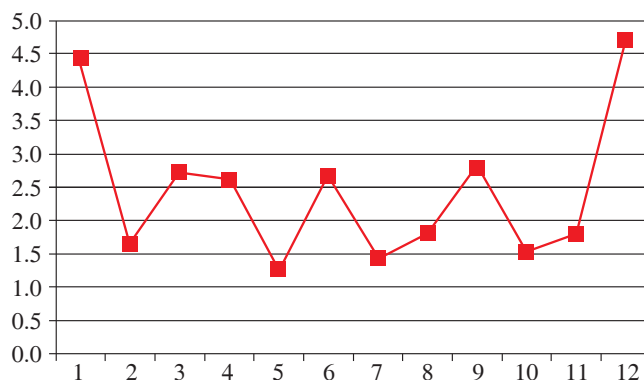
**Tabla 1.** Se observa la distancia entre trabéculas en los diferentes procesos, no hay diferencia significativa entre cada uno y comparando la primera medición a la última la diferencia no es significativa.

Proceso	Tipo de injerto	Medida ( $\mu\text{m}$ )
Corte y limpieza	Esponjosa	4.4
	Cortical	1.7
Incubación	Esponjoso	2.7
	Cortical	2.6
Medición	Esponjoso	2.7
	Cortical	1.3
Selección	Esponjoso	2.8
	Cortical	1.8
Liofilización	Esponjoso	1.6
	Cortical	1.4
Postradiación	Esponjoso	4.7
	Cortical	1.8

Dentro de estos métodos están la ultracongelación ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) y la deshidratación con solventes,<sup>9</sup> esto ha logrado una esterilización con un índice de aseguramiento de  $10^{-3}$ , siendo deseable que se consiga hasta el índice de aseguramiento de  $10^{-6}$ , pero esto sólo se consigue exponiendo los tejidos a radiación gamma a 60 kGys. Otros procedimientos que causan una esterilidad con índice de aseguramiento de  $10^{-3}$  es el liofilizado, sin embargo en los tejidos blandos, como los tendones y meniscos, no se pueden realizar este tipo de esterilizado ya que destruyen la estructura de los mismos y no se liofilizan; este procedimiento se realiza únicamente a los tejidos óseos tanto cortical como esponjoso.

Con la ultracongelación se destruye la estructura microscópica de los tejidos al formarse microcristales dentro de las células y al descongelarlas éstas se rompen; sin embargo al realizar varios estudios para determinar si se afectaban las propiedades estructurales y la función, se encontró que no había modificaciones en las estructuras ni en la función (fuerza, resistencia) del injerto al congelarse a  $-80^{\circ}\text{C}$ , posteriormente al realizar el proceso de congelación y descongelación de una hasta cinco ocasiones.<sup>1,10</sup>

Por último, los aloinjertos se están asegurando de la esterilidad final con radiación gamma pero los límites son de 25 a 30 kGy (2,500,000 rads equivalen a 25,000 grays);<sup>4,11,12,13</sup> se requiere un mínimo de 2.5 milirads (Mrads) para descontaminar injertos, aunque se encontró que hay pérdida en la fuerza mecánica de la colágena ya que a 1 Mrad 5% de las cadenas de colágena alfa se rompen, a 7.5 Mrad 40% de las cadenas alfa se rompen, la tensión se reduce significativamente después de los 3 Mrad y hay replicación viral a dosis de 5 Mrad,<sup>14</sup> por lo que en la actualidad se recomienda utilizar dosis de 25 a 30 kG y para considerar los tejidos estériles con un índice de seguridad de  $10^{-3}$ , aunque en varios estudios se han encontrado que algunas bacterias que producen esporas y algunos virus requieren mayor cantidad de radiación para destruirlos<sup>14,15,16,17</sup> y de esta manera estar seguros de que se alcance un nivel de aseguramiento



**Figura 20.** Se observan los cambios de separación entre las trabéculas óseas sin presentar cambios significativos y al final la separación de la muestra de un inicio fue menor que al finalizar el proceso.

de esterilidad de  $10^{-6}$  para que no se transmita ningún tipo de infección.

Los productores de la sustancia *Clearant* realizaron estudios para valorar si había algún cambio en los aloinjertos al radiarlos a 60 kGys y descubrieron que no hubo ningún tipo de variación estructural en los tejidos,<sup>14,15,16,17</sup> se le hicieron pruebas mecánicas y los resultados fueron los mismos: que al comparar la estructura y las propiedades mecánicas de los aloinjertos sometidos a altas radiaciones tenían los mismo resultados que el aloinjerto recién obtenido y aún igual al autoinjerto.<sup>14,15,16,17</sup>

## Conclusión

La utilización del procedimiento de *Clearant* hace que los tejidos sean protegidos durante el proceso de preparación de los mismos hasta la obtención de los diferentes implantes que se manejan para los procedimientos ortopédicos en donde se requieren aún después de haberlos expuesto a altas dosis de radiaciones y teniendo la confianza y la seguridad que no va a existir algún tipo de infección transmitida por estos tejidos.

**Conflicto de interés:** no existe ningún conflicto de interés.

## Bibliografía

1. Raikera O, Reinholt FP, Zinöcker S, Shegarfi H, Rolstad B: Healing of long-term frozen orthotopic bone allografts is not affected by MHC differences between donor and recipient. *Clin Orthop Relat Res.* 2011; 469: 1479-86.
2. Terry Canale, et al: Campbell, Cirugía Ortopédica, Vol. 1, pte. 1. Principios generales, Cap. 1, Técnicas y vías de abordaje quirúrgicas. 10a ed.:2002; 14-6.
3. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV: Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine* 2011; 9: 66.

4. Calvo R, Figueroa D, Díaz-Ledezma C, Vaisman A, Figueroa F: Aloinjertos óseos y la función del banco de huesos. *Rev Med Chile*. 2011; 139: 660-6.
5. Matassil F, Nistri L, Chicon D, Innocenti M: New biometarials for bone regeneration. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2011; 8 (1): 130-6.
6. Hamadouche M, Karoubi M, Dumaine V, Courpied JP: The use of fibre-based demineralised bone matrix in major acetabular reconstruction: surgical technique and preliminary results. *Intern Orthop (SI-COT)*. 2011; 35: 283-8.
7. Álvarez-San Martín R: Bancos de tejidos musculoesqueléticos en México. Parte I. regulación y organización. *Acta Ortop Mex*. 2012; 26(2): 130-6.
8. Helfrich MP, Ralston SH, Gasser J: Bone measurements by peripheral quantitative computed tomography in rodents, methods in molecular medicine, bone research protocols. Editorial Human Press: 323-41.
9. Emes Y, Ipekoglu M, et al: The effects of freeze drying and solvent dehydration on the bending strength and calcium content of cortical bone. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2011; 45(5): 365-9.
10. Suto K, Urabe K, Naruse K, Uchida K, et al: Repeated freeze-thaw cycles reduce the survival rate of osteocytes in bone-tendon constructs without affecting the mechanical properties of tendons. *Cell Tissue Bank*. 2012; 13: 71-80.
11. Zheing-Jian X, Rong-Xin HE: Selection of allografts for impaction bone grafting for bone defect reconstruction on the acetabular side, review article. *Chin Med J*. 2010; 123(21): 3143-7.
12. Nguyen H, Morgan DAF: Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. *Cell Tissue Bank*. 2007; 8: 93-105.
13. Nguyen H, Morgan DAF: Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation? *Cell Tissue Banking*. 2007; 8: 81-91.
14. Sperandio M, Souza JB, Oliveira DT: Effect of gamma radiation on dentin bond strength and morphology. *Braz Dent J*. 2001; 12(3): 205-8.
15. King W, Mangan D, et al: Microbial sterilization and viral inactivation in soft tissue allografts using novel applications of high-dose gamma irradiation: report of a new graft preparation technique and early clinical follow-up. *AAOS* 2004.
16. Grieb TA, et al: Effective use of optimized, high-dose (50 kGy) gamma irradiation for pathogen inactivation of human bone allografts. *Biomaterials*. 2005; 26: 2033-42.
17. Miekka SI, Fonrg Y, et al: Inactivation of viral and prion pathogens by gamma-irradiation under conditions that maintain the integrity of human albumin. *Vox Sang*. 2003; 84: 36-44.

## Anexo 1.

Tabla de recolección de datos.

	Clave	Etapas	Modificaciones que se observan
Óseo	C1	Corte	
	C2	Incubación	
	C3	Liofilización	
	C4	Irradiación	
	E1	Corte	
	E2	Incubación	
	E3	Liofilización	
	E4	Irradiación	
Tendón	T1	Corte	
	T2	Incubación	
	T4	Irradiación	

Tabla de concentrado de muestras para protocolo de microscopía electrónica.

Observaciones: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_