

Gestión de la Autosuficiencia de Tejidos en España (Módulo II)

Procesamiento de Tejidos

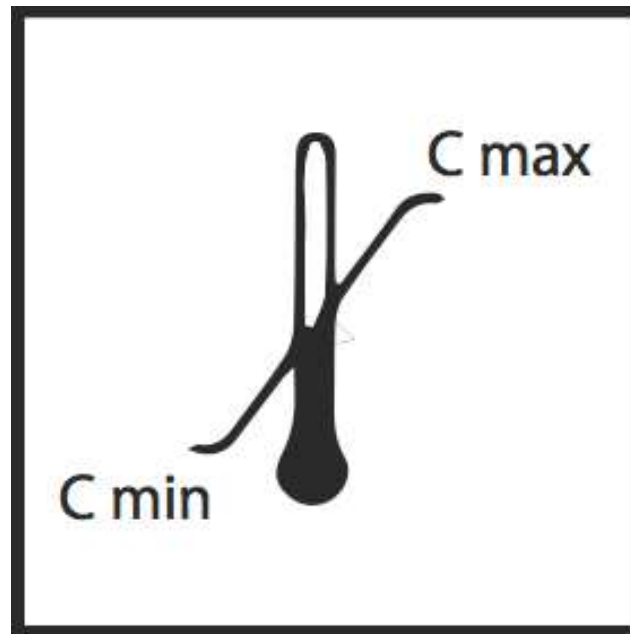


14-15 de Noviembre 2019
Palma de Mallorca



Procesamiento de Tejidos

Preservación de tejidos a T^a ambiente



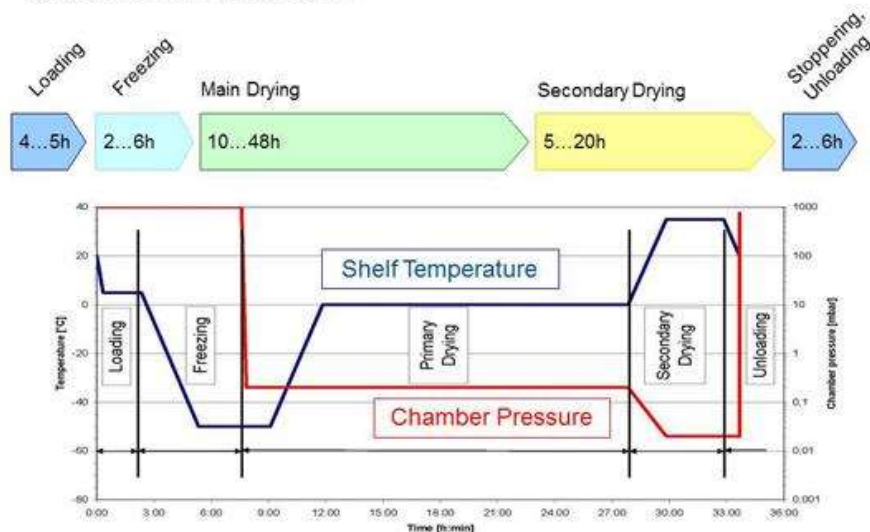
Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

La liofilización es un proceso que tiene como objetivo separar el agua (u otro solvente) de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida

Typical Freeze Drying Cycle



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : **LIOFILIZACIÓN**

El proceso de liofilización se realiza a vacío y a baja temperatura evitando la desnaturalización de las proteínas. Los materiales biológicos tales como células, tejidos, bacterias y vacunas se convierten en productos secos, evitando el paso por su fase líquida, y en consecuencia los cambios enzimáticos, biológicos y químicos

Cuando se vuelve añadir agua o disolvente al producto seco, este debe presentar las mismas características que el producto original.



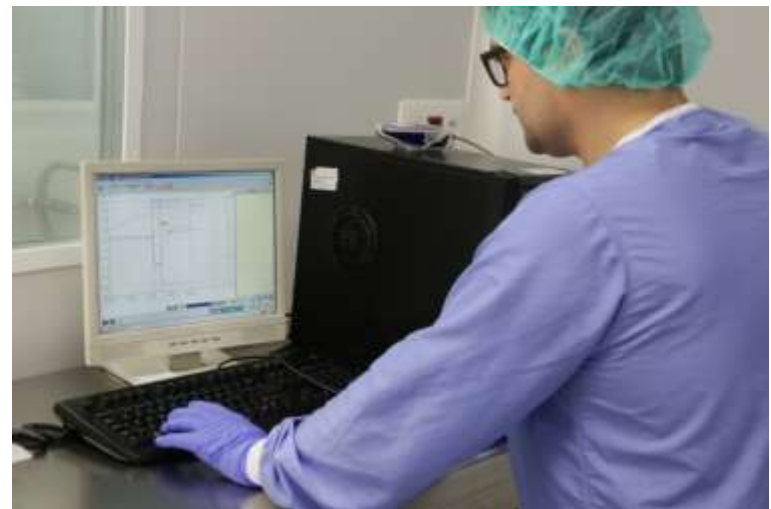
Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

El liofilizador

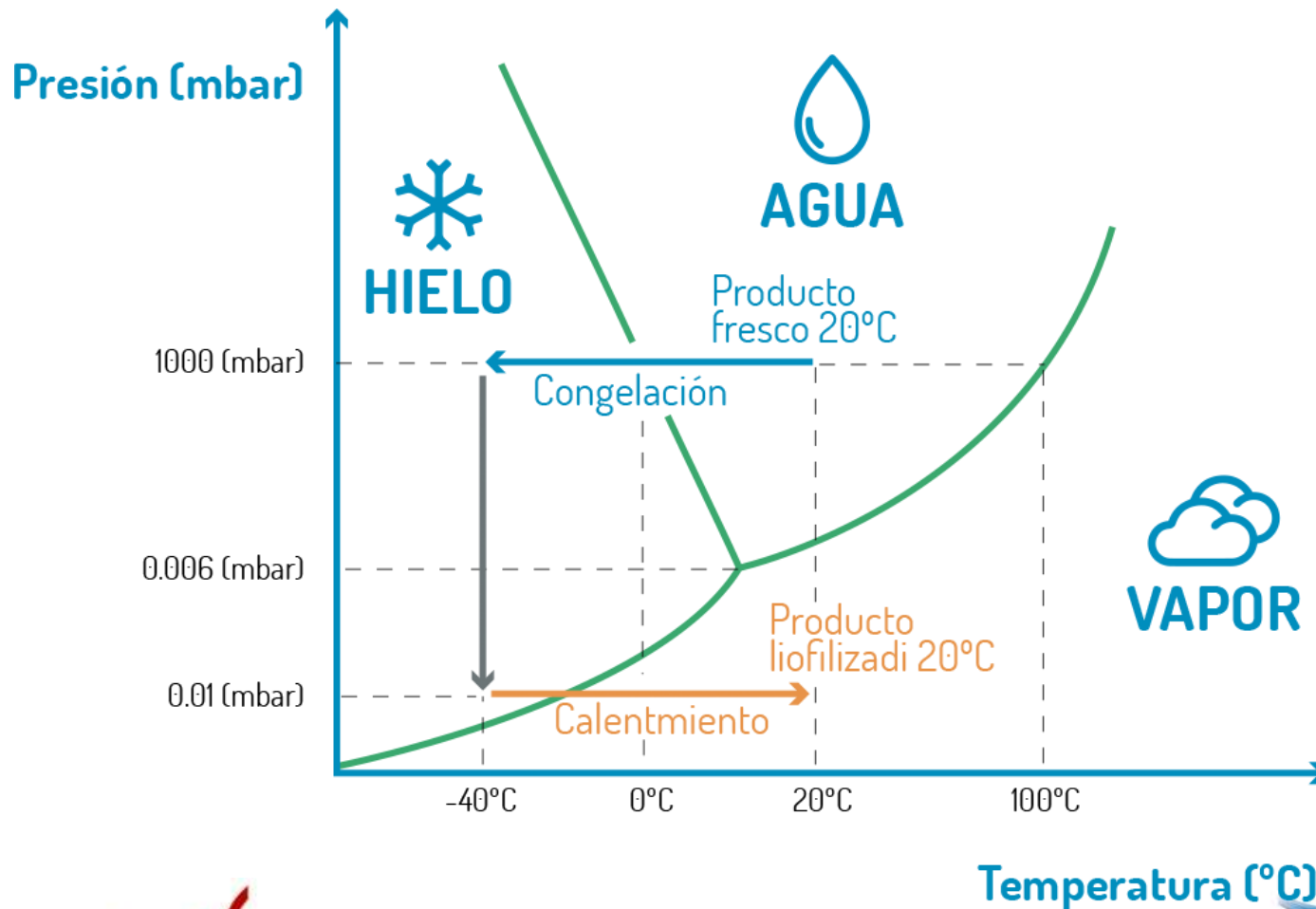
Consta de las siguientes partes:

- **Cámara seca o cámara de liofilización:** es el lugar donde se coloca la sustancia a liofilizar. Puede tener formas diferentes con compartimentos donde se realiza la sublimación, pasando el agua de sólido a vapor. El cierre es hermético y se trabaja bajo el vacío.
- **Condensador con circuito de refrigeración:** comunica con la cámara seca y es donde se condensa el vapor que se va produciendo en la sublimación. Un refrigerante lo mantiene a una temperatura más baja que la cámara seca (entre -50 y -125 °C).
- **Sistema de vacío:** El vacío se produce con una bomba de aceite que trabaja sobre 10^{-2} mbar conectada a una trampa para que no pasen vapores del solvente a su interior. El sistema de vacío elimina primero el aire de la cámara seca al iniciar el proceso de liofilización, y luego ayuda a la sublimación.

Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

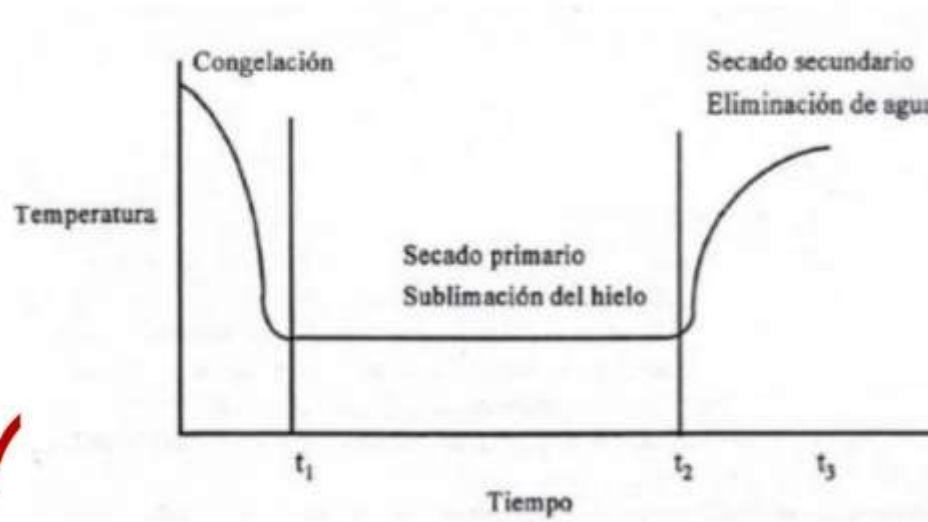


Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : **LIOFILIZACIÓN**

- Etapas principales proceso de liofilización:
 - Congelación
 - Secado primario
 - Secado secundario



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

1ª etapa: Congelación

Es la etapa mas importante de todo el proceso de liofilización:

- La nucleación es el momento en que se inicia la congelación del disolvente
- La Tª de nucleación y la velocidad de congelación determinaran la morfología y la distribución de cristales en la muestra congelada
- La morfología y tamaño de los cristales influye en:
 - La velocidad de sublimación en el secado primario
 - La velocidad de desorción en el secado secundario
 - La agregación de las proteínas
 - El grado de porosidad final y sus características mecánicas
 - La viabilidad posterior de la muestra
 - La facilidad y rapidez en la rehidratación para su uso



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

1ª etapa: Congelación

Velocidad congelación	Número y tamaño cristales	Estructura del material	Dsecación primaria	Dsecación secundaria
LENTA	Pocos y grandes	Poros grandes Estructura menos resistente	Más rápida	Desorción más lenta
RÁPIDA	Numerosos y pequeños	Poros pequeños estructura mas resistencia	Más lenta	Desorción más rápida

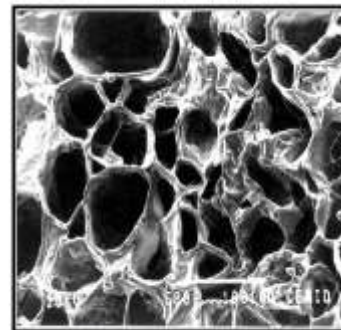
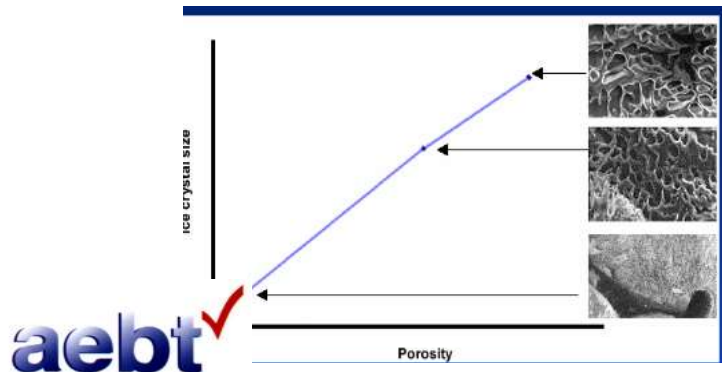


Figura N°3: Enfriamiento lento.

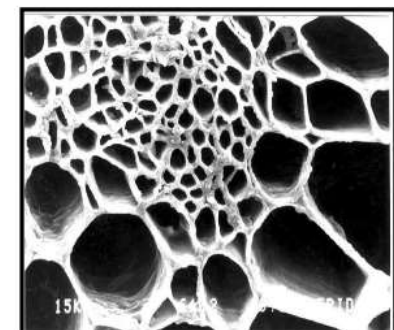
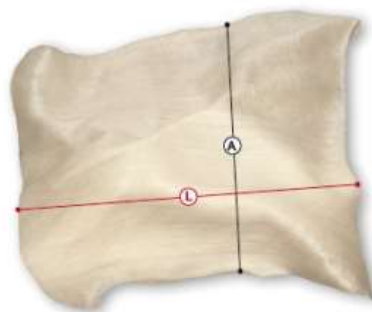


Figura N°2: Enfriamiento rápido.

Tipos de crio/lioprotectores

-PERMEABLES a la membrana celular: Son muy solubles y de bajo peso molecular . Los más utilizados son el DMSO y el glicerol, el 1-2propanodiol y el etilenglicol. Son efectivos a tasas de congelación lentas y en la mayoría de tipos celulares.

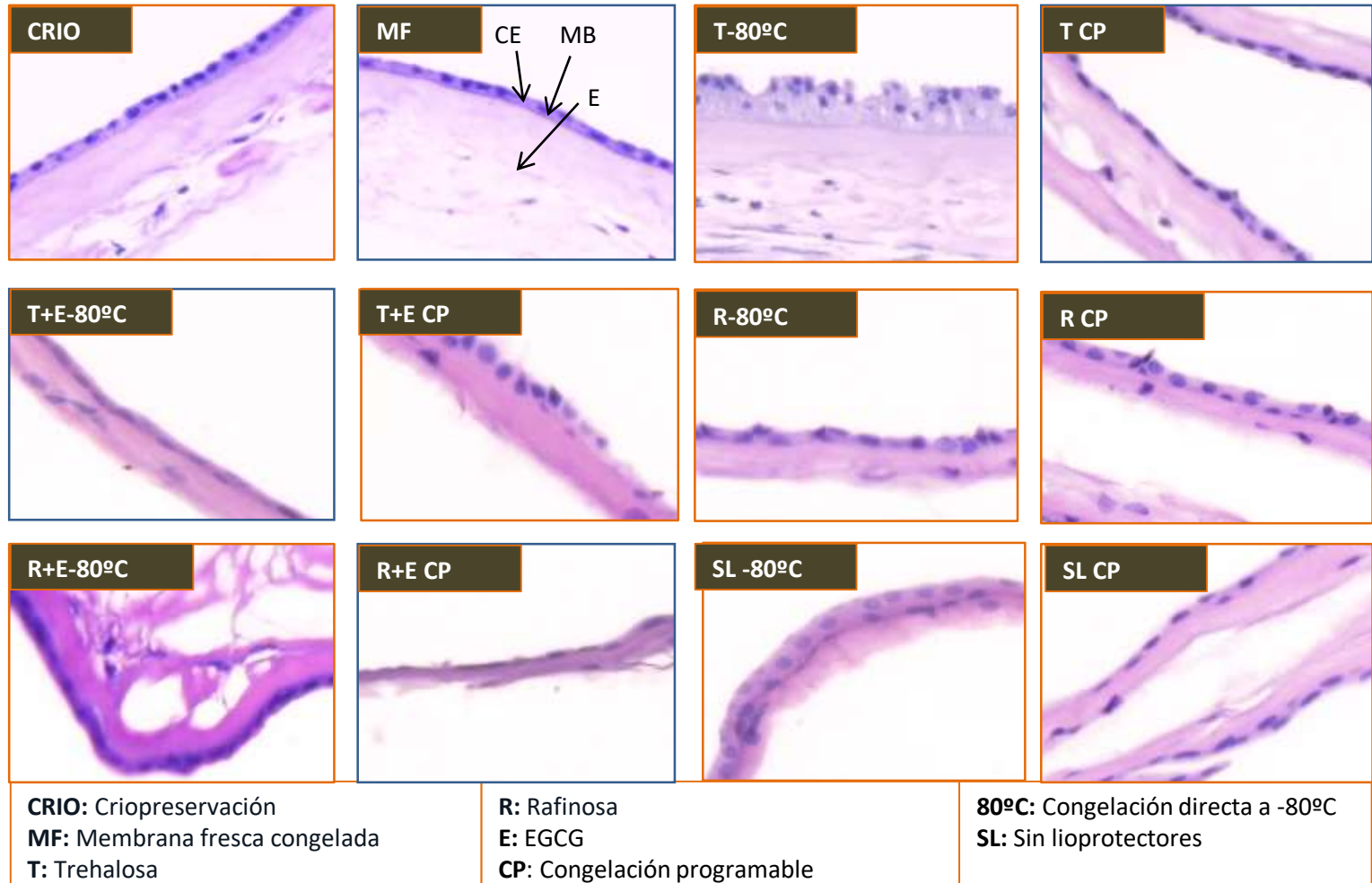
- NO PERMEABLES a la membrana celular: alto peso molecular. Son efectivos a tasas de congelación rápidas . Los más utilizados son el dextrano, la glucosa, sacarosa, trehalosa, y el polietilenglicol. Los azúcares son especialmente utilizados como lioprotectores por sus efectos durante las etapas de congelación y de deshidratación.



BT3008

Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

DESARROLLO DE LA M.A. LIOFILIZADA



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

2 etapa: Secado primario

Extracción del agua del tejido mediante presiones de vacío (5 Pa a 10 Pa) y temperatura baja (-50°C a -70°C) se logra **sublimar** el hielo. EL vapor de agua que se genera debe ser eliminado para así mantener la baja presión necesaria. De ello se encarga el condensador del liofilizador, que trabaja a baja presión y temperatura convirtiendo el vapor en hielo.



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

3 etapa: Secado Secundario

La matriz seca producida por el secado primario contiene todavía unida agua no congelada que debe ser eliminada por desorción a temperaturas más altas (entre 20-40°C)



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

Transición del secado primerio al secado secundario

Si procedemos al secado secundario antes de que el hielo se extraiga del producto, es probable acabar con defectos en el producto tales como **colapso** o derretido eutéctico.

Se observa la reducción de tamaño de poro , la disminución del volumen y se produce porque el material es incapaz de soportar su propio peso.

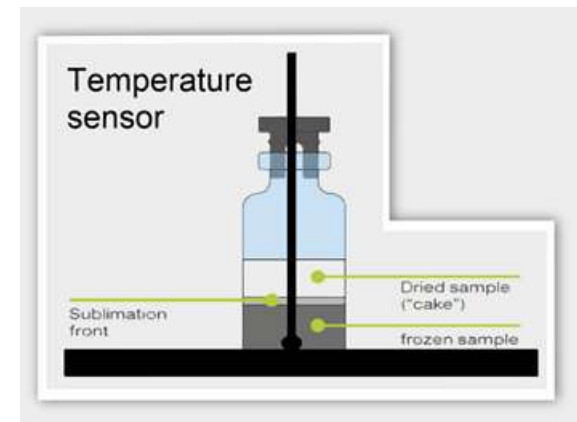
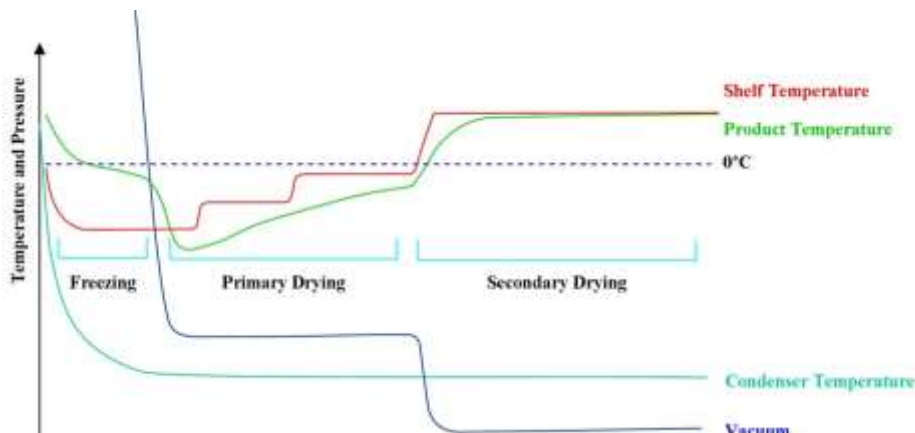
Para evitar el colapso es importante determinar el punto en que finaliza el secado primario y no se debe aumentar la temperatura de la bandeja demasiado rápido



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

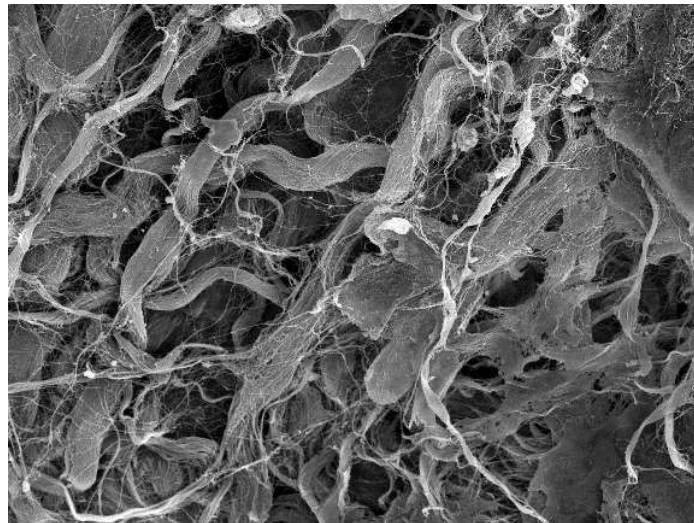
Determinación automática del punto final del secado primario implica la medición de temperatura mediante termopares.

La temperatura del producto es más fría que la temperatura de la bandeja durante la sublimación, ya que se necesita el calor de la bandeja para que el cambio de fase ocurra. Cuando termina la sublimación del hielo, la temperatura del producto aumentará y se acercará al valor de la temperatura del estante. Una vez que la temperatura del producto es igual a temperatura estante $\pm 1^\circ \text{C}$, el secado primario se considera completado.



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : **LIOFILIZACIÓN**

El colapso tiene un relación estrecha con la rehidratación y la porosidad del producto, se puede determinar si la muestra ha colapsado, cuando se estudia el comportamiento de la rehidratación, ya que el daño estructural disminuye la capacidad de rehidratación.



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : **LIOFILIZACIÓN**

El diseño de la curva de liofilización dependerá:

- Tipo de tejido que queramos liofilizar (espesor, porcentaje de agua, estructura interna,....)
- Volumen del producto y contenedor seleccionado
- Propiedades que queremos preservar (acción mecánica, matriz de colageno, componentes celulares,.....)
- Porcentaje de agua residual aceptado: influencia en la caducidad

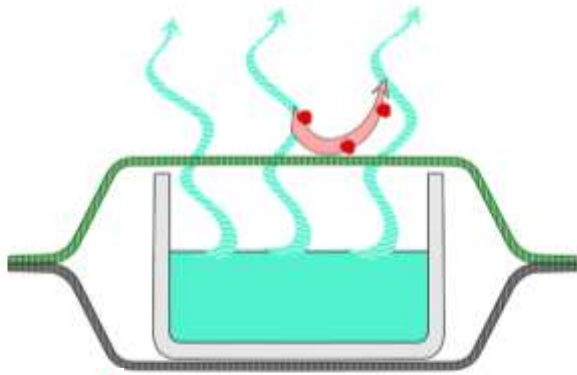


Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

Bolsas de liofilización

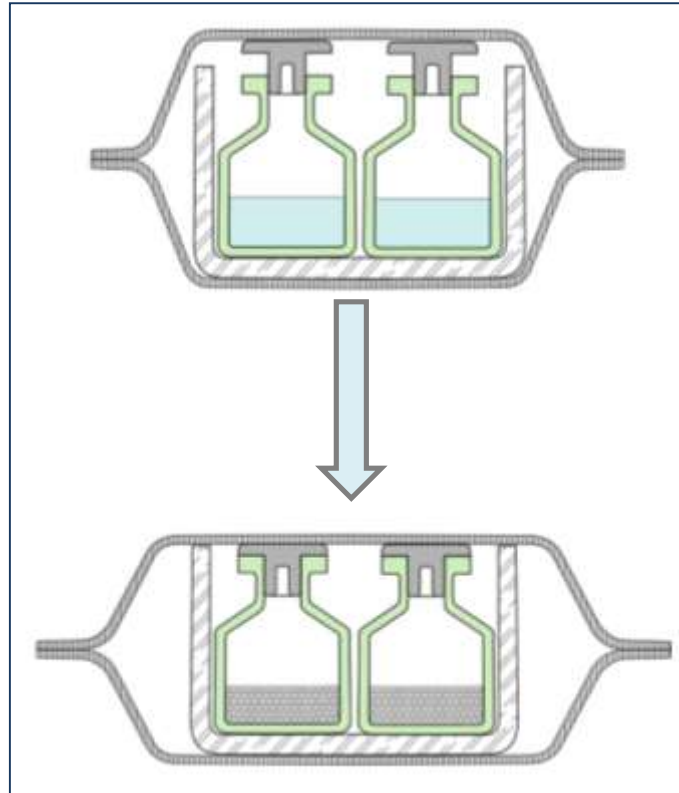
La parte superior de la bolsa consiste en una membrana vapor-permeable y la parte inferior impermeable. La membrana es suficiente porosa para no presentar resistencia durante el proceso de sublimación y por otra parte es suficientemente impermeable para impedir la entrada de microorganismos y partículas no viables.

Al finalizar el proceso de liofilización se debe proceder al empaquetado final (emblistado) o en su defecto proteger con bolsa hermética.



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

Viales



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN



Presión (vacío)
Temperatura de la bandeja
Temperatura de la cámara
Temperatura del condensador

Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

Ventajas respecto a otras técnicas

- Se obtienen productos que se pueden volver a regenerar muy rápidamente.
- La forma y características del producto final son esencialmente las originales.
- El contenido de humedad final es muy bajo: larga caducidad y riesgo de contaminación microbiana muy bajo
- Se pueden liofilizar varios donantes a la vez
- Técnica aplicable a muchos tipos de tejidos: tejidos óseo, membrana amniótica, colirios, pericardio, fascia lata, piel.....

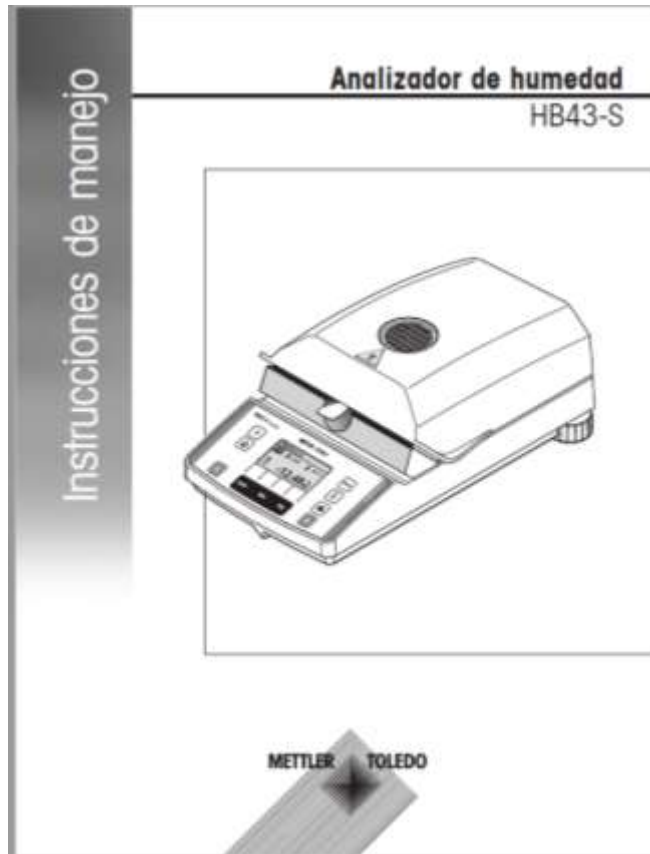
Inconvenientes

- Coste elevado de los equipos, instalaciones y mantenimiento
- Gran consumo energético requerido
- Duración del proceso
- Desarrollo y validación de cada nuevo producto



Preservación de tejidos a Temperatura ambiente : LIOFILIZACIÓN

Los productos liofilizados presentan una **humedad residual** muy baja y, por tanto, el riesgo de deterioro químico, bioquímico o microbiológico es mínimo.



8.5 Características técnicas

Tenga presente que el analizador de humedad está sometido a continuas mejoras en beneficio del usuario. Por ello, METTLER TOLEDO se reserva el derecho de modificar las características técnicas en cualquier momento y sin previo aviso.

Desecador

Unidad de calentamiento:	Radiador halógeno circular
Intervalo de temperatura:	50–200 °C
Paso de temperatura:	1 °C
Ajuste de la unidad de calentamiento:	con kit de ajuste de temperatura HA-TO ó HA-TCO

Balanza

Peso mínimo de la muestra:	0.5 g
Peso máximo de la muestra:	54 g
Ajuste del balanceo:	con pesa externa, 20 g ± 0.1 mg
Detector de estabilidad:	con símbolo en el indicador
Precisión de indicación de balanza:	1 mg
Precisión de indicación de resultado:	0.01%
Repetibilidad (sd) con 2 g de muestra:	0.10%
Repetibilidad (sd) con 10 g de muestra:	0.015%

Características

Hora, fecha:	reloj de sistema, contra fallos de corriente
Ajustes de fábrica:	memoria permanente, contra fallos de corriente
Criterios de desconexión:	5 niveles, manual, control por tiempo, test, libre
Programas de desecación:	Desecación estándar, desecación rápida, modo LP16
Tiempo de desecación:	manual (ilimitado), temporizador: 1 minuto hasta 480 minutos
Protección de regulación:	por bloqueo de los ajustes del menú

Evaluación

Tipos de indicación:	5 tipos: Contenido de humedad (MC), contenido de materia seca (DC), peso (g), contenido de humedad ATRO referido al peso en seco (AM), contenido de materia seca ATRO referido al peso en seco (AD)
Informes:	a través de impresora externa (opción)

Preservación de tejidos a T^a ambiente

Solución de preservación ideal:

- Bactericida / Bacteriostática
- Soluble en agua (para facilitar la eliminación por lavados)
- Fácil penetración en los tejidos
- No citotóxico
- No afecte a la estructura
- Coste económico asumible

Preservación de tejidos a Tª ambiente





BURNS

Burns 38 (2002) 52–58

www.burns.com

The use of glycerol-preserved allografts in the Beverwijk Burn Centre: a retrospective study

A.E.P.M. Vloemans*, M.C.J.M. Schreinemachers, E. Middelkoop, R.W. Kreis

Burn Centre, Radboud University Hospital, 13, 1942 LE Beverwijk, The Netherlands

Abstract

This report describes 156 consecutive patients treated with glycerol-preserved allograft skin (GPA) in the Beverwijk Burn Centre between January 1996 and July 2001. Patients with burn and non-burn lesions are included. Age varied from 7 months to 90.7 years. Five different procedures have been identified: (1) sandwich grafting technique; (2) treatment of partial-thickness burns with GPA as a meshed skin dressing; (3) improvement of wound condition; (4) scar release; a temporary coverage of release incisions with allograft skin to improve the wound bed and to benefit further relaxation of the wound primary to autografting.

The main points of interest in this inventory are the results of treatment, the aetiology and the extent of the wounds treated with GPA, the day post injury the GPA treatment was started, the duration of the treatment, the number of allograft applications, the occurrence of wound infection and wound treatment before GPA application. Concerning the scar release an inventory was made of the anatomic sites that were involved.

Sandwich grafting, which is the treatment of choice at this centre for extensive, full-thickness injuries, was performed on 129 wounds. The average burn size in all 70 patients treated was 35.6% TBSA with 26.9% full thickness. In all cases meshed GPA was used. Partial or complete healing was achieved in 57.6% of wounds.

In the treatment of partial-thickness burns, non-meshed GPA was used in all 57 cases. Complete healing without further treatment was achieved in 45.0% of the cases. Excision and autologous skin grafting was needed in 26.3% of the cases.

Meshed GPA was used to improve the condition of 88 non-healing wounds. Spontaneous healing was promoted in 13.6% of the wounds, and the wound bed was successfully prepared for autografting in 39.8% of the cases.

In all 52 scar releases a viable wound bed was obtained prior to autografting. Autologous graft take was 100% and no autologous

Samrati et al. *Biomaterials Research* (2018) 22:5
https://doi.org/10.1186/s40824-019-0154-1

Biomaterials Research

RESEARCH ARTICLE **Open Access**

Preservation of allograft bone using a glycerol solution: a compilation of original preclinical research

Brian Samrati, Davorica Sofic, Xiaofei Qin, Julie McLean, Payal Sohoni, Katrina Gonzales and Mark A. Moore*

Abstract

Background: Bone allografts are used in many orthopedic procedures to provide structural stability as well as an osteoconductive matrix for bone ingrowth and fusion. Traditionally, bone allografts have been preserved by either freezing or freeze-drying. Each of these preservation methods has some disadvantages. Frozen grafts require special shipping and storage conditions, and freeze-drying requires special lyophilization equipment and procedures that may impact biomechanical integrity. This report describes an alternate type of preservation using glycerol, which allows storage of fully hydrated tissues at ambient temperature avoiding the potential complications from freeze-drying.

Methods: In the in vitro three-point bend test, cortical bone was processed and frozen, freeze-dried, or treated with glycerol-based preservation (GBP). Load was applied to each graft at a rate of 2.71 mm/min. The flexural strain, flexural strength, and flexural modulus were then calculated. In the in vitro axial compression test, iliac crest wedges, fibular segments, and Cloward dowels were processed and either freeze-dried or GBP treated. The compressive strength of the grafts were tested at time zero and after real time aging of 1, 4, and 5 years. In the in vivo rat calvarial defect assessment, freeze-dried, frozen, and GBP bone implants were compared after being implanted into a critical sized defect. Samples underwent histological and biomechanical evaluation.

Results: Bone grafts subjected to GBP were found to be at least biomechanically equivalent to frozen bone while also being significantly less brittle than freeze-dried bone. GBP-preserved bone demonstrated significantly greater compressive strength than freeze-dried at multiple time points. Preclinical research performed in calvarial defect models found that GBP-preserved bone had similar osteoconductivity and biocompatibility to frozen and freeze-dried samples.

Conclusion: Preclinical research demonstrated that glycerol-preservation of bone yields a material that maintains biomechanical strength while eliminating the need for extensive rehydration or thaw periods if used clinically. Additionally, in vivo evidence suggests no negative impact of glycerol preservation on the ability of bone grafts to successfully participate in new bone formation and fusion.

Keywords: Glycerol, Tissue preservation, Allograft, Freeze-dried, Frozen, Preservation

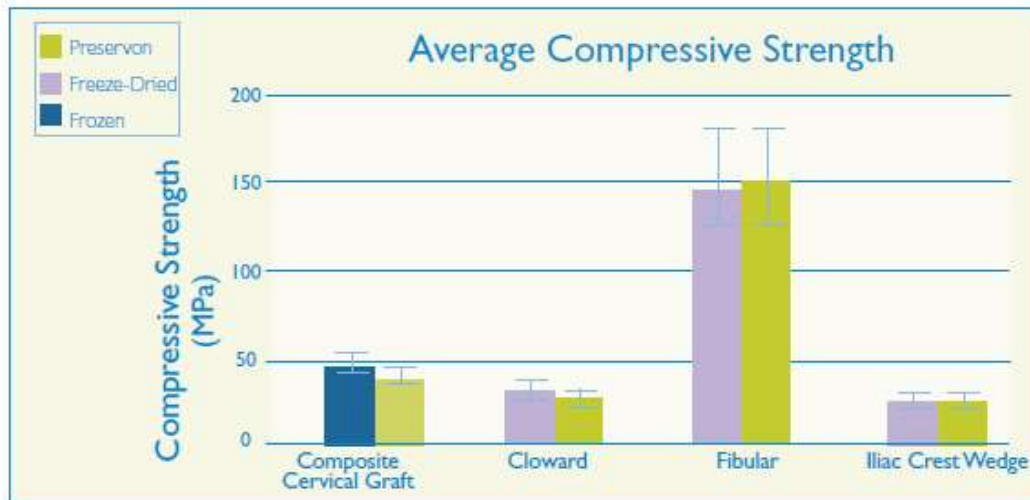
Table 2 – Assumed or documented superiority of preservation techniques (X indicates the superior technique).

	Cryopreservation	Glycerol preservation	Comment
Harvesting technique			Similar
Preparation prior to preservation (i.e. antibiotics treatment)			Similar
Viability of cells	X		
Inherent antimicrobial property		X	
Immunogenic response		X	Literature somewhat conflicting
Average time to healing			Similar
Average percentage of burns healed within set time frame			Similar: literature documents different time frames
Cost of preservation		X	Glycerol technique presumed superior because of simpler technique and equipment

Preservación de tejidos a T^a ambiente

Biomechanical Strength.

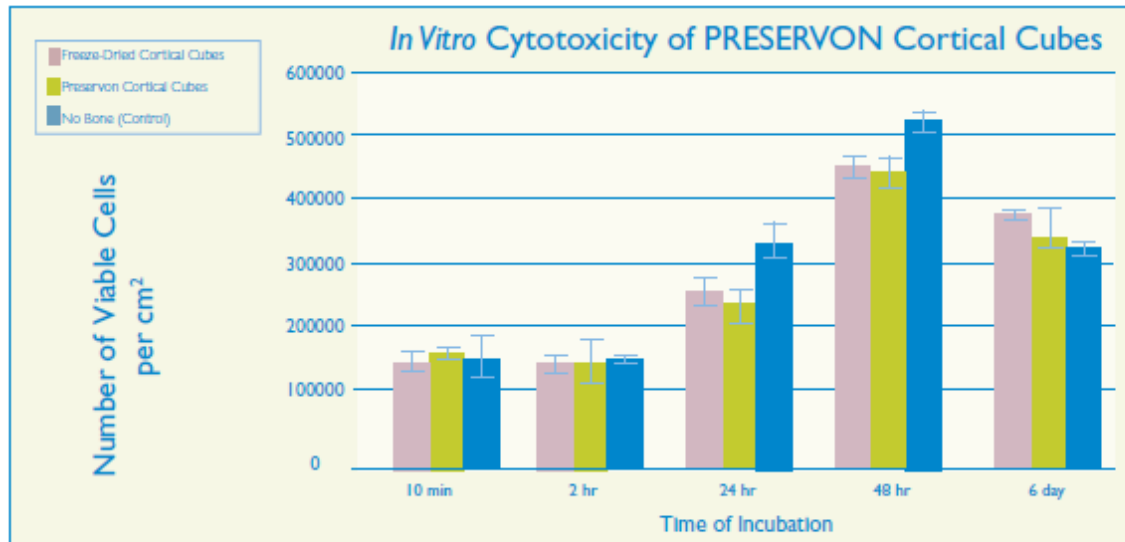
To determine the biomechanical properties of various Preservon-treated allograft bio-implants, compressive strength was evaluated and compared to freeze-dried and frozen bio-implants.



No significant differences are found in compressive strengths of allograft types tested between **PRESERVON** and frozen or freeze-dried bio-implants.¹

¹. Independent sources include the Virginia Commonwealth University Medical Center and the American Association of Mechanical Engineers. Data on file at LifeNet Health, Virginia Beach, VA.

Preservación de tejidos a T^a ambiente



No significant biocompatibility differences are observed between **PRESERVON** and conventional preservation methods.¹

Preservación de tejidos a Temperatura ambiente



AmnioClip-plus



GRACIAS !

