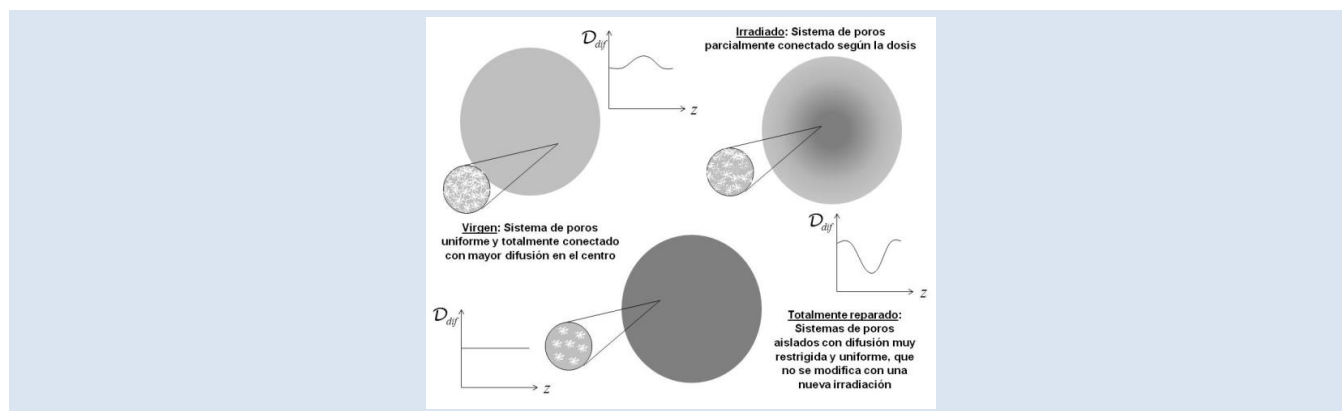


DEMORA MEDIADA POR FRUCTOSA DEL PROCESO DE RENATURALIZACIÓN DE LA CADENA DE TRIPLE HELICE DE GELATINA EN MEDIO ACUOSO

Jesús Enrique Dávila-Pérez^{1,2*}, Rafael Martín-Landrove²

1: Física Médica C. A., Grupo de Radioterapia Oncológica GURVE, Centro Plaza, Avenida Francisco de Miranda, Caracas Venezuela. 2: Centro de Física Molecular y Médica, Escuela de Física, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Paseo Los Ilustres, Caracas, Venezuela.

*e-mail: jdavila@fisicamedica.com.ve



RESUMEN

La desnaturalización de las cadenas de triple hélice en gelatina, producto de la interacción con radiaciones ionizantes y la evolución del proceso de renaturalización fueron estudiados empleando una mezcla de gelatina tipo B de 250 Bloom y fructosa hidratada con agua tridestilada (gelatina + fructosa), la cual fue irradiada con rayos-X producidos por un acelerador lineal de uso clínico con un potencial de operación de 6 MV para entregar dosis entre 30 y 300 Gy. Tanto la muestra virgen como las irradiadas fueron analizadas por medio de espectroscopia de masas e imágenes por resonancia magnética (IRM) utilizando técnicas basadas en difusión. Los resultados con espectroscopia de masas indican que en las muestras estudiadas no hubo formación de nuevos compuestos para las dosis entregadas. Con técnicas de difusión en un resonador magnético de 1,5 T se pudo hacer el seguimiento de los cambios macroscópicos producidos en la mezcla de gelatina + fructosa correspondiendo a la desnaturalización y posterior renaturalización incompleta de la cadena de triple hélice, lo que indica que ocurrieron cambios de la estructura porosa del material a nivel microscópico con un tiempo de media vida para la renaturalización de $12,46 \pm 0,15$ h.

Palabras Claves: Gelatina, Fructosa, Renaturalización, Radiación, Espectroscopia de Masas, Resonancia Magnética por Imágenes.

DELAY IN FRUCTOSE-MEDIATED RENATURALIZATION PROCESS FOR IRRADIATED TRIPLE-HELIX GELATIN CHAINS IN AQUEOUS MEDIUM

ABSTRACT

The triple-helix denaturalization in gelatin as a result of its interaction with ionizing radiation and evolution of renaturalization process were studied in a hydrated mixture of 250 Bloom type B gelatin, fructose and tridistilled water (gelatin + fructose), which was irradiated with X-rays produced by a clinical linear accelerator with an operating potential of 6 MV in order to deliver a dose between 30 and 300 Gy. Irradiated and non-irradiated samples were analyzed with the use of mass spectroscopy and magnetic resonance imaging (MRI) with diffusion techniques. The mass spectroscopy results indicate that no formation of new compounds took place for delivered doses. With diffusion techniques in a magnetic resonance 1.5 T scanner a follow-up of macroscopic changes in gelatin + fructose mixture could be done as they correspond to a triple-helix denaturalization followed by its incomplete renaturalization, which is an indication that changes in the material porous structure at microscopic level happened with a renaturalization half life time of $12,46 \pm 0,15$ h.

Keywords: Gelatin, Fructose, Renaturalization, Radiation, Mass Spectroscopy, Magnetic Resonance Imaging.

1. INTRODUCCIÓN

La palabra desnaturalización se define como alejarse o estar lejos de la forma natural; en un sentido termodinámico se refiere al cambio de un estado ordenado de las moléculas a otro desordenado, lo que trae consigo un incremento de la entropía del sistema. En este proceso las proteínas pierden las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, sin que haya una hidrólisis del enlace peptídico; es decir, los enlaces principalmente afectados son los de hidrógeno, los hidrófobos y los iónicos y, en ocasiones, los disulfuros. Esto puede ocurrir por pasos bien definidos y a diferentes velocidades. Cuando una proteína sufre la ruptura de las uniones disulfuro que estabilizan su estructura terciaria es difícil que regrese a su estado natural; pero en ocasiones el proceso puede ser reversible como sucede con la reactivación (o renaturalización) de algunas enzimas.

La desnaturalización producida por las radiaciones ionizantes en colágeno y gelatina tanto por electrones de alta energía así como con fuentes de emisión de rayos γ ha sido objeto de estudio a través de los años [1-9]. Los cambios en las propiedades físicas del colágeno después de la irradiación correspondiente a dosis entre 50 y 500 kGy han sido reportados por Bowes et al. [8]. Los cambios en la pérdida de cristalinidad analizados a partir del patrón de difracción por rayos X para dosis de 100 a 300 kGy, así como los observados a la temperatura de gelificación y el incremento en la solubilidad, indican que se genera una alteración en la estructura molecular para dosis altas. Las pérdidas relativas de aminoácidos varían con las condiciones de irradiación y se ven afectados de igual forma los aminoácidos ácidos y básicos así como los que tienen una estructura en anillo.

Cheung et al. [2] irradiaron colágeno con rayos gamma a dosis altas donde muestran cómo las moléculas de colágeno se dañan fácilmente con dosis comúnmente utilizadas para la esterilización total de productos biomédicos, las cuales están en el orden de 1 Mrad (10 kGy). Al mismo tiempo reportan que la eficacia de la radiación a una dosis más baja que la utilizada para esterilizar completamente un material es cuestionable y en ese caso se observa un menor daño de la cadena principal del péptido de colágeno. Por encima de las dosis de esterilización total se demostró un daño

significativo tanto en colágeno solo como en colágeno en una matriz de tejido reticulado preparado químicamente. El estudio de la digestión por una enzima mostró que frente a una exposición a una dosis muy elevada de radiación, el material resiste la degradación por pronasa. Sin embargo, el análisis de peso molecular mostró un número significativo de enlaces peptídicos que fueron escindidos por la radiación, los cuales podrían causar cambios considerables en las características del material a largo plazo. Leontiou et al. [11] demostraron utilizando microscopia electrónica que al irradiar fibras de colágeno de piel de ratón con radiación gamma y una dosis de 5 Gy, hay modificaciones estructurales de las mismas caracterizadas por un engrosamiento. Para ello compararon estructuras patrón sin irradiar, cuyo diámetro está en el intervalo 64 – 82 nm, con las irradiadas que alcanzaron el intervalo de 110 – 138 nm.

Los efectos reportados a dosis muy altas y muy bajas tanto sobre la gelatina como el colágeno no permiten inferir lo que debe ocurrir en el intervalo que va de decenas a centenas de Gy, ello nos motivó a plantearnos los siguientes objetivos para este trabajo: (a) Estudiar la composición y el comportamiento de la muestra de gelatina + fructosa al ser irradiada con dosis entre 30 y 300 Gy, mediante espectrometría de masas y técnicas de difusión por resonancia magnética, respectivamente. (b) Como parte del estudio por resonancia magnética, cuantificar particularmente el tiempo de vida media útil de la señal en el maniquí para ser analizado.

Adicionalmente es importante señalar que lo fundamental en aplicaciones dosimétricas es que el material sea capaz de producir un daño que pueda correlacionarse con la dosis absorbida tanto en intensidad como espacialmente en su volumen, así como permitir su observación durante un intervalo de tiempo que resulte manejable en la práctica.

1.1 Estabilización del Gel por Adición de la Fructosa

Se conoce que los azúcares modifican las propiedades de gelación de la gelatina, incrementando su resistencia a la deformación del gel y su punto de fusión. La red extendida de proteínas en la gelatina presenta entrecruzamientos que consisten de regiones donde la proteína ha

revertido a la estructura de triple hélice del colágeno [12-14]. La estabilidad de esta estructura, y de aquí la estabilidad de la gelatina, está influenciada por el soluto agregado. Los azúcares y polioles son utilizados para estabilizar la estructura plegada original de proteínas globulares y fibrosas [15,16] debido a su capacidad de desarrollar estructuras tipo puente de hidrógeno con el agua. Estudios sistemáticos han mostrado que la estabilización depende del efecto del azúcar en las propiedades del agua como solvente aumentando su rigidez y punto de fusión debido al incremento en la estabilidad de la cadena de triple hélice [16, 18-20]. En este trabajo se escogió la fructosa por ser una hexosa que puede obtenerse con muy alto grado de pureza.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Preparación de las muestras para la irradiación

Se preparó una mezcla con 160,0 g de gelatina tipo B de 250 Blomm y 40,0 g de fructosa de alta pureza por litro de agua (0,2 g/mL) en baño de maría a temperatura de 35 °C. Cada muestra se produjo introduciendo la mezcla en una esfera de vidrio de 16 cm de diámetro para formar un maniquí que emule los procesos de transporte de radiación en el cráneo de un paciente. Allí se dejó reposar a temperatura ambiente (22 °C) por 4 horas y posteriormente se llevó a refrigeración a 4 °C por 24 horas.

2.2 Sondeo del maniquí virgen por resonancia magnética

Las muestras (maniqués) fueron llevadas a un equipo de imágenes por resonancia magnética de 1,5 Tesla donde fueron adquiridas las imágenes del maniquí virgen, esto debido a que la difusión por resonancia magnética revela una imagen cuyo contraste es dependiente del movimiento del agua a través del gel el cual se ve alterado por la acción de la radiación. Para la obtención de los perfiles de los coeficientes de difusión se realizaron repetidas series de medidas utilizando técnica de imágenes con resonancia magnética (IRM) con secuencias que permiten obtener mapas del tiempo de relajación transversal T_2 y del tensor asociado al coeficiente de difusión.

2.3 Irradiación de las Muestras

Posteriormente los maniqués fueron irradiados con

un acelerador lineal de uso clínico cuyo potencial de aceleración es de 6 MV, utilizando una geometría de haz angosto y un tamaño de campo de 2,0 cm de diámetro. La forma de irradiación se realizó en un arco de rotación de 270 grados y a un conjunto de 3 muestras se les aplicó una dosis de 30, 100 y 300 Gy. Cada semana fueron irradiadas 3 muestras manteniendo una cuarta muestra virgen como testigo. Durante 10 semanas fueron irradiadas un total de 30 muestras en las mismas condiciones.

2.4 Espectroscopia e imágenes de las muestras

Tanto las muestras irradiadas como las no irradiadas fueron analizadas por espectroscopia de masa. El procedimiento consistió en disolver el gel en agua y añadir 0,5 mM de acetato de sodio y luego es introducido al equipo por inserción directa a la cámara para ionizar la muestra por ESI. Esta técnica tiene la ventaja de que la información en fase de solución se retiene completamente en fase gaseosa y el equipo utilizado fue un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo.

En los estudios de difusión se usa el método Stejskal-Tanner [21] (ver Figura 1), donde con un par simétrico de pulsos de gradiente se incrementa el desfase de los espines observados durante el espín-eco. Los espines que se mueven durante los gradientes de pulsos no recuperan la fase en el tiempo de eco TE y esto causa una pérdida en la amplitud de la señal, la cual viene dada por

$$S(TE) \propto \exp(-TE/T_2) \exp(-bD) \quad (1)$$

donde (γ es el factor giromagnético)

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) \quad (2)$$

La sensibilidad de la señal al movimiento está determinada por el valor del parámetro b . Grandes valores de b pueden obtenerse a través de grandes amplitudes de gradientes G , pulsos de gradiente de larga duración δ , o tiempos entre pulsos de gradientes Δ que sean grandes. En la muestra en estudio con pequeños valores de D la tasa de crecimiento de la varianza del desplazamiento es baja y sufre poca pérdida de señal. En cambio con grandes valores de D la tasa de crecimiento de la varianza del desplazamiento es alta y se produce una señal que se atenúa significativamente.

Los geles estudiados en este trabajo van a ser isótropos y en consecuencia el coeficiente de difusión va a ser una cantidad escalar que es

proporcional a la traza del tensor. En el protocolo de adquisición de los datos se producen en principio imágenes donde hay una primera que está ponderada en T2 (con $b = 0$), así como también hay otras tres que están ponderadas al mismo tiempo en T2 y en las componentes $D_{xx} \equiv D_1$, $D_{yy} \equiv D_2$ y $D_{zz} \equiv D_3$ (con $b = 1000 \text{ s/mm}^2$).

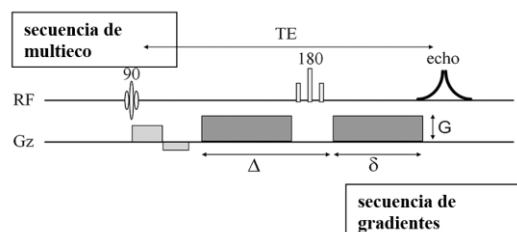


Figura 1. Gradientes de Stejskal-Tanner superpuestos a la secuencia del multieco (par de rectángulos grises).

El protocolo extrae la contribución de T2 en las últimas tres imágenes a través de un cociente simple del resultado de las dos ponderaciones anteriores y usando la Ec. (1). Se producen a continuación mapas de D_1 , D_2 y D_3 tomando el logaritmo del cociente de señales. En principio se puede trabajar con la traza que indicamos anteriormente, pero dado que la muestra es isótropa y para reducir tiempo de adquisición se trabajó solamente con una componente. Una vez obtenidos los mapas del coeficiente de difusión se pueden extraer perfiles utilizando ventanas rectangulares. En este trabajo estas se tomaron de 16 cm de longitud y nueve pixeles de ancho.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Espectroscopia de masas

El espectro de masa de la muestra virgen patrón de la mezcla de gelatina y fructosa en agua de alta pureza se muestra en la Figura 2 y el correspondiente a la mezcla irradiada para una dosis de 300 Gy en la Figura 3. De la misma manera los detalles de ambos espectros para su comparación se presentan en la Tabla 1. Se hizo el análisis de todos los iones aductos que se pueden formar con el apoyo de una herramienta de computación desarrollada para ese propósito. El pico dominante, que vamos a encontrar en ambos espectros y que sirve de referencia para la abundancia relativa está ubicado en un valor m/z nominal de 203 y corresponde al ión

aducto formado por la fructosa y el ión precursor de sodio, Na^+ , así como también hay contribución del aducto que incluye los aminoácidos de la gelatina glicina (Gly) y serina (Ser), además del ión precursor de sodio. Igualmente hay iones aductos que incluyen fragmentos de la fructosa para valores de m/z nominal de 127 y 145. Al comparar los dos espectros se observa que la posición de los picos es la misma y ello indica que con la irradiación no se producen compuestos diferentes a los ya existentes en el gel virgen. Hay picos asociados a bases de Schiff y fructosilamidas que debieron formarse al producir el gel por calentamiento y como resultado de reacciones entre la fructosa y los aminoácidos presentes en la gelatina. Estos picos los designamos en la Tabla 1 con las siglas BSF acompañadas con la abreviatura del aminoácido que debió tomar parte en la reacción. Todos los picos tienen asignadas contribuciones de iones aductos de aminoácidos con un ión precursor que puede ser H^+ , Na^+ o H_3O^+ y ellas compiten en porcentaje con aquellas relacionadas a compuestos BSF. Se observa entonces que la mayoría de los picos donde hay contribución de compuestos BSF sufren una reducción porcentual en la muestra irradiada como es el caso de BSF(Arg), BSF(Glu,Lys,Ala,Hlys,Arg), BSF(Hlys) y BSF(Ser) para m/z nominales de 85, 104, 127, 145, 180, 290 y 391, asociadas a los aminoácidos ácido glutámico (Glu), lisina (Lys), alanina (Ala), hidroxilisina (Hlys) y arginina (Arg). La excepción viene dada por un pico de BSF(Hlys), así como BSF(Hpro, Met, Leu, Ileu) y BSF(Tyr) para m/z nominales de 101, 312 y 362, respectivamente, los cuales están asociados a hidroxilisina, hidroxiprolina (Hpro), metionina (Met), leucina (Leu), isoleucina (Ileu) y Tyr (tirosina). Como en todos los picos hay contribución de aductos de aminoácidos de la gelatina, ese incremento puede deberse a una mayor presencia relativa de estos aductos después de la irradiación como ocurre particularmente con los picos de m/z nominales en 87 y 475. Vemos que picos relacionados con BSF(Hlys) reducen su contribución para m/z nominal de 127 y 145, lo que nos indica que su contribución en m/z nominal 312 debiera igualmente disminuir y el incremento global observado debe corresponder a aductos de aminoácidos. Dado que estamos empleando fructosa, se espera que la generación de bases de Schiff o fructosilamidas ocurra con mayor frecuencia con la hidroxilisina y la lisina durante la

generación del gel con calor y entonces con bases de Schiff o fructosilamidas asociadas al resto de los aminoácidos debe ocurrir igualmente una reducción. La reducción en los picos relacionados con compuestos BSF junto con el importante incremento de aquellos con picos de m/z nominal 87 y 475, sugiere que aparte de no haber producción de compuestos nuevos vamos a tener cambios estructurales en el material irradiado y ello da la motivación para estudiar el daño por radiación empleando técnicas de resonancia magnética por imágenes, lo cual va a ser considerado en las siguientes secciones.

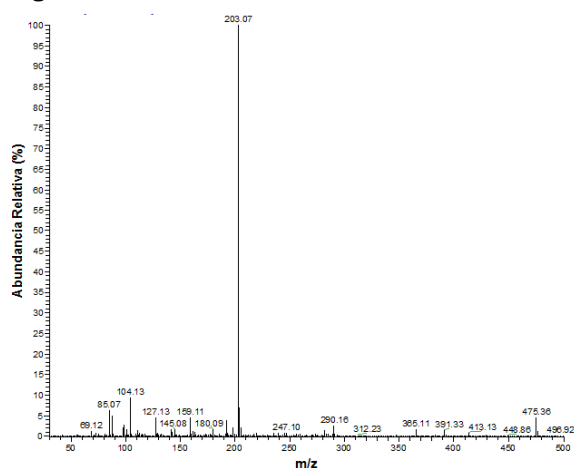


Figura 2. Espectro de masa de la muestra de la mezcla de gelatina y fructosa preparada con agua de alta pureza. Los iones aductos más abundantes corresponden al valor nominal m/z 203, que sirve de referencia para la comparación de abundancias relativas.

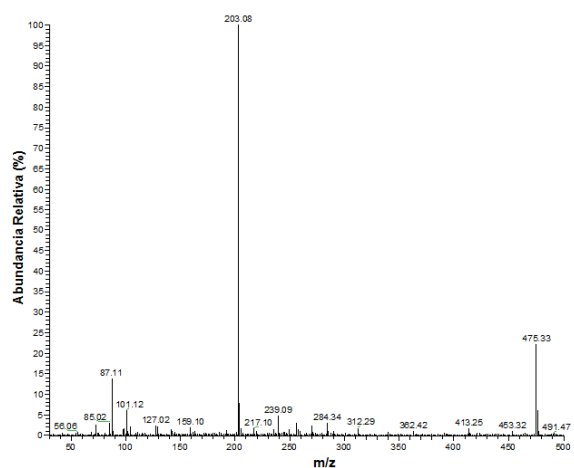


Figura 3. Espectro de masa de la muestra de la mezcla de gelatina y fructosa irradiada con un acelerador lineal operando a un potencial de 6 MV con una dosis entregada de 300 Gy.

Tabla 1. Abundancias Relativas de los Espectros de Masas de Gelatina+Fructosa.

m/z *	Sin Irrad.(%)	Irrad. (%)	Origen
56	0,5	0,8	AA, BSF ausentes
69	1,3	0,8	AA, BSF ausentes
85	6,2	2,6	AA, BSF(Arg)
87	5,0	14,7	AA, BSF ausentes
101	1,5	6,0	AA, BSF(Hlys)
104	9,6	2,2	AA, BSF(Glu, Lys, Ala, Hlys, Arg)
127	4,4	2,3	AA, BSF(Hlys), $[C_4H_8O_3+Na]^+$
145	1,6	0,7	AA, BSF(Hlys), $[C_4H_{10}O_4+Na]^+$
159	4,5	1,8	AA, BSF ausentes
180	1,6	0,5	AA, BSF(Arg)
203 ^a	100 ^a	100 ^a	$[C_6H_{12}O_6+Na]^+$, $[Gly+Ser+Na]^+$, BSF ausentes
217	0,6	1,8	AA, BSF ausentes
239	0,5	4,8	AA, BSF ausentes
247	1,0	0,6	AA, BSF ausentes
284	0,6	3,0	AA, BSF ausentes
290	2,5	1,0	AA, BSF(Ser)
312	0,3	1,7	AA, BSF(Hpro, Met, Leu, Ileu)
362	0,3	1,0	AA, BSF(Tyr)
365	1,5	0,5	AA, BSF ausentes
391	1,5	0,6	AA, BSF(Arg)
413	1,0	1,8	AA, BSF ausentes
448	0,3	0,15	AA, BSF ausentes
453	0,1	1,0	AA, BSF ausentes
475	4,5	22,2	AA, BSF ausentes
491	0,2	0,6	AA, BSF ausentes
496	0,2	0,2	AA, BSF ausentes

*: Valor Nominal. ^a: Valor de Referencia

AA: Aductos de Aminoácidos. BSF: Base de Schiff y/o Fructosilamida

3.2 Análisis de las imágenes obtenidas por resonancia magnética

3.2.1 Maniquí sin irradiación: perfil del coeficiente de difusión

Previo a la irradiación de la muestra de gelatina + fructosa se realizó un sondeo de la misma y la imagen obtenida con el mapa del coeficiente de difusión se muestra en la Figura 3. Esta prueba sirve como referencia de base para comparaciones posteriores con los maniqués que recibieron irradiación. La imagen que se presenta en la Figura 4 se ve uniforme pero el perfil del coeficiente de difusión a lo largo de su diámetro revela que hay un máximo central como se ve en la Figura 5. Para el tratamiento cuantitativo de las imágenes va a ser fundamental encontrar la dependencia de ese perfil con la posición.

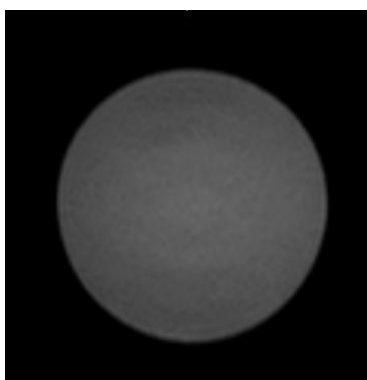


Figura 4. Imagen de resonancia magnética de la muestra de gelatina + fructosa sin irradiar.

Para evaluar la dependencia del coeficiente de difusión con la posición del punto de observación en el maniquí esférico consideramos la función de Green $G_0(\vec{r}, \vec{r}')$ asociada a difusión en presencia de una fuente puntual en $\vec{r}'$ para un medio homogéneo e infinito, en el instante t , punto de observación $\vec{r}$ y que viene dada por la gaussiana

$$G_0(\vec{r}, \vec{r}', t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{3/2}} \exp\left[-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4Dt}\right] \quad (3)$$

cuyo ancho σ viene dado por $\sigma^2 = 2Dt$, siendo D el coeficiente de difusión y es simétrica frente al intercambio de $\vec{r}$ con $\vec{r}'$. La cantidad σ^2 es la varianza de la distribución gaussiana del desplazamiento en el instante t , cuando la difusión ocurre en un medio homogéneo e infinito. Para

evaluar el coeficiente de difusión observado en un punto del maniquí no irradiado en principio se puede emplear una función de Green $G(\vec{r}, \vec{r}')$ que satisfaga condiciones de frontera homogéneas en la superficie esférica del maniquí y ella se puede obtener inmediatamente por el método de imágenes a partir de la función dada en la Ec. (3) con el resultado

$$G(\vec{r}, \vec{r}', t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{3/2}} \left\{ \exp\left[-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4Dt}\right] - \exp\left[-\frac{\frac{r'^2 r^2}{R^2} + R^2 - 2\vec{r}' \cdot \vec{r}}{4Dt}\right] \right\} \quad (4)$$

para posteriormente obtener la varianza efectiva $\sigma_{EF}^2(\vec{r})$ como

$$\sigma_{EF}^2(\vec{r}) \equiv \frac{\int_V d^3r' (\vec{r} - \vec{r}')^2 G(\vec{r}, \vec{r}')}{\int_V d^3r' G(\vec{r}, \vec{r}')} - \langle \vec{r} \rangle^2 \quad (5)$$

donde el desplazamiento medio $\langle \vec{r} \rangle$ corresponde a

$$\langle \vec{r} \rangle \equiv \frac{\int_V d^3r' (\vec{r} - \vec{r}') G(\vec{r}, \vec{r}')}{\int_V d^3r' G(\vec{r}, \vec{r}')} \quad (6)$$

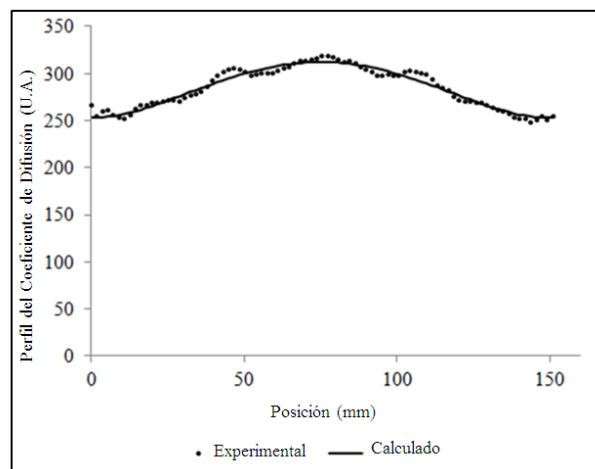


Figura 5. Perfil del coeficiente de difusión (tomado según lo indicado en el Sección 3.4) para el maniquí sin irradiar o virgen que muestra un máximo central, lo que indica que hay mayor difusión en el centro. La línea continua representa lo calculado con la Ec. (14) con un error relativo medio del 1.36%. La relación encontrada es exacta para un maniquí esférico.

Para obtener el perfil podemos usar como referencia la varianza efectiva en el centro o en la superficie del maniquí no irradiado esférico. En nuestro caso el hacer el cálculo detallado de la varianza efectiva

dada por la Ec. (5) puede ser un esfuerzo innecesario ya que $\sigma^2 = 2Dt \ll R^2$. Efectivamente el coeficiente de difusión del medio homogéneo e infinito correspondiente al gel debe tener como cota superior el coeficiente de difusión del agua libre sin barreras, el cual corresponde a

$$D_{\text{agua libre}} = 2560 \pm 270 \mu\text{m}^2/\text{s} \quad (7)$$

y si suponemos un tiempo de medición en el resonador de 10 minutos, así como un maniquí de 16 cm de diámetro, encontramos que

$$\sigma^2 \leq \sigma_{\text{agua libre}}^2 = 0.027 \text{ cm}^2 \ll 256 \text{ cm}^2 = R^2 \quad (8)$$

y ello indica que podemos comparar las varianzas efectivas en el centro y el borde del maniquí con un cálculo sencillo ya que en el primer caso tomamos simplemente el resultado de un medio infinito y en el segundo evaluamos la varianza en la pared de un medio semi-infinito. Entonces en el centro del maniquí esférico, reemplazando la Ec. (3) en la Ec. (5) y Ec. (6), obtenemos

$$\sigma_{EF}^2(\vec{r} = 0) = 3\sigma^2 = 6Dt \quad (9)$$

Para trabajar el medio semi-infinito la función de Green debe anularse en la pared, la cual va a ser perpendicular al eje- z y está colocada en $z' = 0$. Volvemos a usar el método de las imágenes y el resultado es

$$G(\vec{r}, \vec{r}') = \frac{1}{(2\pi)^{3/2} \sigma^3} \exp\left[-\frac{(x-x')^2}{2\sigma^2}\right] \exp\left[-\frac{(y-y')^2}{2\sigma^2}\right] \otimes \left\{ \exp\left[-\frac{(z-z')^2}{2\sigma^2}\right] - \exp\left[-\frac{(z+z')^2}{2\sigma^2}\right] \right\} \quad (10)$$

Para obtener el desplazamiento medio dado en Ec. (7) hay que tomar el límite cuando $z' \rightarrow 0$ y entonces llegamos a

$$\langle \vec{r} \rangle = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \sigma \hat{z} \quad (11)$$

Empleando la Ec. (5) y la Ec. (10) la varianza efectiva en este caso pasa a ser la contribución en x e y , la cual es de σ^2 cada una y debe sumarse a la contribución $2\sigma^2$ en z , para finalizar restando $\langle \vec{r} \rangle^2$ con el resultado

$$\sigma_{EF}^2(\vec{r} = R\hat{r}) = \left(4 - \frac{\pi}{2}\right) \sigma^2 = 2\left(4 - \frac{\pi}{2}\right) Dt \quad (12)$$

Entonces a partir de la Ec. (9) y la Ec. (12) encontramos la fracción f_0 que representa el cociente del valor en el centro entre el valor en la superficie del maniquí esférico y que viene dada por

$$f_0 \equiv \frac{\sigma_{EF}^2(|\vec{r}| = 0)}{\sigma_{EF}^2(|\vec{r}| = R)} = \frac{3}{4 - \frac{\pi}{2}} \quad (13)$$

Igualmente se puede demostrar empleando la Ec. (10) que la derivada de σ_{EF}^2 como función de z en la superficie se anula. Este último hecho combinado con el resultado de la Ec. (13), donde se evidencia que σ_{EF}^2 tiene un máximo en el centro, permite inferir que la función más sencilla a considerar para representar el perfil es un polinomio de cuarto orden ya que al menos tres puntos tienen derivada nula como funciones de la posición en el perfil, uno en el centro y los otros dos en los extremos. El perfil del coeficiente de difusión en el maniquí sin irradiar viene entonces dado por

$$\frac{D(\xi)}{D_0} = 1 + 64(f_0 - 1) \left(\frac{\xi^4}{4} - \frac{\xi^3}{2} + \frac{\xi^2}{4} \right) \quad \xi \equiv \frac{z}{2R} \quad (14)$$

Donde ahora D_0 es el coeficiente de difusión en la superficie, el cual es el único parámetro a ser ajustado. La Ec. (14) permite calcular el perfil mostrado en la Figura 5 el cual tiene un grado de acuerdo con los observado experimentalmente de 1.36% y va a ser empleado para el tratamiento cuantitativo que permite la obtención de la dosis como función de la posición.

3.2.2 Comparación de las imágenes de dos maniqués irradiados, uno con gelatina y el otro con la mezcla de gelatina+fructosa

Se prepararon dos maniqués, uno de gelatina y otro con la mezcla de gelatina y fructosa. Estos dos maniqués fueron irradiados en idénticas condiciones y sometidos al sondeo por resonancia magnética para obtener los mapas del coeficiente de difusión.

En las imágenes de la Figura 6 se presenta la comparación de la irradiación del maniquí que contiene solo gelatina (Figura 6a) y el maniquí que contiene la mezcla de gelatina y fructosa (Figura 6b), irradiados en las mismas condiciones, es decir, 6 MV de voltaje acelerador y en un arco de rotación de 270 grados para producir la máxima entrega de

300 Gy en el centro. En ellas se puede ver claramente el efecto que produce la adición de la fructosa y que conduce a la visualización del daño por radiación en el maniquí.

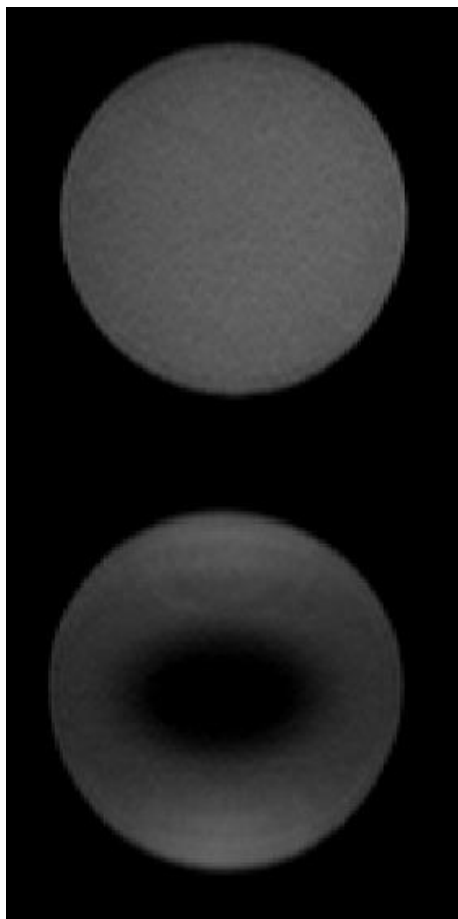


Figura 6. Comparación de los efectos luego de haberse irradiado cada maniquí para llegar a una dosis de 300 Gy y con un potencial de operación de 6 MV para el acelerador lineal clínico. **(a)** Arriba: Imagen del maniquí que contiene solo gelatina. **(b)** Abajo: Imagen del maniquí que contiene la mezcla de gelatina y fructosa. Ambos maniquíes fueron sondeados 24 horas después de la irradiación, la cual se realizó en un arco de rotación de 270 grados y produce la máxima entrega de dosis en el centro.

Las imágenes corresponden a una de las componentes del tensor de difusión ya que por isotropía las otras dos no van a aportar más información. Hay una variación del coeficiente de difusión, donde los tonos más oscuros representan los valores más bajos y ello indica un cambio en la estructura de poros que debe alterar el transporte de agua en el interior del maniquí. Ello debe estar

asociado al entrecruzamiento amino-fructosa que potencia el efecto sobre la desnaturalización de las triples hélices y es consistente con el análisis de los espectros de masas obtenidos, lo cual reitera que el único cambio es estructural. Este entrecruzamiento lleva al sellamiento de poros a todas las escalas y hace que la reparación de las cadenas de triple hélice se lleve a cabo en intervalos de tiempo más largos de manera que pueda ser detectado con técnicas de imágenes.

3.2.3 Efectos a observar con la variación de la dosis

Para explorar la respuesta del material cuando se entrega una dosis por debajo de 300 Gy, se irradiaron muestras para alcanzar dosis de 30 y 100 Gy. Por las intensidades relativas observadas en las imágenes producidas se desprende que el fenómeno tiene una memoria o una edad y que en consecuencia el sondeo debe hacerse en un tiempo lo suficientemente corto como para evitar que la intensidad de la imagen disminuya y no se pueda obtener la información requerida para la comparación con la dosis entregada. Esta alteración de la imagen hacia una disminución de la intensidad con el tiempo evidencia la existencia de mecanismos de reparación en el gel aun cuando tenemos gelatina en presencia de cantidades importantes de fructosa como las empleadas para la mezcla.

Para una verificación adicional de que hay mecanismos de reparación funcionando la siguiente prueba fue hacer el sondeo 72 horas después de la irradiación en el maniquí originalmente irradiado a 100 Gy y el resultado se presenta en la Figura 7. En este caso el mapa de coeficiente de difusión es completamente uniforme y carece de máximo central. Entonces podemos concluir que la señal se va debilitando por la reparación o renaturalización de las cadenas de triple hélice.

Con la motivación que proporciona el resultado anterior, donde a las 72 horas se obtiene un mapa de coeficiente de difusión uniforme, el mismo maniquí fue llevado a irradiación nuevamente pero ahora a una dosis de 300 Gy con el propósito de observar la respuesta a la radiación del gel que ha sido reparado y la reversibilidad que pudiera exhibir dado que uno de los componentes de la mezcla es gelatina. En la Figura 8 podemos apreciar la imagen del maniquí que ha sido irradiado nuevamente para alcanzar una dosis de 300 Gy.

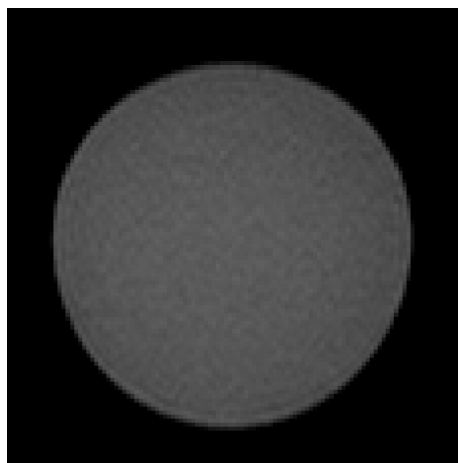


Figura 7. En la imagen se muestra el resultado de la medición del maniquí 72 horas posteriores a la irradiación con 100 Gy y 6 MV.



Figura 8. En la imagen se presenta el maniquí nuevamente irradiado para alcanzar una dosis de 300 Gy. Esta prueba se realizó para verificar la alteración de la respuesta una vez que la reparación del material tiene lugar y al mismo tiempo explorar la posibilidad de volver a usarlo como detector.

Como en la Figura 8 la imagen ofrece un mapa completamente uniforme podemos concluir que la reparación de las cadenas de triple hélice por efecto de la renaturalización es necesariamente incompleta ya que el gel no regresó a su estado original y entonces estamos en presencia de un comportamiento irreversible. Ese no sería el caso si se irradia un maniquí virgen para alcanzar la misma dosis de 300 Gy y el mapa de coeficiente de difusión corresponde a lo mostrado en la Figura 6b donde hay una clara variación en el espacio. Podemos decir entonces que la desnaturalización de las cadenas producto de la irradiación conduce a una

regeneración parcial que altera considerable las funciones del material. Ello no hace el gel reversible y el maniquí no puede usarse para varias irradiaciones. Desde el punto de vista de la práctica clínica esto no es un problema porque los materiales son de fácil acceso y bajo costo.

Analizando lo anterior podemos representar la evolución del maniquí como se indica en la Figura 9. Allí vemos que mientras el maniquí está sin irradiar los poros dentro de la matriz del gel están uniformemente distribuidos y como se muestra en la Figura 5, el coeficiente de difusión en el centro del maniquí tiene un máximo. Luego que el maniquí se irradia la distribución de poros se modifica quedando parcialmente conectada de acuerdo a la zona irradiada y a la dosis entregada. La distribución de poros se afecta localmente y en este caso podemos hablar de una difusión restringida debido a la desnaturalización de las cadenas de triple hélice, lo que lleva a una mayor caída del coeficiente de difusión en las regiones de mayor entrega de dosis. Posterior a esto sucede la renaturalización de las cadenas volviendo a formarse las triples hélices pero no con la configuración original. Debido a esto, los poros se encuentran aislados y parcialmente conectados y la difusión pasa a ser uniforme en todo el gel. Este hecho impide que el gel pueda ser reutilizado para producir cambios con una nueva irradiación.

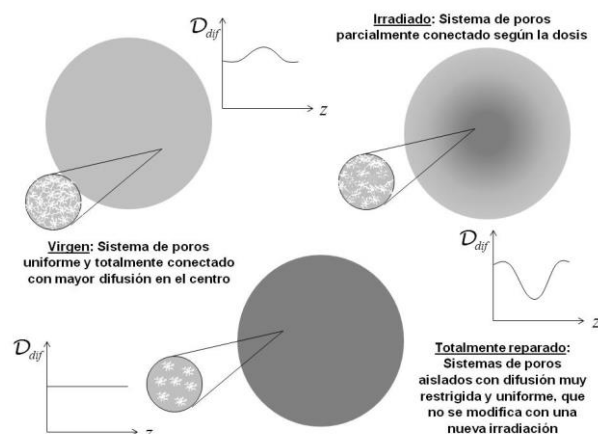


Figura 9. Imagen en la que se aprecia la transformación sufrida por el gel luego de la irradiación y como el sistema de poros sufre cambios por acción de la radiación.

Un resultado reciente que confirma y complementa estos resultados es el obtenido por Zhang et al. [22] donde se evaluó la arquitectura de los poros internos

y las propiedades mecánicas de hidrogeles del colágeno cuando se produce entrecruzamiento por efecto de la radiación gamma, encontrándose que los poros disminuyen de tamaño y el módulo de compresión aumenta.

3.2.4 Teoría asociada al perfil del coeficiente de difusión

Para analizar el problema de manera conveniente consideramos perfiles como los mostrados en la Figura 10. Las mediciones se realizaron para $TE = 90,752\text{ ms}$, $TR = 3107,9\text{ ms}$ y $b = 1000\text{ s/mm}^2$. Allí vemos que la región de interés (normalmente abreviada como ROI, region of interest) corresponde a una ventana rectangular cuyo ancho se selecciona para reducir ruido y al mismo tiempo no producir una distorsión importante en el valor de la señal.

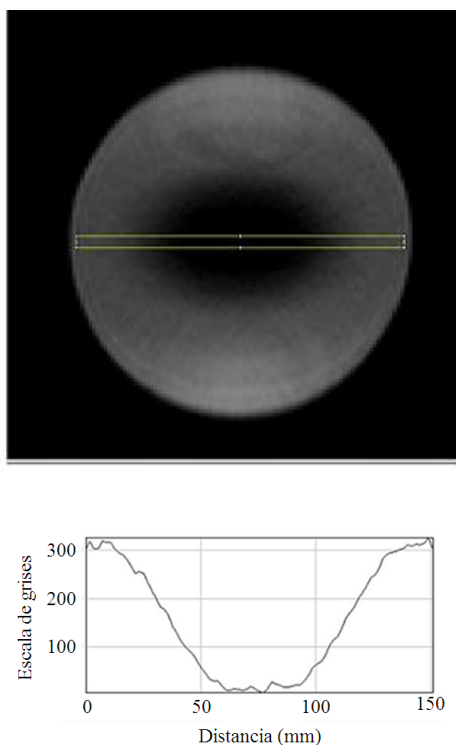


Figura 10. En la figura se presenta la imagen del mapa del coeficiente de difusión (arriba) y el perfil horizontal del maniquí irradiado (abajo) con 100 Gy con potencial de 6 MV. La ventana rectangular se toma según lo indicado en la Sección 3.4.

Una primera observación experimental que es fundamental para establecer la teoría es encontrar que a través de una transformación lineal los perfiles

hallados a 30, 100 y 300 Gy se pueden hacer coincidir dentro de los errores experimentales como puede verse en la Figura 11. Esto va a tener importantes consecuencias que van a ser examinadas más adelante en esta sección y aun en la circunstancia en la que este resultado no sea exacto, ello nos va a permitir dar un paso necesario en la construcción de la teoría.

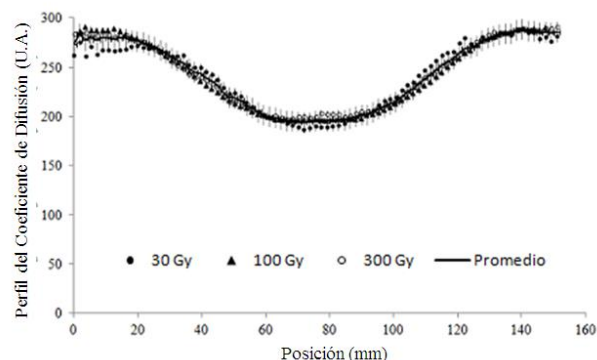


Figura 11. Perfiles del coeficiente de difusión para 30 (2 horas), 100 (24 horas) y 300 (24 horas) Gy en unidades arbitrarias (U. A.) después de aplicar la transformación lineal para hacerlos coincidir de manera óptima y en función de la posición a lo largo del diámetro del maniquí esférico.

Para la comparación de los perfiles hay que recurrir a esta transformación lineal debido a que el resonador en el manejo de las imágenes utiliza una ventana variable de tonos de gris donde hay cambio de escala y de línea base, lo que obliga a trabajar el perfil del coeficiente de difusión en unidades arbitrarias. Para encontrar los factores de escala y línea base se recurrió a un procedimiento de optimización donde uno de los perfiles se toma como referencia. Para encontrar esas cantidades en el caso del perfil α , distinto del que hemos tomado como referencia, buscamos el mínimo de la función de costo Δ_α dada por

$$\Delta_\alpha \equiv \frac{1}{N_P} \sum_{i=1}^{N_P} \left| \frac{\tilde{D}_{dif,D_\alpha}^{(i)} - \mathcal{D}_{dif,D_{Ref}}^{(i)}}{\tilde{D}_{dif,D_\alpha}^{(i)}} \right| \quad (15)$$

donde N_P es el número de puntos experimentales y $\mathcal{D}_{dif,D_{Ref}}^{(i)}$ es el conjunto de datos crudos del perfil de coeficiente de difusión experimental que va a ser tomado como referencia. De la misma manera

$\tilde{D}_{dif,D_\alpha}^{(i)}$ es el perfil experimental transformado del coeficiente de difusión, correspondiente al perfil de dosis D_α y que viene dado por

$$\tilde{D}_{dif,D_\alpha}^{(i)} = S_\alpha \mathcal{D}_{dif,D_\alpha}^{(i)} + L_\alpha \quad (16)$$

donde $\mathcal{D}_{dif,D_\alpha}^{(i)}$ representa el conjunto de datos crudos asociados al coeficiente experimental para el perfil de dosis D_α , así como S_α y L_α son respectivamente el factor de escala y la línea base que van a permitir la superposición. Como nuestro principal interés está orientado a desarrollar un nuevo método en dosimetría aplicada a radioterapia, la referencia la vamos a tomar con el perfil de 30 Gy por ser el más cercano a las aplicaciones. Los resultados de las optimizaciones se presentan en la Tabla 2 donde se puede observar que el valor porcentual tanto de la función de costo como del error medio sobre el perfil promedio, están por debajo del valor de la incertidumbre experimental de 4.17%. A continuación se va a extraer la forma funcional del perfil del coeficiente de difusión partiendo de observaciones experimentales como la que acabamos de presentar.

Tabla 2. Resultados de la optimización de la transformación lineal.

a: Perfil de referencia.

Perfil de Dosis (Gy)	S_α	L_α (U.A.)	$100 \times \Delta_\alpha$ (%)	Error Medio (%)
30 ^a	1,0	0,0	0,0	4,17
100	0,297	194,0	3,61	1,57
300	0,292	196,5	3,10	1,03

Para ello consideramos el perfil del coeficiente de difusión en su forma más general como $\mathcal{D}_{dif,\alpha}[z, D_\alpha(z), t_\alpha]$ y ello significa que depende del instante de tiempo t_α en que se realiza la observación, del perfil de dosis $D_\alpha(z)$ y en principio depende de la posición z que estamos tomando a lo largo del maniquí esférico.

Al examinar experimentalmente la evolución del perfil del coeficiente de difusión encontramos dos aspectos importantes, uno es que éste se extingue

entre uno o varios días a partir del momento de la irradiación según la dosis entregada total y se llega a un perfil que dentro de la incertidumbre experimental es constante con respecto a la posición z , es decir, carece de estructura. El otro es que según lo mostrado en la Figura 11 la forma no cambia con la posición z conforme el tiempo transcurre, aunque su amplitud debe decrecer. Estas dos observaciones llevan a considerar

$$\mathcal{D}_{dif,\alpha}[z, D_\alpha(z), t_\alpha] = A_\alpha H[z, D_\alpha(z)] T(t_\alpha) + B_\alpha(t_\alpha) \quad (17)$$

donde $T(t_\alpha)$ decrece de manera que $T(t_\alpha \rightarrow \infty) \rightarrow 0$ y tomamos $T(t_\alpha = 0) = 1$ y los detalles restantes del perfil se incluyen en $H[z, D_\alpha(z)]$. Por otro lado $B_\alpha(t_\alpha)$ debe alcanzar un valor de saturación cuando $t_\alpha \rightarrow \infty$ y esto permite obtener para tiempos de observación largos el perfil sin estructura anteriormente comentado.

Otra consecuencia de lo observado en la Figura 11 es que $T(t_\alpha)$ debe ser una exponencial decreciente en el tiempo y ello está fundamentado en que la exponencial es la función que preserva su forma frente a un desplazamiento finito del dominio, es decir, al considerar un corrimiento en el tiempo $t \rightarrow t - t_0$ vemos que

$$\begin{aligned} f(t) &= \exp(\alpha t) \rightarrow \\ f(t - t_0) &= \exp[\alpha(t - t_0)] \\ &= \exp(-\alpha t_0) \exp(\alpha t) \propto \exp(\alpha t) \end{aligned} \quad (18)$$

El corrimiento en el tiempo produce escalamiento a través de un factor multiplicativo, aspecto que será tomado en cuenta más adelante. El que la exponencial sea decreciente se desprende de que $T(t_\alpha \rightarrow \infty) \rightarrow 0$. El mismo argumento no aplica en general para $B_\alpha(t_\alpha)$ ya que corresponde a una línea base, pero lo que sí es cierto es que $T(t_\alpha)$ y $B_\alpha(t_\alpha)$ van a estar correlacionadas en su evolución al proceso de reparación que ocurre en el material después de la irradiación.

La función $H[z, D_\alpha(z)]$ contiene la información relacionada con el daño producido por irradiación en el material para $t_\alpha = 0$. Teniendo en cuenta la situación donde se irradia el maniquí uniformemente

de manera que $D_\alpha(z)$ es una constante C_0 para cualquier z , podemos escribir

$$H[z, D_\alpha(z) \equiv C_0] \propto f_v(z) \quad (19)$$

Donde $f_v(z)$ es el perfil del maniquí virgen o sin irradiar y ello es el resultado de producir daño de manera uniforme, que al no alterar la forma y tener en consecuencia un medio uniforme el perfil del coeficiente de difusión resultante debe ser proporcional al perfil original. La Ec. (19) permite factorizar $H[z, D_\alpha(z)]$ como

$$H[z, D_\alpha(z)] \equiv f_v(z) F[D_\alpha(z)] \quad (20)$$

y entonces la forma final para $\mathcal{D}_{dif,\alpha}[z, D_\alpha(z), t_\alpha]$ corresponde a

$$\begin{aligned} \mathcal{D}_{dif,\alpha}[z, D_\alpha(z), t_\alpha] \\ = A_\alpha f_v(z) F[D_\alpha(z)] \exp(-\lambda_R t_\alpha) + B_\alpha(t_\alpha) \end{aligned} \quad (21)$$

donde $T(t_\alpha) \equiv \exp(-\lambda_R t)$ y λ_R debe ser la constante de desaparición del daño debido a la radiación por el efecto de los mecanismos de reparación. En la misma forma podemos hablar de un tiempo de media vida dado por $T_R \equiv \ln 2 / \lambda_R$. Es importante señalar que debido a que la determinación con el resonador del perfil del coeficiente de difusión no es absoluta por el manejo que se hace de la imagen con ventana variable de tonos de gris, no es posible observar directamente la caída de la exponencial. No obstante haciendo uso de las Ecs. (17) y (21) se puede notar que

$$\begin{aligned} \mathcal{D}_{dif,\beta}[z, D_\beta(z), t_\beta] &= A_\beta f_v(z) F[D_\beta(z)] T(t_\beta) + B_\beta(t_\beta) \\ &= \frac{T(t_\beta)}{T(t_\alpha)} \{A_\beta f_v(z) F[D_\beta(z)] \exp(-\lambda_R t_\alpha) + B_\beta(t_\alpha)\} + B_\beta(t_\beta) - B_\beta(t_\alpha) \frac{T(t_\beta)}{T(t_\alpha)} \\ &= S_\beta \mathcal{D}_{dif,\alpha}[z, D_\beta(z), t_\alpha] + L_\beta \end{aligned} \quad (22)$$

donde vemos que la Ec. (22) tiene la misma forma que la Ec. (16) y está asociada a un corrimiento temporal. El factor de escala S_β viene dado por $S_\beta = \exp[-\lambda_R(t_\beta - t_\alpha)]$. Al examinar el contenido de la Tabla 2 para los perfiles tomados para dosis totales de 100 y 300 Gy se observa que los correspondientes factores de escala tienen valores

muy cercanos, lo cual es compatible con el hecho de que el tiempo de observación después de la irradiación es el mismo y no son iguales por la incertidumbre experimental (2.06% en este caso). Entonces se obtiene como resultado

$$\lambda_R = 0.0556 \pm 0.0007 \text{ h}^{-1}$$

$$T_R = 12.46 \pm 0.15 \text{ h}$$

y la escala de tiempo observada en la práctica para la extinción de los perfiles es consistente con este resultado.

4. CONCLUSIONES

Al irradiar la mezcla de gelatina y fructosa propuesta se produce un daño en el material que altera su estructura de poros y por ende sus propiedades de transporte. Cuando se hizo la prueba con y sin fructosa se pudo comprobar que la respuesta se genera en la muestra que contiene fructosa y no en la que contiene solo gelatina. Esto solo comprueba el hecho que la gelatina se autorepara luego del impacto con radiaciones ionizantes y que al añadirle fructosa a la preparación, está va a hacer más lenta la reparación del daño al punto de hacerla incompleta. Esto queda demostrado cuando al irradiar nuevamente no se producen daños detectables en la muestra que puedan observarse por los métodos de imágenes. La reparación incompleta de la triple hélice es lo que permite que el fenómeno pueda ser observado en las imágenes de resonancia magnética. Aunque la señal al cabo de unos días desaparece del maniquí, el material no queda en el estado original debido a la reparación incompleta. La irradiación del maniquí y tiempo de medición deben estar sincronizadas para evitar que la señal caiga tanto en intensidad que no pueda ser detectada por el equipo de resonancia magnética por imágenes. Las pruebas dieron satisfactorias para 30 Gy medidos 2 horas después, 100 Gy y 300 Gy medidos 24 horas después.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial al Grupo Curve de Radioterapia Oncológica y a Física Médica C.A. por el apoyo institucional y económico para la realización de este trabajo. También agradecemos al Servicio de Imágenes MEDIMAGEN y a su personal técnico por el apoyo y colaboración en la realización de los estudios de imágenes con resonancia magnética, al Laboratorio de Espectroscopia de Masas del Centro de Química del

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas y a la MSc Ana Angarita por permitirnos realizar el análisis de las muestras en estudio.

6. REFERENCIAS

- [1]. Gouk SS, Lim TM, Teoh SH, Sun WQ. "Alterations of Human Acellular Tissue Matrix by Gamma Irradiation: Histology, Biomechanical Property, Stability, in vitro Cell Repopulation, and Remodeling", *J. Biomed. Mater. Res. B* 2008; 84B(1):205-217.
- [2]. Cheung DT, Perelman N, Tong D, Nimni ME. "The Effect of γ -Irradiation on Collagen Molecules, Isolated α -chains, and Crosslinked Native Fibers", *J. Biomed. Mater. Res.* 1990; 24(5):581-589.
- [3]. Jiang B, Wu Z, Zhao H, Tang FJL, Wei Q, Zhang X. "Electron Beam Irradiation Modification of Collagen Membrane", *Biomaterials* 2006; 27(1):15-23.
- [4]. Zhang X, Xu L, Huang X, Wei S, Zhai M. "Structural Study and Preliminary Biological Evaluation on the Collagen Hydrogel Crosslinked by γ -Irradiation", *J. Biomed. Mater. Res. A* 2012; 100A(11):2960-2969.
- [5]. Vieira FF, Del Mastro NL. "Comparison of γ -Radiation and Electron Beam Irradiation Effects on Gelatin", *Radiat. Phys. Chem.* 2002; 63(3-6):331-332.
- [6]. Grant RA, Cox RW, Kent CM. "The Effects of Irradiation with High Energy Electrons on the Structure and Reactivity of Native and Cross-linked Collagen Fibres", *J. Cell Sci.* 1970; 7:387-405.
- [7]. Grant RA, Cox RW, Kent CM. "The Effects of Gamma Irradiation on the Structure and Reactivity of Native and Cross-linked Collagen Fibres", *J. Anat* 1973; 115(1):29-43.
- [8]. Bowes JH, Moss JA. "The Effect of Gamma Radiation on Collagen", *Radiat. Res.* 1962; 16:211-223.
- [9]. Cooper DR, Russell AE. "The Decomposition of Soluble Collagen by γ -Irradiation", *Biochem. J.* 1969; 113:263-269.
- [10]. Leontiou I, Matthopoulos DP, Tzaphlidou M, Glaros D. "The Effect of Gamma Irradiation on Collagen Fibril Structure", *Micron* 1993; 24(1):13-16.
- [11]. Veis A. *The Macromolecular Chemistry of Gelatin*. Waltham (Massachusetts, Estados Unidos): Academic Press Inc., 1964.
- [12]. Ohan MP, Dunn MG. "Glucose Stabilizes Collagen Sterilized with Gamma Irradiation", *J. Biomed. Mater. Res. A* 2003; 67A(4):1188-1195.
- [13]. Seto A, Gatt CJ, Dunn MG. "Radioprotection of Tendon Tissue via Cross-linking and Free Radical Scavenging", *Clin. Orthop. Relat. R.* 2008; 466(8):1788-1795.
- [14]. Back JF, Oakenfull D, Smith MB. "Increased Thermal Stability of Proteins in the Presence of Sugars and Polyols", *Biochemistry* 1979; 18:5191-5196.
- [15]. Masutani EM, Kinoshita CK, Tanaka TT, Ellison AKD, Yoza BA. "Increasing Thermal Stability of Gelatin by UV-Induced Cross-Linking with Glucose", *Int. J. of Biomat.* 2014[On-Line]; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/979636>.
- [16]. Kaushik JK, Bhat R. "Thermal Stability of Proteins in Aqueous Polyol Solutions: Role of the Surface Tension of Water in the Stabilizing Effect of Polyols", *J. Phys. Chem. B* 1998; 102:7058-7066.
- [17]. Naftalin RJ, Symons MC. "The Mechanism of Sugar-dependent Stabilization of Gelatin Gels", *Biochim. Biophys. Acta* 1974; 30:352 (1):173-178.
- [18]. Oakenfull D, Alan S. "Hydrophobic Interaction in the Gelatin of High Methoxyl Pectins", *Journal of Food Science* 1984; 49(4):1093-1098.
- [19]. Doublier JL, Garnier C, Renarda D, Sanchez C. "Protein-polysaccharide Interactions", *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2000; 5:202-214.
- [20]. Davidson RJ, Cooper DR. "The Effect of γ -Irradiation on Soluble Collagen", *Biochem. J.* 1968; 107:29.
- [21]. Stejskal, E.O.; Tanner, J. E.; Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *The Journal of Chemical Physics* 42 (1): 288. 1965
- [22]. Zhang X, Zhang Y, Chen W, Xu L, Wei S, Zheng Y, Z Maolin. "Biological Behavior of Fibroblast on Contractile Collagen Hydrogel Crosslinked by γ -Irradiation", *J. Biomed. Mater. Res. A* 2014; 102A(8):2669-2679.