



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**PREPARACION, PROPIEDADES Y PROPUESTAS DE USO BIOMEDICO
DEL COPOLIMERO DE INJERTO PVC-g-PEGMA MODIFICADO
CON ESTREPTOQUINASA**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

I.Q. EVER ARENAS BERUMEN

TUTOR: Dr. Emilio Bucio Carrillo



AÑO: 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Padre e Hijo por estar siempre guiando mi camino.

A mi Tutor el Dr. Emilio Bucio Carrillo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido en forma de beca durante mis estudios de doctorado así como por medio del programa de Apoyos Integrales para la Formación de Doctores en Ciencias.

A mis amigos y compañeros del Instituto de Ciencias Nucleares por su apoyo y sus conocimientos.

Al Dr. Epifanio Cruz Zaragoza y al Fis. Francisco García Flores del Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM por su colaboración en la irradiación de las matrices poliméricas empleadas en este trabajo.

Al los técnicos administrativos Q.F.B. Claudia Consuelo Camargo y al Sr. Saúl Trujillo Arias por su ayuda en el laboratorio.

A los doctores José Fausto Rivero Cruz, Ernesto Rivera García, Juan Manuel Navarrete Tejero, Alejandro Alagón Cano y Flora Adriana Ganem Rondero y por sus valiosas correcciones a la presente tesis.

Al Dr. Ashok Mulchandani de la Universidad de California, Riverside por su apoyo en el acoplamiento de la proteína a la matriz polimérica.

Al personal administrativo del Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo recibido durante mi estancia en el programa en Ciencias Químicas.

Al personal de la Secretaría de Servicios Escolares por su apoyo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de realizar un doctorado del más alto nivel al servicio de nuestro país.

A Alejandra Ortega Aramburú por la realización de diversos trámites y observaciones a mi tesis.

A Luz del Carmen Murcio Mansilla por el apoyo prestado.

DEDICATORIA

A MI FAMILIA POR SU APOYO, COMPRENSIÓN Y RESIGNACIÓN ANTE LAS HORAS ROBADAS.

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de macromoléculas del Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM y en el Departamento de Ingeniería Química y Medioambiental, M & R Bourns College of Engineering, Riverside, CA.

ABREVIATURAS	X
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	15
CAPÍTULO 3. GENERALIDADES	17
3.1. BIOMATERIALES	18
3.1.1. BIOCMPATIBILIDAD	18
3.2. FACTORES QUE INDUCEN UNA RESPUESTA POR PARTE DE LA SANGRE Y LOS TEJIDOS EN UN BIOMATERAL	19
3.2.1. RESPUESTA QUÍMICA	20
3.2.2. RESPUESTA FÍSICA	21
3.2.3. RESPUESTA MEDIOAMBIENTAL	22
3.2.4. INTERACCIÓN DE LOS MATERIALES CON LA SANGRE Y COMPONENTES TISULARES	22
3.2.4.1. INTERACCIÓN CON EL PLASMA DE PROTEÍNA	22
3.2.4.2. INTERACCIÓN CON LOS ELEMENTOS CELULARES	23
3.2.4.2.1. PLAQUETAS	23
3.2.4.2.2. ERITROCITOS Y LEUCOCITOS	24
3.2.4.3. LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES	24
3.2.4.4. LA FUNCIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS ADHESIVAS: FIBRONECTINAS	25
3.2.5. PLASMINÓGENO	27
3.2.6. PLASMINÓGENO HUMANO	28
3.2.7. PLASMINA	29
3.2.8. ACTIVADORES PLASMINÓGENOS	29
3.2.8.1. t-PA	30
3.2.8.2. ESTREPTOCINASA	30

3.2.9. CINÉTICA ENZIMÁTICA	32
3.2.10. MODELO CINÉTICO DE MICHAELIS-MENTEN	35
3.2.11. SIGNIFICADO DE K_m	36
3.3. MODIFICACIÓN DE SUPERFICIES POLIMERICAS	36
3.3.1. INJERTO POR RADIACIÓN	37
3.4. PROCESOS DE RADIACIÓN	37
3.4.1. RADIACIONES IONIZANTES	37
3.4.2. IONIZACIÓN DIRECTA E INDIRECTA	
3.4.3. INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN	38
ELECTROMAGNÉTICA CON LA MATERIA	38
3.4.3.1. EFECTO FOTOELÉCTRICO	39
3.4.3.2. EFECTO COMPTON	39
3.4.3.3. PRODUCCIÓN DE PARES	40
3.4.4. COEFICIENTE DE ABSORCIÓN DE RAYOS GAMMA	41
3.5. FUENTES DE RADIACIÓN	41
3.5.1. RAYOS ALFA	41
3.5.2. RAYOS BETA	42
3.5.3. RAYOS GAMMA	42
3.6. EFECTOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN POLÍMEROS	43
3.6.1. ENTRECruzAMIENTO DE POLÍMEROS	43
3.6.2. DEGRADACIÓN DE POLÍMEROS	44
3.6.3. INJERTOS	44
3.6.3.1. IRRADIACIÓN DIRECTA	
3.6.3.2. IRRADIACIÓN DIRECTA EN PRESENCIA	44
DE VAPOR	45
3.6.3.3. PREIRRADIACIÓN OXIDATIVA	45
3.6.3.4. PREIRRADIACIÓN AL VACÍO	46
CAPÍTULO 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	47
4.1. MATERIALES	

4.1.1. MATERIALES PARA LA FORMACIÓN DEL COPOLÍMERO DE INJERTO	47
4.1.2. MATERIALES PARA LA CONJUGACIÓN	47
4.1.3. MATERIALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD	48
4.2. INSTALACIONES Y EQUIPOS	49
4.2.1. GAMMA BEAM	50
4.2.2. FTIR-ATR	50
4.2.3. TGA	50
4.2.4. DSC	51
4.2.5. ESPECTROFOTÓMETRO UV/VISIBLE	51
4.2.6. MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA (AFM)	51
4.2.7. MICROSCOPIO FLUORESCENTE	51
4.3. METODOLOGÍA	
4.3.1. INJERTADO DEL PEGMA SOBRE PVC (COPOLÍMERO DE INJERTO)	52
4.3.2. INMOVILIZACIÓN DE LA PROTEINA	55
4.3.3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ANTES Y DESPUÉS DE LA BIOCONJUGACIÓN	56
4.3.4. DETERMINACIÓN DE LA ENZIMA INMOVILIZADA POR EL MÉTODO DE BRADFORD	57
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
5.1. CINÉTICA DE INJERTO	60
5.1.1. ESQUEMA DE REACCIÓN DEL INJERTO	61
5.1.2. INJERTO OBTENIDO VARIANDO EL TIEMPO DE REACCIÓN	62
5.1.3. INJERTO OBTENIDO VARIANDO LA DOSIS DE EXPOSICIÓN	62
5.1.4. INJERTO OBTENIDO A DOS TEMPERATURAS:	63

50 °C y 60 °C	
5.1.5. INJERTO OBTENIDO A DOS CONCENTRACIONES: 0.3 M Y 0.5 M	63
5.1.6. INJERTO OBTENIDO A DOS INTENSIDADES: 1.3 kGy/h Y 2.7 kGy/h	65 66
5.1.7. ESPECTRO DE INFRARROJO	67
5.1.8. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO TGA Y DSC	69
5.1.9. MICROSCOPIO FLUORESCENTE (FM)	
5.1.10. EFECTO DEL PORCENTAJE DE INJERTO CON LA INMOVILIZACIÓN DE LA ESTREPTOCINASA	70
5.1.11. k_m y V_{max} DE LA ESTREPTOCINASA LIBRE E INMOVILIZADA	72 72
5.1.12. MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA (AFM)	72
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	75
CAPÍTULO 7. PROPUESTAS DE USO BIOMÉDICO	77
BIBLIOGRAFÍA	79
GLOSARIO	85
ANEXOS	92

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

Desde sus orígenes, los seres humanos han empleado materiales, provenientes del medio ambiente que los rodea, para fabricar toda clase de herramientas y dispositivos. Las materias primas empleadas fueron partes de animales, plantas, rocas y en general toda clase de compuestos orgánicos e inorgánicos. Por otro lado, el hombre ha ido descubriendo la manera de combinar estos materiales que podemos llamar elementales para originar nuevos materiales de ellos, tal es el caso del bronce a partir del cobre y estaño.

Conforme fue avanzando la humanidad a través del tiempo se desarrollaron nuevos materiales tales como aleaciones, cerámicas y polímeros químicamente modificados gracias al desarrollo de una importante rama de la ciencia llamada ciencia de materiales (1). Gracias a esta ciencia se ha logrado investigar a una familia de materiales que rápidamente ha ganado un status importante por la posibilidad de sus aplicaciones y son los materiales poliméricos conocidos desde hace aproximadamente noventa años. Aunque hay detalles ignorados en cuanto a la estructura de este tipo de compuestos, esto no ha impedido su utilización desde hace varios años.

Ahora prácticamente todos los sectores de la actividad humana se benefician mediante el uso de este tipo de materiales a menudo sustituyendo materiales naturales como la madera, celulosa, piel, lana, etc.

Por otro lado la química orgánica es fuente de una gran cantidad de compuestos entre los cuales podemos mencionar al de los monómeros los cuales son las unidades de construcción en la preparación de polímeros. Los polímeros son de naturaleza tan diversa que estamos ante una gran cantidad de posibilidades, que nos permiten tomar tal o cual material para satisfacer una necesidad determinada.

El sector biomédico es una de las áreas que ha mostrado particular interés por la ciencia de polímeros debido a que requiere cada vez más de

estructuras complejas en un intento por satisfacer los requerimientos de una multitud de aplicaciones. El enfoque empleado debe tener en cuenta las complejas estructuras biológicas que están a su vez lejos de ser entendidas dada la gran complejidad con que han sido diseñadas por la naturaleza.

El concepto de biomaterial fue introducido después de la Segunda Guerra Mundial y por supuesto que los polímeros fueron inmediatamente empleados como biomateriales. Hoy en día, el uso de polímeros es prácticamente una necesidad en cirugía, prótesis, y en farmacología para la formulación de drogas y liberación controlada de fármacos. Por tanto, el sector de los biomateriales es muy importante desde el punto de vista socioeconómico. Muchos materiales poliméricos se encuentran en el rango de biomateriales (2).

Su explotación en el campo de los biomateriales resulta, en la mayoría de los casos, de la simple adaptación a los requerimientos terapéuticos y no de un desarrollo muy específico. Por ejemplo, no hay diferencia fundamental entre las fibras textiles y las biomédicas usadas en cirugía vascular, por lo menos desde el punto de vista de ciencia de polímeros.

En nuestros días, las innovaciones en el campo de los biopolímeros han permitido crear materiales altamente específicos, si bien aún son usados los polímeros clásicos. También, son necesarios nuevos compuestos adaptados a aplicaciones muy específicas y/o limitados en tiempo (prótesis temporal), regeneración tisular asistida, ingeniería tisular, sistemas de liberación de drogas, transfección de genes, etc.

Desde el punto de vista del progreso, la investigación debe ser preferentemente orientada hacia el desarrollo de materiales sofisticados, polímeros y dispositivos plásticos desarrollados específicamente para interactuar más cercanamente con las células, tejidos y órganos, evitando muchos de los problemas actuales.

Uno de dichos problemas es el que se presenta cuando un material, extraño al cuerpo, está en contacto con la sangre y los tejidos. Cuando lo anterior sucede el primer paso es la activación de la hemostasis (3). El primer paso del proceso anterior es la absorción de las proteínas de la sangre, seguida por una adhesión de plaquetas y su activación. La activación de las plaquetas puede originarse por una variedad de agentes, como el colágeno (que es parte del tejido conectivo subendotelial), proteínas del plasma sanguíneo y productos del metabolismo de las plaquetas (por ejemplo ADP, tromboxano A₂) (4). El resultado final es una masa (coágulo) que rodea al cuerpo extraño compuesta de células de la sangre y fibrina. Esta masa afecta el desempeño mecánico del material además de que puede desprender coágulos más pequeños, producto del flujo sanguíneo y del estrés mecánico, pudiendo originar con eso afecciones como embolismo pulmonar, trombosis profunda de venas, infarto agudo al miocardio, etc. (5). Las patologías anteriores, y en general todas aquellas que involucran una falla de la hemostasis y el desarrollo de coágulos requiere de intervención clínica y la administración de agentes trombolíticos (6). Uno de tales agentes trombolíticos es la estreptocinasa, la cual es una proteína exocelular producida por varias cepas de estreptococos beta hemolítico (5) y su función es la conversión específica del plasminógeno en plasmina (7). La estreptocinasa es un activador plasminógeno y disuelve los coágulos de sangre así como las porciones fibrinosas de los exudados (8).

En el presente trabajo se logra sintetizar y caracterizar un nuevo material formado por el acoplamiento de la enzima estreptocinasa al copolímero de injerto PVC-g-PEGMA.

CAPÍTULO II OBJETIVOS

La presente tesis tiene como objetivo general la formación de un nuevo material polimérico que permita el acoplamiento de la enzima estreptocinasa. Como primera parte se va a modificar superficialmente el cloruro de polivinilo (PVC) con polietilenglicometacrilato (PEGMA) para obtener el copolímero de injerto PVC-g-PEGMA. En la segunda parte se acoplará la enzima estreptocinasa (SK) dando como resultado final el sistema (PVC-g-PEGMA)-SK. Se empleará radiación ionizante por el método de modificación superficial, empleando la técnica de preirradiación oxidativa.

En la consecución del objetivo general se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Encontrar las condiciones óptimas de preparación del sistema (PVC-g-PEGMA)-SK (aquellas que no modifiquen ni la transparencia ni la flexibilidad de la matriz), por medio del estudio de los siguientes parámetros:
 - a. Dosis
 - b. Intensidad de dosis
 - c. Concentración
 - d. Temperatura y
 - e. Tiempo de reacción

- Caracterizar el compuesto por las técnicas:
 - a. Espectroscopía de infrarrojo (FTIR-ATR)
 - b. Análisis Termogravimétrico (TGA)
 - c. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)
 - d. Ultravioleta (UV) y
 - e. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

CAPÍTULO III GENERALIDADES

3.1. BIOMATERIALES

Un biomaterial puede definirse como un material que será usado en el tratamiento de pacientes y en los cuales dicho material se encontrará de alguna manera en contacto con su sangre y tejidos creando una interfase por una cantidad de tiempo considerable. En tales circunstancias la interacción entre la sangre, tejido y material será un factor importante durante el tratamiento.

La definición abarca todos aquellos materiales constituidos de metal, plásticos, cerámica o tejidos naturales, tejidos ricos en colágeno, y que están en contacto con otros tejidos distintos de la epidermis. Los materiales usados en dispositivos totalmente incorporados al cuerpo constituyen la categoría más obvia de biomateriales. Aparte, existen aquellos materiales usados en odontología. Similarmente, ciertos dispositivos anticonceptivos se colocan dentro del útero mientras que otro tipo de dispositivos son los lentes colocados sobre la córnea. Muchos tipos de dispositivos penetran la piel y residen tanto en la parte interna como externa del cuerpo. Otros materiales se usan extracorporalmente en su totalidad y ayudan en equipos como oxigenadores y hemodiálisis (9).

3.1.1. BIOCOMPATIBILIDAD

Es el término usado para describir el estado de uso de un material cuando este existe dentro de un ambiente fisiológico. Existe por supuesto, una variedad de grados de interacción y esta definición puede interpretarse ampliamente para cualquier biomaterial.

Hay dos amplios aspectos de compatibilidad: (1) los efectos en el material y (2) los efectos en el tejido. Sin embargo, estos están muy interrelacionados porque a menudo un efecto adverso en el material como la liberación de una partícula o material soluble, debido al natural flujo de fluidos fisiológicos, puede ser la causa de una respuesta adversa del tejido que circunda el material. De esta forma la biocompatibilidad de materiales

metálicos es controlada por la interacción química, o más precisamente por la interacción electroquímica, que trae consigo la liberación de iones metálicos o, en algunos casos partículas insolubles dentro del tejido con la subsecuente toxicología implicada. De igual forma, la biocompatibilidad de los plásticos es controlada por los fluidos circundantes que extraen monómeros residuales, aditivos, y productos de degradación.

3.2. FACTORES QUE INDUCEN UNA RESPUESTA POR PARTE DE LA SANGRE Y LOS TEJIDOS EN UN BIOMATERIAL

Cuando un material se pone en contacto con la sangre, se disparan una serie de respuestas inmunológicas inclusive si el material es biocompatible y químicamente inerte. En la mayoría de los casos, una especie de cápsula se forma alrededor del implante, que aísla el cuerpo extraño de los alrededores del tejido. Si el material es compatible con la sangre, es compatible con el tejido.

Los materiales que se pretende que sean útiles para prótesis en sangre no deben:

- Causar trombosis
- Destruir elementos celulares de la sangre
- Alterar el plasma
- Destruir enzimas
- Causar una respuesta inmune adversa
- Inducir cáncer
- Iniciar reacciones tóxicas y alérgicas

Un tejido responde a una prótesis con inflamación y el proceso inflamatorio dependerá de factores que relacionan tanto a la prótesis como a su ambiente funcional. La extensión y progresión de este proceso es dictado por las propiedades químicas y físicas del material así como el ambiente que rodea el sitio del implante. Esencialmente, cualquier implante provocará una respuesta tisular que resultará finalmente en una

encapsulación fibrosa del material implantado, si bien es cierto la cantidad, distribución y tipo de fibra de colágeno que se forme puede variar. Los factores que influirán en la respuesta biológica son:

- A. Química
- B. Física
- C. Medio ambiental

3.2.1. RESPUESTA QUÍMICA

Como se mencionó anteriormente, tan pronto se pone en contacto un material externo con la sangre tienen lugar una serie de eventos químicos y bioquímicos (sistema hemostático) que dan origen a un coágulo de sangre (trombo). Un coágulo de sangre o trombo consiste de células de sangre ocluidas en una matriz de fibrina. La disolución mediada por enzimas de este coágulo de fibrina se conoce como trombólisis o fibrinólisis. La enzima responsable (mamíferos) de la fibrinólisis es la plasmina, una proteasa serina tipo tripsina (10). La actividad fibrinolítica de la plasmina proviene de la proteína inactiva plasminógeno que está presente en la circulación. La conversión del plasminógeno inactivo a plasmina fibrinolítica involucra una ruptura proteolítica parcial mediada por varios activadores plasminógeno (11). Dos activadores plasminógenos presentes en la sangre son el tipo tisular (tPA) y el tipo urocinasa (uPA).

La actividad fibrinolítica en la circulación es modulada por inhibidores de los activadores plasminógenos (inhibidor del activador plasminógeno 1, PAI-1, un inhibidor rápido de tPA y uPA) y plasmina (antiplasmina- α_1 , macroglobulina α_2) (12). La cascada de reacciones que se originan para la disolución de los coágulos de fibrina se ilustra en la fig. 1.

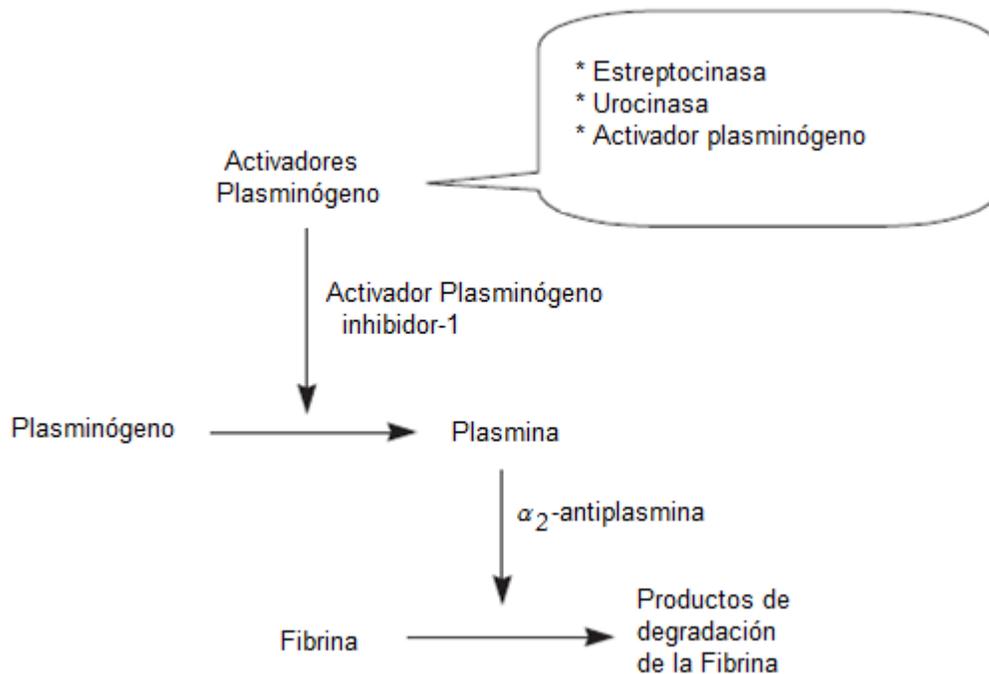


Figura 1. Representación esquemática de la fibrinólisis

3.2.2. RESPUESTA FÍSICA

La forma física del material usado para la construcción de un implante y aquella del implante en si mismo pueden afectar marcadamente la respuesta tisular del dispositivo en términos de la reacción inflamatoria y subsecuente fibrosis. Se ha demostrado que el diámetro de filamentos individuales así como estrías en superficie afectan dramáticamente el comportamiento de las células en términos de morfología y orientación (13). Las características de superficie fueron también importantes, y la orientación de las estrías con respecto a los ejes de la fibra tendió a influir la alineación de la célula sobre la superficie de la fibra.

Además, estas características de superficie pueden también influir en la respuesta del tejido. Las superficies rugosas evocan a una reacción más marcada que las superficies lisas (14). El tamaño de los poros en o entre las fibras influye de nuevo en la respuesta del tejido.

La preocupación sobre los posibles efectos cancerígenos de las prótesis implantadas ha aumentado desde que se observa una incidencia mayor de tumores relacionada con áreas grandes de material, mientras que cuando el material fue implantado en forma de fibras casi no se observó la incidencia de tumores.

3.2.3. RESPUESTA MEDIOAMBIENTAL

El remplazo de cualquier parte del cuerpo con un implante originará una respuesta que va a depender del sitio del que se trate, asumiendo que se usa el mismo material. Dependiendo de la ubicación del implante, la respuesta de los tejidos ante el mismo será una función de la cantidad de esfuerzo mecánico aplicado, movimiento del implante, tipo de tejido y la geometría propia del implante.

3.2.4. INTERACCIÓN DE LOS MATERIALES CON LA SANGRE Y COMPONENTES TISULARES

3.2.4.1. INTERACCIÓN CON EL PLASMA DE PROTEÍNA

Cuando superficies extrañas están en contacto con el plasma o con la sangre, la evidencia indica que la mayoría de ellos son recubiertos con proteínas a los pocos segundos de su contacto inicial. Este proceso de adsorción inicial activa el factor XII de Hageman (15) y puede traer cambios en las plaquetas, las cuales pueden disparar el mecanismo de coagulación de la sangre. La naturaleza de esta adsorción inicial está influenciada por una combinación de factores, incluyendo lo liso de la misma, carga iónica, hidrofobicidad, estructura química, elasticidad y flujo de sangre. Sin embargo, ninguno de estos factores por sí solo puede explicar porque un material es mejor que otro cuando están en contacto con la sangre (15).

Si bien es cierto que superficies con grupos con carga negativa parecen ser más resistentes a la formación de trombos respecto de las superficies que exhiben carga positiva hay muchas excepciones (16). Es obvio por consiguiente que la carga iónica por sí misma no puede explicar el problema con la compatibilidad con la sangre. Se ha sugerido que la adsorción del factor XII puede ser relacionado a espacios negativamente cargados rígidamente espaciados en la superficie (17). Tales cargas negativas rígidamente espaciadas pueden entonces inducir cambios conformacionales en el factor XII de Hageman (15) con la esperada iniciación en la secuencia de reacción de la coagulación de la sangre.

3.2.4.2. INTERACCIÓN CON LOS ELEMENTOS CELULARES

3.2.4.2.1. PLAQUETAS

Es bien conocido que las plaquetas se adhieren a los sitios dañados de los vasos sanguíneos como resultado de la exposición a la capa de colágeno nativa en las paredes de los vasos (18). Como resultado de esta interacción, las plaquetas liberan adenosín difosfato (ADP), que causa que las plaquetas se adhieran unas a otras.

Las cargas iónicas rígidamente espaciadas (tanto positivas como negativas) pueden estar involucradas no solamente en la activación del factor XII mencionado anteriormente sino también en la agregación plaquetaria (17).

La interacción de las plaquetas con el colágeno es de gran interés por ser el colágeno el mayor componente de los vasos sanguíneos. Se ha mostrado (19) que la liberación de gránulos que contienen nucleótidos de adenina proceden simultáneamente cuando las plaquetas se exponen al colágeno o al ADP, y que no se observa liberación alguna durante el periodo siguiente a la exposición de colágeno o durante la agregación, que es estimulada por pequeñas cantidades de ADP. El periodo de la agregación de plaquetas seguido de la estimulación por

colágeno ocurre sólo si el colágeno está en la forma de tropocolágeno y se asocian con el tiempo necesario por el colágeno para formar fibrillas.

Por consiguiente la reacción primaria consiste de una adhesión de plaquetas estimulada por colágeno fibroso, mientras que una reacción secundaria es la agregación y la liberación. Este punto de vista se basa en el hecho de que la agregación de plaquetas comienza simultáneamente y procede en fase con la liberación de adenosín trifosfato (ATP) (19).

3.2.4.2.2. ERITROCITOS Y LEUCOCITOS

Los eritrocitos constituyen alrededor del 45% del volumen de la célula en plasma. Los eritrocitos pueden dañarse por el estrés reológico y de la interacción con superficies. La hemólisis puede depender del área superficial, la estructura química, la adhesión de materia sintética, parámetros del flujo sanguíneo, alteración en el mecanismo de coagulación y otros factores aún no conocidos (20).

Se ha observado que también ocurre daño en las células blancas como resultado de la exposición a superficies extrañas y estrés reológico (21). Esto incluye cambios morfológicos en las células blancas, utilización alterada del oxígeno y un desbalance en la actividad fagocítica. Consecuentemente la habilidad de estas células para combatir infecciones y su participación en el proceso inflamatorio de tejidos pueden verse afectadas.

3.2.4.3. LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES

Las dos mayores funciones de las células endoteliales son el control de la permeabilidad de las paredes de los vasos sanguíneos y proveer una superficie compatible con la sangre. Entre las numerosas propiedades funcionales de las células endoteliales están la liberación de mucopolisacáridos sulfonados (22), síntesis de colágeno (23), así como la producción de un inhibidor fibrolítico (24). La habilidad de las células

endoteliales para degradar el ATP y el ADP es importante en el mantenimiento de la trombo-resistencia.

3.2.4.4. LA FUNCIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS ADHESIVAS: FIBRONECTINAS

Un grupo de glicoproteínas de alto peso molecular o fibronectinas (FN) (25) se encuentra en la superficie de las células, tejido conectivo y plasma, aparentemente juegan papeles importantes en la adhesión celular, hemostasis, funcionamiento del sistema reticuloendotelial (26). La fibronectina de la superficie celular forma estructuras fibrilares en muchas células cultivadas, extendiéndose no solamente entre las células sino también entre las células y el tejido (27). La fibronectina del plasma es una glicoproteína dimérica compuesta de subunidades de polipéptidos.

Existen pequeñas diferencias estructurales entre fibronectinas aisladas de las superficies de células cultivadas y del plasma. Las fibronectinas se unen directamente a las células rojas y está involucrada en la unión o disociación de células al colágeno. La fibronectina puede también participar en la remoción de material colaginoso de la sangre por los macrófagos del sistema retículo endotelial cuando ocurre un daño a las paredes vasculares (26).

3.2.5. PLASMINÓGENO

La coagulación de la sangre es un evento enzimático complejo que culmina en la formación de un coágulo insoluble de proteínas llamada fibrina. Junto con las plaquetas la fibrina forma una unión hemostática para prevenir el exceso de sangrado. Estos coágulos de fibrina son finalmente disueltos en su momento con el fin de restaurar la permeabilidad vascular. Las enzimas involucradas en este importante proceso fisiológico son parte del sistema fibrinolítico (Figura 2) (28).

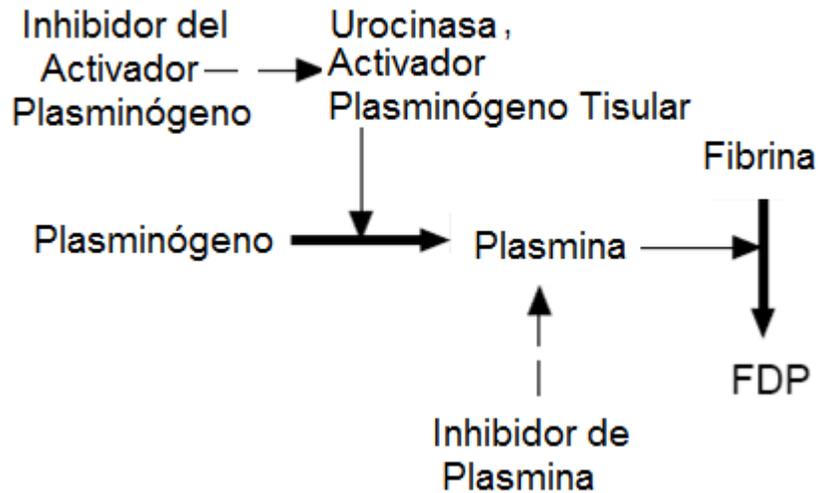


Figura 2. El sistema fibrinolítico

El componente central en el sistema fibrinolítico es la glicoproteína plasminógeno, que es producida por el hígado y está presente en el plasma y en la mayoría de los fluidos extravasculares. El plasminógeno es un precursor enzimático (zimógeno) que, mediante rupturas parciales mediadas por un activador plasminógeno se convierte a su forma activa y proteolítica, plasmina. Su objetivo principal es la fibrina, pero también puede degradar varios constituyentes de la matriz extracelular y convertir un número de pro-hormonas y precursores citoquinas a su forma activa.

La generación de plasmina ocurre preferentemente en la superficie de la fibrina, misma que ofrece sitios de enlace para el plasminógeno y su principal activador en sangre, el activador plasminógeno tipo tisular (t-PA).

Mediante este enlace se estimula la activación del plasminógeno al mismo tiempo que localiza la acción de la plasmina en los sitios de formación de fibrina, lo que promueve una disolución eficiente de coágulos.

Posteriormente, se da una regulación subsecuente por la presencia en plasma de inhibidores, primeramente el inhibidor plasmina y el inhibidor del activador plasminógeno 1 (PAI-1).

La función importante del plasminógeno en la fibrinólisis lo convierte en un parámetro interesante a evaluar en varias enfermedades. Una disminución en el nivel del plasminógeno puede en ciertos casos, comprometer la habilidad del cuerpo para degradar la fibrina y así predisponer a una trombosis.

3.2.6. PLASMINÓGENO HUMANO

El plasminógeno humano es una cadena de glicoproteína que contiene 791 residuos aminoácidos y 2% de carbohidratos. Su masa molecular es de aproximadamente 92 kilodaltons (kDa). La molécula de plasminógeno contiene un total de seis dominios estructurales, cada uno con diferentes propiedades (29, 30). La parte N-terminal de la molécula consiste de 5 dominios kringle con la capacidad de enlazarse a la fibrina.

El dominio kringle fue primeramente descrito por Magnussen y colaboradores (1975) quienes compararon la estructura con una pasta danesa. Junto con la preactivación del péptido, los kringles controlan la habilidad del plasminógeno a adoptar diferentes conformaciones. El dominio proteasa se asemeja a aquellas otras proteasas serinas y contiene el sitio activo His⁶⁰³, Asp⁶⁴⁶ y Ser⁷⁴¹. Esta región también contiene Ala⁶⁰¹ que parece ser esencial para la función normal del plasminógeno ya que una mutación en Thr⁶⁰¹ permite un incremento en el riesgo de trombosis (31).

Se conocen muchas formas de plasminógeno en plasma y pueden separarse por cromatografía de afinidad (32). La forma nativa del plasminógeno en plasma tiene ácido glutámico en la terminal-N y se denomina Glu-plasminógeno. Otras formas, que contienen mayormente lisina en la posición N-terminal, se denominan Lis-plasminógeno.

El Glu-plasminógeno existe en una conformación cerrada que se extiende cuando se une a los residuos de lisina sobre una superficie de fibrina. Se piensa que un cambio conformacional similar tiene lugar cuando

Glu-plasminogeno se convierte a lis-plasminógeno. El papel fisiológico de estos cambios conformacionales no está del todo bien entendido, aunque se cree que el efecto general es un aumento en la velocidad de activación del plasminógeno catalizado por el t-PA (33, 34). Se observa el efecto opuesto en la presencia de aniones, en particular con el ión cloruro (Cl^-), que estabiliza la forma cerrada del Glu-plasminógeno, lo que provoca que el plasminógeno sea pobremente activable (35).

3.2.7. PLASMINA

La activación del plasminógeno por sus activadores naturales, t-PA y u-PA (activador plasminógeno urocinasa), involucra la ruptura de un enlace en un sitio específico en la molécula del plasminógeno, que da lugar a una molécula de dos cadenas unidas por dos enlaces disulfuro.

La plasmina formada puede degradar la fibrina (fibrinógeno) en una variedad de formas dando lugar a fibrina soluble, productos de degradación o fragmentos llamados X, Y, D y E. La plasmina es una proteasa relativamente no específica y puede degradar no solamente a la fibrina sino también muchas proteínas en plasma y espacios extracelulares, como a los factores de coagulación V, VIII y de von Willebrand.

La actividad de la plasmina es inhabilitada principalmente por la unión química con el inhibidor de plasmina, con el que forma un complejo estable careciendo de actividad proteolítica.

3.2.8. ACTIVADORES PLASMINÓGENOS

Los activadores plasminógenos (36, 37) pueden dividirse en dos grupos: activadores endógenos (t-PA y u-PA), presentes en la sangre y otros fluidos corporales y activadores exógenos (estreptocinasa). Los activadores plasminógenos se usan clínicamente como agentes disolventes de coágulos (trombolíticos) para el tratamiento del embolismo pulmonar e infarto agudo al miocardio.

3.2.8.1. t-PA

El activador plasminógeno tipo tisular (t-PA) es el principal activador endógeno del plasminógeno en sangre. Es producido por las células endoteliales vasculares y es secretado continuamente dentro del plasma o por una liberación aguda resultado de la estimulación de ciertos receptores de las células endoteliales. Se pueden observar fluctuaciones rápidas en cuanto a la concentración de t-PA cuando se hace ejercicio así como oclusión venosa (38).

Es una glicoproteína de 68 kDa que consiste de 530 aminoácidos y contiene de 7-13% de carbohidratos. En plasma humano, se encuentra principalmente como complejo con su principal inhibidor PAI-1. El nivel de t-PA antígeno es de alrededor de 5 µg/ml, mientras que la concentración del t-PA libre es únicamente de alrededor de 1 µg/l o 0.5 U/ml (la actividad específica va de 500,000 a 700,000 U/mg). La molécula de t-PA es convertida por la plasmina a una molécula de dos cadenas. Una de ellas es un polipéptido de 38kDa que tiene sitios responsables de la regulación enzimática; la otra de 31 kDa contiene sitios activos, similares a los de las otras proteasas serinas. Una importante característica del t-PA es que su actividad catalítica es ve muy estimulada cuando la enzima se une químicamente a ciertos compuestos tales como la fibrina, fragmentos de fibrinógeno, polilisina, heparina o proteínas desnaturalizadas (36).

3.2.8.2. ESTREPTOCINASA

La estreptocinasa es un activador plasminógeno exógeno de 47 kDa, producido por bacterias estreptococos del grupo hemolítico beta ya que funciona formando un complejo estequiométrico 1:1 con el plasminógeno humano (38). Este complejo además de disolver redes de fibrina puede funcionar como un activador de otros plasminógenos. La formación del complejo está acompañada por un cambio conformacional en la molécula de plasminógeno, exponiendo el sitio activo para activar

una segunda molécula de plasminógeno, seguida de por la conversión de SK-plasminógeno en un complejo SK-plasmina. Ambos tipos de SK-complejo son igualmente eficientes como activadores de plasminógeno (Figura 3).

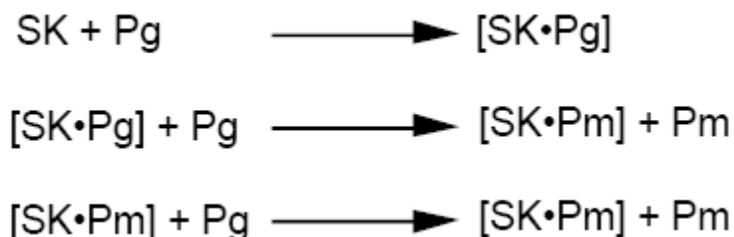


Figura 3. Secuencia de reacciones de estreptocinasa (SK), plasminógeno humano (Pg) y plasmina (Pm) (39)

3.2.9. CINÉTICA ENZIMÁTICA

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima. La velocidad de una reacción catalizada por un enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos no es necesario purificar o aislar la enzima. La medida se realiza en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc; y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima (V_{max}). La velocidad puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los sustratos.

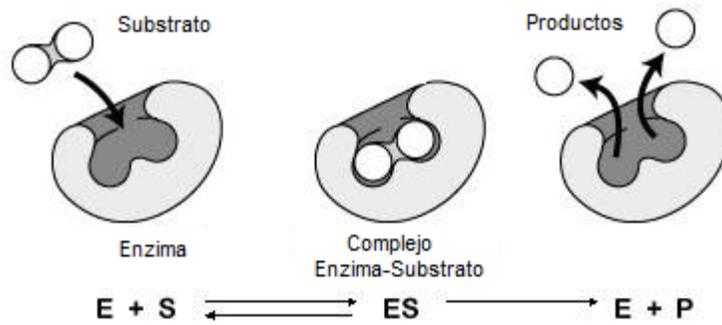


Figura 4. Secuencia de formación del complejo Enzima-Sustrato y posterior formación del producto

Al seguir la velocidad de aparición de producto (o de desaparición del sustrato) en función del tiempo se obtiene la llamada curva de avance de la reacción, o simplemente, la cinética de la reacción. A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción (Figura 4). Para evitar esta complicación se procede a medir la velocidad inicial de la reacción (v_0). La velocidad inicial de la reacción es igual a la pendiente de la curva de avance a tiempo cero.

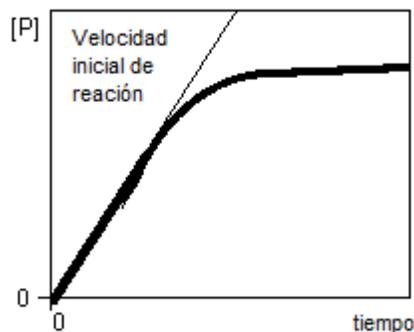


Figura 4. Curva de avance de la reacción o cinética de la reacción

De esta forma, la medida de v_0 se realiza antes de que se consuma el 10% del total del sustrato, de forma que pueda considerarse la $[S]$ como esencialmente constante a lo largo del experimento. Además, en estas condiciones no es necesario considerar la reacción inversa, ya que la cantidad de producto formada es tan pequeña que la reacción inversa

apenas ocurre. De esta forma, se simplifican enormemente las ecuaciones de velocidad.

Para estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción, manteniendo la cantidad de enzima constante. Si representamos v_0 frente a $[S]_0$ obtenemos una gráfica como la mostrada en la Figura 5.

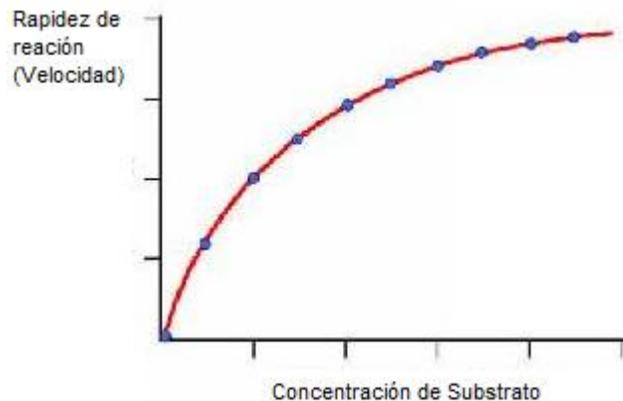


Figura 5. Efecto de la velocidad inicial de la reacción con la concentración de sustrato

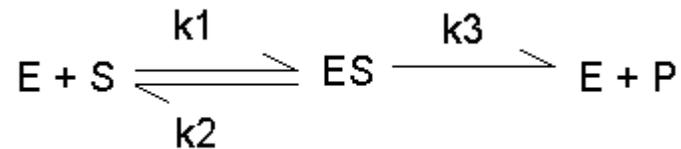
Cuando $[S]_0$ es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, la reacción es de primer orden. A altas $[S]_0$, el enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de $[S]_0$. En este punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima (V_{\max}).

3.2.10. MODELO CINÉTICO DE MICHAELIS-MENTEN

Los estudios sistemáticos del efecto de la concentración inicial del sustrato sobre la actividad enzimática comenzaron a realizarse a finales del siglo XIX. Ya en 1882 se introdujo el concepto del complejo enzima-sustrato como intermediario del proceso de catálisis enzimática. En 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten desarrollaron esta teoría y propusieron

una ecuación de velocidad que explica el comportamiento cinético de los enzimas.

Para explicar la relación observada entre la velocidad inicial (v_0) y la concentración inicial de sustrato ($[S]_0$) Michaelis y Menten propusieron que las reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren en dos etapas: En la primera etapa se forma el complejo enzima-sustrato y en la segunda, el complejo enzima-sustrato da lugar a la formación del producto, liberando el enzima libre:



En este esquema, k_1 , k_2 y k_3 son las constantes cinéticas individuales de cada proceso y también reciben el nombre de constantes microscópicas de velocidad. Según esto, podemos afirmar que:

$$\begin{aligned} v_1 &= k_1 [E] [S] \\ v_2 &= k_2 [ES] \\ v_3 &= k_3 [ES] \end{aligned}$$

Se puede distinguir entre enzima libre (E) y enzima unida al sustrato (ES), de forma que la concentración total de enzima, $[ET]$, (que es constante a lo largo de la reacción) es: $[ET] = [E] + [ES]$, como $[E] = [ET] - [ES]$, resulta que: $v_1 = k_1[S] [ET] - k_1 [S] [ES]$

Este modelo cinético adopta la hipótesis del estado estacionario, según la cual la concentración del complejo enzima-sustrato es pequeña y constante a lo largo de la reacción. Por tanto, la velocidad de formación del complejo enzima-sustrato (v_1) es igual a la de su disociación ($v_2 + v_3$):

$$v_1 = v_2 + v_3$$

Además, como [ES] es constante, la velocidad de formación de los productos es constante: $v = v_3 = k_3 [ES] = \text{constante}$. Como $v_1 = v_2 + v_3$, podemos decir que: $k_1[S] [ET] - k_1 [S] [ES] = k_2 [ES] + k_3 [ES]$

Despejando [ES], queda que:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{K_m + [S]}$$

Siendo

$$K_m = (k_2 + k_3) / k_1$$

K_m es la constante de Michaelis-Menten.

Por lo tanto, en el estado estacionario, la velocidad de formación del producto es:

$$v = v_3 = k_3 [ES] = \frac{k_3 [E_T] \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Para cualquier reacción enzimática, [ET], k_3 y K_m son constantes. Vamos a considerar dos casos extremos:

- A concentraciones de sustrato pequeñas ($[S] \ll K_m$) $v = (k_3 [ET]/K_m) [S]$. Como los términos entre paréntesis son constantes, pueden englobarse en una nueva constante, k_{obs} , de forma que la expresión queda reducida a: $v = k_{obs} [S]$, con lo cual la reacción es un proceso cinético de primer orden.

- A concentraciones de sustrato elevadas ($[S] \gg K_m$), $v = k_3 [ET]$. La velocidad de reacción es independiente de la concentración del sustrato, y por tanto, la reacción es un proceso cinético de orden cero.

Además, tanto k_3 como [ET] son constantes, y nos permite definir un nuevo parámetro, la velocidad máxima de la reacción (V_{max}): $V_{max} = k_3 [ET]$

[ET], que es la velocidad que se alcanzaría cuando toda la enzima disponible se encuentra unida al sustrato.

Si introducimos el parámetro V_{\max} en la ecuación general de la velocidad, la fórmula recuadrada anteriormente, obtenemos la expresión más conocida de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

3.2.11. Significado de K_M

La constante de Michaelis-Menten (K_M) es un parámetro cinético importante por múltiples razones:

- K_M es la concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. En efecto, si $K_M = [S]$, la ecuación de Michaelis-Menten se reduce a: $v = V_{\max}/2$.

- El valor de K_M da idea de la afinidad del enzima por el sustrato: A menor K_M , mayor afinidad del enzima por el sustrato, y a mayor K_M , menor afinidad. Este hecho tiene fácil explicación si tenemos en cuenta que K_M se define como (k_2+k_3/k_1) , donde las reacciones 2 y 3 destruyen el complejo ES, mientras que la reacción 1 lo forma. Así, si K_M es grande, el complejo ES es inestable pues predomina la tendencia a destruirlo (poca afinidad hacia el sustrato) y si K_M es pequeña el complejo ES es estable, ya que predomina la tendencia a formarlo (gran afinidad hacia el sustrato).

- La K_M del sustrato natural es menor que la de los sustratos análogos. Si dos sustratos del mismo enzima tienen distinta K_M , el que presente mayor K_M tiene menor afinidad por la enzima y la reacción transcurre siempre a menor velocidad que con el sustrato de menor K_M , salvo a concentraciones saturadas de sustrato, donde la $v = V_{\max}$.

- Los valores de K_M de muchas enzimas son próximos a los de la concentración fisiológica de sus sustratos, de forma que pequeñas

variaciones en la [S] pueden suponer grandes cambios en la velocidad de toda una ruta metabólica.

3.3. MODIFICACIÓN DE SUPERFICIES POLIMÉRICAS

La modificación de superficies poliméricas es una importante área de investigación. Se aprovechan las propiedades en masa de los polímeros y se mejoran cambiando sus características superficiales por la de otros materiales (metales, monómeros e incluso otros polímeros). Existe una gran variedad de métodos de entre las cuales destacamos el injerto por radiación.

3.3.1. INJERTO POR RADIACIÓN

Esta técnica consiste en hacer incidir sobre la superficie del polímero un haz de radiación ionizante en diversas condiciones. Las características resultantes dependerán del tipo de monómero empleado y el tipo de fuente de radiación. Las fuentes más comunes de radiación son electrones de alta energía, radiación gamma, luz ultravioleta y luz visible. El injertado es usualmente llevado a cabo mediante la irradiación directa del polímero en presencia de un monómero usualmente contenido en un solvente.

Alternativamente, el injerto puede ser logrado irradiando inicialmente el material en presencia de aire y posteriormente colocado en una solución que contenga al monómero en un baño de temperatura. La rama de la ciencia que se encarga de estudiar los efectos de la radiación ionizante en la materia se llama Química de Radiaciones.

3.4. PROCESOS DE RADIACIÓN

3.4.1. RADIACIONES IONIZANTES

Se define a las radiaciones ionizantes como aquellas que tienen suficiente energía como para convertir al menos un átomo neutro o

molécula en un par iónico (un componente con carga positiva y otro con carga negativa).

La energía que se deposita por causa de la radiación está bien localizada y tiene suficiente energía como para romper enlaces, mismos que se pueden reconfigurar después de un periodo de tiempo corto. Este es precisamente la base fisicoquímica del uso de las radiaciones ionizantes en la investigación y procesamiento industrial de los polímeros.

Además de este medio, existe otro por el cual las radiaciones depositan energía para crear un par de iones. También es posible la excitación en la cual un átomo o molécula es llevada a un nivel energético mayor lo suficiente como para liberar un electrón y formar un par iónico.

3.4.2. IONIZACIÓN DIRECTA E INDIRECTA

Las radiaciones ionizantes se dividen en dos grandes grupos. El primero consiste de partículas cargadas como electrones, protones, partículas alfa e iones pesados que tienen suficiente energía como para causar ionización por repulsión al colisionar con el material absorbente.

Tales radiaciones producen ionización directa. La ionización indirecta consiste de partículas no cargadas (radiación electromagnética y partículas neutras), y por consiguiente no hay repulsiones electrostáticas sino choques directos, los cuales pueden originar liberación de electrones secundarios o protones del núcleo (por retroceso) dando lugar a excitaciones e ionizaciones en el absorbedor (40).

3.4.3. INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA CON LA MATERIA

Hablaremos de la radiación electromagnética por ser la de interés en el presente trabajo. Los rayos gamma se emiten por el núcleo, cuando éste se encuentra en un estado de excitación y decae a un nivel energéticamente inferior. Es diferente de la emisión de rayos X, que tiene

lugar cuando ocurre una transición entre un estado excitado mayor del átomo a otro estado excitado inferior, por el cambio de un electrón a un nivel inferior. Al pasar de un nivel a otro con energías bien definidas, las radiaciones resultantes tienen una dimensión energética específica.

La manera en que interaccionan los rayos X y los rayos gamma con la materia es muy similar, difiriendo solamente en la cantidad de energía que disipan en el material al ser absorbidos; la mayor parte de la ionización causada por los rayos X o gamma resulta en ionización secundaria. Existen tres mecanismos de interacción de la radiación electromagnética con la materia son:

- a. Efecto Fotoeléctrico
- b. Efecto Compton
- c. Producción de Pares

3.4.3.1. EFECTO FOTOELÉCTRICO

Cuando un cuanto, de baja energía, interacciona con la materia es absorbido completamente. De la transferencia de energía total, un electrón, llamado fotoelectrón, es lanzado fuera del átomo desde su interior con una energía, cuyo valor es la diferencia entre la energía del cuanto original y la de amarre del electrón en el núcleo.

El fotoelectrón a su vez pierde energía, originando la producción de pares iónicos. Como queda una vacante orbital, ésta es ocupada por otro electrón proveniente de niveles energéticos mayores emitiéndose un rayo X con una energía específica igual a la diferencia entre las energías de amarre de los electrones a ambos niveles. Puede ocurrir que este rayo X, colisione con otro electrón del mismo átomo, lanzándolo fuera de éste; este fenómeno se conoce como emisión de electrones Auger.

3.4.3.2. EFECTO COMPTON

Si un rayo gamma tiene una mayor energía que en el caso previo, no es absorbido completamente al interactuar sino que su trayectoria es desviada con menor energía, mayor amplitud de onda y en consecuencia menor frecuencia.

El rayo dispersado puede sufrir varias colisiones, antes de ser absorbido por efecto fotoeléctrico.

3.4.3.3. PRODUCCIÓN DE PARES

Si el rayo gamma incidente es de al menos 1.02 MeV, al momento de ser absorbido por la materia entonces se puede transformar en masa y dar origen a 2 partículas beta, una con carga negativa y la otra con carga positiva. Si la energía del rayo gamma inicial es mayor que este valor, el exceso aparecerá como energía cinética del par formado. La partícula negativa (negatrón) a su vez causa ionización posterior y la partícula positiva (positrón) existe hasta que interacciona con otro electrón y se aniquilan, produciéndose ahora dos rayos gamma de 0.51 MeV cada uno, conocidos como radiación de aniquilación, por lo que este proceso puede ser considerado hasta cierto punto como el inverso de la producción de pares.

A grandes rasgos, podemos decir que el efecto fotoeléctrico predomina cuando interactúan rayos gamma con energías menores de 60 KeV cuando atraviesan Aluminio y menores de 600 KeV si plomo es el medio de absorción. El efecto Compton ocurre con más frecuencia en energías de rayos gamma entre 60 KeV y 1.5 MeV en aluminio y entre 600 KeV y 5 MeV en plomo. La producción de pares es el principal mecanismo de interacción para energías mayores al límite donde se produce principalmente el efecto Compton.

La emisión e interacción de las radiaciones con la materia están en relación muy estrecha. Frecuentemente en vez de emitir un rayo gamma, el núcleo interacciona con sus capas electrónicas externas y causa

la emisión de un electrón. Este proceso se llama conversión interna y los electrones son llamados electrones por conversión. Al mismo tiempo, puede tener lugar la emisión de rayos X cuando la vacante es ocupada por otro electrón de un nivel energético mayor, o en su lugar producirse la emisión de electrones Auger por un mecanismo igual a la conversión interna.

También pueden darse otros tipos de interacciones como el tipo de decaimiento conocido por captura electrónica, en el cual tiene lugar la emisión de rayos X o electrones Auger o la transición isomérica; cuando un núcleo en un estado excitado o metaestable decae a un estado base estable, puede realizarse la emisión de rayos gamma o electrones por conversión y de rayos X o electrones Auger (41).

3.4.4. COEFICIENTE DE ABSORCIÓN DE RAYOS GAMMA

Los rayos gamma son absorbidos según una ley exponencial caracterizada por un espesor medio y un coeficiente de absorción.

Se llama espesor medio o capa hemirreductora al espesor del material absorbente requerido para absorber la mitad de los rayos gamma incidentes. Mientras que el coeficiente de absorción es un factor que mide la disminución en cuanto a la intensidad de la radiación al atravesar la materia, por unidad de longitud del medio atravesado (llamado coeficiente de absorción lineal) o por unidad de masa (coeficiente de absorción másico).

Para propósitos de modificación superficial en polímeros, empleando rayos gamma, los coeficientes de absorción sólo tienen trascendencia si se trata con materiales de muy alto espesor y alta densidad así como fuentes de rayos gamma muy bajas, lo que no es el caso para el presente trabajo.

3.5. FUENTES DE RADIACIÓN

Las fuentes de radiación usadas pueden ser divididas en dos grupos, aquellas que emplean isótopos radiactivos naturales o artificiales y las que emplean algún tipo de acelerador de partículas.

En el primer grupo están las fuentes de radiación clásicas como el radio y el radón (naturales) o el Cobalto-60, Cesio-137 y el Estroncio-90 (artificiales). El segundo grupo incluye a los rayos X (originados de tubos de rayos X), a los electrones acelerados por dispositivos como el acelerador Van de Graaff, el betatrón o el ciclotrón.

3.5.1. RAYOS ALFA

Las partículas alfa son núcleos de Helio que han perdido ambos electrones y por consiguiente tienen doble carga positiva. Ellos son emitidos por núcleos radioactivos.

Este tipo de partícula es pesada y grande por lo que su trayectoria es muy corta, entregan toda su energía en un corto trayecto (del orden de milímetros o centímetros), recto de átomos o moléculas ionizadas (41).

3.5.2. RAYOS BETA

Las partículas beta son electrones rápidos emitidos por núcleos radioactivos, no tienen la misma energía y varían desde un valor cero hasta un máximo (E_{β}) característico del elemento. Son más pequeñas, rápidas y ligeras que las partículas alfa. En consecuencia, causan una ionización específica menor, su trayectoria resulta más larga y hacia diversas direcciones.

3.5.3. RAYOS GAMMA

Es radiación electromagnética de origen nuclear con energías de 40 KeV a 4 MeV. Los rayos gamma emitidos por isótopos radiactivos son monoenergéticos. Puede suceder que un mismo elemento emita rayos

gamma de distintas energías (por ejemplo el Cobalto-60 emite rayos gamma de 1.332 MeV y 1.173 MeV en igual cantidad). Pierden su energía gradualmente al pasar por la materia, los rayos gamma tienden a ceder la mayor parte de su energía en una interacción, sin embargo dado que no poseen masa, tienden a recorrer grandes distancias antes de que sean absorbidos (42).

Los rayos gamma absorbidos pueden generar a su vez emisiones secundarias de electrones (por conversión o Auger) y rayos X los que a su vez generarán caminos de entidades ionizadas creando en su totalidad una intrincada red de átomos o moléculas ionizadas.

3.6. EFECTOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN POLÍMEROS

Los cambios químicos producidos por la irradiación de los polímeros son similares a aquellos producidos por métodos químicos, y el principal interés de estudio en la modificación de superficies radica en averiguar cuan pequeño puede ser un cambio químico para producir un gran cambio en las propiedades físicas del polímero.

Los principales cambios químicos que tienen lugar al irradiar un polímero son dos: entrecruzamiento y degradación (42).

3.6.1. ENTRECruzAMIENTO DE POLÍMEROS

Es un proceso por el cual dos cadenas moleculares separadas llegan a unirse dando origen a una nueva molécula con una masa molar promedio mayor.

La unión de estas cadenas suele ser aleatoria pudiendo enlazarse en las partes finales o intermedias. La cantidad de uniones depende de la dosis aplicada y del tipo de uniones químicas. La cadena principal de estos polímeros debe contar con al menos un enlace Carbono-Hidrógeno para que se lleve a cabo el entrecruzamiento.

Cada entrecruzamiento reduce el número de moléculas separadas e incrementa la masa molar del conglomerado. La irradiación continúa y los entrecruzamientos también, tomando importancia aquellos originados en la misma molécula en distintas partes de la misma, lo que no disminuye el número de moléculas separadas. Propiedades como la viscosidad se incrementan gradualmente.

Llega un punto conocido como el punto de gelación en el que el polímero se torna insoluble y comienza a formarse una red tridimensional con ayuda de las moléculas separadas.

3.6.2. DEGRADACIÓN DE POLÍMEROS

Es el proceso opuesto al entrecruzamiento en el sentido de que involucra una reducción en la masa molar promedio. Es de hecho el rompimiento de la cadena polimérica; el material pierde gradualmente sus propiedades llegando a convertirse en su mínima unidad posible como polvo o pirolizado. Durante la irradiación tanto la degradación como el entrecruzamiento pueden suscitarse. Algunos polímeros son más propensos al entrecruzamiento y otros a la degradación.

3.6.3. INJERTOS

En materiales injertados, una base de polímero formada por unidades monoméricas A se une en sitios específicos con otro polímero, formado por unidades monoméricas B. Las propiedades fisicoquímicas del polímero A y del polímero B pueden ser completamente diferentes, pero el injerto de ambos traerá la combinación de dichas propiedades en la medida que sean cambiadas haciendo del injertado un método de gran valor (40). Existen varios métodos para formar injertos mediante el uso de la radiación que se reseñan a continuación.

3.6.3.1. IRRADIACIÓN DIRECTA

Método en el cual se irradia un polímero A en presencia de una solución (acuosa) de un monómero B. Para evitar que el monómero B se polimerice solo, forme el homopolímero, se agrega a la solución un inhibidor (40). Asimismo se debe eliminar el oxígeno presente de la solución para que éste no reaccione, formando óxidos y peróxidos y entre en competencia con el monómero B.

3.6.3.2. IRRADIACIÓN DIRECTA EN PRESENCIA DE VAPOR

Este método es parecido al anterior en el sentido de que el polímero A y el monómero B están en contacto directo en el momento de la irradiación, pero a diferencia el monómero B se encuentran en fase vapor. Los vapores provienen de una solución singular, para evitar la formación del homopolímero durante la irradiación, se protege mediante un blindaje (chaqueta de plomo). No se requiere de un inhibidor aunque sigue siendo necesaria la eliminación del oxígeno.

3.6.3.3. PREIRRADIACIÓN OXIDATIVA

Consiste en irradiar A en presencia de oxígeno o aire para formar óxidos y peróxidos (40), los cuales son térmicamente inestables. Posteriormente el material se pone en contacto con un monómero B en ausencia de oxígeno, se calienta y entonces los grupos óxido y peróxido se romperán homolíticamente permitiendo la formación de enlaces con el monómero, el cual se polimerizará por medios convencionales.

3.6.3.4. PREIRRADIACIÓN AL VACÍO

El polímero A se irradia al vacío bajo atmósfera inerte para formar radicales libres dentro de sí mismo; a continuación se pone en contacto con un monómero B, asegurándose que el polímero A este libre de oxígeno.

La reacción puede ocurrir rápidamente, aunque en algunos casos se requiere calentamiento para llevar a cabo la misma. Por este método no

se logra la formación uniforme del injerto en la superficie, debido a la recombinación de los radicales libres y a la poca penetración del monómero B.

CAPÍTULO IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. MATERIALES

A continuación se enlistan y describen los materiales empleados en las diversas etapas de la presente tesis.

4.1.1. MATERIALES PARA LA FORMACIÓN DEL COPOLÍMERO DE INJERTO

a. PVC $(-\text{CH}_2-\text{CHCl}-)_n$

Proveedor: Spectra Hardware Inc.

Características: PVC de alta densidad con Bis(2-ethylhexil) ftalato (DEHP) como aditivo, masa molar por unidad de 62.5 g/mol

CAS #: 9002-86-2

Forma: Película flexible y transparente de 1 cm de ancho, 0.09 cm. de espesor y 3 cm de largo

b. PEGMA $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$

Proveedor: Aldrich

Características: masa molar: 360 g/mol, densidad: 1.105 g/ml, CAS #: 25736-86-1

Forma: Líquido viscoso de color transparente

4.1.2. MATERIALES PARA LA CONJUGACIÓN

a. Estreptocinasa (SK)

Proveedor: Aldrich

Características: masa molar: 90 kDa, plasmina < 0.5 % de actividad

CAS#: 9001-91-6

Forma: Polvo liofilizado

b. 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$

Proveedor: Aldrich

Características: masa molar: 191.70 g/mol, Pureza \geq 98%

CAS#: 25952-53-8

Forma: Polvo

- c. Sulfo-N-Hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) $C_4H_4NNaO_6S$
Proveedor: Aldrich
Características: masa molar: 217.13 g/mol Pureza $\geq 98.5\%$
CAS#: 106627-54-7
Forma: Polvo
- d. N-Hidroxisuccinimida (NHS) $C_4H_5NO_3$
Proveedor: Aldrich
Características: masa molar: 115.09 g/mol, Pureza $\geq 98\%$
CAS#: 6066-82-6
Forma: Polvo
- e. 5-Fluoresceinisotiocianato (FITC) $C_{21}H_{11}NO_5S$
Proveedor: Fluka
Características: masa molar 389.38 g/mol Pureza $\geq 97.5\%$
CAS #: 3326-32-7
Forma: Sólido

4.1.3. MATERIALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD

- a. H-D-Val-Leu-Lys-pNA x 2HCl (Substrato Cromogénico)
Proveedor: Instrument Lab
Características: masa molar: 551.6 g/mol Pureza $\geq 95\%$
CAS #: 100-01-6 (p-NA)
Forma: Polvo liofilizado
- b. Plasminógeno de plasma humano (Pg)
Proveedor: Aldrich
Características: masa molar: 90 kDa, adecuado para la medición con estreptocinasa, plasmina $< 0.5\%$ de actividad
CAS #: 9001-91-6
Forma: Polvo liofilizado

4.2. INSTALACIONES Y EQUIPOS

En seguida se enlistan las instalaciones y equipos utilizados.

4.2.1. GAMMABEAM

En esta instalación se irradiaron las muestras de PVC antes de ser injertadas.

Modelo: 651-PT

Isótopo: Cobalto 60 (para irradiación)

Actividad: 22×10^3 Curies

Características: La figura 4.1 muestra un diagrama de la instalación con sus respectivas características

4.2.2. FTIR-ATR

En este equipo se determinaron los espectros infrarrojos del PVC antes y después de ser injertados con PEGMA;

Marca: Perkin Elmer

Modelo: Paragon 500

ATR: Seleniuro de Zinc (ZnSe)

Condiciones de Operación: $4000 - 700 \text{ cm}^{-1}$

Ubicación: Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM

4.2.3. TGA

Se utilizó para determinar las temperaturas de descomposición del PVC antes y después de ser injertado con PEGMA;

Marca: TA Instruments, New Castle, DE

Modelo: Q50

Condiciones de Operación: Atmósfera de Nitrógeno con un calentamiento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ en un rango de $25 - 600 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ubicación: Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM

Aquí se localiza, desde 1986, el irradiador GAMMABEAM 651-PT de alta intensidad y dosis variable

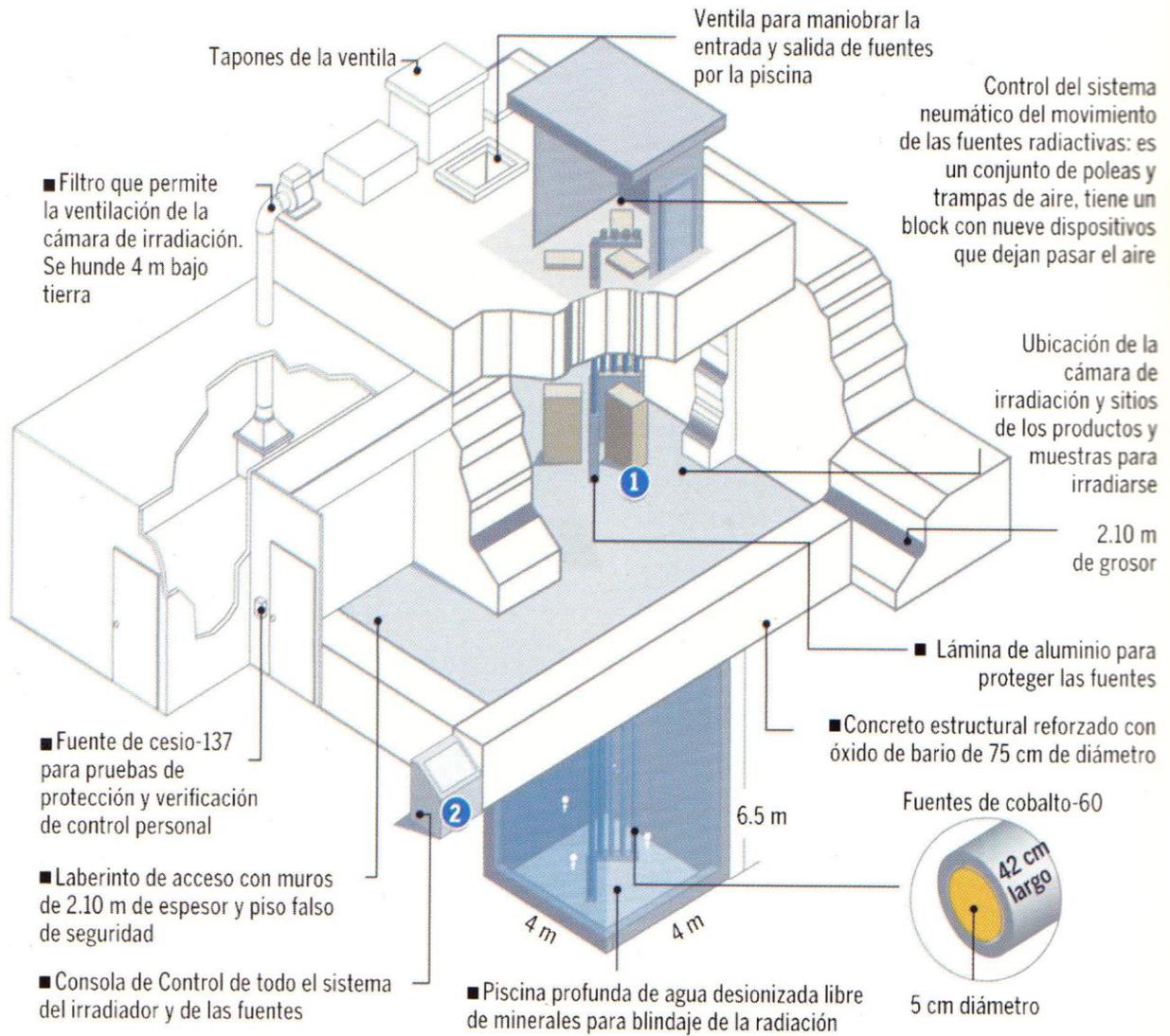


Figura 4.1. Irradiador Gamma Beam 651-PT con estructura blindada.
Fuente: Dr. Epifanio Cruz Zaragoza ICN-UNAM

4.2.4. DSC

En este aparato se registraron los cambios de fase del PVC antes y después de ser injertado con PEGMA;

Marca: TA Instruments, New Castle, DE

Modelo: 2010

Condiciones de Operación: Calentamiento a razón de 10 °C/min en un rango de 25 – 250°C.

Ubicación: Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM

4.2.5. ESPECTRÓMETRO UV/VISIBLE

En este equipo se midió la actividad de la estreptocinasa antes y después de ser unida al copolímero de injerto.

Marca: Beckman Coulter

Modelo: DU 800

Ubicación: Departamento de Ingeniería Química y medioambiental, M & R Bourns College of Engineering, Riverside, California

4.2.6. MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

En este se tomó la orografía del PVC, PVC-g-PEGMA y (PVC-g-PEGMA)-SK.

Marca: Veeco

Modelo: diMultiMode V

Ubicación: Departamento de Ingeniería Química y medioambiental, M & R Bourns College of Engineering, Riverside, California

4.2.7. MICROSCOPIO FLUORESCENTE

En este equipo se verificó la viabilidad de la unión del PEGMA, injertado sobre PVC, con proteína.

Marca: Olympus

Modelo: BX51

Ubicación: Departamento de Ingeniería Química y medioambiental,

4.3. METODOLOGÍA

A continuación se describe paso a paso la metodología utilizada durante el desarrollo del presente trabajo.

4.3.1. INJERTADO DEL PEGMA SOBRE PVC (COPOLÍMERO DE INJERTO)

a. Irradiación de matrices de PVC

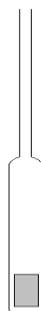
- i. Todas las matrices poliméricas fueron irradiadas a una de las dos intensidades de dosis siguientes: 1.3 kGy/h, 2.7 kGy/h
- ii. Se identificaron debidamente cada uno de los tubos.
- iii. Se irradiaron las muestras.
- iv. Una vez irradiadas se introdujeron las muestras al congelador.

b. Preparación de soluciones de PEGMA en agua a 0.5 y 1 mol/l

- i. Se pesaron las cantidades de sustancia necesarias dentro de un matraz aforado de 50 mL.
- ii. Se agregó agua bidestilada hasta el aforo.
- iii. Se agitó hasta dilución completa.
- iv. Se vació en un frasco debidamente identificado.
- v. Las soluciones fueron utilizadas inmediatamente.

c. Preparación de ampolletas

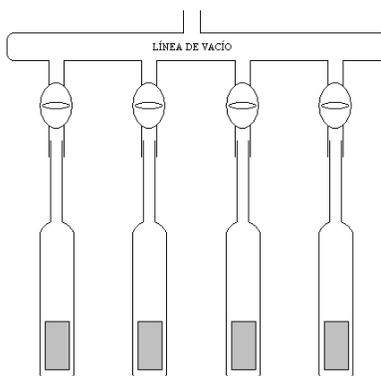
- i. Se unió un tubo de vidrio de 10 cm de largo y 0.5 cm de diámetro interno con un tubo de ensaye marca Pyrex 'USA'.
- ii. Se introdujo un tubo de PVC debidamente identificado en la ampolleta, como se observa en la siguiente figura:



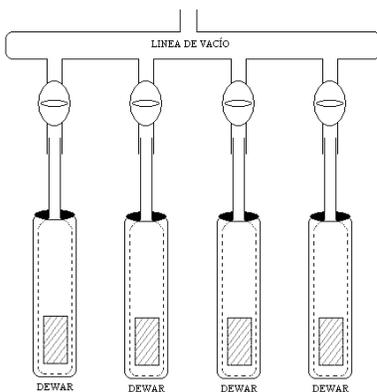
iii. Se colocaron 5ml de la solución (PEGMA en agua) preparada en dicho tubo.

d. Eliminación del oxígeno de las ampolletas y sellado a vacío

i. Se armó un dispositivo como el siguiente:



ii. Se introdujeron las ampolletas en Dewars con nitrógeno líquido como se muestra:



iii. Se esperó 1 minuto a que se congelara el contenido de las ampolletas.

iv. Se abrió la línea de vacío por 5 minutos.

- v. Se cerró la línea de vacío.
- vi. Se retiró el Dewar y se introdujeron las ampolletas en vasos de precipitados con agua a temperatura ambiente, con objeto de que se descongelaran totalmente las muestras y se liberara el oxígeno atrapado.
- vii. Se repitieron los pasos ii al vi hasta que se observó que ya no se liberaban burbujas de la masa congelada.
- viii. Se sellaron los tubos por la parte estrecha con ayuda de un soplete.

Nota: No se debe desprender el tubo de la línea de vacío

e. Colocación en el baño maría de las ampolletas

- i. Se colocaron todas las ampolletas dentro de un vaso de precipitados y se fijaron con el fin de que no floten libremente durante el calentamiento en el baño.
- ii. Se introdujeron en un baño maría a temperatura de 50 ó 60 °C, asegurándose que el agua cubriera las ampolletas en su totalidad.
- iii. Se dejó en el baño maría durante el tiempo de reacción requerido.
- iv. Al terminar el tiempo de reacción se retiraron las ampolletas y se dejaron enfriar.

f. Lavado y pesado de las películas

- i. Se abrieron las ampolletas.
- ii. Se retiraron los tubos de PVC injertados de las ampolletas.
- iii. Se retiró el exceso de polímero formado, colocando los tubos de PVC injertados dentro de frascos con 20 mL de agua destilada a 60°C. Se colocó un agitador magnético en cada frasco y se dejaron en agitación durante 24 horas.

- iv. Concluido el tiempo se retiraron los tubos de PVC injertados del recipiente con agua.
- v. Los tubos de PVC injertados, se colocaron en un desecador a vacío por 24 horas con la finalidad de eliminar la humedad.
- vi. Una vez libres de humedad se pesaron cada uno de los tubos.
- vii. Se determinó el porcentaje de injerto a partir de la siguiente fórmula:

$$\%injerto = \frac{W_f - W_o}{W_o} * 100\%$$

Donde W_f es el peso final, W_o es el peso inicial

- viii. Con los datos obtenidos se elaboraron las gráficas presentadas en esta tesis.
- ix. A partir de las gráficas se determinaron las condiciones óptimas del injerto.

4.3.2. INMOVILIZACIÓN DE LA PROTEINA

- a. Inmovilización de SK-FITC sobre el copolímero de injerto
 - i. Se disolvieron 5 mg de SK en 1 mL de solución buffer de fosfatos a pH 8.9
 - ii. En un cuarto oscuro se agregaron 251 μ L de una solución FITC/DMSO 1.4 mg/mL muy lentamente
 - iii. Se dejó reaccionar por 2 horas a 30°C en total obscuridad
 - iv. Posteriormente la solución fue dializada usando una membrana molecular de 6.4 mm de diámetro y MWCO de 12-12,000 empleando una solución buffer de fosfatos a pH 4.5
 - v. Se tomó 1mL de la solución dializada y se agregó el copolímero de injerto PVC-g-PEGMA junto con 38.8 mg de

EDC y 1 mL de NHS 2.3 mg/ml agitando y reaccionando por 3 horas a 30°C.

- vi. Las muestras obtenidas fueron lavadas por 24 horas a temperatura ambiente con agua destilada y secadas a vacío toda la noche a 30°C
- vii. Las muestras fueron observadas empleando el microscopio fluorescente

b. Inmovilización de SK sobre el copolímero de injerto en medio acuoso

- i. El copolímero de injerto se hizo reaccionar con 0.4 mg de EDC y 1.1 mg de sulfo-NHS en una solución buffer de fosfato de sodio pH 6.0 por 15 minutos a 30°C
- ii. Las muestras fueron lavadas con el mismo buffer por 30 minutos a 30°C
- iii. Inmediatamente se colocaron en una solución buffer de fosfato de sodio pH 7.5 y se agregaron 2.5 mg de SK
- iv. Se dejó reaccionar por 2 horas a 30°C
- v. Se lavaron con agua destilada por 1 hora y se secaron a vacío toda la noche

4.3.3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ANTES Y DESPUÉS DE LA BIOCONJUGACIÓN

- a. Se colocaron 185 µL de una solución de sustrato cromogénico H-D-Val-Leu-Lys-pNa x 2HCl (1 mg/mL) dentro de celdas UV, a las que también se adicionó 25 – 562 µL de Pg y 3 µL de una solución de SK (0.02 u/ml) o 2.8 µg/cm² de la enzima inmovilizada.

- b. El volumen final se ajustó a 1 mL con una solución tris buffer 0.1 mM con Triton X-100 a pH 7.1
- c. Las celdas UV se mantuvieron a 37°C con agitación intermitente durante las mediciones
- d. Los parámetros cinéticos se determinaron de la gráfica de Lineweaver-Burke obtenida de las mediciones

4.3.4. DETERMINACIÓN DE LA ENZIMA INMOVILIZADA POR EL MÉTODO DE BRADFORD

- a. Preparación del reactivo de Bradford
 - i. Disolver 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 ml de etanol 95%, adicionar 100 mL de una solución de ácido fosfórico 85% (w/v). Agitar hasta disolución completa
 - ii. Diluir a un litro con agua destilada y filtrar usando papel filtro del # 1
 - iii. Guardar la solución en un frasco ámbar a 4°C

- b. Preparación de la curva de calibración
 - i. Calentar el espectrómetro UV/Vis
 - ii. Preparar estándares conteniendo de 5 a 100 microgramos de albumina en 100 μ L de volumen
 - iii. Agregar 5 mL del reactivo de Bradford previamente preparado
 - iv. Incubar por 5 minutos
 - v. Medir la absorbancia a 595 nm
 - vi. Repetir los incisos ii a v 2 veces mas
 - vii. Sacar el promedio de las mediciones y elaborar una gráfica de concentración versus absorbancia

- c. Determinación de la concentración de SK en el sobrenadante
 - i. Preparar varias soluciones de la muestra problema a distintas concentraciones en 100 μL de volumen
 - ii. Agregar 5 mL del reactivo de Bradford
 - iii. Incubar por 5 minutos
 - iv. Medir la absorbancia a 595 nm
 - v. Repetir 3 veces cada medición
 - vi. Sacar el promedio y determinar con ayuda de la curva de calibración la concentración de SK en el sobrenadante

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CINÉTICA DE INJERTO

5.1.1. ESQUEMA DE REACCIÓN DEL INJERTO

Para lograr el injerto es necesario la creación de radicales libres, generados a partir de los peróxidos formados durante la irradiación de la matriz polimérica (PVC) con rayos gamma en presencia de aire. El injerto así obtenido posee la ventaja de ser rápido y uniforme.

Una vez irradiada la matriz polimérica el injerto se logra por reacción química al ponerlo en contacto con una solución del compuesto a injertar, en nuestro caso PEGMA. En la Figura 5.1 se muestra el esquema de reacción general del injerto.

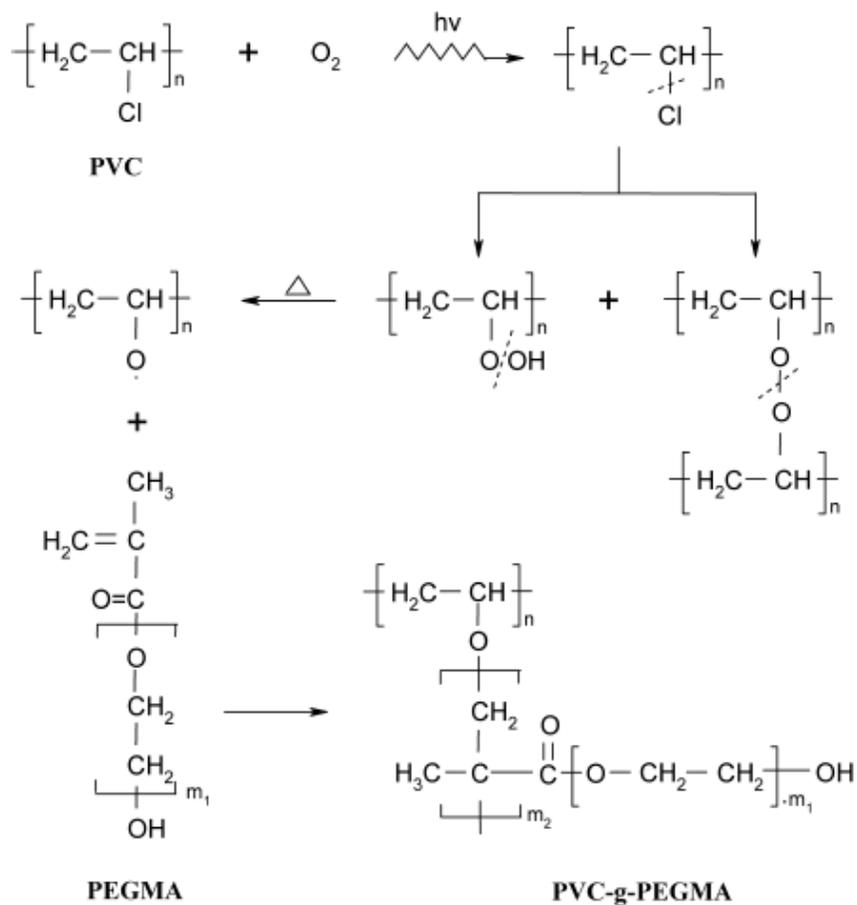


Figura 5.1. Esquema de reacción del polímero de injerto obtenido

5.1.2. INJERTO OBTENIDO VARIANDO EL TIEMPO DE REACCIÓN

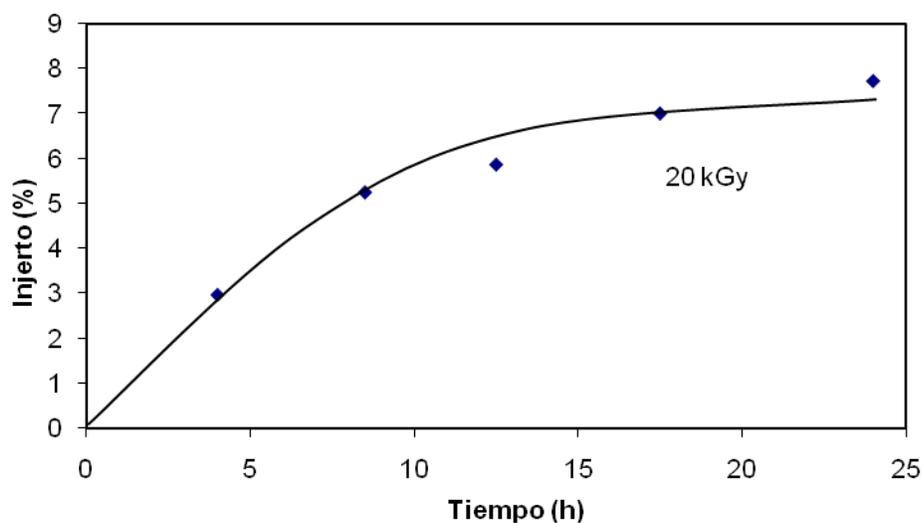


Figura 5.2 Porcentaje de injerto en función del tiempo de reacción. Concentración 0.5M, temperatura 60 °C, tiempo de reacción 24 h, dosis 20 kGy, intensidad de radiación 2.7 kGy/h

En la figura 5.2 se puede apreciar que el porcentaje de injerto alcanza su máximo valor aproximadamente ente 18-20 horas de reacción, para una dosis de 20 kGy, obteniéndose injertos de aproximadamente del 7% (en peso de PEGMA sobre el peso de la matriz polimérica).

Lo anterior se atribuye a un incremento en el tamaño de la cadena polimérica conforme aumenta el tiempo de reacción (0 a 13 hrs) hasta un punto en el cual la concentración del monómero en solución es mínima y las cadenas poliméricas ya no pueden crecer significativamente (18 y 24 hrs), formándose la meseta que se puede apreciar en la Figura 5.2. Es de esperar que por encima de este tiempo, el incremento del injerto sea prácticamente nulo.

5.1.3. INJERTO OBTENIDO VARIANDO LA DOSIS DE EXPOSICIÓN

Como puede observarse en la Figura 5.3 al aumentar la dosis se incrementa el porcentaje de injerto hasta un valor límite, esto se debe a que al ir aumentando la dosis de exposición del material a los rayos gamma mayor cantidad de centros activos se forman, ésto es mayor cantidad de peróxidos e hidroperóxidos sobre la superficie del material, al momento de la reacción habrá una cantidad de cadenas poliméricas en crecimiento proporcional a la dosis, lo que se traduce en un mayor injerto.

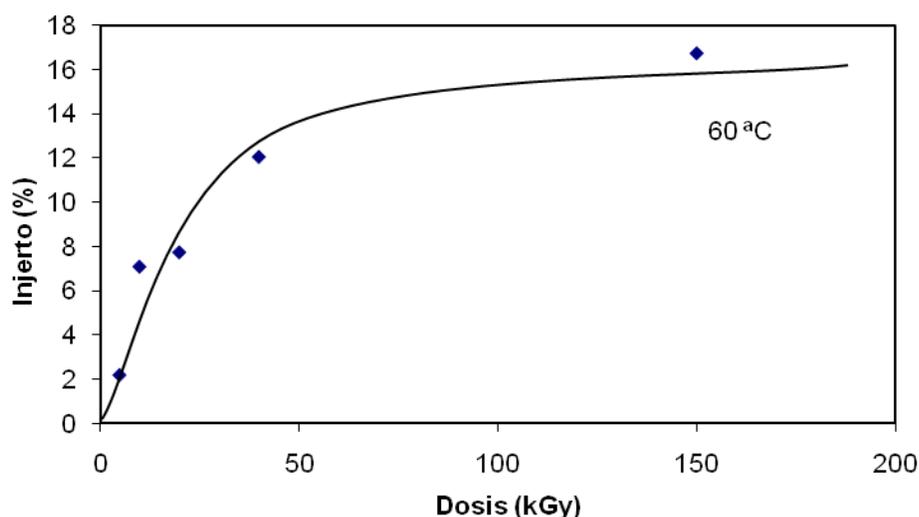


Figura 5.3 Porcentaje de Injerto en función de la dosis, concentración 0.5M, tiempo de reacción 24 h, intensidad de radiación 2.7 kGy/h, temperatura de reacción 60 °C.

Observando la Figura 5.3 podemos decir que hay una relación constante entre el injerto y la dosis a baja exposición (5 a 20 kGy) lo que significa un crecimiento lineal entre el número de centros activos formados en el material y la energía recibida del ^{60}Co . La meseta formada por los puntos finales (40 y 150 kGy) nos indica una saturación de peróxidos e hidroperóxidos que no permite un injerto mayor de alrededor de 18%.

5.1.4. INJERTO OBTENIDO A DOS TEMPERATURAS: 50 °C y 60 °C

La Figura 5.4 nos muestra un incremento del injerto en función de la dosis a dos distintas temperaturas, 60 °C y 50 °C. Tanto a una como a otra temperatura se recibió la misma energía por parte de la fuente; sin embargo es durante la reacción donde se aprecia la diferencia de injertos debido a la temperatura, lo que indica que el proceso de polimerización cambia con la temperatura. Dado que la polimerización es función de la temperatura, la concentración, etc. (43).

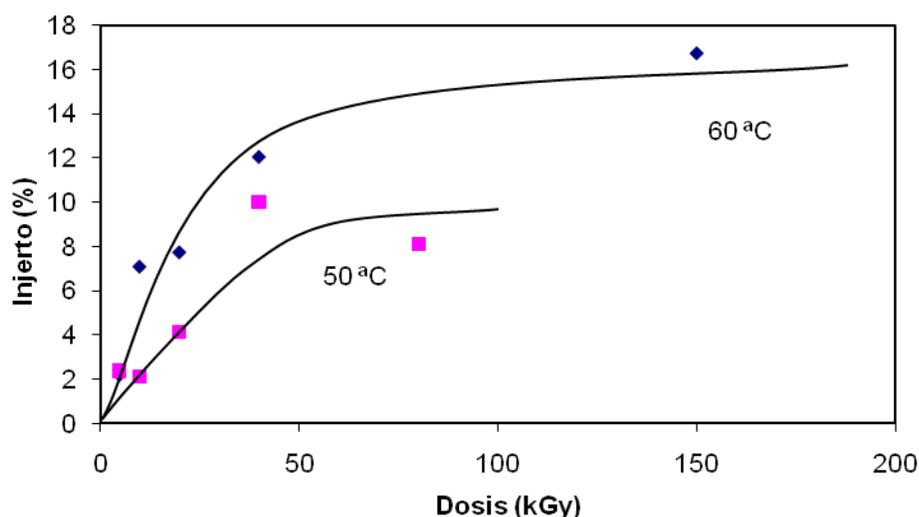


Figura 5.4 Porcentaje de Injerto en función de la dosis a diferentes temperaturas; concentración 0.5M, tiempo de reacción 24 h, intensidad de radiación 2.7 kGy/h.

5.1.5. INJERTO OBTENIDO A DOS CONCENTRACIONES: 0.3 M Y 0.5 M

La misma regla observada con la temperatura se aplica con la concentración. Ambos materiales recibieron la misma energía pero exhiben distinto grado de injerto. La explicación de nuevo la encontramos durante la reacción de injertado, en la cual una concentración mayor de PEGMA origina una rapidez de reacción mayor, lo que se traduce en un cadenas poliméricas más grandes respecto de aquellas con menor concentración de monómero. En la Figura 5.5 podemos observar un injerto inferior al 10 %

a una concentración 0.3M, un incremento de concentración de monómero a 0.5M permite injertos menores de 18%. Si bien la tendencia de la curva sigue siendo la misma para ambas concentraciones (una parte inicial lineal y una final de meseta), un incremento en la concentración implica un mayor injerto. Sin embargo, el mecanismo de formación de centros activos es el mismo.

Un punto importante a notar es que ambas gráficas prácticamente coinciden en lo referente a la parte lineal (hasta 20 kGy) lo que permite inferir que 0.3M y 0.5M no implican gran diferencia para la cantidad de centros reactivos formados, es decir éstos son pocos y el proceso de polimerización se lleva a cabo a una velocidad tal, que no permite ver diferencia entre ambas concentraciones. Caso opuesto para las mesetas formadas por ambas gráficas a 40 y 150 kGy donde la cantidad de peróxidos e hidroperóxidos formados es tal, que la concentración sí hace una diferencia en cuanto a la velocidad de polimerización.

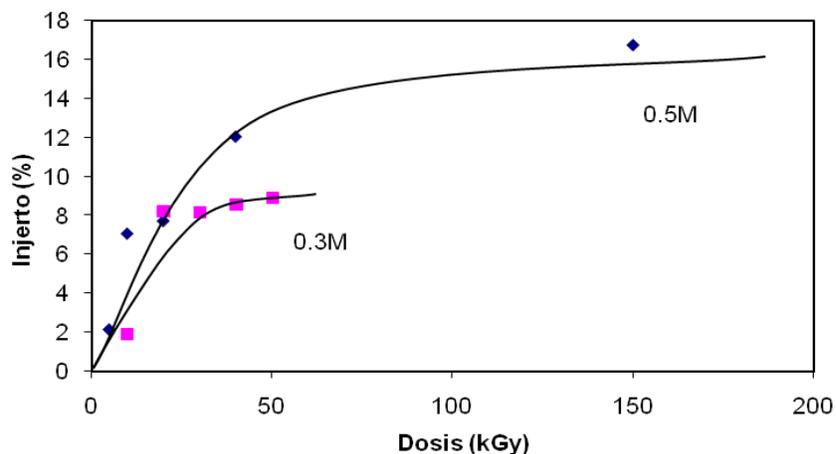


Figura 5.5 Porcentaje de injerto en función de la dosis a distintas concentraciones de monómero. Temperatura 60 °C, tiempo de reacción 20 h, intensidad de radiación 3.0 kGy/h

Los datos obtenidos también nos permiten inferir que las condiciones de polimerización (temperatura, concentración) deben ser

tomadas en cuenta cuando se piensa en la modificación de superficies mediante injerto por radiación.

5.1.6. INJERTO OBTENIDO A DOS INTENSIDADES: 1.3 kGy/h Y 2.7 kGy/h

De acuerdo a los resultados previamente obtenidos, podemos decir que la polimerización se ve favorecida por un aumento de la concentración y la temperatura. Sin embargo, la intensidad de radiación que es otro factor importante de estudio en el presente trabajo, no favorece significativamente el porcentaje de injerto como se puede observar en la Figura 5.6.

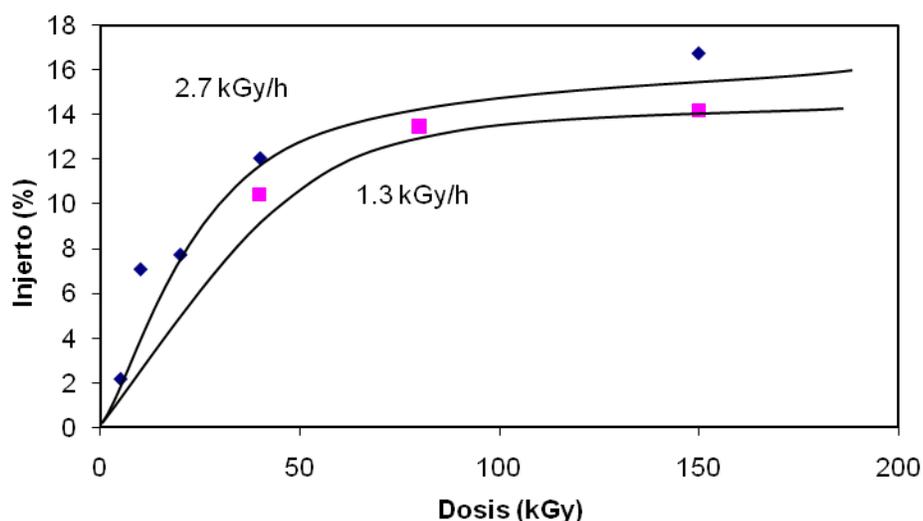


Figura 5.6 Porcentaje de injerto en función de la dosis a diferentes intensidades de radiación. Concentración 0.5M, temperatura 60 °C, tiempo de reacción 24 h.

En un trabajo previo (44) se encontró que al duplicar la intensidad de dosis prácticamente se duplicaba el porcentaje de injerto lo que significa que se generan el doble de centros activos a pesar de que ambos materiales recibieron la misma cantidad de energía (dosis). Esto contrasta

con los resultados obtenidos de los presentes experimentos en los que prácticamente no hubo cambio alguno con la duplicación de la intensidad.

Lo anterior infiere que la velocidad de polimerización no se ve afectada por este hecho. Sin embargo, basados en los resultados del estudio mencionado se deben generar más peróxidos e hidroperóxidos en el material con un aumento de la intensidad por lo que sólo queda pensar en la reacción de polimerización como la parte responsable.

Observando detenidamente el tamaño de la molécula de PEGMA observamos que su tamaño es significativo, pues es un polímero (de bajo peso molecular), y este puede ser el porqué de la invariación del injerto con la intensidad de dosis, pues como es grande, ocupa un espacio por molécula mínimo para reaccionar y entonces no importa mucho que aumente la cantidad de sitios activos al final sólo cabrá la misma cantidad de moléculas iniciadoras por unidad de área.

5.1.7. ESPECTRO DE INFRARROJO

Una vez que tenemos los injertos el siguiente paso es realizar una serie de pruebas de caracterización para confirmar la modificación superficial de nuestro material.

La Figura 5.7 muestra evidencia de que se ha logrado con éxito la obtención del copolímero de injerto. A continuación se comparan los infrarrojos del PEGMA puro, el PVC virgen y el copolímero de injerto.

Para el PEGMA se observa el espectro con señales características en 3471 cm^{-1} (OH), 2865 y 1451 cm^{-1} (CH_3) y 1714 cm^{-1} (C=O).

En el PVC se pueden apreciar 2 picos característicos a 2924 y 2859 cm^{-1} (CH_2), 1459 y 1267 cm^{-1} (CHCl).

Finalmente el espectro del injerto resultante en el que se puede apreciar existencia de los grupos característicos de ambos componentes; OH (3426 cm^{-1}), CH_2 (2918 cm^{-1}), C=O (1727 cm^{-1}), CH_3 (2867 y 1453 cm^{-1}) lo que demuestra que se ha logrado obtener el copolímero deseado.

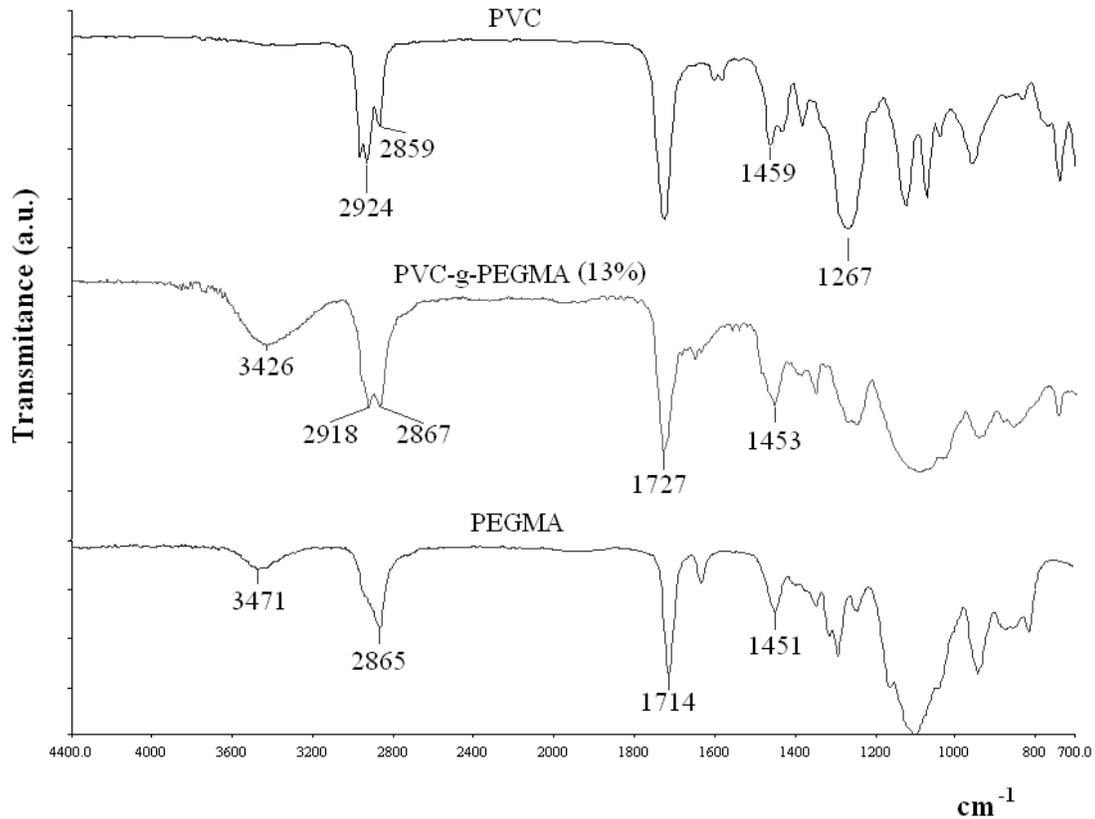


Figura 5.7 Espectro de infrarrojo de PVC, PEGMA y copolímero de injerto PVC-g-PEGMA 13 % injerto.

5.1.8. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO TGA Y DSC

En la Figura 5.8 se puede apreciar una temperatura de descomposición (10% peso) cercana a los 244 °C para el PVC y de 199 °C para el PEGMA. En el caso del copolímero de injerto se aprecia un cambio en la temperatura de descomposición, siendo esta de 237 °C (10 % en pérdida de peso), lo que representa una variación de 7 °C con respecto al PVC y de 38 °C con respecto al PEGMA.

Por calorimetría diferencial de barrido (DSC) observamos un cambio en las propiedades del PVC virgen y el modificado con PEGMA (Ver Figura 5.9).

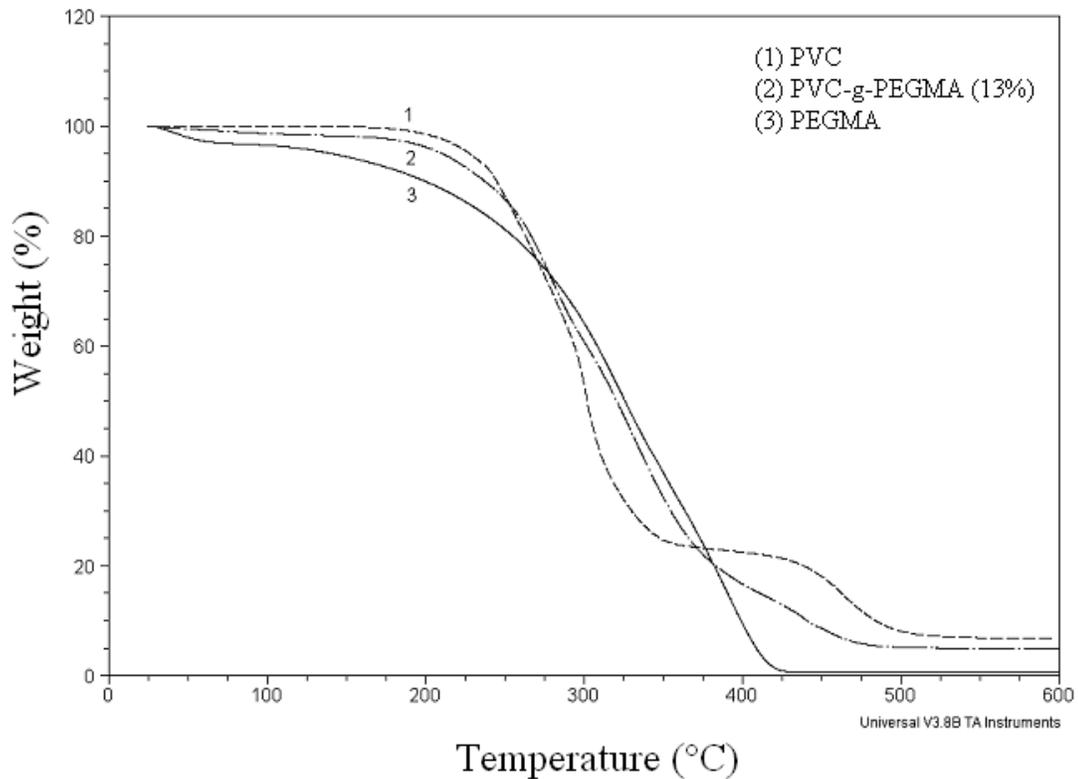


Figura 5.8 Análisis termogravimétrico. PVC (1), PVC-g-PEGMA 13% injerto (2) y PEGMA (3).

En ella se puede apreciar que el PVC es un material amorfo mientras que el PEGMA presenta una T_g de alrededor de 168 °C. Hay un incremento en esta T_g a 215 °C en el copolímero PVC-g-PEGMA, debido a la formación de un nuevo material. Se puede con ésto confirmar la modificación superficial del PVC con PEGMA.

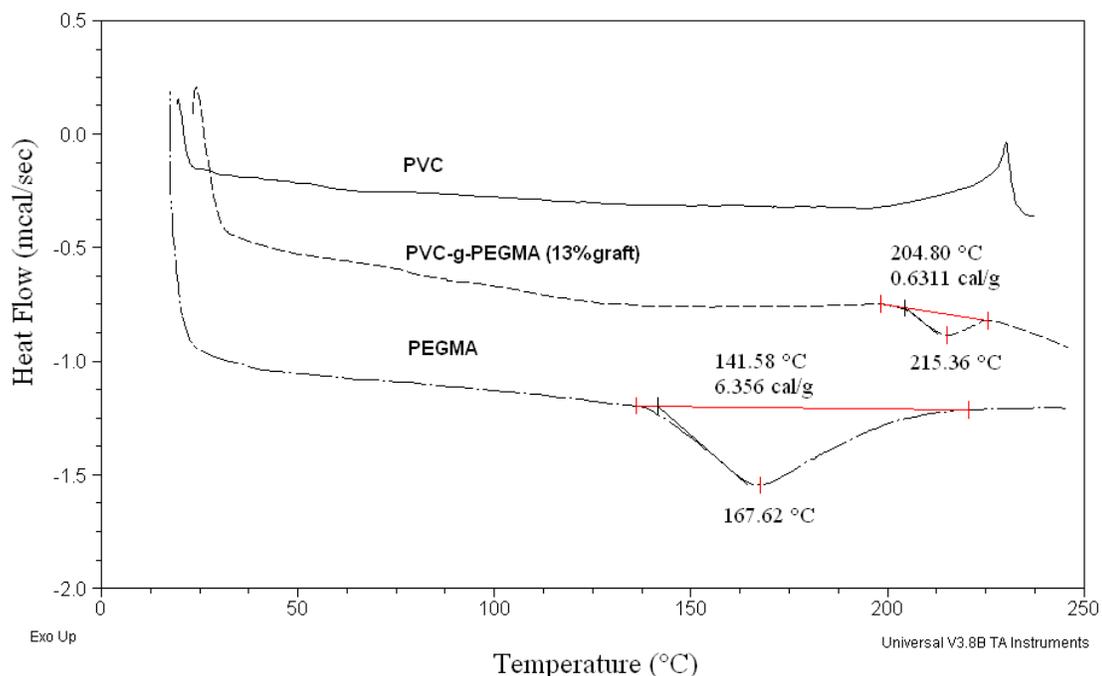


Figura 5.9 Calorimetría Diferencial de Barrido. PVC, PVC-g-PEGMA 13%, PEGMA

5.1.9. MICROSCOPIO FLUORESCENTE (FM)

Con objeto de probar la posibilidad de que la SK pueda ser acoplada en medio acuoso se decidió unir FITC con SK previamente en medio orgánico como primer paso y después sobre el copolímero de injerto PVC-g-PEGMA previamente elaborado en solución acuosa como segundo paso.

Las muestras fueron entonces analizadas empleando un microscopio fluorescente.

Se puede observar en la Figura 5.10 la reacción del grupo isotiocianato con la amina nucleófila de la SK produciendo un enlace estable, es de notar que el FITC es selectivo para con la amina N-terminal de la SK.

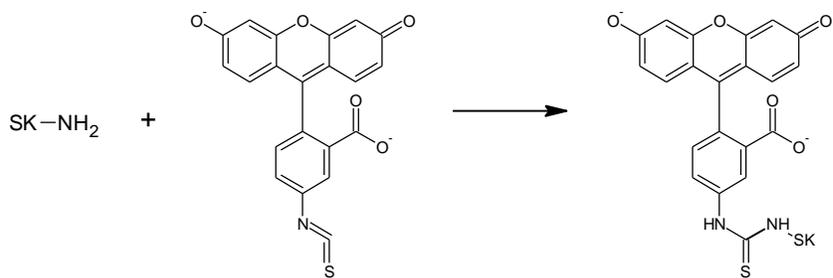


Figura 5.10 El FITC reacciona con la amina contenida en la SK para producir una unión isotiourea

La Figura 5.11 muestra algunas partes brillantes en correspondencia con las moléculas de SK-FITC acopladas con la superficie del PEGMA (fondo gris).

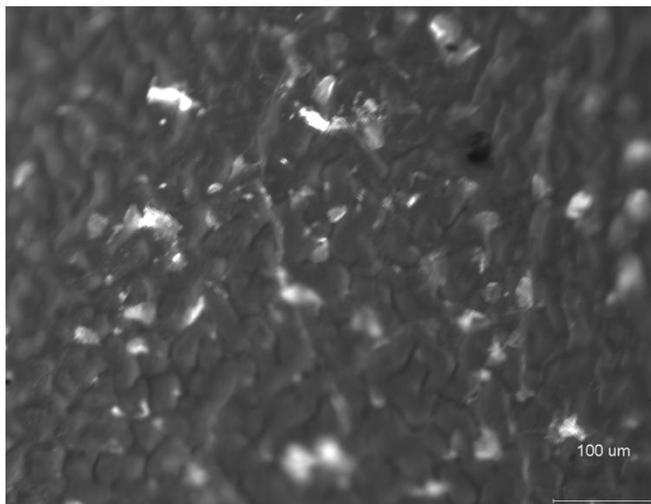


Figura 5.11 Fotografía de (PVC-g-PEGMA)-(SK-FITC). Las partes brillantes muestran la unión SK-FITC

5.1.10. EFECTO DEL PORCENTAJE DE INJERTO CON LA INMOVILIZACIÓN DE LA ESTREPTOCINASA

A distintos copolímeros, entre 20 y 30% de injerto, con un área superficial de 0.5 cm² se les conjugó SK (cantidad inicial de 5.0 μg) mostrando una cantidad prácticamente constante de 1.4 μg (Figura 5.12).

La cinética de inmovilización revela que la SK fue óptimamente inmovilizada sobre el copolímero de injerto alrededor de 30% de injerto (Figura 5.13).

Los resultados revelan que las moléculas de SK pueden estar inmovilizadas sobre la superficie expuesta y dentro de la capa superior del soporte (PEGMA) por quimisorción (adsorción), así como por unión química (grupos hidróxilo) de PEGMA por la acción mediada del EDC/sulfo-NHS.

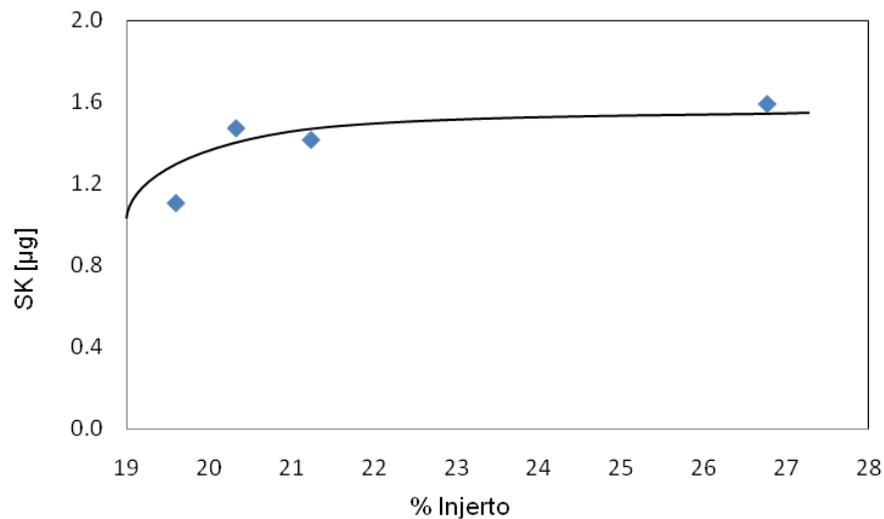


Figura 5.12 Efecto del porcentaje de injerto en la inmovilización de SK

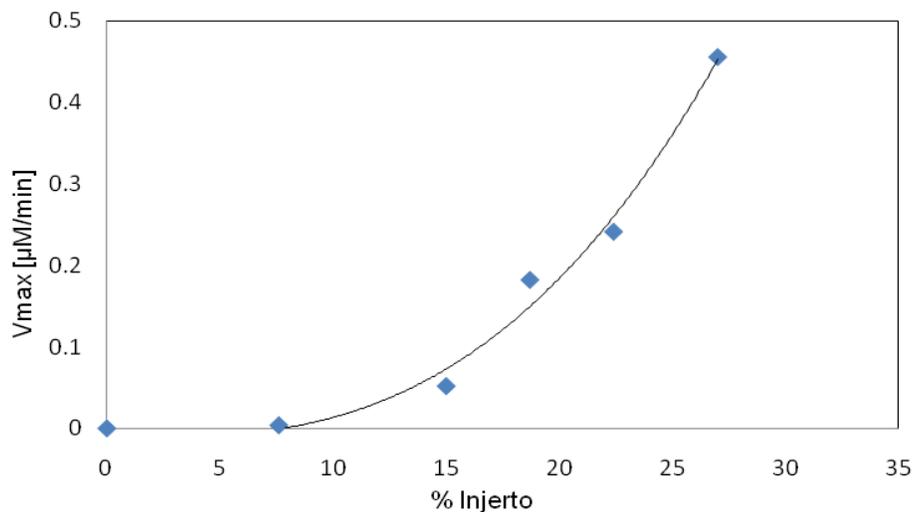


Figura 5.13 Cinética de inmovilización de la SK unida al copolímero de injerto

Tanto la quimisorción como la unión química pueden ser incrementadas con el aumento del PEGMA injertado sobre el PVC hasta cierto valor por encima del cual permanece constante.

5.1.11. K_m y V_{max} DE LA ESTREPTOCINASA LIBRE E INMOVILIZADA

La constante aparente de Michaelis, K_m para la SK inmovilizada fue de $0.14 \mu\text{M}$ y el correspondiente valor de velocidad, V_{max} resultó de $29.8 \mu\text{M}/\text{min}$. Se encontró que la V_{max} de la SK inmovilizada fue de mayor que la de la SK libre ($13.8 \mu\text{M}/\text{min}$). El valor comparable de la constante de Michaelis para la SK inmovilizada ($0.13 \mu\text{M}$), determinada experimentalmente indica que hay la misma afinidad a través del sustrato.

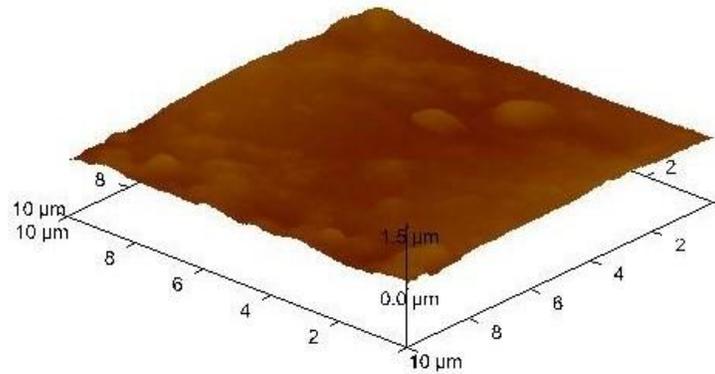
Tanto V_{max} como la constante aparente de Michaelis para la SK libre corresponden con aquellos reportados por Pizzo (45) y Robbins (46).

5.1.12. MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

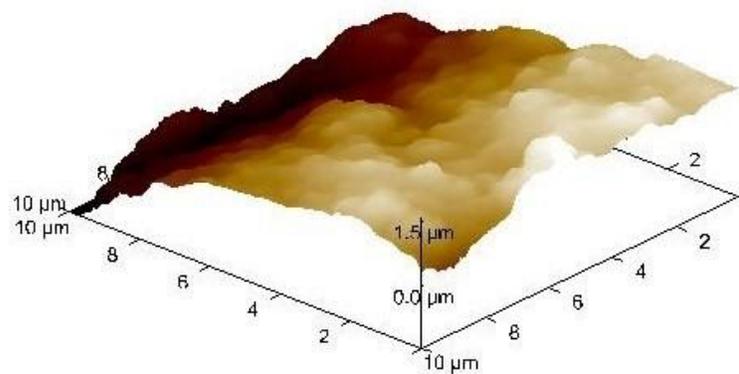
Imágenes en AFM del PVC virgen como del injerto con PEGMA y la inmovilización de la SK se muestran en la Figura 5.14. La película de PVC muestra una apariencia lisa excepto por algunas protuberancias microscópicas (i). El injerto de PEGMA sobre la superficie del PVC forma irregularidades tal como se muestra en (ii). En la imagen mostrada en (iii) se aprecia claramente la inmovilización de la proteína, hay ciertos lugares donde la proteína se localiza debido a su tamaño y punto de unión.

En la Figura 5.15 se aprecia claramente los diámetros y las alturas característicos durante las tres etapas que sufre el material. Para el PVC se pueden apreciar protuberancias con un radio promedio de $0.6 \mu\text{m}$ y una altura máxima de 250 nm , que contrasta con las del PEGMA con radios promedio de $1.1 \mu\text{m}$ y alturas de 360 nm que corresponde con lo esperado pues las moléculas de PEGMA son más grandes. Esto mismo puede verse

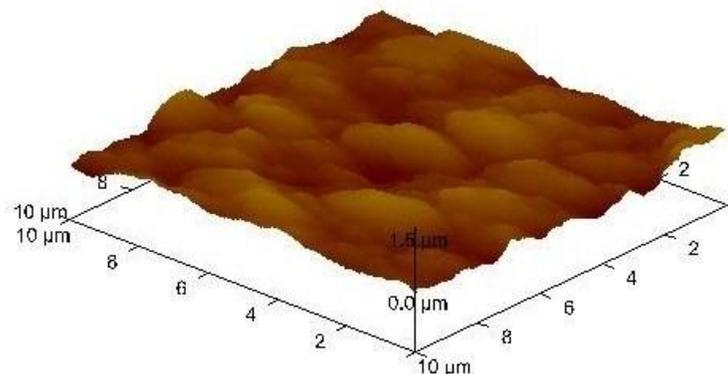
con la conjugación de la SK (iii) que presenta radios de $2.9 \mu\text{m}$ y altura de 500nm ya que la SK es una proteína muy grande.



(i) Control

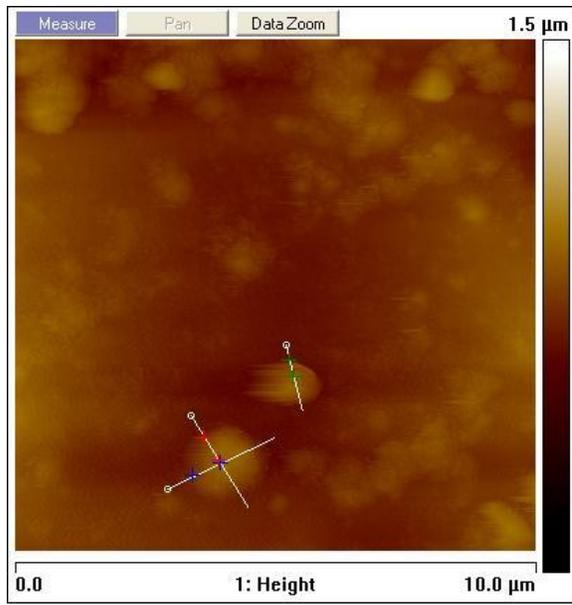


(ii) PVC-g-PEGMA 15%

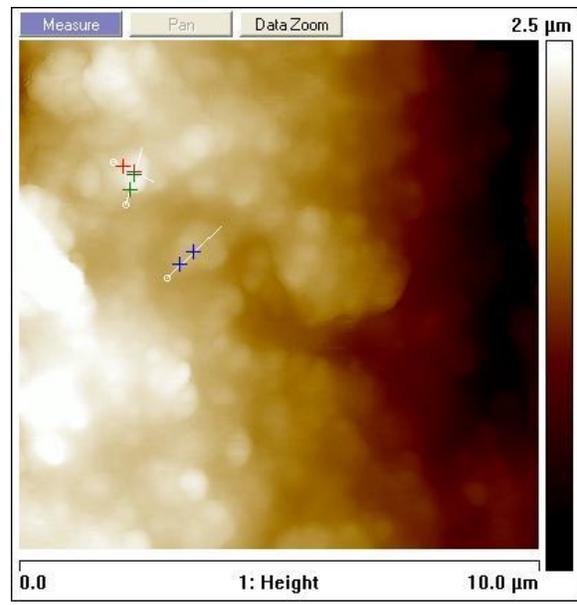


(iii) (PVC-g-PEGMA)-SK

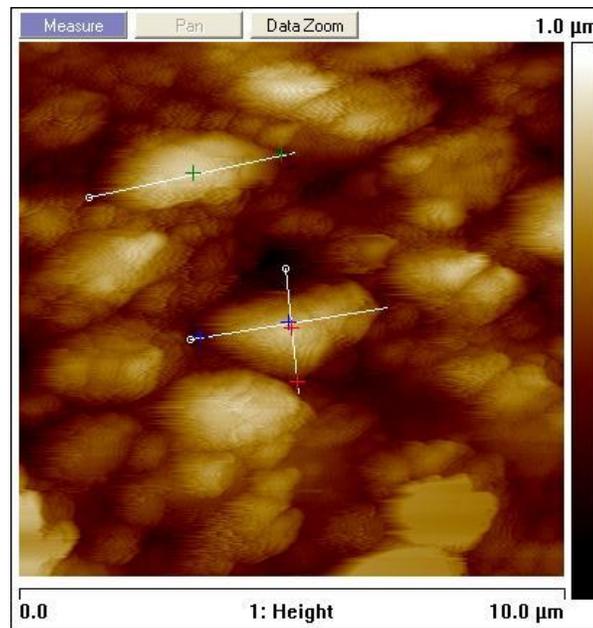
Figura 5.14 AFM del PVC virgen, PVC-g-PEGMA 15% y (PVC-g-PEGMA)-SK



(i) PVC



(ii)(PVC-g-PEGMA) 15%



(iii)(PVC-g-PEGMA)-SK

Figura 5.15 Radios promedio y altura tomadas con AFM. (i) $r = 0.6 \mu\text{m}$, $H = 250 \text{ nm}$ (ii) $r = 1.1 \mu\text{m}$, $H = 360 \text{ nm}$ and (iii) $r = 2.9 \mu\text{m}$, $H = 500 \text{ nm}$

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- Es posible sintetizar el copolímero de injerto PVC-g-PEGMA por el método de preirradiación oxidativa. Las condiciones óptimas de injerto que permiten mantener la transparencia de material a una intensidad de dosis de 2.7 kGy/h son: dosis 150 kGy, concentración del monómero 0.5 mol/L, temperatura de reacción 60 °C. La espectroscopia de infrarrojo confirmó el injerto.
- Asimismo fue posible conjugar la SK sobre el copolímero de injerto en medio acuoso obtenido, nunca antes efectuado, hasta 1.4 µg por 0.5 cm² de material.
- Los estudios cinéticos revelaron una K_m de 0.13 µM y una V_{max} de 13.8 µM/min para la SK libre que corresponden a los valores reportados en la literatura. Estos valores para la SK conjugada sobre el copolímero de injerto son K_m de 0.14 µM y V_{max} de 29.8 µM/min lo que significa que no hubo una pérdida significativa de la actividad de la SK y que la afinidad por el sustrato se mantiene.
- Por las imágenes obtenidas en AFM se confirma la modificación sufrida por la superficie del PVC (lisa) transformándola en rugosa, lo que favorece la adhesión de la SK misma que es confirmada por el radio y la altura característicos de las proteínas en superficie.

CAPÍTULO VII. PROPUESTAS DE USO BIOMÉDICO

El resultado final del presente trabajo es la unión química de la estreptocinasa sobre una matriz de cloruro de polivinilo. Lo anterior representa un material novedoso flexible y transparente que posee en su superficie una coenzima que retiene su actividad después del acoplamiento manteniendo de esta forma su capacidad de disolver coágulos de sangre.

Surge de inmediato una propuesta de aplicación biomédica, como material en todo tipo de dispositivos por los cuales estará en contacto sangre o plasma evitando o reduciendo la formación de coágulos en superficie. Aplicaciones de lo anterior es como recubrimiento en bolsas donde se almacene sangre o plasma, en tubos donde es necesario hacer circular sangre como en cirugías a corazón abierto, como material en implantes artificiales evitando o reduciendo las fallas mecánicas originadas por la formación de coágulos en superficie, en todo tipo de objetos de laboratorio donde se trabaje con sangre o plasma y cuyos reactivos no sean lábiles de reaccionar con la coenzima.

Otra propuesta es como material empacado dentro de reactores biológicos para la producción de plasmina o como componente de sensores para la detección de coágulos de sangre o plasminógeno en medio acuoso.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) VS. Maria de la Luz, GS. Consuelo; History of Culture; Cengage Learning Editores; 2005, 54-57
- (2) M. Szycher; Biocompatible polymers, metals and composites. USA; Technomics Publication. Co. Inc.; 1983, 156-170
- (3) H.T. Spijker, R. Graaff, P.W. Boonstra, H.J. Busscher, W. van Oeveren; On the influence of flow conditions and wettability on blood material interactions; Biomaterials 24 (2003) 4717-4727
- (4) LF. Brass; Hematology. Basic principles and practice; Churcill Livingstone; 1991; 1176-1197
- (5) A. Banerjee, Y. Chisti, U.C. Banerjee; Streptokinase—a clinically useful thrombolytic agent; Biotechnology Advances 22 (2004) 287-307
- (6) D. Collen D, DC. Stump, HK. Gold; Thrombolytic therapy; Annual Review of Medicine 39 (1988) 405- 23
- (7) Castellino, J. Francis, Sodetz, M. James; Methods in Enzymology 45 (1977) 244-257
- (8) Goodman, S. Louis, Gillman, Alfred; The Pharmacological Basis of Therapeutics; Macmillan publishing Co. Inc. New York; 1995, 5th edition; 956,1364,1365
- (9) SD. Bruck; Properties of Biomaterials in The Physiological Environment; CRC Press, Inc.; 1980; 23
- (10) FJ. Castellino; Recent advances in the chemistry of the fibrinolytic system; Chemical Reviews 81 (1981) 431- 446
- (11) FJ. Castellino; Biochemistry of human-plasminogen; Seminars in Thrombosis and Hemostasis 10 (1984) 18 - 23
- (12) CW. Francis, VJ. Marder; Fibrinolytic therapy for venous thrombosis; Progress in Cardiovascular Diseases 34(3) (1991) 193-204
- (13) J. Ricci, H. Alexander, Parsons, J. R. & Gona; Dynamics of tendon cell growth on synthetic fiber materials in vitro. 2nd World

- Congress on Biomaterials, Washington, D.C.; ed. James M. Anderson; 1984, 298
- (14) SF. Bowen, JA. Dyer; A silicone rubber tendon for extraocular muscle; *Investigative Ophthalmology* 1 (1962) 4
 - (15) AC. Gyton; *Textbook of Medical Physiology*, Philadelphia; ed. W.B. Saunders Co.; 1971, 140
 - (16) SD. Bruck; *Properties of Biomaterials in the Physiological Environment*, Florida; CRC Press, Inc.; 1980, 23
 - (17) HL. Nossell, GD. Wilneer, EC. LeRoy; Importance of polar groups for initiating blood coagulation and aggregating platelets; *Nature* 221 (1969) 75
 - (18) JF. Mustard, MA. Packham; Platelet Function and Myocardial Infarction in *Research on Acute Myocardial Infarction*, American Heart Association, New York; ed. S. Bondurant; 1969, IV20-IV30
 - (19) SA. Jimenez, PL. Kronick; Simultaneous aggregation and release from platelets monitored continuously in plasma; *Thrombosis Research* 9 (1976) 553-563
 - (20) EF. Bernstein; Certain aspects of blood interfacial phenomena – red blood cells; *Federation Proceedings* 30 (1971) 1510-1515
 - (21) B. Kusserow, R. Larrow, J. Nichols; Perfusion- and surface-induced injury to leucocytes; *Federation Proceedings* 30 (1971) 1516-1520
 - (22) V. Buonassisi; Sulfated mucopolysaccharides synthesis and secretion in endothelial cell cultures; *Experimental Cell Research* 76 (1973) 363-368
 - (23) EA. Jaffe, LW. Hoyer, R. Nachma; Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured endothelial cells; *Clinical Investigation* 52 (1973) 2757-2764
 - (24) AM. Dosne, E. Dupuy, E. Bodevin; Production of a fibrinolytic inhibitor by cultured endothelial cells derived from human umbilical vein; *Thrombosis Research* 12 (1978) 377-387

- (25) MW. Mosesson, RA Umfleet; The cold-insoluble globulin of human plasma. I. Purification, primary characterization and relationships to fibrinogen and other cold-insoluble fraction components; *Journal of Biological* 245 (1970) 5728-5736
- (26) KM. Yamada, K. Olden; Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood; *Nature* 275 (1978) 179-184
- (27) P. Bornstein, D. Duksin, G. Balian, JH. Davidson, E. Crouch; Organization of extracellular proteins on the connective tissue cell surface: relevance to cell-matrix interactions in vitro and in vivo; *Annals o the New York Academy of Sciences* 312 (1978) 93-101
- (28) DF. Mosher; Blood coagulation and fibrinolysis: an overview; *Clinical Cardiology* 13 VI (1990) 5-11
- (29) J. Henkin, P. Marcotte, H. Yang; The plasminogen-plasmin system; *Progress in Cardiovascular Disease* 2 (1991) 135-164
- (30) CP. Ponting, JM. Marshall, SA. Cederholm-Williams; Plasminogen: a structural review; *Blood Coagulation Fibrin* 3 (1992) 605-614
- (31) F. Bachmann, AL. Bloom, CD. Forbes, DP Thomas; Molecular aspects of plasminogen, plasminogen activators and plasmin. In: *Hemostasis and Thrombosis*, Churchill Livingstone, Edinburgh; ed. Tuddenham EGD, 1994, 575-613
- (32) W. Nieuwenhuizen, DW. Traas; A rapid and simple method for the separation of four molecular forms of human plasminogen; *Thromb Haemostas* 61 (1989) 208-219
- (33) HL. Wu, BI. Chang, DH. Wu, et al; Interaction of plasminogen and fibrin in plasminogen activation; *Journal of Biological Chemistry* 32 (1990) 19658-19664
- (34) JC. Fredenburgh, ME. Nesheim; Lys-plasminogen is a significant intermediate in the activation of Glu-plasminogen during fibrinolysis in vitro; *Journal of Biological Chemistry* 36 (1992) 26150-26156

- (35) S. Stack, M. Gonzales-Gronow, SV. Pizzo; The effect of divalent cations of the conformation and function of human plasminogen; Archives of biochemistry and of Biophysics 284 (1991) 58-62
- (36) M. Mayer; Biochemical and biological aspects of the plasminogen activation system; Clinical Biochemistry 23 (1990) 197-211
- (37) D. Collen, HR. Lijnen; Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis; Blood 12 (1991) 3114-3124
- (38) DB. Baruah, N. Rajendra, MR. Chaudhari, SS. Kadam; Plasminogen activators: A comparison; Vascular Pharmacology 44 (2006) 1 – 9
- (39) J. Henkin, P. Marcotte, H. Yang; The plasminogen-plasmin system. Progress in Cardiovascular Disease 2 (1991) 135-164
- (40) DW. Clegg, AA. Collyer; Irradiation Effects on Polymers; Elsevier applied science; 1991; 2-3
- (41) Navarrete Manuel, Luís Cabrera; Introducción al Estudio de los Radioisótopos; UNAM; 1993; 56-58
- (42) JW. Spinks, RJ. Woods; An introduction to Radiation Chemistry; John Wiley and Sons; 1964; 9-27
- (43) Benson, Sidney: The Foundation of Chemical Kinetics; 1960; McGraw-Hill; 6-8, 599-611
- (44) A. Ever, B. Emilio, B. Guillermina, L. Gabriel; Radiation Grafting of N-Isopropylacrylamide onto Poly(vinyl chloride) tubes by Gamma Irradiation; Polymer Bulletin 58 (2007) 401–409
- (45) SV. Pizzo; Preparation, in vivo properties and proposed clinical use of polyoxyethylene-modified tissue plasminogen activator and streptokinase; Advanced Drug Delivery Reviews 6 (1991) 153-166
- (46) KC. Robbins, S. Louis, CW. Robert; Human Plasmin; Methods in Enzymology 80 (1981) 379-387.

GLOSARIO

Acelerador.- Equipo mediante el cual se le imprime una determinada energía cinética a conjuntos de partículas (cargadas o iones) por medio de campos eléctricos y/o magnéticos, con objeto de seleccionarlos y dirigidos a blancos específicos.

Actividad (o radiactividad).- Fenómeno que presentan los núcleos atómicos inestables que tienden a un estado de estabilidad mediante la emisión de partículas con masa y carga, o radiación electromagnética característica, sin masa ni carga, teniendo lugar un intercambio de energía al mismo tiempo.

Aniquilación.- Es el choque entre una partícula y su antipartícula originando rayos gamma. La aniquilación positrón-electrón es la forma más observada de aniquilación. La energía resultante puede dar origen a nuevos pares partícula-antipartícula, los que a su vez, pueden volver a aniquilarse o decaer.

Átomo.- (Del latín atomum, y éste del griego άτομον, indivisible) es la unidad más pequeña de un elemento químico que mantiene su identidad o sus propiedades y que no es posible dividir mediante procesos químicos.

Capa hemirreductora.- Se puede definir como el grueso de absorbedor necesario para reducir la intensidad inicial de la radiación a la mitad.

Captura electrónica.- La captura electrónica es un tipo de desintegración beta. En este proceso un electrón de un átomo, normalmente de la capa K, se combina con un protón del núcleo y forma un neutrón y un neutrino.

Coefficiente de absorción.- El coeficiente de absorción o de atenuación se define como el cociente entre la energía incidente y la energía absorbida

por una superficie o sustancia. Normalmente, se expresa en una escala de 0 a 1.

Conversión interna.- Proceso por el cual un rayo gamma originado en el núcleo de un átomo comunica su energía a un electrón del mismo átomo, mismo que es emitido con una energía igual a la diferencia de energía de la radiación electromagnética menos la energía orbital del electrón.

Constante de Michaelis.- la constante de Michaelis-Menten es característica de una enzima y particular para un sustrato. Refleja la afinidad de la enzima por ese sustrato. K_m es numéricamente igual a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la V_{max} ($K_m = V_{max}/2$). Este parámetro, K_m no varía con la concentración de enzima.

Decaimiento radiactivo.- Proceso en el cual el núcleo de los átomos se escinde (fisión) liberando energía en forma de radiación alfa, beta o gamma.

Efecto Compton.- Consiste en el aumento de la longitud de onda de un fotón de rayos X, cuando choca con un electrón libre y pierde parte de su energía. La frecuencia o la longitud de onda de la radiación dispersada depende únicamente de la dirección de dispersión

Efecto fotoeléctrico.- Consiste en la aparición de una corriente eléctrica en ciertos materiales cuando éstos se ven iluminados por radiación electromagnética.

Electrón.- El electrón (Del griego elektron, ámbar), comunmente representado como e^-) es una partícula subatómica. En un átomo los electrones rodean el núcleo, compuesto de protones y neutrones. Dado

que los electrones de las capas más externas de un átomo definen las atracciones con otros átomos, éstas partículas desempeñan un papel primordial en la química.

Electrones Auger.- Son electrones expelidos del átomo como consecuencia del choque entre un rayo X generado por capas internas del mismo átomo y dicho electrón.

Electrones por conversión.- Son electrones expelidos del átomo como consecuencia de haber sido impactados por un rayo gamma, generado por el núcleo del mismo átomo.

Elemento.- Se conoce como un material constituido por el mismo tipo de átomos.

Gray.- Unidad radiobiológica del Sistema Internacional de Unidades que, mide la dosis de radiación ionizante absorbida por un ser vivo. Se abrevia Gy. $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Julio de energía ionizante absorbida por un kilogramo de tejido orgánico irradiado}$. Esta unidad fue creada en 1975 en honor al físico Louis Harold Gray.

Isótopo.- (Del griego isos, mismo, y topos, lugar, debido a que ocupan el mismo lugar en la Tabla periódica de los elementos). Se denominan isótopos a los núcleos atómicos con el mismo número de protones pero con distinto número de neutrones. Dos isótopos por tanto corresponden al mismo elemento químico, pero tienen un peso atómico distinto. En la nomenclatura científica, los isótopos se denotan por el nombre del elemento correspondiente, seguido por el número másico, separado habitualmente por un guión, aunque algunos de ellos poseen nombres especiales. Así: hidrógeno-3 o tritio, carbono-12, carbono-14, uranio-238,

etc. En forma simbólica, el número de nucleones se añade como superíndice a la izquierda del símbolo químico: ^3H , ^{12}C , ^{14}C , ^{238}U .

Neutrón.- Partícula sin carga con masa igual a 1.008668 u.m.a. contenida en el núcleo del átomo, cuyo número sumado al número atómico determina el número de masa.

Núcleo atómico.- El núcleo atómico es la parte central de un átomo, donde se concentra prácticamente la totalidad de su masa. Está formado por protones y neutrones que se mantienen unidos por medio de la interacción nuclear fuerte. La cantidad de protones en el mismo determina el elemento químico al que pertenece.

Número atómico.- El número atómico es el número de protones en un núcleo atómico. Se suele representar con la letra Z.

Par iónico.- Conjunto formado por el ión positivo remanente y el electrón orbital lanzado del átomo cuando radiación nuclear interacciona con este último al atravesar la materia.

Partículas alfa.- Las partículas o rayos alfa (α) no son más que núcleos totalmente ionizados de Helio-4 (^4He), es decir, sin su envoltura de electrones correspondiente. Estos núcleos están formados por dos protones y dos neutrones. Al carecer de electrones, su carga eléctrica es positiva, de +2qe de carga, mientras que su masa es de 4 uma

Partículas beta.- Es un electrón que sale despedido de un suceso radiactivo. Si un átomo emite una partícula beta, su número atómico aumenta en una unidad y el número de masa no varía.

Producción de pares.- Proceso mediante el cual un rayo gamma da origen a un electrón y un positrón con una energía cinética igual al exceso de energía del rayo gamma sobre 1.02 MeV.

Protón.- (Del griego proton = primero) es una partícula subatómica con una carga eléctrica de una unidad fundamental positiva ($1,602 \times 10^{-19}$ culombios) y una masa de $938,3 \text{ MeV}/c^2$ ($1,6726 \times 10^{-27} \text{ kg}$), o, del mismo modo, unas 1836 veces la masa de un electrón

Rayos X.- Radiación descubierta por Wilhelm Röntgen a finales del S. XIX, invisible, capaz de atravesar cuerpos opacos y de impresionar las películas fotográficas. Es una radiación electromagnética de la misma naturaleza que las ondas de radio, las microondas, los rayos infrarrojos, la luz visible, los rayos ultravioleta y los rayos gamma. La diferencia fundamental con los rayos gamma es su origen: los rayos X surgen de fenómenos extranucleares, a nivel de la órbita electrónica, fundamentalmente producidos por un detenimiento abrupto de electrones.

Rayos gamma.- La radiación gamma (γ) es un tipo de radiación electromagnética producida generalmente por elementos radiactivos, procesos subatómicos. Los rayos gamma se producen en la desexcitación de un nucleón de un nivel excitado a otro de menor energía y en la desintegración de isótopos radiactivos.

Vida media.- La vida media representa el promedio de vida de un núcleo antes de desintegrarse. Ya que la desintegración nuclear sigue unas leyes estadísticas, no se puede establecer que un determinado núcleo vaya a tardar ese tiempo en desintegrarse.

Radiation grafting of poly(ethylene glycol) methacrylate onto poly(vinyl chloride) tubes

EVER ARENAS¹, EMILIO BUCIO^{1,*}, GUILLERMINA BURILLO¹
and GABRIEL P. LOPEZ²

¹ *Departamento de Química de Radiaciones y Radioquímica, Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, A. Postal 70-543, 04510 México, D.F., Mexico*

² *Center for Biomedical Engineering, Department of Chemical and Nuclear Engineering, University of New Mexico, Albuquerque NM 87131, USA*

Abstract—Poly(ethylene glycol)methacrylate (PEGMA) was grafted onto poly(vinyl chloride) (PVC) tubes by pre-irradiation in presence of air using a gamma-ray source. The effects of monomer concentration, pre-irradiation dose from 5 to 150 kGy, dose rate, reaction time between 4 and 24 h, and reaction temperature were investigated. Highest grafting degree obtained was 14%. The grafting process was characterized by FTIR spectroscopy, differential scanning calorimetry, thermogravimetric analysis, swelling and water contact angle.

Keywords: Poly(ethylene glycol)methacrylate (PEGMA); poly(vinyl chloride) (PVC); grafting; gamma-ray.

1. INTRODUCTION

Radiation grafting of PVC with different monomers has some advantages compared to conventional grafting methods and has been a well-known process for many years [1, 2]. Over the last two decades, research in biomaterials science and engineering has led to the development of numerous polymeric materials and alloys for biomedical applications. Biomaterials application involves the creation of at least one interface between the material itself and the biological environment. Thus, interfacial interactions of polymers with proteins in biological fluids, plasma proteins and platelets are the basic consideration in establishing the biocompatibility and blood compatibility of polymers [3, 4]. When such surfaces are placed in direct

*To whom correspondence should be addressed. Tel.: (52-55) 5622-4674; Fax: (52-55) 5616-2233; e-mail: ebucio@nucleares.unam.mx

contact with a biological system such as blood, cells and tissues, the adsorption of proteins will occur in less than a minute, forming a complex protein coating. The adsorption of protein and attachment of biological components will usually trigger a subsequent series of mostly adverse biological reactions toward the polymeric materials [5]. Increasing hydrophilicity is believed to be a useful method for improving blood compatibility, and various polymer materials have been modified by water-soluble polymer for biomedical use such as poly(ethylene glycol) (PEG) or poly(ethylene oxide) (PEO) that can prevent plasma protein adsorption, platelet adhesion, and thrombus formation by the steric repulsion mechanism. Steric repulsion by surface-bound water-soluble polymer chains occurs as a result of overlapping polymer layers that could lead to loss in configurational entropy because of volume restriction and/or osmotic repulsion between inter-digitized polymer chains [6, 7]. The grafting method needs free radicals or peroxides to modify the surface of polymers. The production of these initiation species is possible by UV, plasma and chemicals. Radiation-induced grafting is one of the effective methods because of its rapid and uniform creation of active radical sites on the existing polymer matrix. Synthesizing blood-compatible materials by radiation has often been done using γ -rays or electron beams to graft hydrophilic monomers onto substrates [8, 9]. Here, we describe a procedure for the PEG methacrylate (PEGMA) grafted onto poly(vinyl chloride) (PVC) tubes (Fig. 1). We investigated different parameters of PVC tubes modification including reaction time, reaction temperature, concentration, dose rate and pre-irradiation dose.

2. EXPERIMENTAL

PVC tubes were irradiated with a ^{60}Co gamma source (Gammabeam 651 PT, Nordion International) with an activity of 22×10^3 Ci, in the presence of air by pre-irradiation method, at room temperature, dose rate from 1.3 to 2.7 kGy/h and pre-irradiation dose between 5 and 150 kGy. The irradiated PVC tubes were placed in glass ampoules which contained aqueous solutions at two different PEGMA monomer concentrations (0.3 and 0.5 mol/l), the ampoules were sealed off in vacuum after degassing by repeated freeze/thaw cycles. Reaction temperatures were 50 and 60°C, at reaction times between 4 and 24 h. The grafting reaction (Fig. 1) was conducted by placing the ampoules in a water bath set at the relevant temperature. After the grafting reaction, grafted tubes were taken out from the monomer solution in a glass ampoule and washed with distilled water to remove the remaining homopolymer. The degree of grafting was determined by the following equation:

$$\text{Grafting (\%)} = ((W_g - W_0) / W_0) \times 100,$$

where W_g and W_0 are the weights of the PVC grafted and starting PVC tubes, respectively.

PVC grafted tubes were studied by Infrared absorption spectra from a Perkin-Elmer PARAGON 500 Fourier transform infrared (FT-IR) spectrophotometer

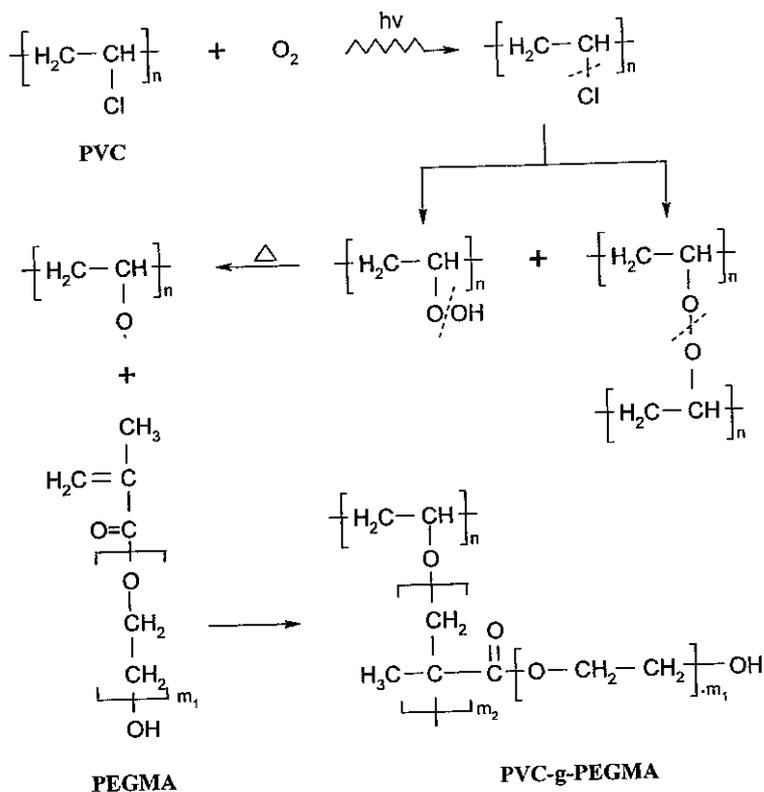


Figure 1. Grafting of PEGMA onto PVC tubes.

equipped with an attenuated total reflection (ATR) sample holder. For each spectrum a total of 16 scans were obtained. The control and modified PVC tubes surfaces were characterized by contact angle measurements. The contact angle was measured using the sessile-drop method with an optical contact angle Krüss DSA100 Drop Shape Analysis System. The measurements of the contact angle for various samples were carried out at room temperature, 1 min after deposition on the tubes. Water drops were deposited onto the graft PVC tubes surface, and the direct microscopic measurement of the contact angles. Differential scanning calorimetry was performed using a DSC 2010 calorimeter (TA Instruments, USA). The decomposition temperatures were determined in argon atmosphere by thermogravimetric analysis, in a TGA Q50 (TA Instruments). For determination of equilibrium water absorbency, the samples were immersed into distilled water for different periods of time. The excess of solution on the PVC surface was wiped off by filter paper, and the swollen samples were weighted. The swelling % was determined by the equation:

$$\text{Swelling (\%)} = ((W_s - W_d) / W_d) \times 100,$$

where W_s and W_d are swelling and dry tubes, respectively.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2 shows the influence of the reaction time on the grafting yield of PEGMA onto PVC in aqueous solution by pre-irradiation method; it shows typical conversion curves obtained when heating an irradiated film in different systems; graft increase efficacy with reaction times up to 24 h; after this time graft yield was constant, because the peroxides formed by pre-irradiation in air produced radicals and reacted with the monomer; the maximum graft percentage obtained in these conditions was 8%.

Figure 3 shows the grafting percentage of PEGMA onto PVC tubes, as a function of pre-irradiation dose, at two different dose rates, 1.3 and 2.7 kGy/h. At low doses the concentration of peroxides rises proportionately with dose, and the curves level off at about 40 kGy, higher dose rates favor the graft yield, because of the increase on the number of radicals.

Figure 4 shows the grafting percentage as a function of pre-irradiation dose at two grafting temperatures, 50 and 60°C. The influence of the reaction temperature on the kinetics of the graft process is complex. A change in temperature affects various characteristic processes in grafting; for example, an increase in temperature increase the rate of initiation, which tends to reduce the length of the chains, but also the temperature affects the rate of diffusion of the monomer and the compatibility of various phases [10], and enhances the mobility of macroradicals. In this case 60°C was the optimal temperature.

Figure 5 shows the grafting percentage as a function of pre-irradiation dose at two different concentrations; the concentration of the monomer in the reacting medium changes during the reaction, the monomer diffuses continuously from one phase

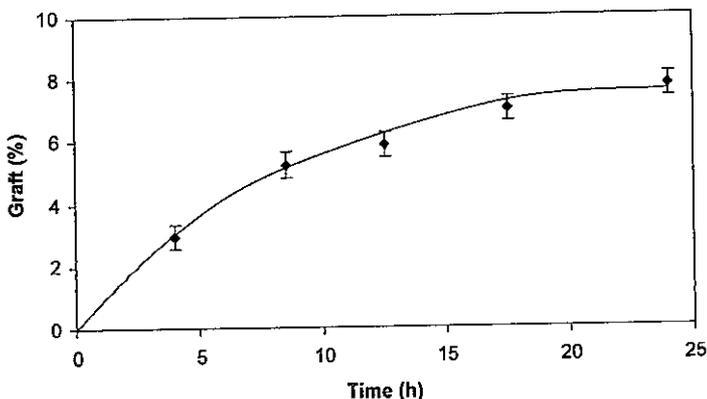


Figure 2. Grafting yield of PEGMA onto PVC tubes with increasing reaction time. Monomer concentration 0.5 mol/l, reaction temperature 60°C, dose rate 2.7 kGy/h, pre-irradiation dose 20 kGy.

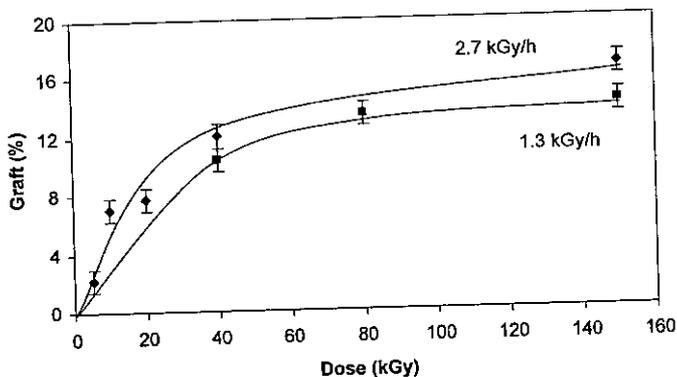


Figure 3. Grafting yield of PEGMA onto PVC tubes as a function of pre-irradiation dose, at different dose rates. Monomer concentration 0.5 mol/l, reaction time 24 h, reaction temperature 60°C.

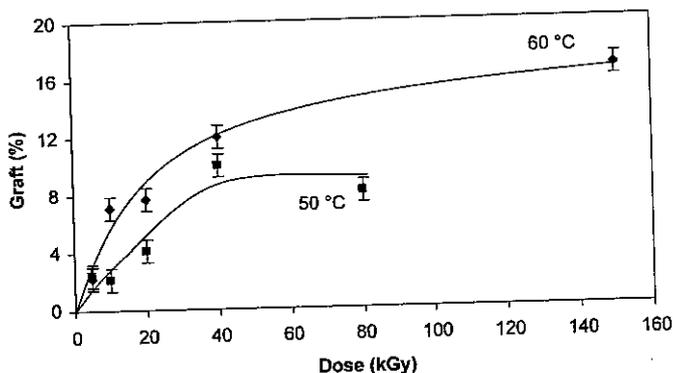


Figure 4. Grafting yield of PEGMA onto PVC tubes with increasing pre-irradiation dose, at different temperatures for 0.5 mol/l monomer concentration. Reaction time 24 h, dose rate 2.7 kGy/h.

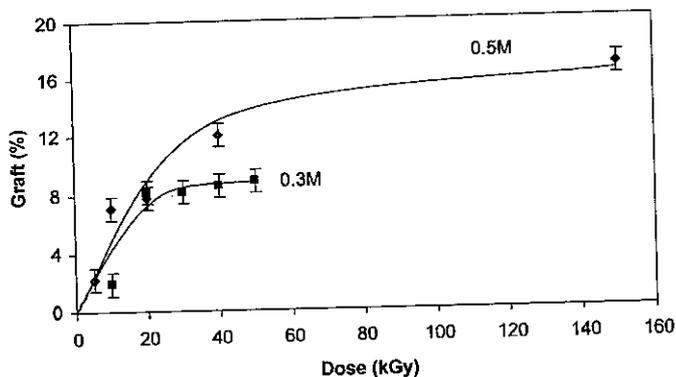


Figure 5. Grafting yield of PEGMA onto pre-irradiated PVC tubes as a function of pre-irradiation dose at different monomer concentrations. Reaction temperature 60°C, reaction time 24 h, dose rate 2.7 kGy/h.

to the other, to satisfy thermodynamic equilibrium. Higher initial concentration of monomer favors graft because the probability of side chain polymer formation.

The swelling kinetics of the PEGMA grafted onto PVC tubes immersed in water at room temperature was followed by gravimetry. Swelling of PVC and PVC-g-PEGMA at two different graft percentages is plotted in Fig. 6. Typical diffusion profiles of grafted tubes indicated that equilibrium is reached at 15 min. The swelling percentage increase with grafting yield because of hydrophilicity increase, from 1.4 and 6.9% swelling in tubes with 7.6 and 16.7% graft, respectively, PVC alone did not shows any swelling effect.

Figure 7 shows the variation of contact angle for different PEGMA graft percentages and PVC alone. Contact angle for PVC tube without grafting was 85.3° and PVC tubes from 2.1 to 12.0 graft percentage decrease water contact angle from 81.7 to 73.5° at pH 7 and 26.5°C. Contact angle decrease with graft percentage was due to the presence of hydrophilic polymer (PEGMA).

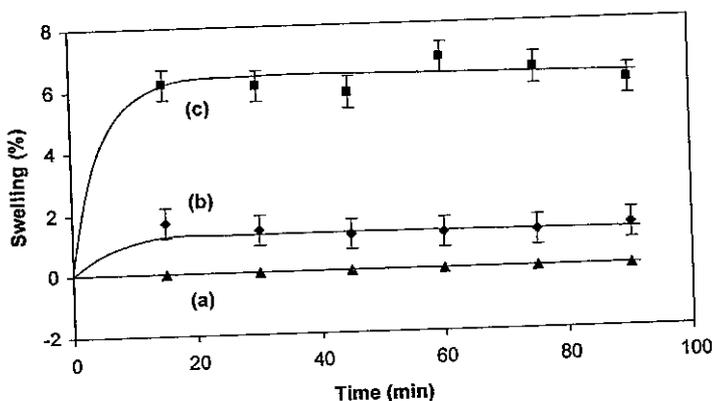


Figure 6. Swelling of (a) PVC alone, (b) PVC-g-PEGMA (7.6% graft) and (c) PVC-g-PEGMA (16.7% graft).

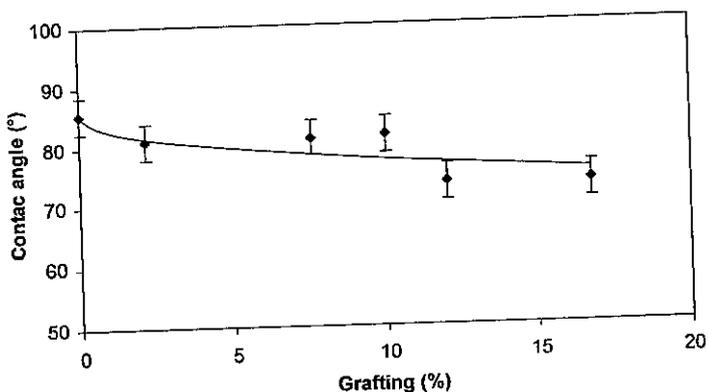


Figure 7. Contact angle of PEGMA grafted onto PVC tubes in water at 26°C and pH 7.

The ATR-FT-IR spectrum (Fig. 8) of starting and modified PVC tubes showed the following peaks. Tubes: CH_2 (2924 and 2859 cm^{-1}), CH-Cl (1459 and 1267 cm^{-1}); PEGMA: OH (3471 cm^{-1}), CH_3 (2865 and 1451 cm^{-1}), C=O (1714 cm^{-1}); PVC-g-PEGMA: OH (3426 cm^{-1}), CH_2 (2918 cm^{-1}), C=O (1727 cm^{-1}), CH_3 (2867 and 1453 cm^{-1}). This information confirmed graft polymerization of PEGMA onto PVC tubes.

Figure 9 shows thermal decomposition temperature in nitrogen atmosphere. PVC alone 244.6°C (10% loss) and 6.8% char yield (600°C); PEGMA 198.9°C (10% loss) and 0.6% char yield (600°C); PVC-g-PEGMA 236.9°C (10% loss) and 5.1% char yield (600°C). PEGMA presents the lower thermal resistance, but this polymer grafted in PVC increases the thermal resistance and shows a behavior similar to PVC.

Differential scanning calorimetry of commercial PVC tubes (Fig. 10) shows amorphous material, maybe due to the additives to process PVC tubes, PEGMA presented T_g at 167.6°C, lower than that in PVC-g-PEGMA (215.3°C), because the formation of a new material. It confirmed the modification of PVC tubes with PEGMA.

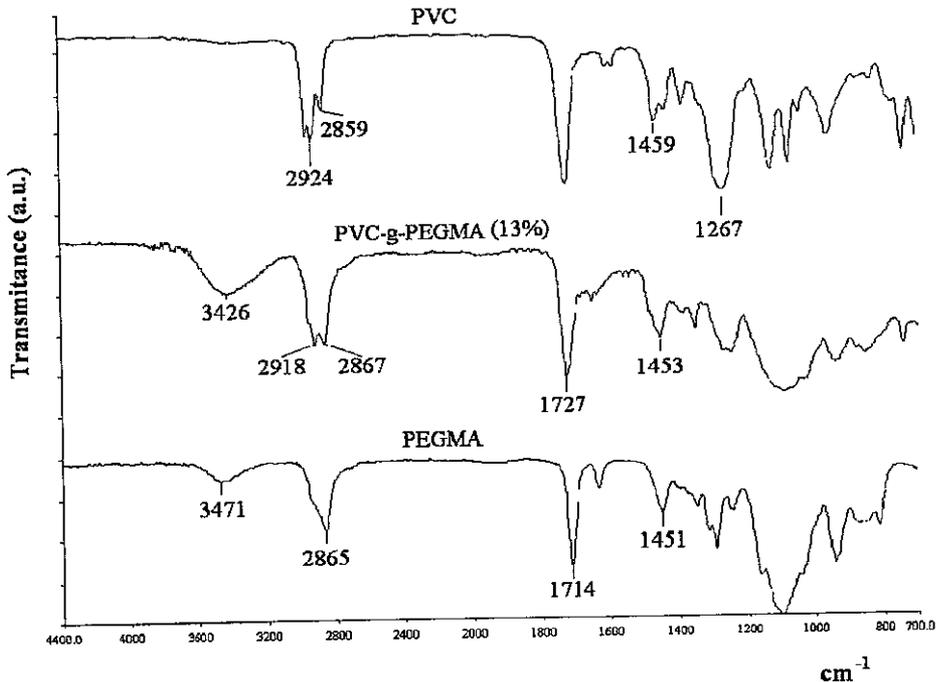


Figure 8. ATR-FT-IR spectra of the starting and modified: PVC tube, PVC-g-PEGMA 13% graft and PEGMA.

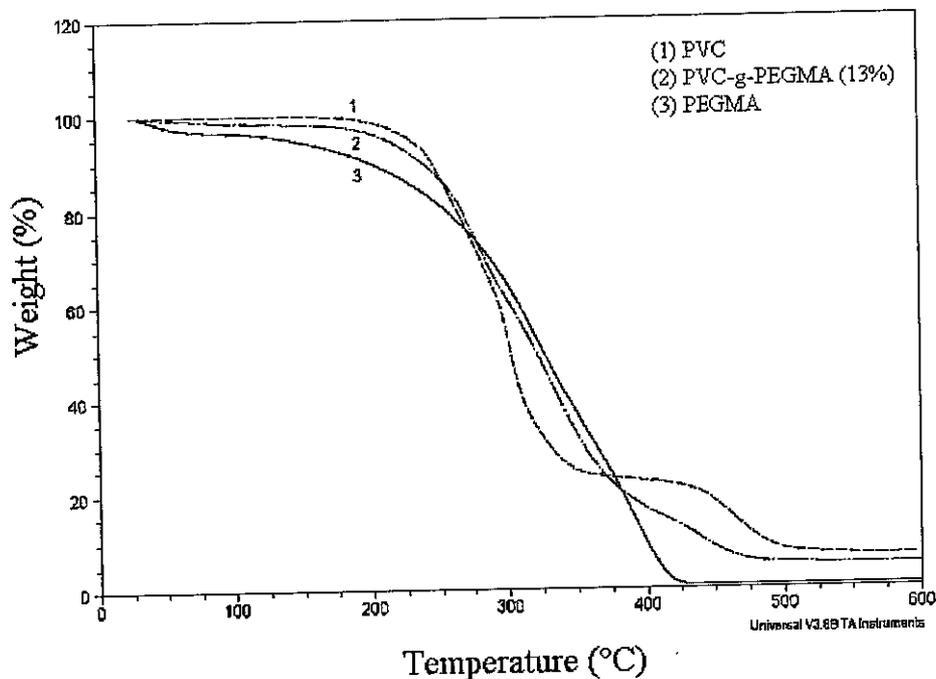


Figure 9. Thermogravimetric analysis (TGA) curves of PVC (1), PVC-g-PEGMA 13% graft (2) and PEGMA (3).

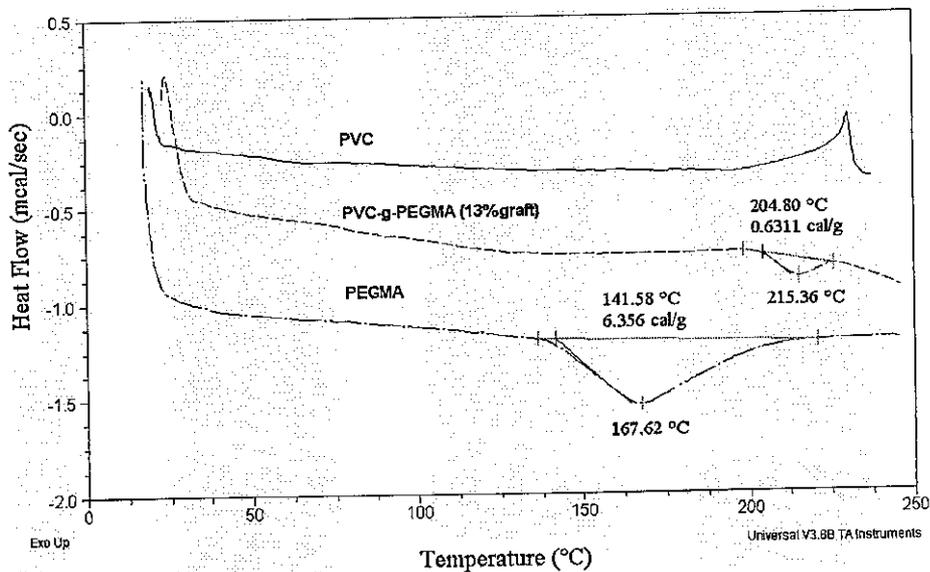


Figure 10. DSC curves of PVC alone, PVC-g-PEGMA 13% and PEGMA.

4. CONCLUSIONS

A new co-polymer of PVC-g-PEGMA has been prepared and characterized. The maximum grafting obtained was 14.2% at a concentration of 0.5 mol/l, reaction temperature 60°C, pre-irradiation dose 150 kGy and dose rate 2.7 kGy/h. At all grafting percentages the surface of the PVC tubes was homogeneously covered by PEGMA. The new co-polymer has T_g value at 215.3°C and exhibits moderate thermal stability. Decomposition temperature in argon was 245°C (10% loss). Grafting of PEGMA onto PVC tubes was confirmed by infrared spectroscopy. Contact angle indicated a more hydrophilic surface.

In the grafting onto peroxidized polymers, the rate of initiation is determined by the dose of pre-irradiation and the grafting temperature; these two parameters were well established in this paper.

Acknowledgements

The authors wish to express their thanks to Enrique Palacios from ICN-UNAM, for technical assistance. This work was financially supported by DGAPA-UNAM Grant IN200306 and the Office of Naval Research, USA.

REFERENCES

1. A. Bhattacharyya and B. N. Misra, *Prog. Polym. Sci.* **29**, 767 (2004).
2. A. Chapiro, *Radiation Chemistry of Polymeric Systems*. Wiley-Interscience, New York, NY (1962).
3. L. Costa, V. Brunella, M. Paganini, S. Baccaro and A. Cecilia, *Nucl. Instr. Methods Phys. Res. B* **215**, 471 (2004).
4. D. Braun, *Prog. Polym. Sci.* **27**, 2171 (2002).
5. Y. Chen, E. T. Kang, K. G. Neoh, P. Wang and K. L. Tan, *Synth. Met.* **110**, 47 (2000).
6. K. Friese and F. Tannert, *Radiat. Phys. Chem.* **55**, 47 (1999).
7. S.-E. Park, Y.-C. Nho and H.-I. Kim, *Radiat. Phys. Chem.* **69**, 221 (2004).
8. Y.-C. Nho and O.-H. Kwon, *Radiat. Phys. Chem.* **66**, 299 (2003).
9. Y. Li, K. G. Neoh and E. T. Kang, *Polymer* **45**, 8779 (2004).
10. F. Zhang, E. T. Kang, K. G. Neoh, P. Wang and K. L. Tan, *Biomaterials* **22**, 1541 (2001).
11. C. Mao, Y. Qiu, H. Sang, H. Mei, A. Zhu, J. Shen and S. Lin, *Adv. Colloid Interface Sci.* **110**, 5 (2004).
12. O. H. Kwon, Y. C. Nho, K. D. Park and Y. H. Kim, *J. Appl. Polym. Sci.* **71**, 631 (1999).
13. Y. Chen, L. Chen, H. Nie, E. T. Kang and R. H. Vora, *Mater. Chem. Phys.* **94**, 195 (2005).