

SEP

SES

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



**Instituto Tecnológico de Tijuana
Centro de Graduados e Investigación en Química**

TESIS

**“ANDAMIOS DE POLISACÁRIDO GENÉTICAMENTE
ACTIVADOS CON POLICOMPLEJOS DE ADN A BASE DE
N, N, N-TRIMETILQUITOSANO PARA INGENIERÍA DE
TEJIDOS Y MEDICINA REGENERATIVA”**

Presentado por
I.B.M Anayanci Mendoza Villicaña

Para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN QUÍMICA

Director de tesis
Dr. Manuel Alatorre Meda
Co-directora de tesis
Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez

TIJUANA, B. C.

MARZO DE 2024



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, 19/febrero/2024
Oficio No. 35/CG/2024
Asunto: Se autoriza impresión de trabajo de tesis

GUADALUPE HERNÁNDEZ ESCOBEDO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE

Los que suscriben tienen a bien informar que el manuscrito de tesis titulado "Andamios de polisacárido genéticamente activados con policomplejos de ADN a base de N, N, N-trimetilquitosano para ingeniería de tejidos y medicina regenerativa", presentado por la C. Anayanci Mendoza Villicaña, (con número de control M22210008), cumple con los requisitos de calidad y formato para tesis de Maestría en Ciencias en Química. Por consiguiente, se aprueba y autoriza al interesado para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE


DR. MANUEL ALATORRE MEDA
Presidente


DR. VALENTÍN MIRANDA SOTO
Secretario del Jurado


DR. IGNACIO ALFREDO RIVERO ESPEJEL
Vocal del Jurado

C.p. Oficina de Titulación
C.p. Expediente



Calzada del Tecnológico 12950 esquina Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzin,
Fracc. Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400
dir_tijuana@tecnm.mx | tecnm.mx | tijuana.tecnm.mx



2024
Felipe Carrillo
DIRECTOR

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, 01/marzo/2024
Oficio No. 027/DEPI/2024
Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

MARÍA MAGDALENA SERRANO ORTEGA
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE

En lo referente al trabajo de tesis, "Andamios de polisacárido genéticamente activados con policomplejos de ADN a base de N, N, N-trimetilquitosano para ingeniería de tejidos y medicina regenerativa". Presentado por C. Anayanci Mendoza Villicaña, alumna de la Maestría en Ciencias en Química con número de control M22210008; informo a usted que a solicitud del comité de tutorial, tengo a bien Autorizar la Impresión de Tesis, atendiendo las disposiciones de los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado del Tecnológico Nacional de México.

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica
Por una Juventud Integrada al Desarrollo de México



GUADALUPE HERNÁNDEZ ESCOBEDO
JEFE DE DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ccp. Archivo
GHE/lzp



Calzada del Tecnológico 12950 esquina Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzin,
Fracc. Tomás Aquino C.P. 22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400
dir_tijuana@tecnm.mx | tecnm.mx | tijuana.tecnm.mx





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tijuana

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TIJUANA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Tijuana, B.C. del 29 de enero del 2024, la C.Anayanci Mendoza Villicaña alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Química con número de control M22210008, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Manuel Alatorre Meda y de la Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez; y ceden los derechos del trabajo titulado “Andamios de polisacárido genéticamente activados con policomplejos de ADN a base de N, N, N-trimetilquitosano para ingeniería de tejidos y medicina regenerativa” al Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico Tijuana para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, figuras, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico: manuel.alatorre@tectijuana.edu.mx y eustolia.rodriguez@uabc.edu.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Anayanci M.V

Anayanci Mendoza Villicaña



Calzada del Tecnológico 12950 esquina Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzin,
Fracc. Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400
dir_tijuana@tecnm.mx | tecnm.mx | tijuana.tecnm.mx



DEDICATORIAS

Tener a padres que, desde que tengo memoria, han estado ahí incondicionalmente, preocupándose por mí, nutriéndome con amor, compartiendo historias, y saliendo valientemente de su zona de confort para acompañarme en mis locuras, es un auténtico privilegio. No puedo expresar lo agradecida que estoy por el mar de coincidencias que debieron alinearse en este vasto universo para que yo pudiera ser bendecida con padres como ustedes. Mi existencia está tejida con los hilos de su cariño y dedicación. No solo estoy aquí físicamente, sino que también soy quien soy gracias a la guía, el apoyo y el amor inquebrantable que me han brindado. No hay palabras suficientes para expresar mi gratitud. Gracias por ser los pilares que sostienen mi mundo.

Le dedico esta tesis a papá y mamá

Laura Villicaña García

Baldomero Mendoza Navarrete

CONTENIDO

CARTA DE LIBERACIÓN DE TESIS	I
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN	II
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIAS	IV
CONTENIDO	VII
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	VIII
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABLAS	XIII
AGRADECIMIENTOS	XIV
RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES	XV
RESUMEN	XVI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	3
2.1. Justificación	3
2.2. Objetivo General	3
2.3. Objetivos específicos	3
III. TEORÍA GENERAL	4
3.1. Introducción a la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos	4
3.1.1. Biomateriales	5
3.1.2. Terapia génica	7
3.2. Vectores genéticos virales y no virales	7
3.3. Quitosano y N,N,N-trimetilquitosano como vectores genéticos	10

3.4. Andamios genéticamente activados para la regeneración de cartílago articular	12
IV. HIPÓTESIS	15
V. EXPERIMENTAL	16
5.1. Metodología	16
5.1.1. Síntesis N,N,N-trimetilquitosano	16
5.1.2. Síntesis policomplejos TMQ/ADN	18
5.1.3. Síntesis de andamios ALG/GELAT	19
5.2. Caracterización	20
5.2.1. Caracterización N,N,N-trimetilquitosano	20
5.2.2. Caracterización fisicoquímica de los policomplejos TMQ/ADN Y QT/ADN	21
5.2.3. Estudios de compactación de los policomplejos TMQ/ADN Y QT/ADN	22
5.2.4. Eficiencia de cargado y asociación de los policomplejos TMQ/ADN Y QT/ADN	22
5.2.5. Caracterización fisicoquímica de los andamios ALG/GELAT	23
5.2.6. Pruebas de hinchamiento de los andamios ALG/GELAT	24
5.2.7. Prueba de retención de líquido de los andamios ALG/GELAT	24
5.2.8. Pruebas de degradación enzimática de los andamios ALG/GELAT	24
5.2.9. Evaluación mecánica de los andamios ALG/GELAT	25
5.2.10. Liberación de ADN de los policomplejos TMQ/ADN y QT/ADN	26
5.2.11. Liberación de ADN de los policomplejos TMQ/ADN y QT ADN cargados en los andamios ALG/GELAT	27
5.2.12. Análisis estadístico	27
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
6.1. Síntesis de N,N,N-trimetilquitosano	28
6.2. FTIR de los andamios ALG/GELAT	32
6.3. Dispersión de luz dinámica y potencial Z de los policomplejos QT/ADN	39

6.4. Electroforesis en gel de los policomplejos QT/ADN	43
6.5. Microscopía de fuerza atómica de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN	45
6.6. Eficiencia de cargado y asociación de los policomplejos QT/ADN	47
6.7. Microscopía óptica de los andamios ALG/GELAT	52
6.8. Pruebas de hinchamiento en los andamios ALG/GELAT	56
6.9. Pruebas de retención de agua en los andamios ALG/GELAT	58
6.10. Evaluación de la interconexión de los poros en los andamios ALG/GELAT	59
6.11. Pruebas de degradación enzimática	61
6.12. Pruebas mecánicas de los andamios ALG/GELAT	63
6.13. Pruebas de liberación de ADN de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN	71
6.14. Pruebas de liberación de ADN de los andamios genéticamente activados	73
VII. CONCLUSIONES	76

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- AFM: microscopía de fuerza atómica, por sus siglas en inglés
- AGA: andamios genéticamente activados
- ALG: alginato
- ADN: ácido desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés
- b(mim)Cl: cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio
- BIS-TRIS: 2-Bis(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
- DLS: dispersión de luz dinámica, por sus siglas en inglés
- DMC: dimetil carbonato
- DQ: porcentaje de cuaternización, por sus siglas en inglés
- ECM: matriz extracelular, por sus siglas en inglés
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- GELAT: gelatina
- GlcN: unidad de glucosamina
- GlcNAc: unidad de glucosamina acetilada
- GTA: glutaraldehído
- N/P: relación nitrógeno/fosfato
- NMP: N-metilpirrolidona
- POT Z: potencial Z

- QT: quitosano
- TERM: ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, por sus siglas en inglés
- TMQ: N,N,N-trimetilquitosano
- UV: luz ultravioleta
- VAP: método de entrecruzamiento con GTA en fase vapor
- WET: método de entrecruzamiento con GTA en fase líquida

LISTA DE FIGURAS

1. Sistema para formar ECM y regeneración de tejidos a partir de andamios y factores bioactivos.	6
2. Proceso de compactación y transfección de policomplejos polimerización/ADN.	9
3. Estructura química del QT.	10
4. Estructura química del TMQ.	11
5. Comparación esquemática de la inyección local de policomplejos de ADN con la administración basada en materiales para la terapia génica. . . .	12
6. Estructura química del TMQ con la posición de cada hidrógeno asignada.	21
7. Estructura química del QT con la posición de cada hidrógeno asignada.	21
8. Espectro de 1H RMN de quitosano.	28
9. Espectro de 1H RMN de N,N,N-trimetilquitosano 12 h de reacción, obtenido a partir de las condiciones 1.	29
10. Espectro de 1H RMN de N,N,N-trimetilquitosano 8 h de reacción, obtenido a partir de las condiciones 1.	30
11. Espectro de 1H RMN de N,N,N-trimetilquitosano 4 h de reacción, obtenido a partir de las condiciones 1.	30
12. Espectro de 1H RMN de N,N,N-trimetilquitosano 2 h de reacción, obtenido a partir de las condiciones 2.	32
13. Espectro FTIR del biopolímero ALG.	33
14. Estructura química del ALG.	33
15. Espectro FTIR del biopolímero GELAT.	35
16. Representación estructural de los grupos funcionales de la GELAT en el FTIR.	35
17. Espectro FTIR los andamios ALG/GELAT.	37
18. Representación estructural del andamio ALG/GELAT entrecruzado con $CaCl_2$ y GTA	38
19. Gráfico del diámetro hidrodinámico de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN a diferentes N/P.	40
20. Gráfico del POT Z de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN a diferentes N/P.	42

21. Ensayo de retardación en electroforesis en gel de los policomejos QT/ADN y TMQ/ADN	44
22. Imágenes obtenidas por AFM de una molécula de ADN	45
23. Imagen obtenida por AFM de los policomplejos QT/ADN con una N/P = 10 (a) y su perfil de topografía (b)	46
24. Imagen obtenida por AFM de los policomplejos TMQ/ADN con una N/P = 10 (a) y su perfil de topografía (b)	46
25. Espectros de absorbancia del ADN a 260 nm (a) y curva de calibración del ADN (b)	48
26. Espectros UV-Vis del ADN libre de soluciones de QT/ADN a diferentes N/P	50
27. Espectros UV-Vis del ADN libre de soluciones de TMQ/ADN a diferentes N/P	51
28. Fotografía del andamio CaCl ₂ con una magnificación de 4x teñido con cristal violeta	52
29. Fotografía del andamio CaCl ₂ con una magnificación de 4x teñido con rodamina	53
30. Fotografía del andamio VAP con una magnificación de 4x teñido con cristal violeta	54
31. Fotografía del andamio VAP con una magnificación de 4x teñido con rodamina	54
32. Fotografía del andamio WET con una magnificación de 4x teñido con cristal violeta	55
33. Fotografía del andamio VAP con una magnificación de 4x teñido con rodamina	55
34. Gráfica del porcentaje de hinchamiento a 12 h de los andamios ALG/GELAT_CaCl ₂ , ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET	57
35. Imagen secuencial de la adsorción y absorción de la solución de cristal violeta en el andamio CaCl ₂	59
36. Imagen secuencial de la adsorción y absorción de la solución de cristal violeta en el andamio ALG/GELAT_VAP	60

37. Imagen secuencial de la adsorción y absorción de la solución de cristal violeta en el andamio ALG/GELAT_WET	61
38. Gráfica de la degradación enzimática de 1 a 15 días de los andamios ALG/GELAT_CaCl ₂ , ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET.	62
39. Gráfica de esfuerzo contra deformación hasta el 80 % de los andamios ALG/GELAT_CaCl ₂ , ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET.	64
40. Gráfica de los valores del E correspondientes a los andamios ALG/GELAT_CaCl ₂ , ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET.	65
41. Gráfica de los valores de $*U_T$ correspondientes a los andamios ALG/GELAT_CaCl ₂ , ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET.	66
42. Imagen secuencial del efecto de los diferentes ciclos de compresión en los andamios ALG/GELAT en orden de arriba hacia abajo, ALG/GELAT_CaCl ₂ , ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET.	67
43. Gráficos correspondientes a las pruebas de fátiga de compresión en los andamios ALG/GELAT_CaCl ₂ y ALG/GELAT_VAP, y ALG/GELAT_WET.	69
44. Gráfica de esfuerzo contra deformación de la prueba de fatiga a 20 ciclos del andamio ALG/GELAT_WET.	70
45. Gráfica de los valores E de la prueba de fatiga a 20 ciclos del andamio ALG/GELAT_WET.	71
46. Gráfica de la liberación acumulada de ADN de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN.	72
47. Gráfica de la liberación acumulada de los AGA cargados con policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN	74

LISTA DE TABLAS

1.	Porcentaje de cuaternización en las diferentes muestras de TMQ	30
2.	Grupos funcionales característicos del ALG en el FTIR	34
3.	Grupos funcionales característicos de la GELAT en el FTIR	36
4.	Grupos funcionales característicos del ALG/GELAT en el FTIR	37
5.	Eficiencia de cargado y eficiencia de asociación de los policomplejos	
	QT/ADN y TMQ/ADN	52
6.	Hinchamiento de equilibrio de los andamios ALG/GELAT	58

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera podido realizarse sin la ayuda del Dr. Valentín Miranda, que amablemente me ha encaminado y aconsejado en la síntesis química, así como también prestarme su laboratorio para trabajar. Al Dr. Ignacio Rivero por sus entrañables consejos y apoyo con reactivos faltantes. Gracias al Dr. Julio Calva por su paciencia y ayuda para obtener las imágenes por AFM. Gracias al Dr. José Manuel Cornejo, por apoyarnos en la caracterización de los andamios por FTIR. Quisiera expresar un agradecimiento especial al Dr. Manuel Alatorre Meda y a la Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez por su apoyo invaluable y su guía fundamental en la realización de este proyecto. Estoy profundamente agradecida por la generosidad con la que compartieron su conocimiento y tiempo, haciendo posible la culminación exitosa de este proyecto. Gracias, Dr. Manuel Alatorre Meda y Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez, por ser guías excepcionales en este viaje significativo.

Agradezco al Dr. Carlos Vera, Dr. Luis Villareal y a la Dra. Yhadira Gochi, sus enseñanzas y apoyo tocaron fibras sensibles en mi consciente que me permitieron creer en mi, salir de mi zona de confort y buscar en la ciencia un refugio para desarrollarme tanto intelectualmente como creativamente, gracias por encaminarme.

A mi nina Claudia Villicaña y a mi tita Esther Garcia, su amor y apoyo incondicional siempre me han acompañado a lo largo de mi vida. No concibo ser la mujer que soy sin su influencia, las amo.

Quiero dedicar unas palabras especiales a Carlos Murga. Este camino ha estado lleno de desafíos y obstáculos, pero tu presencia ha sido la constante que iluminó mi sendero. En cada paso, en cada momento, estuviste a mi lado, brindándome un apoyo inquebrantable. Tu amor se convirtió en mi refugio diario, una fuente inagotable de fuerza que me impulsó a seguir adelante cuando las cosas se volvían difíciles. No solo compartiste mis alegrías, sino que también aliviaste mis penas con tu comprensión y ternura. Recuerdo con gratitud los días en los que dudaba de mis propias capacidades; en esos momentos, tú estabas ahí, alentándome a creer en mí misma. Cada palabra tuya recordándome que soy capaz de superar cualquier desafío. Te amo.

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

El trabajo experimental de la presente tesis fue llevado a cabo en el laboratorio de Cultivo Celular y Microscopia Confocal del Instituto Tecnológico de Tijuana.

La alumna Anayanci Mendoza Villicaña recibió una beca a través del programa de becas de para maestría por CONACyT, a la cual se le registro con el CVU: 1144398.

Los fondos económicos necesarios para financiar esta investigación fueron otorgados por CONACyT y la Secretaría de Educación Pública a través de los proyectos siguientes:

1. Biomateriales producidos a partir de polimeros naturales para tratamiento regenerativo de úlceras del pie diabético.

Patrocinador: CONACyT

Proyecto: PDCPN-2015-89

Responsable: Dr. Manuel Alatorre Meda

2. Síntesis y caracterización fisicoquímica/biológica de membranas readsorbibles a partir de polímeros naturales para el tratamiento regenerativo de lesiones periodontales irreversibles

Patrocinador: PRODEP

Proyecto: UABC-PTC-689

Responsable: Dra. Eustolia Rodríguez Velázquez

RESUMEN

En este documento se presenta la tesis correspondiente al periodo de 2022-2024. Se realizó la síntesis verde del compuesto N,N,N-trimetilquitosano (TMQ) utilizando al dimetil carbonato (DMC) como agente de metilación y al yodo metano (CH_3I). Con el fin de comparar su eficacia como vector génico con el quitosano (QT) en andamios genéticamente activados (AGA). Se realizaron los policomplejos de QT/ADN y TMQ/ADN, se estudiaron sus propiedades fisicoquímicas con el objetivo de determinar la relación nitrógeno/fosfato (N/P) en donde el vector génico compactara de manera eficiente el ADN y además fuera estable. Los AGAs se realizaron a partir de la combinación de dos biopolímeros; el alginato (ALG) y la gelatina (GELAT). Estos entrecruzaron con tres métodos diferentes utilizando cloruro de calcio (CaCl_2) y glutaraldehído (GTA) como agentes de entrecruzamiento. Aunque por síntesis verde se logró obtener QT con un porcentaje de cuaterización ($\% \text{DQ}$) de casi 10 % no fue soluble en agua, esto se atribuyó principalmente a la formación de metóxidos, por lo que fue necesario recurrir a otro tipo de síntesis con la cual se pudieron obtener $\% \text{DQ}$ más altos. Utilizando CH_3 se llegó a un $\% \text{DQ}$ de alrededor del 35 % el cual si fue soluble y por lo tanto, fue la metodología seleccionada para la obtención de TMQ. Por su parte, los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN mostraron que a partir de un $\text{N/P} \geq 3$ compactaban de manera eficiente al ADN y eran estables. Sin embargo, los policomplejos TMQ/ADN demostraron ser más compactos y actuar de manera más eficaz como vehículo material genético. Los tres diferentes métodos de entrecruzamiento dieron como resultado hidrogeles con diferentes características, tanto de captación de agua, retención de agua, porosidad, degradación y propiedades mecánicas. El hidrogel con mejores características para avanzar con los procesos posteriores de caracterización y pruebas celulares fue el entrecruzado con CaCl_2 y GTA en fase líquida.

I. INTRODUCCIÓN

El incremento en la expectativa de vida de la población resulta en un aumento proporcional en la incidencia de desórdenes músculo-esqueléticos, donde la artrosis es el que ocurre con mayor frecuencia. Esta es una enfermedad crónico-degenerativa que desgasta el cartílago. Afecta a tres de cada diez personas en el mundo y en México diez de cada cien personas mayores de 45 años la padecen.^{[1][2]} El cartílago articular es una estructura anatómica que sirve como soporte y protección contra el contacto de huesos contiguos, permitiendo su deslizamiento de manera suave. Al dañar el cartílago, la artrosis causa limitaciones en el movimiento de la articulación y mucho dolor. Algo que agrava la situación es que el cartílago no puede sanar por sí mismo o regenerarse.^[3]

Los tratamientos para los defectos en el cartílago incluyen alternativas farmacológicas y quirúrgicas. El enfoque farmacológico tiene como objetivo manejar el dolor. En el enfoque quirúrgico, los implantes mecánicos para el remplazo de rodilla son el tratamiento más común, pero estos no cuentan con las propiedades de los tejidos que pretenden sustituir y son incapaces de regenerar la estructura original del cartílago.^[4] Estas limitaciones han propiciado un gran progreso en el área de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (TERM, por sus siglas en inglés), la cual puede incluir tratamientos de terapia génica.^[1] Desde su conceptualización en 1970, la terapia génica ha tenido como objetivo entregar y liberar ácidos nucleicos en el ambiente intracelular para corregir o reemplazar un gen preexistente, modulando su expresión para lograr un efecto deseado.^{[5][6]} La terapia génica para reparar el cartílago tiene la finalidad de rescatar o activar los condrocitos saludables.^[4]

La entrega de genes involucra el empaquetamiento del material genético en vehículos llamados vectores o acarreadores. Estos se dividen en dos: virales y no virales. Los vectores no virales tienen un perfil superior de seguridad con una baja respuesta inmunológica, baja citotoxicidad, alta eficacia de cargado, etc.^[7] Para este proyecto se busca utilizar como vector no viral al polication TMQ.

El QT es un polisacárido catiónico, biocompatible y biodegradable, estudiado para aplicaciones farmacéuticas, biomédicas, cosméticas, etc. Su naturaleza catiónica le

permite interactuar electrostáticamente con material genético (de naturaleza aniónica) formando policomplejos.^{[8][9]} Debido a su valor de pKa de 6.5, el quitosano es soluble solo en soluciones ácidas.^[10] Esta propiedad compromete la estabilidad de los policomplejos en un medio fisiológico.^[11] Por su parte, el TMQ es un derivado parcialmente metilado del quitosano, esta metilación da lugar a la formación de aminas cuaternarias que otorgan al polímero una carga positiva permanente. Esta carga positiva permanente favorece la solubilidad acuosa del biopolímero en un intervalo mayor de pH, así como su capacidad de cargado de material genético y posterior captación celular.^{[10][12]}

En lo que respecta a las estrategias de terapia génica exploradas para el cartílago, se ha detectado que inyectar los vectores genéticamente cargados (vectores cargados o complejados con material genético) directamente en el espacio articular es a menudo impreciso y transitorio. Como alternativa, los sistemas de liberación basados en AGAs pueden proteger al material genético de la rápida degradación y la fagocitosis en el líquido sinovial, al mismo tiempo de garantizar un confinamiento espacial para la entrega de los genes.^{[3][13]} El AGA para este proyecto estará constituido por una combinación de los biopolímeros ALG/GELAT. El ALG es un polisacárido aniónico hidrofílico. Este es un polímero natural que al ser entrecruzado con algún ion divalente o trivalente genera una estructura 3D (hidrogel) similar a la matriz extracelular, además de ser biocompatible y biodegradable.^[14] Por su parte, la GELAT es un derivado del colágeno, un componente crucial de la matriz extracelular del cartílago y también puede captar grandes cantidades de agua, lo que es favorable para el transporte e intercambio de nutrientes y residuos a través del andamio.^[15]

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. Justificación

Padecimientos como la artrosis, de naturaleza crónico-degenerativa, difícil tratamiento y pronóstico discapacitante, requieren de la exploración de estrategias de tratamiento regenerativo como alternativa a los procedimientos quirúrgicos convencionales altamente invasivos. En este proyecto se propone el procesamiento y caracterización de andamios de ALG/GELAT genéticamente activados con policomplejos de N,N,N-trimetilquitosano/ADN, para su uso potencial en el tratamiento regenerativo de este tipo de enfermedades.

2.2. Objetivo General

El objetivo general de este proyecto es procesar y caracterizar andamios de ALG/GELAT cargados con policomplejos de N,N,N-trimetilquitosano/ADN.

2.3. Objetivos específicos

1. Sintetizar TMQ y caracterizar su estructura química.
2. Preparar policomplejos de TMQ/ADN y QT/ADN para estudiar y comparar sus propiedades fisicoquímicas.
3. Preparar andamios de ALG/GELAT y caracterizar sus propiedades mecánicas, hinchamiento, retención de agua y degradación enzimática.
4. Caracterizar la respuesta biológica de los andamios genéticamente activados.

III. TEORÍA GENERAL

3.1. Introducción a la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos

La regeneración sucede en el cuerpo humano en cierta medida a lo largo de la vida. La sangre y la piel son continuamente restauradas en comparación con el hígado, hueso, músculo y vasos sanguíneos que tienen una capacidad limitada de auto-repararse. Sin embargo cuando se sufre de un evento traumático que ocasione un gran daño, el poder regenerativo de un tejido adulto no será capaz de compensar el daño.^[16] El utilizar alguna parte del cuerpo por otra o el intercambio de partes de una persona a otra ha sido mencionado desde la antigüedad. Sin embargo, no fue hasta 1955 cuando fue posible realizar un trasplante riñón entre gemelos. Y hasta principios de 1960 se logró realizar un trasplante de riñón de un paciente no idéntico genéticamente a otro. Esto abrió el camino a una nueva era en la medicina. Sin embargo, este tipo de terapia era acompañada con muchos efectos adversos tales como la falta de una buena inmunosupresión, incapacidad de monitorear y controlar el rechazo del órgano y la creciente escasez de donantes. Todo lo anterior a motivado a científicos y médicos a encontrar otra alternativa a la necesidad de órganos u tejidos.^[17] Además de que la edad promedio de la población está incrementando y con ello la incidencia de condiciones relacionadas al desgaste tales como osteoporosis, diabetes, enfermedades cardiovasculares, Alzheimer y Parkinson. La medicina regenerativa promete soluciones más permanentes que las actuales estrategias farmacéuticas.^[16] En 1999, William Haseltine, el científico fundador y director ejecutivo de Ciencias del Genoma Humano, acuñó el término de medicina regenerativa el cual encapsula el intervalo amplio de disciplinas y compañías que trabajan en conjunto tras un objetivo en común: repara o reemplazar células, tejidos y órganos.^{[16][17]} Haseltine creyó que la medicina regenerativa llegaría en cuatro fases:

1. Estimular o copiar los mecanismos propios del cuerpo para repararse mediante imitar las acciones de los factores de crecimiento.
2. Implantar tejidos u organos que crezcan afuera del cuerpo despues de que los

factores de crecimiento necesarios hayan sido identificados.

3. Tecnologías que puedas rejuvenecer tejidos viejos, reseteando los relojes biológicos de las células.
4. Explotar la rama emergente de la nanotecnología y ciencias de materiales.

Los estudios de la matrix extracelular y sus interacciones con células, y factores de crecimiento y sus ligantes, guiaron el camino para comprender a partir de las células el crecimiento de tejidos y su diferenciación. En 1970 los investigadores empezaron a combinar materiales y equipos médicos con conceptos de biología celular creando un nuevo campo en la medicina llamado ingeniería de tejidos. La ingeniería de tejidos emplea aspectos de la biología celular y trasplante, ciencia de materiales e ingeniería biomédica con el objetivo de desarrollar substitutos biológicos que puedan restaurar y mantener la función normal del tejido u órgano dañado. El diseño y fabricación de materiales con una estructura optimizada y propiedades biocompatibles es de vital importancia para la eficacia en la regeneración.^{[17][18]} Existen datos preclínicos y clínicos prometedores hasta la fecha que respaldan la posibilidad de tratar enfermedades crónicas y agudas, y que la medicina regenerativa incita el tratamiento a enfermedades que ocurren en una amplia variedad de sistemas y contextos de órganos, incluidas heridas dérmicas y enfermedades cardiovasculares y traumas, tratamientos para ciertos tipos de cáncer y más. Desde que la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos emergió como industria hace alrededor de dos décadas numerosas terapias han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), como Carticel (condrocitos autólogos para defectos en los cartílagos), Dermagraft (fibroblastos alogénicos para tratamiento de úlceras en el pie diabético), entre otros.^[19]

3.1.1. Biomateriales

Para ingeniería de tejidos basada en células, las células son plantadas sobre el andamio creado con un biomaterial apropiado. En ingeniería de tejidos, los biomateriales replican la función biológica y mecánica de la matrix extracelular (ECM, por

sus siglas en inglés) del tejido nativo. Los biomateriales proveen de una estructura tridimensional a las células para su crecimiento y posterior formación de tejido, estos también pueden proveer de biofactores apropiados, como factores de crecimiento, a sitios específicos en el cuerpo. Este tipo de terapia repara el tejido *in situ*. Típicamente, es desarrollado un andamio poroso donde las células pueden ser liberadas por medios pasivos, degradación del material, difusión, migración celular, etc.^{[17][18]} En la figura 1 se observa un esquema representativo de la conjunción entre células, andamios y factores bioactivos.^[20]

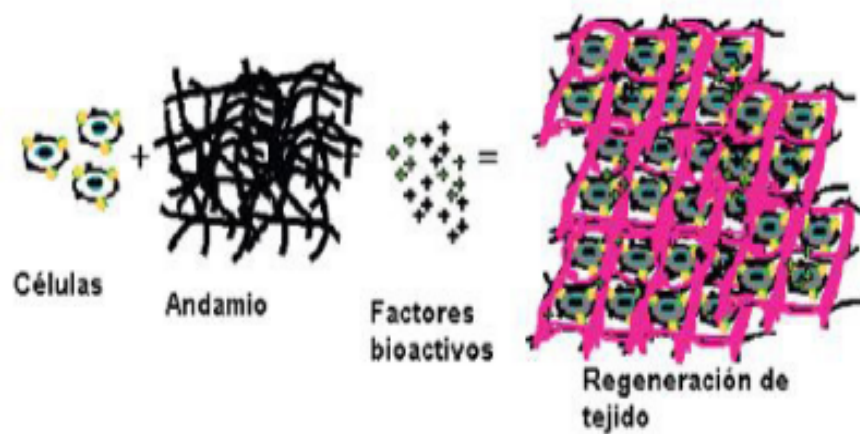


Figura 1. Sistema para formar ECM y regeneración de tejidos a partir de andamios y factores bioactivos.

Los biomateriales se clasifican en tres: materiales de derivados naturales o polímeros naturales, matrices tisulares acelulares, y polímeros sintéticos:

- Los polímeros naturales son biomateriales prometedores debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y su señalización biomimética, lo cual promueve la migración celular, proliferación y diferenciación celular. Este tipo de polímeros pueden ser procesados de diferentes tipos de andamio, de andamios porosos a hidrogeles.^[1]
- Una matriz tisular acelular es un injerto de tejido suave generado mediante un proceso de desnaturalización que preserva intacta la ECM. Después de su implantación, esta estructura sirve como andamio a las células correspondientes del tejido objetivo.^[21]

- Los polímeros sintéticos ofrecen una gran versatilidad que permite el control de sus propiedades físicas, químicas y mecánicas para diferentes aplicaciones en la ingeniería de tejidos. Adicionalmente se puede tener un mayor control en el tamaño de los poros y la geometría de los andamios. Sin embargo, su mayor limitación es que no pueden facilitar apropiadamente interacciones celulares.^[1]

3.1.2. Terapia génica

Existen diferentes sub-vertientes en cómo aplicar este tipo de tecnología, una de ellas es la terapia génica. La cual consiste en insertar al medio intracelular material genético para que este se transcriba en el núcleo y de como resultado la síntesis de proteínas o el silenciamiento de algún gen, con el objetivo de inducir la regeneración de algún tejido en específico. En el contexto de la reparación de tejido musculoesquelético, la transferencia de genes es una alternativa prometedora para la liberación de factores que crecimiento ya que permite la síntesis sostenida de una o varias proteínas nativas del sitio de lesión.^[1] Para que el ADN pueda entrar a la célula y viajar en el citoplasma sin ser degradado, este tiene que ser protegido y/o encapsulado. El ADN tiene una vida media de 10 min después de ser inyectado por vía intravenosa,^[22] esto principalmente por la acción de enzimas llamadas nucleasas. Además, debido a su carga negativa otorgada por los grupos fosfatos que se encuentran al exterior de la doble hélice, el ADN desnudo no puede acercarse lo suficiente para interaccionar con la célula y entrar de manera pasiva mediante endocitosis. Existen diferentes materiales a partir de los cuales se pueden producir vehículos o vectores de material genético. Estos se pueden dividir en dos categorías: virales y no virales.^[23]

3.2. Vectores genéticos virales y no virales

Un gen es definido como una porción de la molécula de ADN que es responsable de codificar una cadena de polipéptidos.^[24] El objetivo principal de la terapia génica es encontrar formas reproducibles y seguras de introducir genes en células específicas para curar o retrasar el progreso de una enfermedad. Uno de los mayores retos para cumplir este objetivo es desarrollar vectores efectivos y seguros que transporten el material genético a la célula.^[23] El proceso de la liberación del gen en la célula y su expresión se

conoce como transfección; para que un vector genético sea eficaz tiene que tener una transfección efectiva. La transfección consiste en los siguientes pasos: compactación del ADN mediada por un vector, captación celular, escape endosomal, decompactación del ADN y la transferencia del ADN al núcleo.^[7]

El concepto básico de los vectores virales es aprovechar la habilidad innata de los virus que han evolucionado y mejorado desde hace millones de años para liberar material genético en la célula infectada. Para convertir estos patógenos en sistemas de liberación es necesario separar los componentes que se necesitan para la replicación viral de los que son capaces de causar una enfermedad. El gen de interés junto con elementos transcripcionales regulatorios son insertados en un vector. El empaquetamiento de este vector por la propia estructura del virus modificado se le conoce como vector recombinante viral.^[23] Los virus más utilizados para generar virus recombinantes son los adenovirus, herpesvirus y lentivirus. Las mayores preocupaciones asociadas a los vectores virales se relacionan con su inmunogenicidad potencial, el riesgo de detonar procesos de mutagénesis que pueden resultar en la transactivación de oncogenes y leucemia, y, desde un punto de vista tecnológico, un proceso de producción poco factible de llevarse a cabo a gran escala.^[1]

En lo que respecta a los vectores no virales, existen diferentes tipos de ellos. En general, estos tienen que tener una carga positiva para poder compactar el ADN y también interaccionar con la membrana extracelular. Los hay basados en lípidos, proteínas o péptidos y poliméricos, siendo estos últimos los de interés para este proyecto. Los vectores poliméricos son uno de los vectores más relevantes y ampliamente utilizados como vectores génicos. Estos interaccionan con los fosfatos (carga negativa) del ADN gracias a los grupos catiónicos, principalmente aminas presentes en su estructura, formando policomplejos. Los policomplejos son complejos de polielectrolitos que son formados espontáneamente por la condensación electrostática entre el ADN y el polímero catiónico.^{[1][24]} Existen diferentes teorías sobre los mecanismos por los cuales el gen puede ser transportado, evitando ser degradado en el medio intracelular mediante policationes; sin embargo, una de las más aceptadas es la llamada esponja de protones. Esta se basa en la capacidad tampón de los policationes. Una vez que el policomplejo entra

a la célula este estará en un endosoma, una vez pasado cierto tiempo de maduración este se combinara con un lisosoma. El lisosoma degrada el material que se encuentre en su interior, por medio de enzimas hidrolíticas que se activan en un ambiente ácido, esta acidez se obtiene introduciendo iones H^+ en su interior. Sin embargo, gracias a que lo policationes pueden captar estos H^+ protonando las aminos en su estructura, el medio interno del lisosoma no se acidifica. Además, al protonar las aminos surge una repulsión de carga entre las cadenas del polímero, lo que hace que el lisosoma se hinche y se generen pequeñas fracturas en su membrana. Además, el lisosoma, al detectar que el pH del medio no disminuye, no detiene el flujo de H^+ , por lo que el volumen interno aumenta. Esta expansión termina por hacer ceder al lisosoma y a partir de aquí se libera el ADN y el vector.^{[5][25][26]} En la figura 2 se ejemplifica el proceso de compactación del ADN por medio de un polication y su posterior transfección.

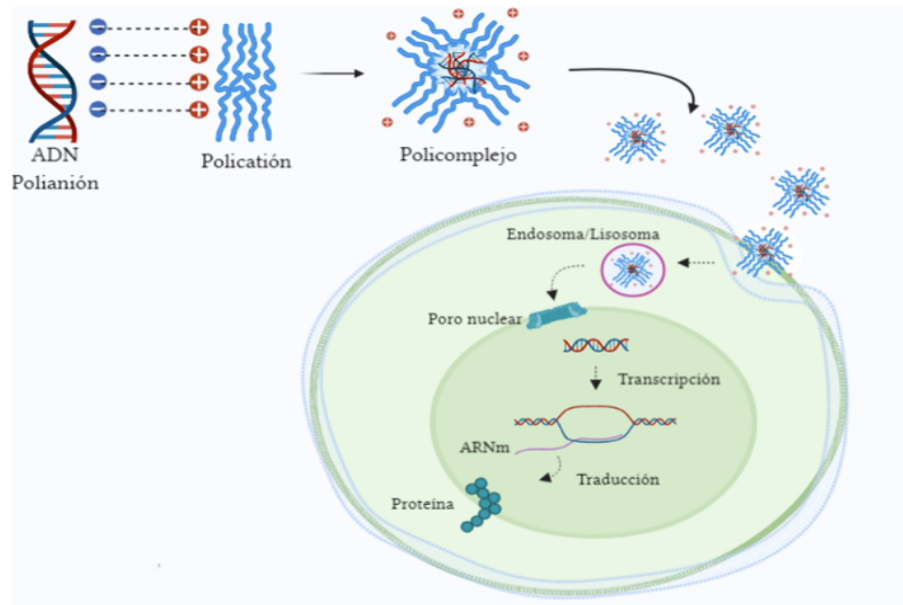


Figura 2. Proceso de compactación y transfección de policomplejos polication/ADN.

Los polímeros como vectores se dividen en naturales y sintéticos. Una de las principales limitantes de los polímeros sintéticos en este rubro es su citotoxicidad e inmunogenicidad *in vivo*.^[27] Vectores naturales como el colágeno y el quitosano son una opción prometedora debido a su biocompatibilidad y citocompatibilidad. El polímero de interés para este trabajo es el QT y TMQ.

3.3. Quitosano y N,N,N-trimetilquitosano como vectores genéticos

El QT es un aminopolisacárido biocompatible y biodegradable, obtenido a escala industrial por la desacetilación de la quitina aislada del desperdicio de crustáceos. Este está comprendido por (1→4)-2-amino-2-desoxi-β-D-glucosa y 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucosa.^[28]

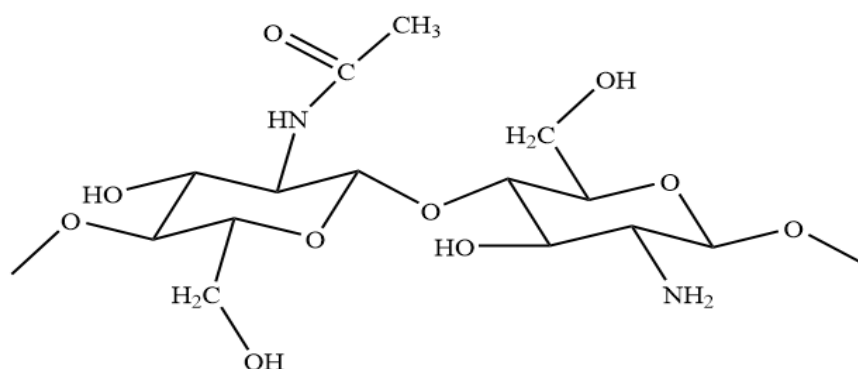


Figura 3. Estructura química del QT.

Debido a sus características policationicas, el QT puede formar complejos con los ácidos nucleicos negativamente cargados a través de interacciones electrostáticas, conduciendo a la condensación y protección del ácido nucleico. Además, tiene propiedades antibacterianas y cicatrizantes, por lo que es utilizado como sistema de liberación de genes para heridas. Sin embargo, este es soluble en agua a un pH abajo de 6.5 (el QT tiene un pKa de 6.5) donde los grupos amino son protonados y se cargan positivamente, por lo que es poco soluble en condiciones neutrales o alcalinas. Debido a lo anterior, los policomplejos QT/ADN tienen que ser formados en condiciones ácidas. El comportamiento del tamaño de partícula, potencial Z y la estabilidad del policomplejo en el medio fisiológico son de especial importancia para la captación celular y en consecuencia la eficiencia de transfección.^{[8][11]}

Por otro lado, el TMQ es un derivado hidrofílico cuaternizado del QT. Es soluble en medio alcalino y neutro. Esto es debido a que la amina en la posición C2 se metila,

3.4. Andamios genéticamente activados para la regeneración de cartílago articular

El cartílago es un tipo de tejido conectivo avascular que tiene una función de proteger y dar soporte. Está compuesto por condrocitos embebidos en matriz extracelular. A diferencia de los huesos o la piel, el cartílago articular carece de la habilidad intrínseca natural de regenerarse, esto es debido a su avascularidad y falta de movilidad de los condrocitos debido a que la propia matriz cartilaginosa es muy densa.^[33]

En la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa aplicada a defectos en el cartílago articular es inefectivo aplicar la terapia génica inyectando policomplejos directamente en el área de lesión, ya que es impreciso y transitorio debido a que los pequeños acarreadores se diluyen en el fluido articular por lo que no llegan al sitio de la lesión.^[3] Una alternativa a este problema son AGAs, estos son andamios, por lo regular a base de hidrogeles, que encapsulan o inmovilizan vectores. Sistemas de liberación basados en AGAs protegen al vector de una degradación rápida y de fagocitosis en el fluido sinovial mientras ofrecen confinamiento espacial a los genes liberados. Estas plataformas hacen que la terapia génica sea más precisa, controlada y que la liberación de los genes terapéuticos sea sustancial.

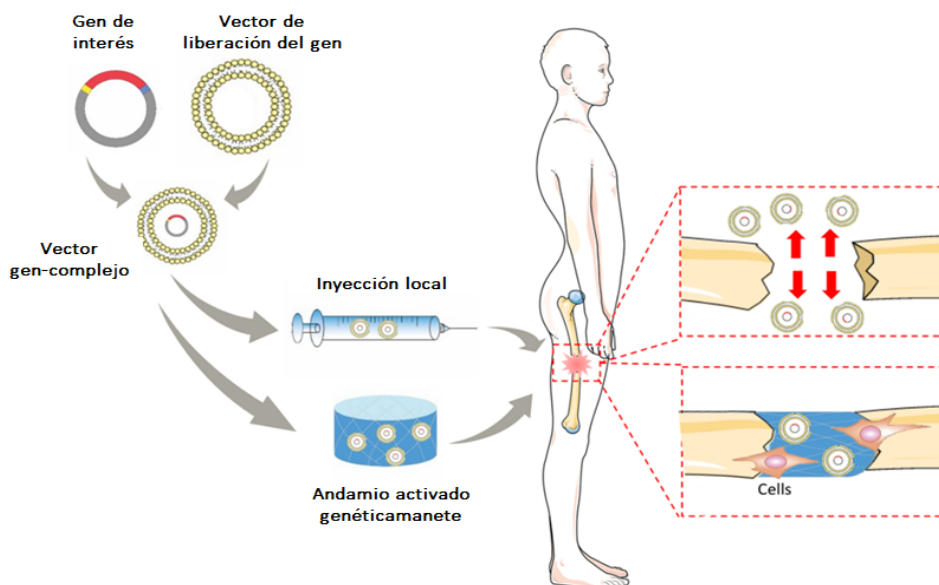


Figura 5. Comparación esquemática de la inyección local de policomplejos de ADN con la administración basada en materiales para la terapia génica.

En la figura 5 se observa la representación de las bondades que ofrece los AGA en comparación con la terapia génica aplicada de manera directa sin un material de soporte. Además, facilitan la captación celular de material genético para asegurar una transfección efectiva.^[13] Si se quiere regenerar un tejido como el cartílago articular es indispensable que el andamio sea 3D y biodegradable, esto es esencial para promover la condrogénesis. Los principales factores involucrados en el diseño de un andamio son su porosidad y tamaño de poro, tasa de degradación, propiedades mecánicas, biocompatibilidad y reproducibilidad.^[34] Los hidrogeles pueden llegar a cumplir con estas características.

Los hidrogeles son redes macromoleculares formadas por el entrecruzamiento de cadenas poliméricas, capaces de absorber en presencia de agua (fluidos biológicos) sin disolverse. También pueden emplearse para una liberación controlada de moléculas biológicamente activas en condiciones hidratadas.^[35] Se pueden realizar hidrogeles de diferentes polímeros y biopolímeros, e incluso sus combinaciones; sin embargo, se ha demostrado que tanto las características los hidrogeles de ALG como la GELAT presentan propiedades dignas de estudiar para su uso tentativo como andamio para la regeneración de cartílago.

El ALG es un copolímero de bloque lineal constituido por ácido β -D-manurónico enlazado (1-4) con los bloques de ácido α -L-glucurónico. El ALG se considera como uno de los mejores candidatos para la regeneración del cartílago debido a su biocompatibilidad, buenas propiedades de andamiaje/formación, biodegradabilidad, disponibilidad y bajo costo. Se han desarrollado perlas de alginato para recuperar o expandir condrocitos primarios. Además, el ALG promueve la proliferación celular y conservan la funcionalidad y el fenotipo celular de un tejido en específico.^[28] Por su parte, la gelatina es sintetizada a partir de la hidrólisis de colágeno animal. Es el mayor componente del tejido conectivo y, además, es un componente crucial de la matriz extracelular del cartílago y favorece la unión celular. La gelatina tiene una antigenicidad relativamente baja porque está desnaturalizada. Además, la gelatina puede absorber alto contenido de agua, lo que es favorable para el transporte e intercambio de nutrientes en los andamios.^[36] Leena y colaboradores^[37] realizaron un andamio de ALG/GELAT obteniendo

resultados alentadores. Los andamios soportaron una fuerza de compresión significativa, además de demostrar la capacidad de captar agua, lo cual es crucial para que el fluido biológico (cargado de nutrientes) se absorba en el andamio y llegue a las células. Así mismo, influye en las propiedades mecánicas del andamio. Por otro lado, se utilizó la enzima lisozima en una prueba de biodegradación, en donde se observó un incremento gradual en la degradación del andamio con el tiempo. Esto es necesario, pues al final se espera que el tejido sea regenerado completamente por las células propias del individuo, esperando que el andamio se degrade totalmente con el tiempo.

IV. HIPÓTESIS

Los andamios de ALG/GELAT genéticamente activados, así como los polí-complejos TMQ/ADN, presentarán propiedades fisicoquímicas, mecánicas (andamios), biológicas adecuadas para su uso potencial en el terreno biomédico.

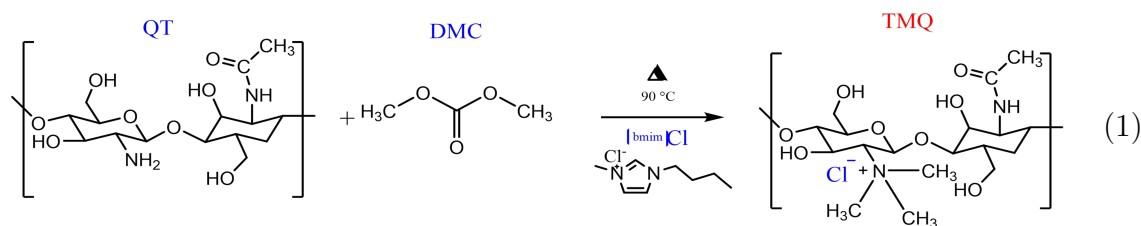
V. EXPERIMENTAL

5.1. Metodología

5.1.1. Síntesis N,N,N-trimetilquitosano

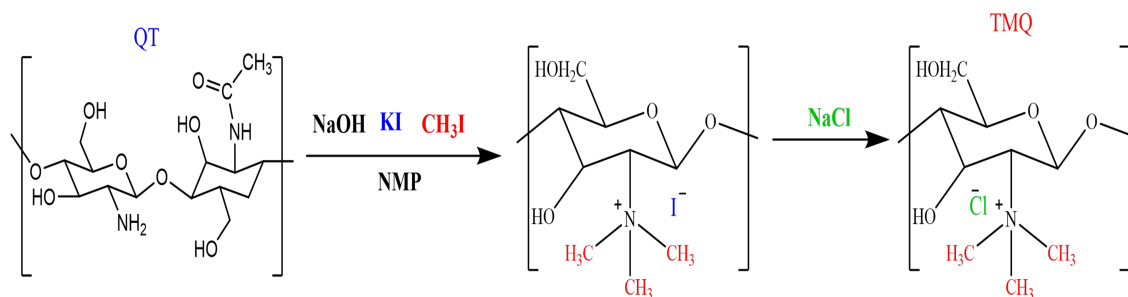
Condiciones de reacción 1

1. 500 mg de (bmim)Cl y 50 mg de QT fueron agregados un matraz de dos bocas de 5 mL. Se conectó un adaptador para la línea de Schlenk en el matraz y se tapó la otra boca del matraz.
2. La reacción se llevó a cabo a reflujo (se calentó a 90 °C) para evitar la evaporación y pérdida del DMC.
3. Se agregaron 3 mL de DMC al matraz en el momento que el QT y (bmim)cl se fundieron.
4. El matraz se dejó en reflujo por (temperatura de fusión del DMC) 4, 8 y 12 h.
5. Una vez que pasó el tiempo de reacción correspondiente, el matraz se retiró de la manta de calentamiento y se dejó enfriar.
6. Se agregó 10 mL de etanol en el matraz, posteriormente se filtró el contenido y se colocó en un matraz limpio.
7. Para purificar y retirar los restos de DMC y (bmim)Cl se hicieron 10 lavados con etanol a 60 °C, retirando este por decantación. La representación de la reacción que procedió se encuentra en la ecuación química 1.



Condiciones de reacción 2

1. 1 g de quitosano fue disuelto en 1-metil-2-pirrolidina (NMP) que en presencia de 2.6 g de KI a 60 °C bajo agitación.
2. Se añadió una solución de NaOH (5 mL, 15 % w/v) para mantener un ambiente alcalino durante la reacción.
3. Se agregaron 6 mL de CH_3I , para que se llevara a cabo la metilación por sustitución nucleofílica. Se dejó reaccionar durante 120 min. Terminado este tiempo se traspasó la mezcla a un tubo Falcon de 50 mL.
4. Los productos fueron precipitados añadiendo dietil eter/etanol (1:1 v/v) y posteriormente centrifugados a 3,000 rpm durante 5 min. Los supernadantes fueron descartados.
5. Los precipitados fueron dispersados nuevamente en NMP y reaccionaron por 120 min.
6. Los productos fueron secados por medio de vacío, re-disueltos en una solución de NaCl a 0.5 M, y precipitados de nuevo con dietil eter /etanol para substituir el yoduro con cloro.
7. La solución se centrifugó nuevamente a 3,000 rpm, los precipitados fueron minuciosamente lavados 10 veces con dietil eter/etanol.
8. Después de secar, los granulos obtenidos fueron disueltos en agua y liofilizados durante 48 h. La representación de la reacción que procedió se encuentra en el esquema 1 el cual se encuentra a continuación.



Esquema 1

Los reactivos que se utilizaron en esta síntesis se manejaron dentro de una caja seca (MBRAUN, Labmaster SP) debido a que el DMC es sensible a la humedad y al aire. El (bmim)Cl por su parte, es higroscópico y sensible a la humedad. El CH_3I es un reactivo altamente tóxico por lo que se debe tener la menor exposición posible. Debido a lo anterior, estos reactivos tienen que mantenerse en una atmosfera inerte hasta que la reacción finalice.

5.1.2. Síntesis policomplejos TMQ/ADN

1. Se realizó una solución madre de TMQ al 0.1 % en una solución 25 mM de ácido acético. Posteriormente, se hizo una dilución para obtener una solución de TMQ a 0.6211 mM en una solución tampón BIS-TRIS-EDTA 10 mM con un pH de 5.
2. De igual manera, se realizó una solución madre de ADN 3 mM en una solución tampón BIS-TRIS-EDTA 10 mM con un pH de 5. Posteriormente, se hizo una dilución para obtener una solución de ADN a 0.061 mM en buffer BIS-TRIS-EDTA 10 mM con un pH de 5. Las soluciones fueron mantenidas en refrigeración a 4 °C hasta su uso.
3. Para la obtención de las diferentes soluciones a las relaciones N/P deseadas (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 y 10) se prepararon mezclas de las soluciones de TMQ y ADN a volúmenes iguales (500 μ L) variando la concentración de las soluciones de TMQ según fuera necesario y manteniendo constante la concentración de las soluciones de ADN. Cada mezcla correspondiente a las diferentes N/P fue agitada durante 10 s en un agitador vórtex y se dejó reposar durante 30 min para la formación

de los policomplejos. Las caracterizaciones llevadas a cabo (se describe abajo) fueron realizadas inmediatamente después de la formación de los policomplejos.

Se realizaron policomplejos de QT/ADN utilizando el mismo procedimiento mencionado anteriormente, con el fin de realizar una comparación directa con los policomplejos TMQ/ADN.

4. En el caso de los policomplejos que se necesitaron preservar, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 30 min a 25 °C, después se mantuvieron a -20 °C por 24 h, seguido de una liofilización por 24 h. Los policomplejos se preservaron a 4 °C hasta su uso.

5.1.3. Síntesis de andamios ALG/GELAT

1. De acuerdo al número de andamios que se requirieron, se prepararon dos soluciones por separado de ALG al 5 % y GELAT al 5 % diluidas en agua destilada. Se mantuvieron bajo agitación constante a 60 °C hasta que los polímeros estuvieran totalmente solubilizados. Posteriormente, se combinaron ambas soluciones y se dejaron en agitación 8 h hasta que la solución resultante de ALG/GELAT se homogeneizara completamente.
2. Se colocaron 2 mL de la solución ALG/GELAT en un molde cilíndrico de 15 mm de diámetro y se dejaron en congelación a -20 °C durante 24 h.
3. Los andamios se obtuvieron después de la liofilización de las muestras por 48 h.
4. Posteriormente, se realizó el entrecruzamiento iónico con CaCl_2 . Para este fin, los andamios previamente liofilizados se dejaron en inmersión en una solución 100 mM CaCl_2 durante 12 h. Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados con agua destilada para remover el exceso de CaCl_2 .
5. Se congelaron los andamios entrecruzados con CaCl_2 durante 24 h a -20 °C. Después se liofilizaron durante 48 h.
6. Se procedió al entrecruzamiento covalente con GTA al 1 % mediante dos proce-

dimientos diferentes; por vapor (VAP) o en solución (WET).

7. Para el procedimiento en VAP se utilizó un dispositivo casero con dos cajas petri de plástico selladas con parafilm con una base de metal dentro para soportar el andamio. Se distribuyeron 40 μL de solución de GTA al 1 % en las paredes internas superior e inferior antes de colocar el andamio y sellar las cajas petri. Se llevaron al horno a 50 °C durante 30 min. Posteriormente, se hicieron tres lavados con agua destilada y se llevaron a congelación a -20 °C durante 24 h para después ser liofilizados por 48 h.
8. Para el procedimiento en WET se colocaron los andamios en inmersión en la solución de GTA al 1 % durante 30 min. Después se realizaron 3 lavados con agua destilada y se llevaron a congelación a -20 °C durante 24 h para después ser liofilizados por 48 h.
9. Los andamios entrecruzados se mantuvieron en el interior de bolsas de plástico cerradas herméticamente para evitar su hidratación por el agua del ambiente.

5.2. Caracterización

5.2.1. Caracterización N,N,N-trimetilquitosano

Las muestras de TMQ fueron caracterizadas por resonancia magnética nuclear de hidrógeno ($^1\text{H} - \text{RMN}$) en un equipo Bruker Avance III HD 400 MHz. Los productos fueron analizados a 25 °C, empleando $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ como solvente. Para el cálculo del %DQ utilizó la siguiente fórmula:

$$\%DQ = \left[\frac{[(\text{CH}_3)_3]}{[H]} \times \frac{1}{9} \right] \times 100 \quad (2)$$

Donde, $[(\text{CH}_3)_3]$ es la integral de la amina cuaternaria a 3.3 ppm (A) y $[H]$ es la integral de los picos de los hidrógenos H1 entre 5.0 y 4.5 ppm.³⁸ En la figura 6 se encuentra la asignación de las posiciones de los hidrógenos en la estructura química del TMQ.

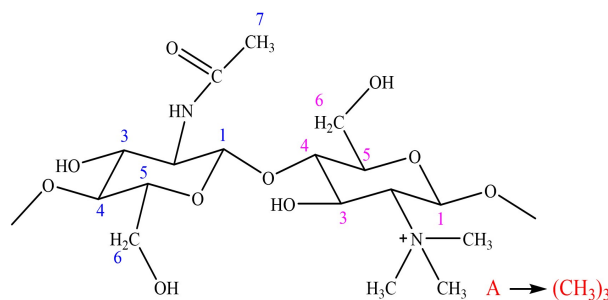


Figura 6. Estructura química del TMQ con la posición de cada hidrógeno asignada.

Para calcular el porcentaje de desacetilación (%DD) del QT se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%DD = 1 - \left[\frac{\frac{1}{3} \times [I_{NAc}]}{\frac{1}{6} \times [I_{H2-H6}]} \right] \times 100 \quad (3)$$

Donde, I_{NAc} es la integral de los hidrógenos correspondientes al grupo acetilo de la unidad acetilada del QT a 2.0 ppm (H7) y I_{H2-H6} corresponde a la suma de las señales del hidrógeno H2 a 3.1 ppm y la señal entre 3.5 a 4.0 ppm correspondiente a los hidrógenos H3-H6. En la figura 7 se encuentra la asignación de las posiciones de los hidrógenos en la estructura química del QT.

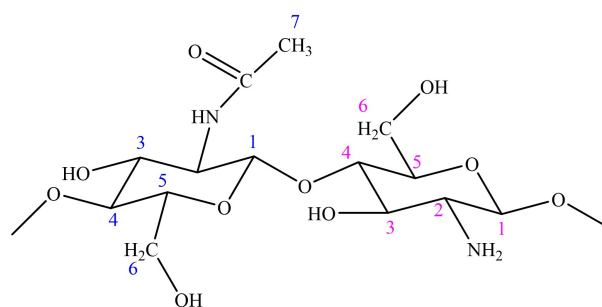


Figura 7. Estructura química del QT con la posición de cada hidrógeno asignada.

5.2.2. Caracterización fisicoquímica de los policomplejos TMQ/ADN Y QT/ADN

Los policomplejos se caracterizaron por Dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés), potencial Z (POT Z) y microscopia de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés). El radio hidrodinámico, la distribución de tamaños y el POT Z se determinó en un equipo DLS Malvern Nano-ZS Nanosizer (ZEN 3690) a 25 °C,

utilizando agua Mili-Q como medio de dispersión. El AFM se llevó a cabo en un equipo Nanosurf en modo contacto. Las muestras fueron depositadas en una mica recién exfoliada y se dejaron en incubación durante 2 min, después fueron secadas por capilaridad. Las imágenes obtenidas se tomaron de al menos 5 áreas macroscópicamente separadas en cada muestra. Todos los experimentos se llevarán a cabo a temperatura ambiente.

5.2.3. Estudios de compactación de los policomplejos TMQ/ADN Y QT/ADN

La compactación del ADN en los policomplejos fue monitorizada por electroforesis en gel, empleando un equipo EDGE Integrated Electrophoresis System. Los policomplejos se prepararon en presencia de bromuro de etidio ($50\text{ }\mu\text{M}$) en las relaciones N/P deseadas en una solución tampón de 10 mM de BIS-TRIS-EDTA (pH 7.4). Se prepararon 45 mL de solución de agarosa al 0.1 %. Una vez que se disolvió totalmente se vertió en el molde hasta que se solidificó. Posteriormente, se colocó en el aparato. Finalmente, se añadieron $35\text{ }\mu\text{L}$ de la solución TMQ/ADN con bromuro de etidio a su respectivo carril en el gel. Los policomplejos y el ADN puro (N/P =0) se caracterizaron a 150 V por 20 min. El ADN se visualizó bajo iluminación UV a temperatura ambiente.

5.2.4. Eficiencia de cargado y asociación de los policomplejos TMQ/ADN Y QT/ADN

Para la cuantificación de la eficiencia de cargado (%LC, por sus siglas en inglés) y eficiencia de asociación (%AE, por sus siglas en inglés) de los policomplejos TMQ/ADN Y QT/ADN se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS (ESPEC UV-VIS) SHIMADZU UV-2600i en un espectro de absorbancia de 200 a 500 nm para medir la banda de absorbancia característica del ADN a 260 nm. Las diluciones correspondientes a las N/P deseadas ($750\text{ }\mu\text{L}$ de la solución TMQ o QT) se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían $750\text{ }\mu\text{L}$ de una solución de ADN a una concentración de 0.061 mM ($15\text{ }\mu\text{g}$ totales de ADN en cada relación N/P), después se agitar vigorosamente el Eppendorf y dejarlo reposar 30 min se añadieron $50\text{ }\mu\text{L}$ de glicerol para mejorar la sedimentación de los policomplejos centrifugados. Estos se centrifugaron a $14,000\text{ }g$ por 45 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se midió en el ESPEC-UV-VIS

para determinar la cantidad de ADN que no se cargó ni asoció con el TMQ o QT. Se utilizaron las siguientes fórmulas correspondientes a la %LC (1) y %AE (2):

$$\%LC = \left(\frac{P_tADN - P_sADN}{P_p} \right) \times 100 \quad (4)$$

$$\%AE = \left(\frac{P_tADN - P_sADN}{P_sADN} \right) \times 100 \quad (5)$$

donde P_tADN corresponde al peso total de ADN en la muestra, P_sADN es el ADN sin ligar al QT (el cual se encuentra en el sobrenadante) y el P_p es el peso total de los policomplejos. Estos parámetros se calcularon a partir de las concentraciones preparadas por UV-Vis

5.2.5. Caracterización fisicoquímica de los andamios ALG/GELAT

Con el fin de encontrar las diferencias entre los distintos procedimientos de entrecruzamiento y definir cuál provee a los andamios las mejores propiedades estructurales, fisicoquímicas y mecánicas, las caracterizaciones se llevaron a cabo separando los andamios por estos métodos: el método VAP, método WET y andamios solo entrecruzados con CaCl_2 .

Los andamios preparados fueron caracterizados por microscopia óptica (MO) y espectroscopía infraroja por transformada de fourier (FTIR, por sus siglas en inglés). Las muestras se analizaron por MO en un microscopio óptico invertido OLYMPUS CKX53 para observar la estructura interna de los andamios ALG/GELAT y medir el diámetro de sus poros. Los andamios previamente liofilizados fueron teñidos con cristal violeta y colocados en un portaobjetos para visualizar la muestra con los objetivos $4x$ y $10x$. El diámetro de los poros se obtuvo con el programa EPview. La FT-IR se llevó a cabo en un espectrómetro de reflectancia total atenuada FTIR (ATR-FTIR) (Thermo Scientific Nicolet 6700). Los datos se recolectaron a 25°C con un rango de adquisición de longitud de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , se registraron 32 escaneos a una resolución de 4 cm^{-1} . Se caracterizaron los andamios ALG/GELAT obtenidos por cada proceso de entrecruzamiento, así como los polímeros ALG y GELAT puros como blancos de comparación. Se monitorearon los cambios conformacionales de acuerdo con las técnicas

de entrecruzamiento en los andamios.

5.2.6. Pruebas de hinchamiento de los andamios ALG/GELAT

El hinchamiento de los andamios de pesos iguales se determinó por medio de su inmersión en 1x PBS a un pH fisiológico con mediciones cada 30 min por 12 h a 37 °C. Al final del tiempo de incubación, los andamios fueron lavados con agua desionizada para remover cualquier ion adsorbido en la superficie y secados suavemente con papel filtro. La prueba se hizo por triplicado. El peso en seco y en húmedo de los andamios fue registrado como P_i y P_f , respectivamente. El porcentaje de hinchamiento (%H) de hinchamiento se calculó con la siguiente fórmula:

$$H \% = \left(\frac{P_f - P_i}{P_i} \right) \times 100 \quad (6)$$

5.2.7. Prueba de retención de líquido de los andamios ALG/GELAT

Para investigar la habilidad de captación de agua en los andamios, estos fueron pesados sin hidratar (P_i), posteriormente se colocaron en una solución de 1x PBS a 37 °C durante 24 h. Después, las muestras fueron centrifugadas a 500 rpm por 3 min. Los andamios fueron pesados nuevamente, registrando el peso como P_w . La prueba se realizó por triplicado. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de retención de agua (%RA).

$$\%RA = \left(\frac{P_w - P_i}{P_i} \right) \times 100 \quad (7)$$

5.2.8. Pruebas de degradación enzimática de los andamios ALG/GELAT

Con el fin de obtener la velocidad de degradación de los andamios ALG/GELAT con diferentes métodos de entrecruzamiento se llevaron a cabo pruebas de degradación enzimática utilizando lisozima. Primeramente los xerogeles de los andamios ALG/GELAT fueron pesados, posteriormente se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se les añadió 1 mL de solución de lisozima 0.1 mg/mL disuelta en PBS

con un pH de 7.4. Se realizaron 3 réplicas de cada muestras (ALG/GELAT_WET, ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_CaCl₂). Cada muestra se colocó en un horno de secado a 37° durante 1, 2, 3, 5, 7, 10 y 15 días. EL medio de cada muestra se cambio cada 48 h. Al terminar el intervalo de tiempo correspondiente se retiró la solución de lisozima y se congeló el andamio durante 24 h. Cada xerogel fue pesado posterior una liofilización de 48 h. La siguiente formula se utilizó para calcular el porcentaje de degradación (%DG):

$$\%DG = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (8)$$

La siguiente formula se utilizó para calcular la tasa de degradación (TD):

$$TD = \frac{\%DG}{Tiempo} \quad (9)$$

La TD nos brindo un promedio el peso perdido (en porcentaje respecto al peso inicial) por día.

5.2.9. Evaluación mecánica de los andamios ALG/GELAT

Las propiedades mecánicas de los andamios se determinarán utilizando el equipo Brookfield CT3TM-10K. Las muestras se encontraban en forma cilíndrica con diámetro y espesor de 15 mm x 7 mm. Los andamios fueron estudiados por ensayos de compresión a las siguientes condiciones: carga de 10 kgf, carga mínima de detección de 20 gf, velocidad de deformación de 0.5 mm/min y deformación máxima de 80 %. Para la evaluación mecánica cíclica (3 y 20 ciclos) se cumplieron las siguientes condiciones: carga de 10 kgf, carga mínima de detección de 20 gf, velocidad de deformación de 0.5 mm/min y deformación máxima de 50 %.

A partir de los resultados obtenidos se calculó el módulo de Young o módulo de elasticidad (E) y el módulo de tenacidad U_T . El (E) se obtuvo a partir de la pendiente de la gráfica (obtenida al mismo tiempo que se llevó a cabo la prueba de compresión)

de deformación (ε) contra esfuerzo (σ) de acuerdo con la siguiente ley de Hook's:

$$E = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon} \quad (10)$$

La tenacidad (U_T) por su parte, corresponde al área bajo la curva obtenida a partir del comportamiento del material al ser comprimido desde el valor 0 hasta el punto máximo de resistencia a la rotura (σ_B):

$$U_T \int_0^{\sigma_B} \quad (11)$$

Para simular condiciones fisiológicas realistas, en ambos casos los andamios se llevaron al hinchamiento en equilibrio, dejándose 12 h inmersos en 1x PBS a 37 °C.

5.2.10. Liberación de ADN de los policomplejos TMQ/ADN y QT/ADN

Con el fin de cuatificar el porcentaje de ADN liberado en los policomplejos. Se realizaron 10 mL de una solución de policomplejos TMQ/ADN y QT/ADN con un N/P = 10 (20 ug/mL), esta se colocó en un tubo Falcon de 15 mL. Con el fin de retirar cualquier resto de ADN no compactado, esta solución se centrifugó a 14,000 *g* por 45 min a 25 °C. Se retiró el sobrenadante y los policomplejos sedimentados se redispersaron en PBS a pH 7.4 (10 mL). Estos se colocaron en un baño de agitación a 37° C a diferentes intervalos de tiempo (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 12 h). Al finalizar el intervalo de tiempo correspondiente la muestra se centrifugo a 13,200 *g* por 15 min, con el fin de separar los policomplejos del ADN liberado. Posteriormente se retiraron 2 mL del sobrenadante y se remplazaron con 2 mL de PBS a ph 7.4 fresco para colocar la muestra nuevamente en el baño de agitación a las mismas condiciones antes mencionadas. Los mililitros retirados se midieron en un ESPEC UV-VIS SHIMADZU UV-2600i en un espectro de absorbancia de 200 a 500 nm para medir la banda de absorbancia del ADN. Se realizaron 3 réplicas de cada intervalo de tiempo. Se utilizó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de liberación de ADN ($\%LIB_{ADN}$)

$$\%LIB_{ADN} = \frac{\mu gADN_{liberado}}{\mu gADN_{policomplejos}} \times 100 \quad (12)$$

5.2.11. Liberación de ADN de los policomplejos TMQ/ADN y QT ADN cargados en los andamios ALG/GELAT

Para medir la liberación de ADN de los andamios ALG/GELAT se cargaron previamente con policomplejos TMQ/ADN y QT/ADN. Los policomplejos TMQ/ADN y QT/ADN (preciamente recuperados y preservados a 4 °C) se redispersaron en 1 mL de agua destilada (20 μ de ADN). Los policomplejos fueron añadidos a los andamios ALG/GELAT por medio de goteo. Estos fueron puestos a 4 °C 24 h para una total absorción de los policomplejos en los andamios. Posteriormente, se congelaron a una temperatura de -20 °C durante 24 h para una posterior liofilización de 48 h. Los andamios cargados con policomplejos TMQ/ADN o QT/ADN fueron preservados a 4 °C hasta su uso. Los andamios ALG/GELAT previamente cargados con los policomplejos fueron colocados en tubos Falcon de 50 mL en presencia de 5 mL de PBS a un pH de 7.4. Estos se colocaron en un baño de agitación a 37 °C durante 0.5, 1, 4, 24, 48, 72 y 96 h. Terminando el intervalo de tiempo correspondiente se recuperaban 2 mL de PBS y se reemplazaba con PBS fresco y se colocaba nuevamente en el baño de agitación hasta completarse el siguiente intervalo de tiempo establecido. Los 2 mL recuperados fueron medidos en un ESPEC-UV-VIS SHIMADZU UV-2600i en un espectro de absorbancia de 200 a 500 nm para medir la banda de absorbancia a 260 nm correspondiente al ADN.

5.2.12. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el análisis de varianza bidireccional (ANOVA) para mediciones repetidas. Se utilizó la prueba post hoc (Bonferroni y Tukey) para realizar comparaciones múltiples (Microcal Origin 2018) y las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0.05$

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Síntesis de N,N,N-trimetilquitosano

En la figura 8 se muestra el espectro 1H RMN de QT el cual sirvió como referencia a los cambios estructurales que se esperaban observar en los espectros de TMQ. La señal de referencia en el espectro de quitosano (H7) es la correspondiente a los tres hidrógenos de la unidad de N-acetil glucosamina (GlcNAc) que aparece entre 2.0 y 2.1 ppm la cual experimenta electro-atracción del grupo amida del carbonilo.^{39,40} La señal que se encuentra entre 5.0 y 4.5 ppm se le adjudica al carbono anomérico H1 en la estructura GlcAc y GlcN (unidad de glucosamina) del quitosano. Por su parte, los hidrógenos enlazados a los carbonos correspondientes de la unidad de glucopiranososa (H3, H4, H5 y H6) aparecen en un grupo de señales sobrepuestas en un intervalo de 3.5 a 4.0 ppm, estos átomos de hidrógeno experimentan una electro-atracción del átomo de oxígeno menor que el H1 por lo que aparecen a campo más bajo.^{30,40} El H2 corresponde al hidrógeno del carbono unido a la amina primaria, el cual aparece a 3.1 ppm, está señal se encuentra a campo más alto (respecto al H1,H3-H6) debido a un menor efecto inductivo de electro-atracción por parte del grupo amino respecto al oxígeno. El %DD del QT obtenido a partir de la señal H7 y H3-6 fue de 86 %.

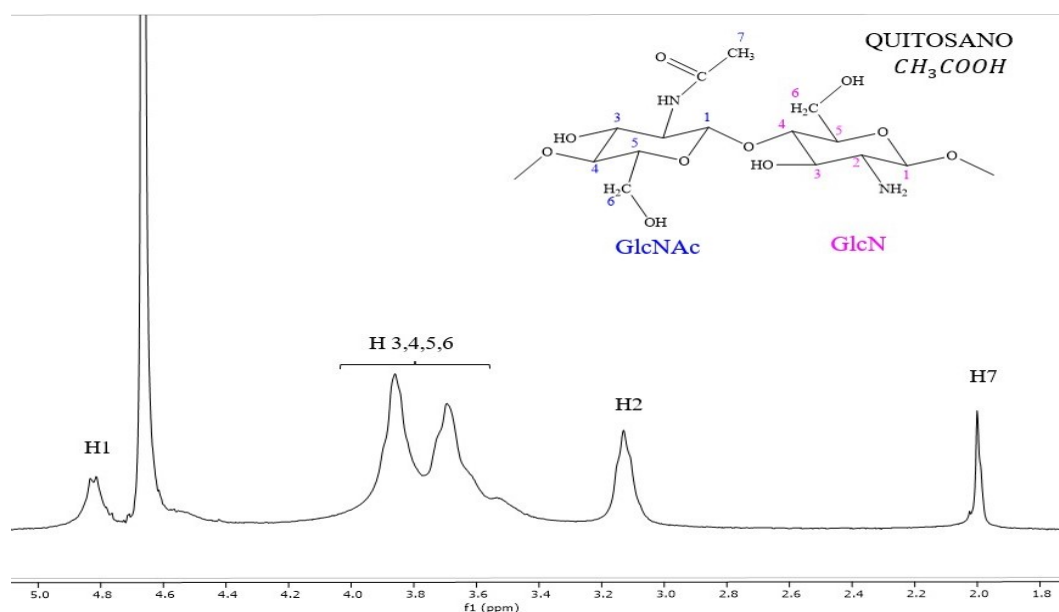


Figura 8. Espectro de 1H RMN de quitosano.

En las figuras 9, 10 y 11 se observan los espectros de TMQ sintetizado a partir de las **condiciones 1** a los diferentes tiempos de reacción 12, 8 y 4 h, los cuales se nombraran como TMQ12, TMQ8 y TMQ4, respectivamente. En los espectros de TMQ también se utiliza la señal H7 como referencia, correspondiente a los hidrógenos de la unidad GlcNAc que aparece entre 2.0 y 2.1 ppm. Las señales de los hidrógenos anoméricos H1 se encuentran entre 5 y 4.5 ppm sobrepuestas a la señal de D_2O . Los hidrógenos enlazados a los carbonos correspondientes de la unidad de glucopiranososa a (H3, H4, H5 y H6) aparecen en un grupo de señales sobrepuestas en el intervalo de 3.5 a 4.0 ppm, al igual que en el espectro de QT.³⁹ La señal, que está etiquetada como A (3.3) ppm, está relacionada directamente con la amina cuaternaria.³⁰ En este caso, la amina primaria que se encontraba en el quitosano antes de la reacción de metilación se cuaternizó debido a la trimetilación. También aparecen otras dos señales B a 3.0 ppm y C a 2.8 ppm, las cuales corresponden a la misma amina, pero en estado dimetilado y monometilado, respectivamente.

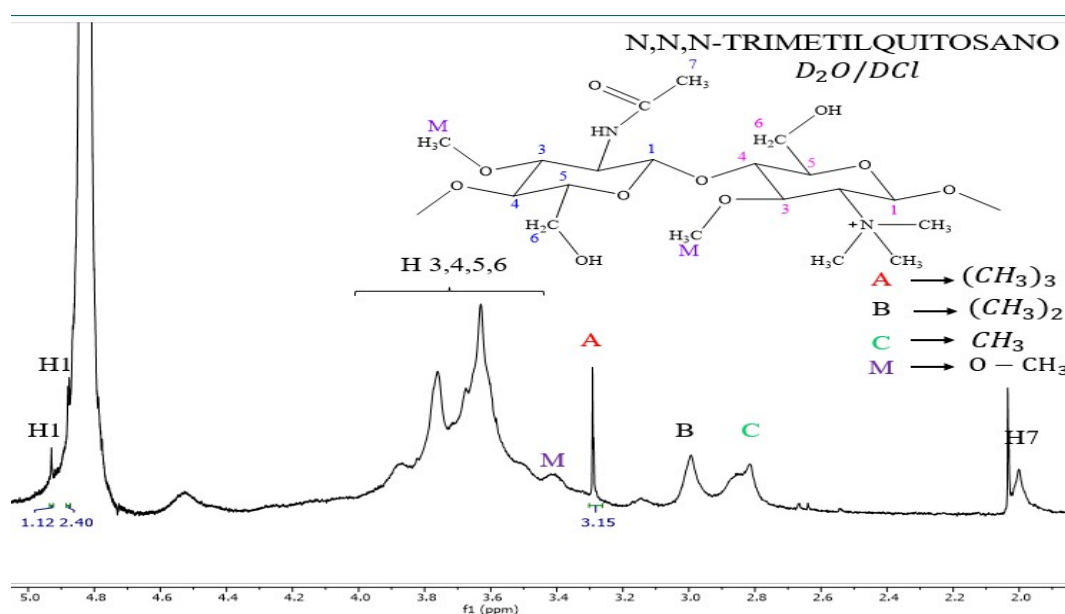


Figura 9. Espectro de 1H RMN de N,N,N-trimetilquitosano 12 h de reacción, obtenido a partir de las condiciones 1.

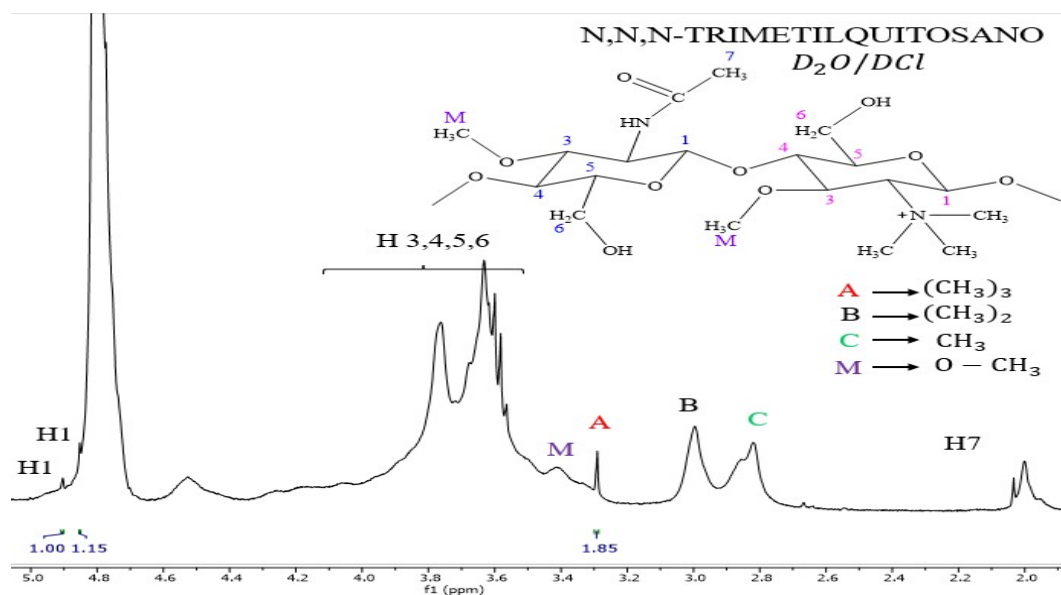


Figura 10. Espectro de ^1H RMN de N,N,N-trimetilquitosano 8 h de reacción, obtenido a partir de las condiciones 1.

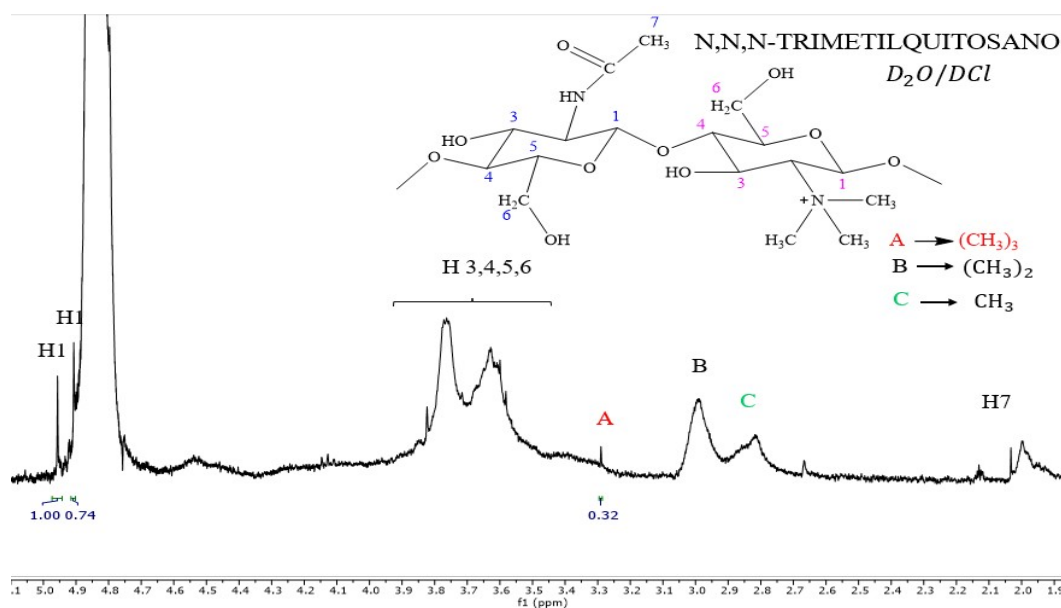


Figura 11. Espectro de ^1H RMN de N,N,N-trimetilquitosano 4 h de reacción, obtenido a partir de las condiciones 1.

Tabla 1: Porcentaje de cuaternización en las diferentes muestras de TMQ

Muestras TMQ			
Nombre de la muestra	Tiempo de reacción	%DQ	O-Met
TMQ12	12 h	9.94	sí
TMQ8	8 h	5.83	sí
TMQ4	4 h	2.04	no

El dato de interés es el %DQ de las muestras que se obtuvieron del QT trimetilado. A partir de este dato se pueden obtener diferentes conclusiones que son de importancia en este proyecto, como lo es, la solubilidad del material a diferentes pH, asociación con el material genético, posible grado de citotoxicidad, etc. Los %DQ de cada muestra se presentan en la tabla [1](#), donde se observa que el %DQ aumenta con el tiempo de reacción. Sin embargo, a partir de las 8 h de reacción aparecieron picos entre 3.45 y 3.50 ppm (señal M), los cuales indicaron la presencia de óxigenos metilados, formando metóxido (CH_3O). Algunos autores como V. Mourya y T. Scharringhausen junto con sus respectivos colaboradores reportaron que uno de los problemas principales al buscar un %DQ mayor es la O-metilación en los grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 6 del quitosano.^{[10](#)[41](#)} La O-metilación no es deseada, ya que se ha demostrado que disminuye la solubilidad del producto.^{[31](#)[42](#)[43](#)}

Al dejar el quitosano reaccionar por más tiempo a una temperatura elevada con el objetivo de obtener un %DQ mayor, provocó la aceleración de la degradación de las cadenas poliméricas y con ello se favoreció la metilación de sus grupos hidroxilo. Ninguna de las muestras TMQ12, TMQ8 y TMQ4 fueron solubles en condiciones alcalinas (pH 7.4) debido a una combinación entre un porcentaje %DQ bajo y la presencia de O-metilación. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas que nos permitan tener un equilibrio entre %DQ y presencia de O-metilación que permita la solubilidad en agua, el cual es uno de los objetivos de este proyecto. Ya sea tener un producto con un %DQ elevado que aún con la presencia de metóxidos la alta densidad de carga positiva permita la solubilidad en agua del mismo^{[44](#)} u obtener un producto con un %DQ deseable sin la presencia de metóxidos.^{[32](#)}

En la figura [12](#) se observa el espectro de TMQ correspondiente al producto obtenido por medio de las condiciones 2. La asignación de las señales es la misma que los espectros anteriores.

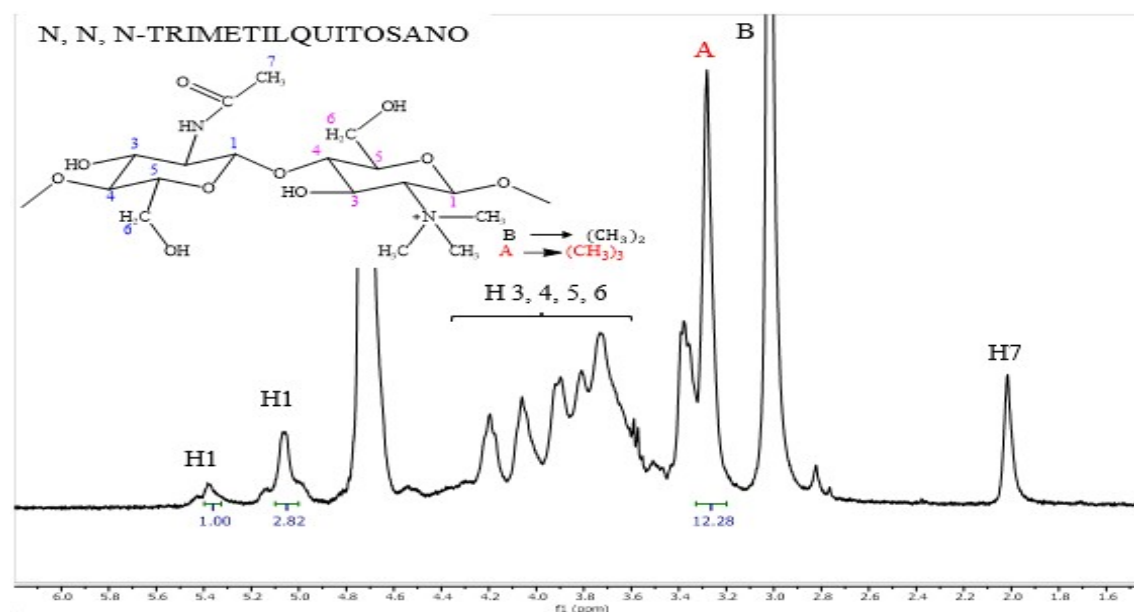


Figura 12. Espectro de ^1H RMN de N,N,N-trimetilquitosano 2 h de reacción, obtenido a partir de las condiciones 2.

Una de las principales diferencias que se observaron fue la intensidad de la señal A, la cual es considerablemente mayor en comparación con los espectros obtenidos del TMQ por las condiciones 1. A partir de esta se obtuvo el valor de %DQ el cual fue de 35 %. También se observó que el producto ya no presenta unidades monometiladas, solo aparece la señal B correspondiente a las unidades dimetiladas. El TMQ obtenido a partir de las condiciones 2 fue soluble a un pH de 7.4. Por lo tanto fue el seleccionado para la preparación de los policomplejos TMQ/ADN.

6.2. FTIR de los andamios ALG/GELAT

En la figura 13 se muestra el espectro FTIR obtenido correspondiente al polisacárido ALG, donde se resaltan las señales características del mismo. Cada color corresponde a un grupo funcional en específico, estas etiquetas se pueden complementar con la figura 14 que corresponde a la estructura química del ALG. En la tabla 2 se presentan los números de onda de los grupos funcionales más representativos del ALG. El estiramiento del grupo hidroxilo (OH) aparece a 3257 cm^{-1} .⁴⁵ El estiramiento asimétrico (A) y el estiramiento simétrico (S) del grupo carboxilato (COO^-) se presentan a 1597 y 1408 cm^{-1} , respectivamente.⁴⁶ Por último, el estiramiento A del grupo éter

alifático se encuentra a 1025 cm^{-1} .⁴⁷

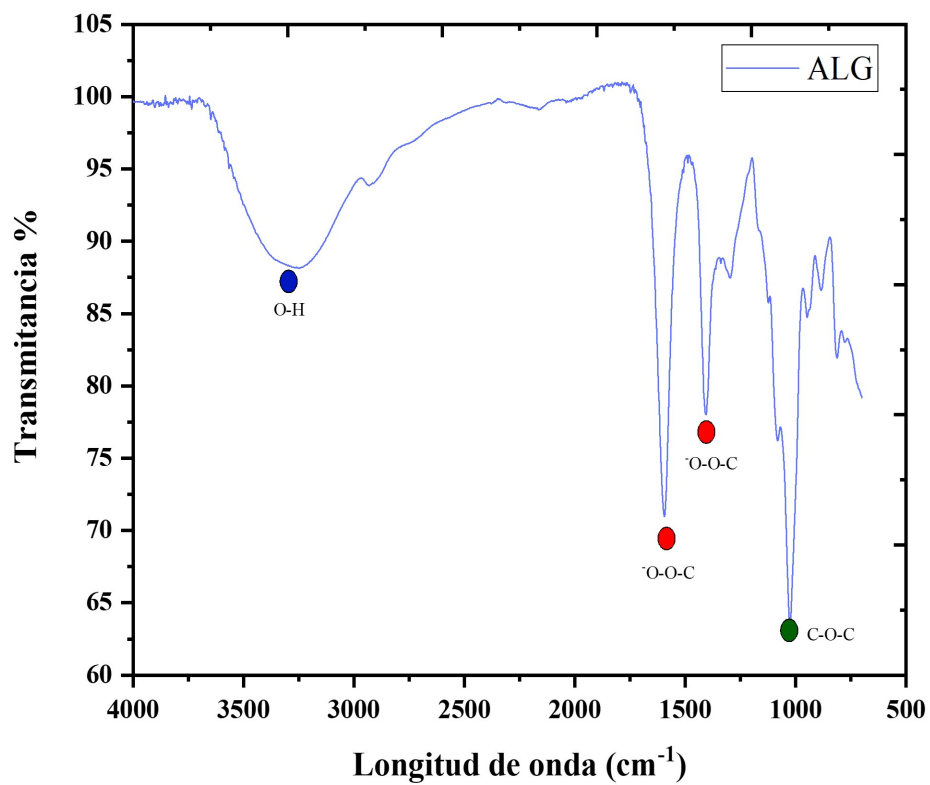


Figura 13. Espectro FTIR del biopolímero ALG.

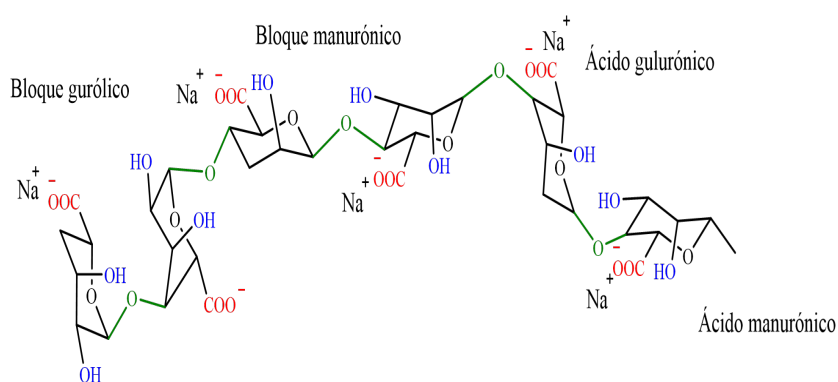


Figura 14. Estructura química del ALG.

Tabla 2: Grupos funcionales característicos del ALG en el FTIR

Número de onda (cm^{-1})	Modo vibratorio
3257	Estiramiento OH
1597	Estiramiento A COO^-
1408	Estiramiento S COO^-
1025	Estiramiento A COC

En la figura 15 se muestra el espectro obtenido correspondiente al polisacárido GELAT en donde se destacaron las señales características del mismo. Cada color corresponde a un grupo funcional en específico, estas etiquetas se pueden complementar con la figura 16 que corresponde a la estructura química de la GELAT. Los enlaces peptídicos de los polipéptidos (la gelatina está conformada por los polipéptidos glicina, prolina e hidroxiprolina) y proteínas tienen bandas vibracionales representativas que permiten elucidar su estructura, los más importantes son la amida A (estiramiento N-H), amida I (estiramiento C=O), amida II (vibración N-H) y amida III (estiramiento C-N y flexión N-H). En la tabla 3 se presentan los números de onda en donde aparecen estas vibraciones características en la GELAT. La amida A aparece a 3284 cm^{-1} , la amida I, II y III aparecen a 1630 , 1527 y 1234 cm^{-1} , respectivamente.⁴⁸

⁴⁷

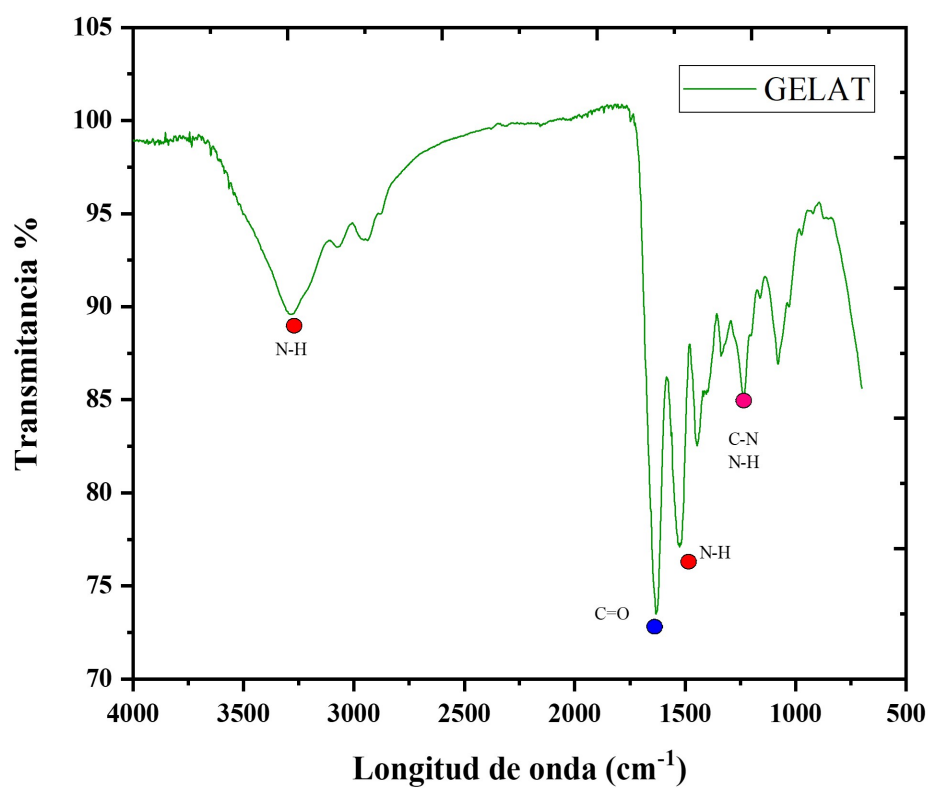


Figura 15. Espectro FTIR del biopolímero GELAT.

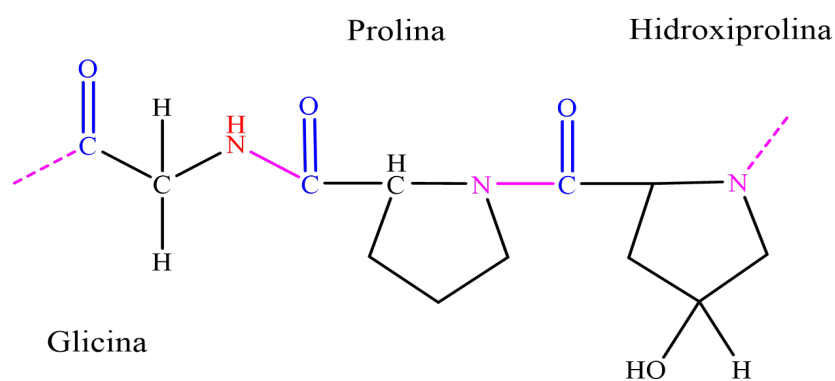


Figura 16. Representación estructural de los grupos funcionales de la GELAT en el FTIR.

Tabla 3: Grupos funcionales característicos de la GELAT en el FTIR

Número de onda (cm^{-1})	Modo vibratorio
3284	Amida A
1630	Amida I
1527	Amida II
1234	Amida III

En la figura 17 Se observan los espectros FTIR de los andamios ALG/GELAT entrecruzados con diferentes técnicas: los andamios ALG/GELAT- CaCl_2 (espectro de color rosa), ALG/GELAT-WET (espectro color azul) y ALG/GELAT-VAP (espectro color verde). En general, todos tienen bandas características tanto del ALG y la GELAT, sin embargo, se apreciaron algunos detalles más específicos de acuerdo al tipo de entrecruzamiento que se llevó a cabo. En la tabla 4 se muestran los números de onda correspondientes al grupo funcional señalado de los tres tipos de andamios. Se observó una reducción de la intensidad en las señales correspondientes al COO^- alrededor de 1597 cm^{-1} (solapada por las señales $\text{C}=\text{O}$ y NH) y 1029 cm^{-1} correspondiente al C-O-C . En la investigación de Saraai y colaboradores⁴⁶ atribuyen esta reducción de intensidad al debilitamiento de estos enlaces cuando se estiran para acomodar la estructura del ALG alrededor de los iones Ca^{2+} . En los entrecruzamientos que se utilizó al GTA como agente entrecruzante (junto con un paso anterior de entrecruzamiento con CaCl_2) hay dos señales específicas que se llevaron la atención (marcado en un rectángulo rojo en la figura 17), estas son las que aparecen a 2919 y 2849 cm^{-1} , propias del estiramiento $-\text{CH}_2-$ (cadena alquílica de entrecruzamiento) y del estiramiento C-H (correspondiente al aldehído), respectivamente.⁴⁶

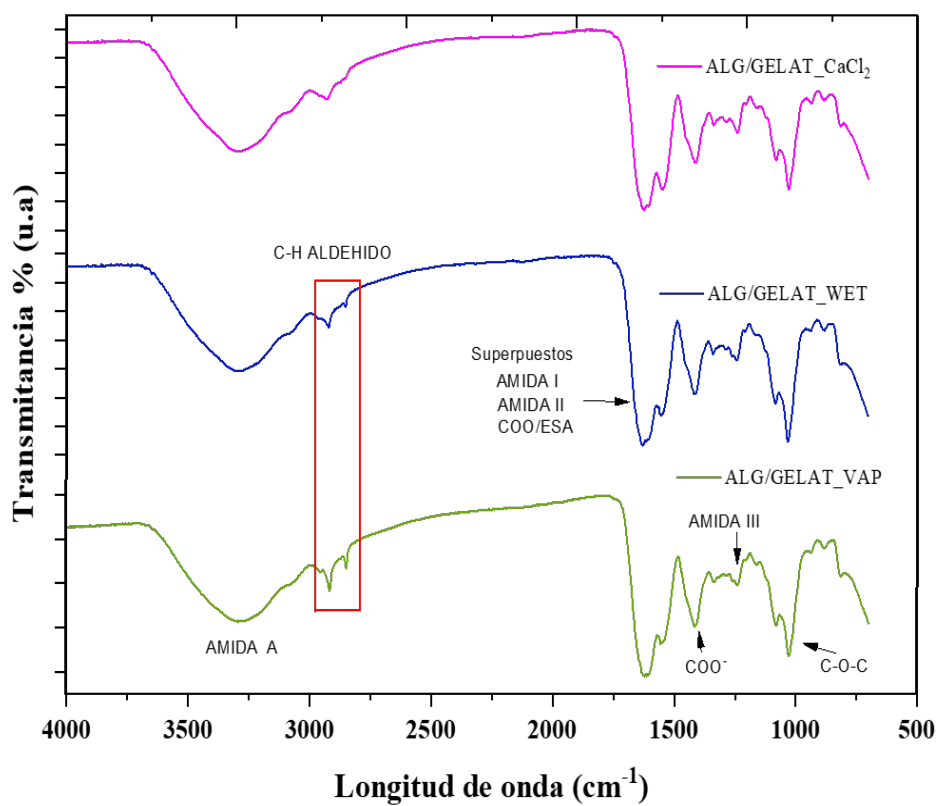


Figura 17. Espectro FTIR los andamios ALG/GELAT.

Tabla 4: Grupos funcionales característicos del ALG/GELAT en el FTIR

Número de onda (cm^{-1})	Modo vibratorio
3284	Estiramiento Amida A
2919	Estiramiento $-\text{CH}_2-$
2849	Estiramiento C-H
1630, 1597, 1527	Estiramiento Amida I y II
1403	Estiramiento S COO^-
1234	Estiramiento Amida III
1029	Estiramiento A C-O-C

Generalmente, se asume que el entrecruzamiento con GTA con la gelatina toma lugar por la reacción entre los grupos amino (NH_2) libres de la gelatina y ambos CHO del GTA formando una base de Schiff. Sin embargo, la reacción del GTA con las proteínas de la gelatina es muy heterogénea y complicada, por lo que no solo se forman bases de Schiff por toda la estructura, sino que se presentan diversas combinaciones entre los grupos CHO y los NH_2 por lo que es de esperarse que algunos grupos CHO queden sin reaccionar y son a los que se le puede atribuir la señal que se presenta en los andamios ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET.^{37,49} Sin embargo, la señal correspondiente a la cadena alquílica de entrecruzamiento nos permitió comparar la formación de estas cadenas en respuesta al entrecruzamiento de la GELAT con el GTA, haciendo una relación directa con la intensidad de la señal correspondiente a estos grupos y haciendo posible una comparación cualitativa en la proporción de entrecruzamiento químico entre las muestras VAP y WET. Por lo que el aumento en la intensidad de esta señal en el andamio tratado con el método VAP, se le atribuyó a que este tuvo un mayor alcance en la estructura interna del andamio, lo que provocó un entrecruzamiento más eficaz.

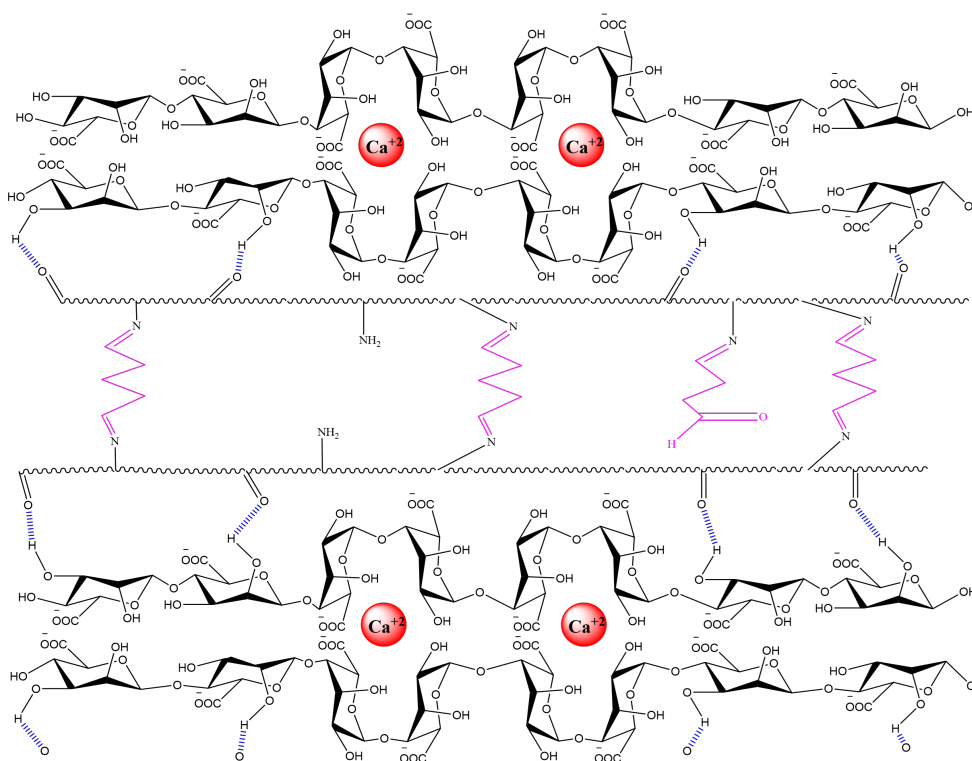


Figura 18. Representación estructural del andamio ALG/GELAT entrecruzado con $CaCl_2$ y GTA

En la figura 18 se propone una posible estructura del andamio ALG/GELAT entrecruzado con CaCl_2 en conjunto con el GTA. Las esferas rojas representan los iones Ca^{2+} , los cuales se encuentran interaccionando electrostáticamente con los iones carboxilato e hidroxilo del ALG formando una estructura llamada egg box.⁵⁰ Las estructuras químicas en color rosa es propio de los enlaces entre la gelatina y el GTA, y los enlaces de color azul representan algunos de los enlaces de hidrógeno que podrían presentarse entre el ALG y GELAT.

6.3. Dispersión de luz dinámica y potencial Z de los policomplejos QT/ADN

En la figura 19 se observa el gráfico del diámetro hidrodinámico en función de las diferentes relaciones N/P que presentan los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN. En el caso de los policomplejos QT/ADN, en un N/P de 0.5 a 2.0 el diámetro hidrodinámico aumentó de 247 a 1399 nm. Este diámetro descendió hasta 418 nm en la muestra N/P 3. Las muestras N/P 5 y N/P 10 tuvieron un diámetro de 413 y 399 nm, respectivamente. En los policomplejos TMQ/ADN en un N/P de 0.5 a 2.0 el diámetro hidrodinámico aumentó de 480 a 1,600 nm y la relación N/P donde el diámetro hidrodinámico fue mayor se presentó entre el N/P 2 y N/P 3. Las muestras N/P 5 y N/P 10 tuvieron un diámetro de 305 y 291 nm, respectivamente. A partir de estas muestras el diámetro se mantuvo relativamente constante en ambos sistemas (QT/ADN y TMQ/ADN).

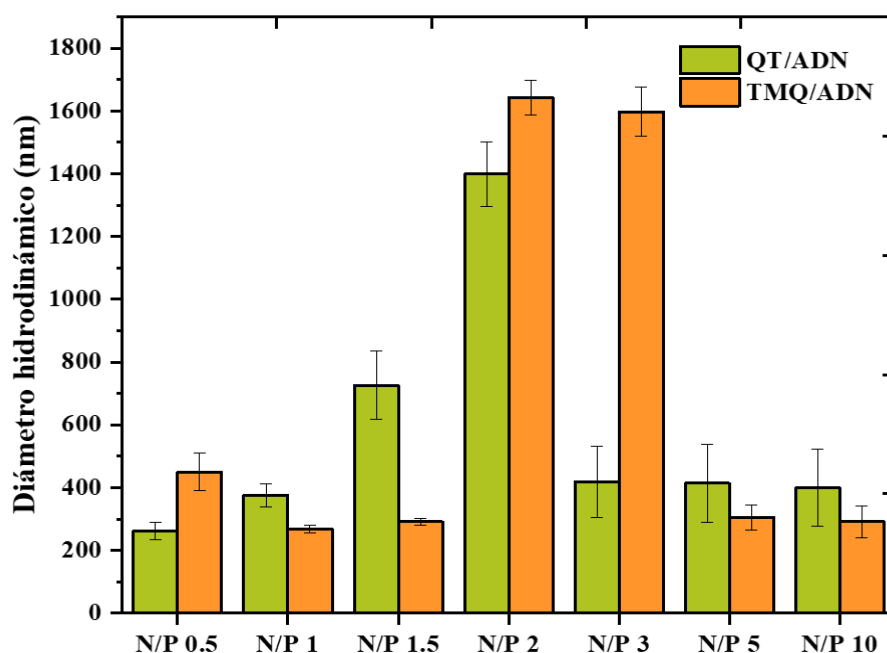


Figura 19. Gráfico del diámetro hidrodinámico de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN a diferentes N/P.

La literatura menciona que el aumento y descenso abrupto del diámetro hidrodinámico se relaciona con el punto isoeléctrico de los policomplejos, es decir, un diámetro hidrodinámico alto se traduce a que los policomplejos de ambos sistemas tienen una carga neta alrededor de 0, por lo que son sistemas inestables, al aumentar la concentración de QT este fenómeno se compensa al tener una mayor cantidad de cadenas poliméricas disponibles para encapsular al ADN y los policomplejos adquieren un carácter más estable.⁵¹ Este análisis se puede correlacionar con los datos que arrojó el POT Z, los cuales se encuentran en la figura 20. Los policomplejos TMQ/ADN lograron tener un diámetro menor alrededor de 100 nm con respecto a los de QT/ADN. A su vez, de acuerdo a la desviación estándar presentadas en el gráfico, también demuestran ser un sistema más reproducible. Existe otro fenómeno interesante que se presenta en los resultados de DLS. Los policomplejos de los dos sistemas a N/P bajos presentan un diámetro hidrodinámico menor que los valores a N/P más elevados. En este caso el

grupo de trabajo llegó a la siguiente hipótesis: El poco QT disponible a N/P entre 0.5 y 1.5 compacta cantidades de ADN correspondientes a la concentración al respectivo N/P por lo que se forman policomplejos muy pequeños en los segmentos grandes de ADN y, debido a que el equipo utilizado se basa en la ley de Stokes-Einstein solo la luz dispersada por estos pequeños policomplejos serán tomados en cuenta descartando los segmentos grandes de ADN no compactados.^[52]

El POT Z de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN mostró a que N/P ocurrió la inversión de carga superficial de los policomplejos (figura [20](#)). Las muestras QT/ADN con un N/P de 0 a 1.5 resultaron con una carga negativa de -28, -29, -34 y -26 mV, respectivamente. La muestra con un N/P 2 exhibió inversión de carga, pero el POT Z no es lo suficientemente positivo para asegurar la estabilidad coloidal del policomplejo, lo cual se puede relacionar al diámetro que se presentó en la figura [19](#). Bravo y colaboradores^[53] obtuvieron resultados similares, explicando que el complejo alcanza su radio hidrodinámico máximo al llegar al punto isoeléctrico del complejo, que en nuestro caso fue el policomplejo con un N/P =2. El POT Z de las muestras con un N/P de 3, 5 y 10 presentaron una carga superficial de 7.7, 11.2 y 13.9 mV, por lo que la carga superficial de los policomplejos se invirtió de negativa a positiva conforme aumentaba la concentración de quitosano. Lo anterior se relaciona al radio hidrodinámico de las mismas muestras. Las cuales disminuyeron su radio hidrodinámico al tener un POT Z positivo. Una historia similar sucede en los policomplejos QT/ADN, sin embargo, la inversión de carga de estos ocurre entre un NP de 2 y 3 (relacionado con el diámetro hidrodinámico a estos N/P).

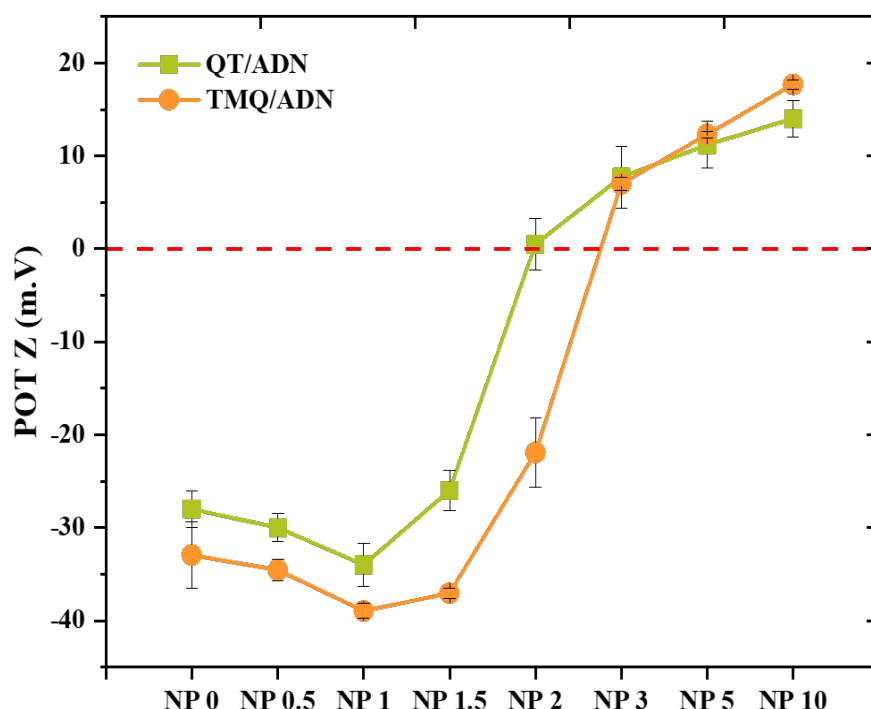
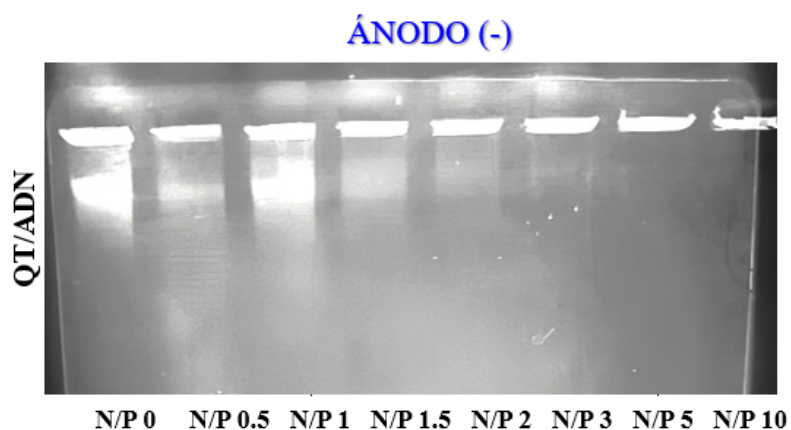


Figura 20. Gráfico del POT Z de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN a diferentes N/P.

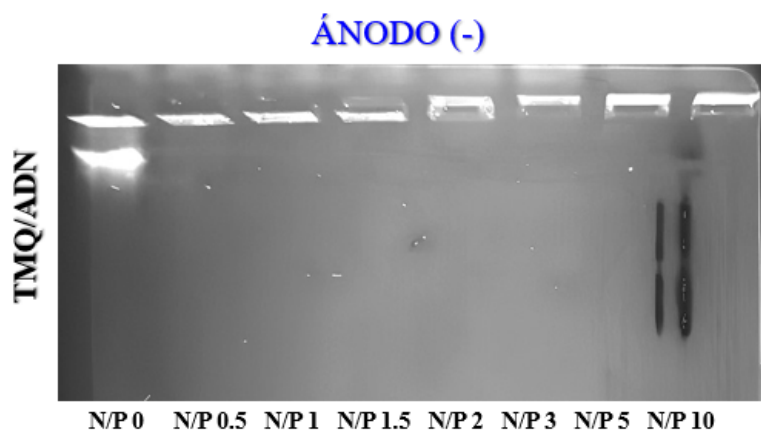
Lo más relevante en los resultados de POT Z fue que los policomplejos TMQ/ADN a un N/P 10 presentaron una carga superficial más positiva (alrededor de 20 mV) en comparación con los de QT/ADN (alrededor de 12 mV). Por lo que se esperaría una mejor interacción de los policomplejos TMQ/ADN con la membrana citoplasmática de la célula, la cual tiene una carga superficial negativa. Estos resultados se pueden comparar y enriquecer con los obtenidos por Garbacki y colaboradores, donde el POT Z fue más alto en sus partículas formadas por TMQ comparadas con las sintetizadas con QT en un pH de 7.4, a diferentes pH no encontraron diferencias en términos de POT Z entre las partículas de QT y ADN (utilizando una relación N/P 30).^[54]

6.4. Electroforesis en gel de los policomplejos QT/ADN

En la Figura 21 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN a las siguientes relaciones $N/P = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5$ y 10 . Los policomplejos se visualizan por la tinción con bromuro de etidio. Este se intercala selectivamente en las bases nitrogenadas del ADN, en donde la parte aromática de la molécula se alinea con el ADN, formando una fuerte interacción de apilamiento, proporcionándole un aumento en su fluorescencia que al estar expuesto a una fuente de luz UV emite una luz roja-anaranjada que se puede diferenciar fácilmente a simple vista (la fotografía se presenta en escala de grises).^{55,56} En la figura 21a al aumentar las concentraciones de QT y manteniendo la concentración de ADN constante, se observaron diferentes niveles de complejación. En el caso de la muestra con valor $N/P = 0$ se observó una migración hacia el cátodo (signo positivo rojo), este era el resultado esperado al no tener la protección del QT como vehículo. En el caso de la muestra con un N/P de 0.5 a 1.5 también se presentó una migración pronunciada debido a que la cantidad de QT no es la suficiente para proteger al ADN de su migración a través del gel. En el carril 5 ($N/P = 2$) también se presenta un ligero desplazamiento del ADN. Al relacionar estos resultados con los obtenidos en POT Z estas muestras están alrededor el punto isoeléctrico de los policomplejos. En las muestras N/P $3, 5$ y 10 ya no se apreció el desplazamiento del ADN, en estas muestras la concentración de QT se iguala a la de ADN o la supera. La complejación se visualiza como una retención de los policomplejos en el ánodo a valores de N/P altos, donde se anticipa que el polication (QT en este caso) recubra la superficie del policomplejo y confine (compacte) el ADN al interior. Mientras tanto, en los sistemas correspondientes a un N/P bajo (a relaciones N/P antes de la condensación de los policomplejos) el ADN es libre para migrar hacia el cátodo en el gel. En la literatura revisada se sigue la misma tendencia, la migración del ADN al cátodo a través del gel de agarosa se detiene a una relación estequiométrica (teórica) alrededor de $N/P = 1$.^{11,53,57,58}



CÁTODO (+)
(a) Policomplejos QT/ADN



CÁTODO (+)
(b) Policomplejos TMQ/ADN

Figura 21. Ensayo de retardación en electroforesis en gel de los policomejos QT/ADN y TMQ/ADN

Por su parte, en la la figura 21b se observa una migración del ADN al cátodo cuando este no esta en presencia del TMQ (N/P 0). En los siguientes carriles se observa una retardación total del ADN. Sin embargo, se observa cierto movimiento dentro de los carriles: a N/P bajos la muestra se observa direccionada hacia el cátodo, mientras que a N/P altos (NP 3, 5 y 10) la muestra se direcciona hacia el ánodo. Se relaciona este comportamiento con la carga superficial positiva de los policomplejos obtenida en los ensayos de POT Z. Estos resultados indicaron una compactación más eficiente del ADN utilizando al TMQ como vehículo del material genético.

6.5. Microscopía de fuerza atómica de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN

En la figura 22 se presentan micrografías de ADN y complejos QT/ADN, respectivamente. En la figura 22a se aprecia el ADN enrollado tomando una forma parecida a un cilindro. De este sale una pequeña hebra que se aprecia mejor en la figura 22b, donde la cadena de ADN está casi totalmente extendida.

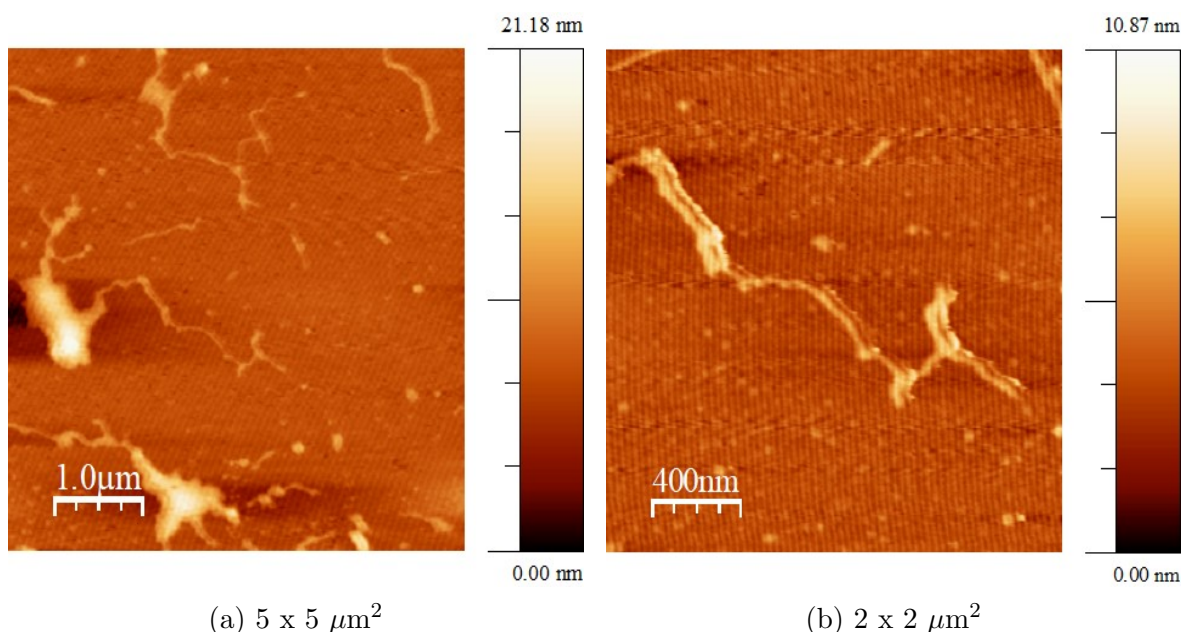


Figura 22. Imágenes obtenidas por AFM de una molécula de ADN

En la figura 23a correspondiente a los policomplejos QT/ADN con un N/P 10 se observaron morfologías principalmente de tipo globulares y de cepillo. Diversos autores mencionan que la morfología esperada para complejos utilizando QT de bajo peso molecular (el cual fue el utilizado en este proyecto) adopta morfologías tipo toroide/varilla, lo que no fue el caso. Ellos explican que la densidad de carga del QT de bajo peso molecular no es suficiente para formar glóbulos,^{59,61} sin embargo, al fotografiar un policomplejo con un N/P 10 y, sabiendo de antemano (por los resultados de DLS y POT Z) que a esta relación N/P la densidad de carga es tal que proporciona una carga superficial positiva y un tamaño estable es de esperar una conformación tipo glóbulo o de cepillo en nuestra muestra. Además, el diámetro obtenido a partir del análisis de la figura 23b coincide con los datos obtenidos por DLS, aproximadamente 400 nm de

diámetro.

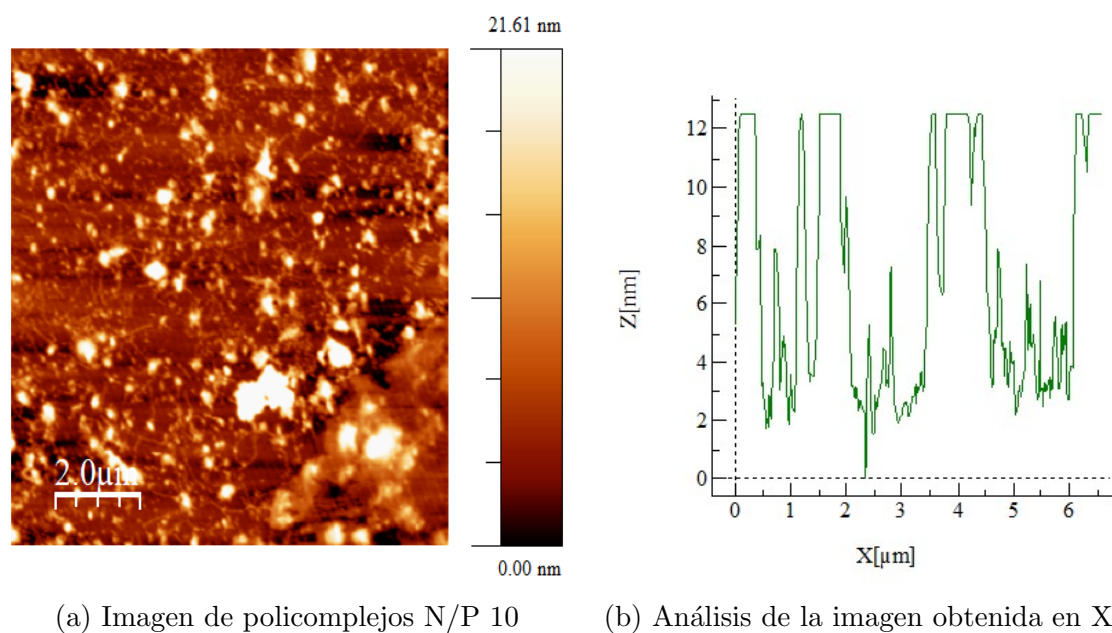


Figura 23. Imagen obtenida por AFM de los policomplejos QT/ADN con una $N/P = 10$ (a) y su perfil de topografía (b)

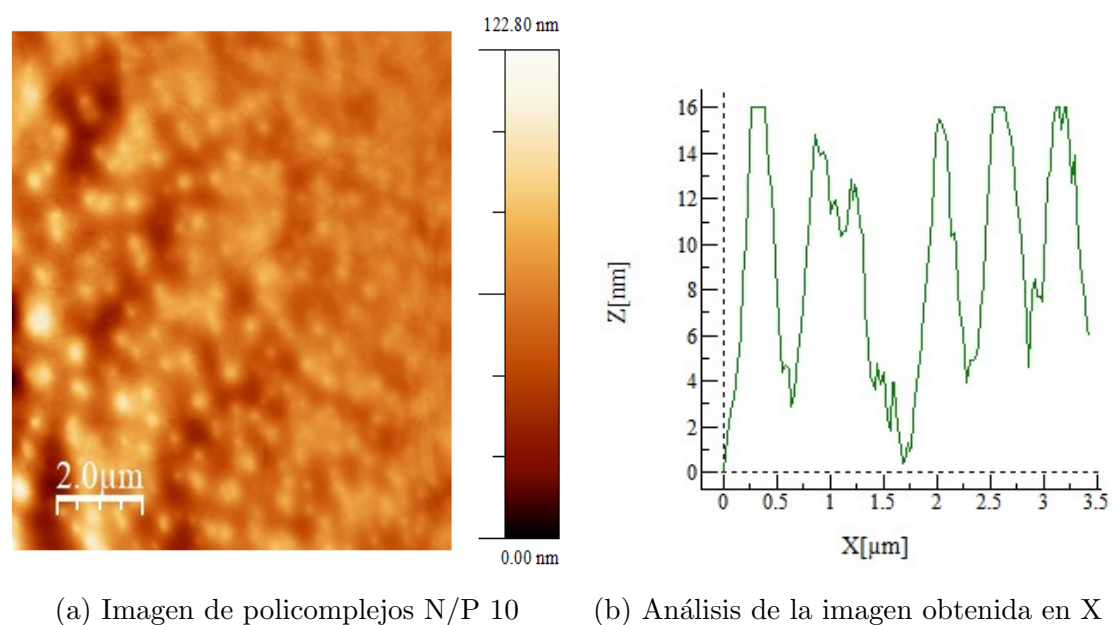


Figura 24. Imagen obtenida por AFM de los policomplejos TMQ/ADN con una $N/P = 10$ (a) y su perfil de topografía (b)

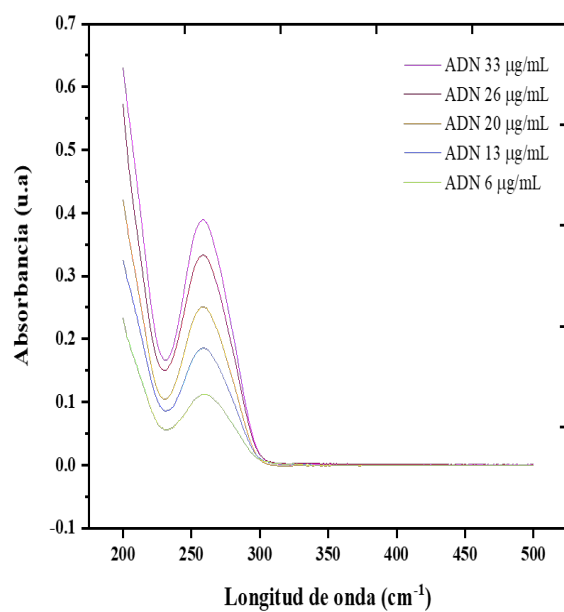
En la figura [24a](#) correspondiente a los policomplejos TMQ/ADN con un $N/P = 10$ se observaron morfologías tipo esfera. Además se observa una mayor población y disper-

sión de los policomplejos TMQ/ADN en comparación con la imagen correspondiente a los policomplejos QT/ADN (figura 23). A su vez, el diámetro obtenido a partir del análisis de la figura 24b coincide con los datos obtenidos por DLS, aproximadamente 300 nm de diámetro. Jiang y colaboradores obtuvieron en sus policomplejos TMQ/ADN a un N/P 10 morfologías también en su mayoría de tipo esferas, donde mencionan que los policomplejos obtenidos a una relación N/P igual no muestran cambios en términos de morfología y tamaño.²⁹ De manera general, Strand y colaboradores⁵⁸ mencionaron que sin importar la naturaleza del agente condensante (del ADN), las formas compactadas resultantes adoptan un intervalo de morfologías limitado, generalmente una mezcla de toroides, varillas, glóbulos y esferas, aunque en cantidades relativamente diferentes.

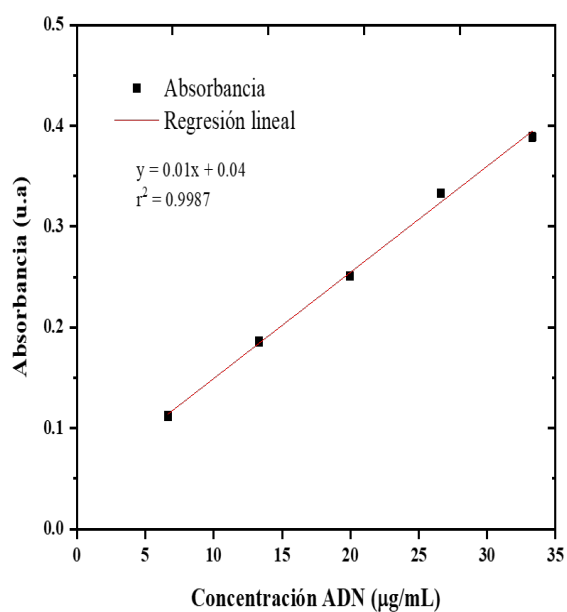
6.6. Eficiencia de cargado y asociación de los policomplejos QT/ADN

La eficiencia de asociación se relaciona con el porcentaje del fármaco (ADN) total disponible que se ha encapsulado dentro de los vectores, mientras que la capacidad de carga se refiere a la cantidad de fármaco cargado por masa de partículas (porcentaje de ADN que corresponde al peso total de la partícula).⁶² Ambos son parámetros clave para identificar que tan funcional es el complejo QT-ADN utilizado en este proyecto.

En la figura 25 se presentan dos gráficas, el espectro UV-VIS del ADN a diferentes concentraciones conocidas (figura 25a) en una solución tampón de BIS-TRIS-EDTA a 10mM y la regresión lineal de los datos obtenidos (curva de calibración, figura 25b) la cual resultó tener una r^2 de 0.99. A partir de la curva de calibración se obtuvieron las concentraciones de ADN en cada sistema y punto de tiempo estudiados, empleadas en el cálculo del porcentaje de capacidad de cargado (%LC, por sus siglas en inglés) y el porcentaje de eficiencia de asociación (%AE, por sus siglas en inglés).



(a) Espectro UV-VIS



(b) Curva de calibración

Figura 25. Espectros de absorbancia del ADN a 260 nm (a) y curva de calibración del ADN (b)

En la figura 26 y 27 se observan los espectros UV-VIS de las diferentes muestras de TMQ/ADN y QT/ADN a diferentes N/P midiendo cuantitativamente la concentración de ADN presente en el sobrenadante de las muestras, para así calcular el %LC y la %AE. Se observó en ambas gráficas una tendencia desde N/P 0 a N/P 1, en donde la intensidad de la señal decrecía, sugiriendo una disminución de la concentración de ADN libre (sin compactar) al incrementar la relación N/P. En la gráfica correspondiente los sobrenadantes de la solución TMQ/ADN (27), partir de la relación N/P 1.5 la banda del ADN decrece a niveles donde es despreciable, ocurrió lo mismo en los sobrenadantes de la solución QT/ADN (26) pero a una relación N/P 2. Se obtuvieron las concentraciones de ADN presente con la curva de calibración obtenida (25b). De acuerdo a esta, la concentración de ADN libre en las muestras N/P 1.5, 2, 3, 5 y 10 (TMQ/ADN) es relativamente cero, pues la absorbancia obtenida no corresponde a ningún valor en la curva de calibración, por lo que se hipotetiza que prácticamente todo el ADN se encuentra interaccionando con el TMQ.

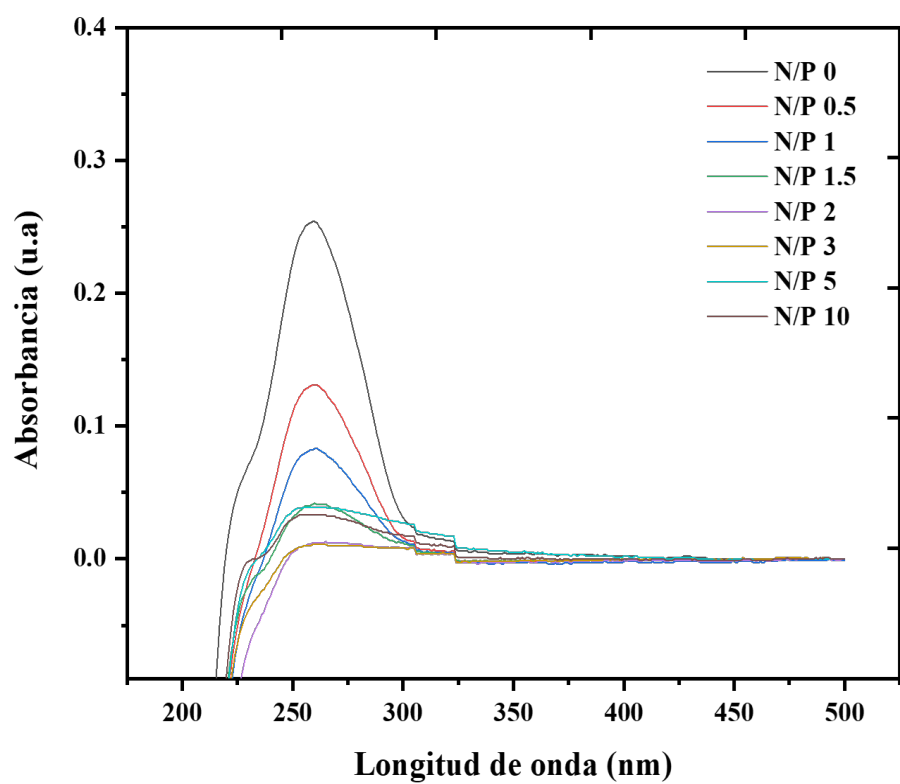


Figura 26. Espectros UV-Vis del ADN libre de soluciones de QT/ADN a diferentes N/P

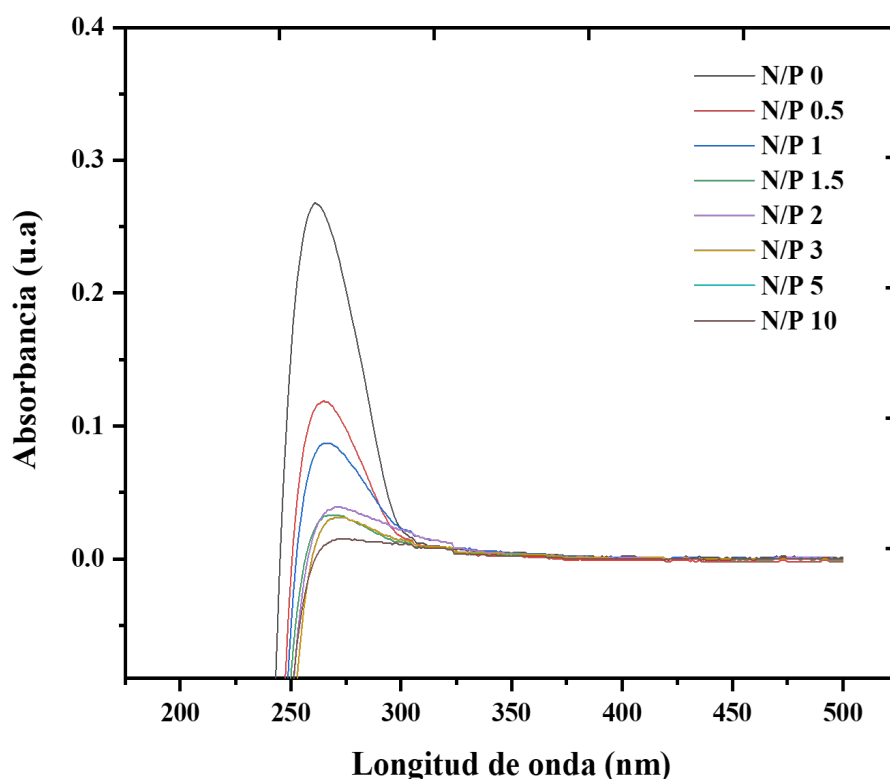


Figura 27. Espectros UV-Vis del ADN libre de soluciones de TMQ/ADN a diferentes N/P

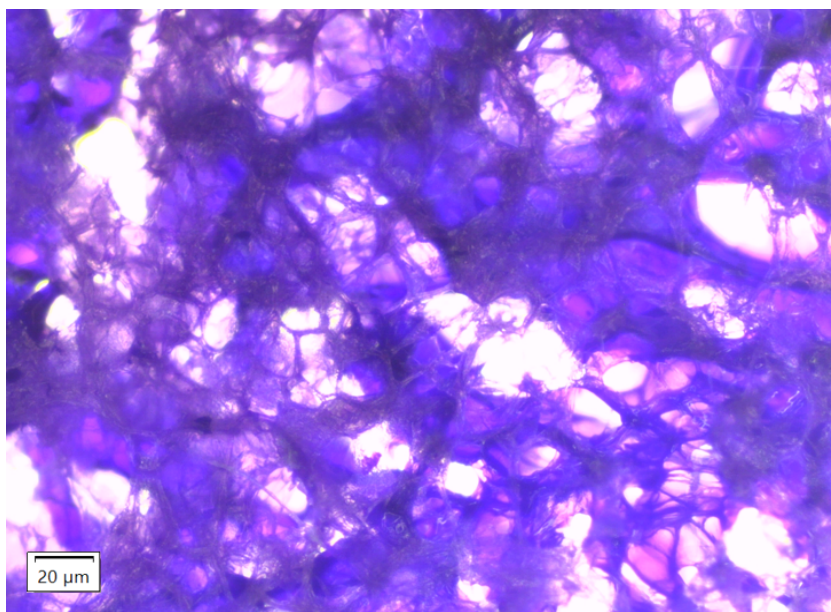
Por lo que los porcentajes de AE solo se calcularon para relaciones N/P con valor de 0.5 y 1 para las muestras TMQ/ADN y N/P 0.5, 1, y 1.5 para las muestras QT/ADN. En la tabla 5 se observan los porcentajes LC y AE correspondientes tanto a las muestras QT/ADN y TMQ/ADN. A partir de esta tabla se observa que los valores de AE en ambos aumentan con la relación N/P, tomando en cuenta que al no tener lectura de ADN libre en las muestras N/P 1.5 a 10 (TMQ/ADN) se consideró que tienen un valor de %AE aproximado a 100 %. EL porcentaje LC disminuyó al aumentar la concentración de QT pues el porcentaje en peso del ADN disminuía al ser cada vez compactado con más cadenas de QT o TMQ. Con los resultados obtenidos se concluye que el TMQ compacta de manera más eficiente al ADN comparando los valores de %AE con el QT a relaciones N/P iguales. Llegando a tener una eficiencia de asociación de alrededor de 12 % más.

Tabla 5: Eficiencia de cargado y eficiencia de asociación de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN

*	QT/ADN	TMQ/ADN
N/P	L.C(%) / A.E(%)	L.C(%) / A.E(%)
0.5	71/59	75/73
1	62/81	65/92
1.5	55/90	57/ $\approx$ 100
2	50/ $\approx$ 100	50/ $\approx$ 100
3	40/ $\approx$ 100	40/ $\approx$ 100
5	29/ $\approx$ 100	29/ $\approx$ 100
10	20/ $\approx$ 100	20/ $\approx$ 100

6.7. Microscopía óptica de los andamios ALG/GELAT

En la figura [28](#) se observa la imagen obtenida por microscopía óptica del andamio ALG/GELAT entrecruzado solo con CaCl_2 a una magnificación de $4x$, el andamio fue teñido con cristal violeta. Se verificó la existencia de poros con un diámetro promedio de $17.42 \pm 3.95 \mu\text{m}$. En la figura [29](#) se presenta otra muestra de andamio, pero teñida con rodamina. La fotografía también se tomó a $4x$. Se observó un andamio con estructura porosa.

**Figura 28.** Fotografía del andamio CaCl_2 con una magnificación de $4x$ teñido con cristal violeta

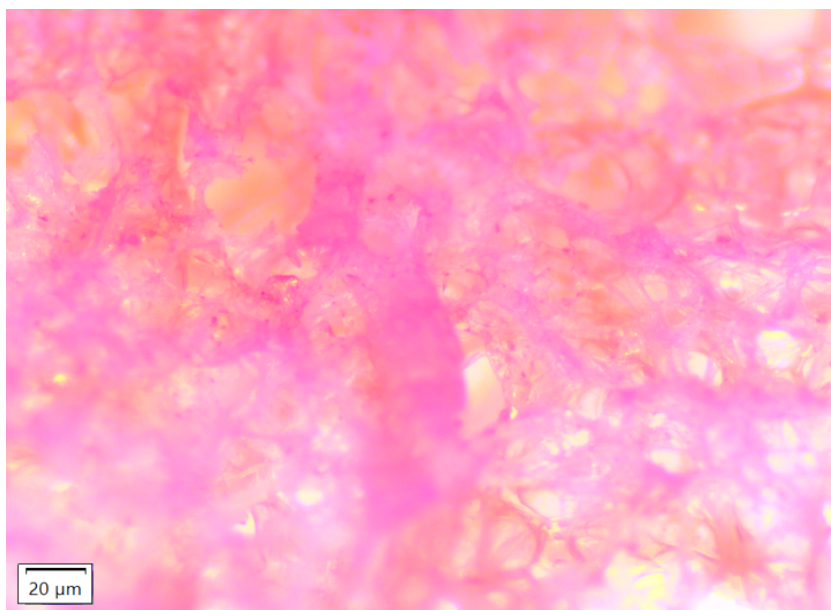


Figura 29. Fotografía del andamio CaCl_2 con una magnificación de $4x$ teñido con rodamina

En la figura [30](#) se encuentra la fotografía obtenida por MO del andamio entrecruzado con el método VAP. Este mostró una estructura semi-porosa, debido a las películas finas, con diferentes niveles de transparencia. El diámetro promedio de los poros en con este método de entrecruzamiento fue de $11.32 \pm 3.29 \mu\text{m}$. En la figura [31](#) esta otra muestra del mismo tipo de andamio pero teñido con rodamina. La fotografía también se obtuvo a $4x$. De la misma manera que la muestra teñida con cristal violeta se observó una estructura porosa con un filme sobre los poros, haciendo parecer que este método permite que la estructura sea más sólida, sin tanto espacio para los poros.

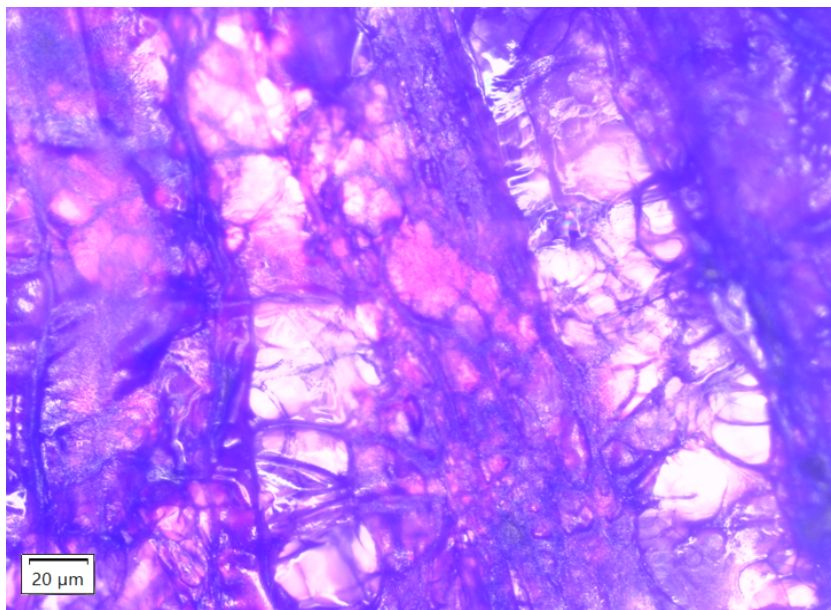


Figura 30. Fotografía del andamio VAP con una magnificación de $4x$ teñido con cristal violeta

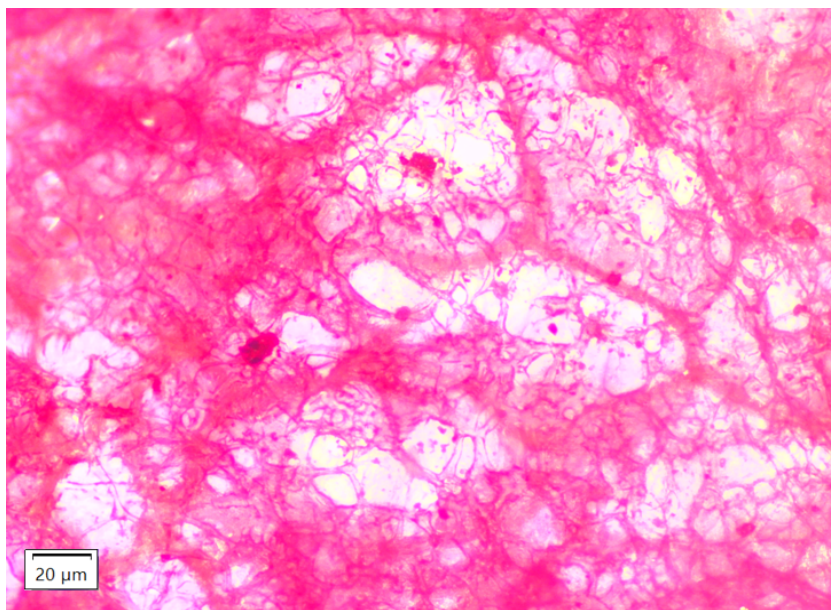


Figura 31. Fotografía del andamio VAP con una magnificación de $4x$ teñido con rodamina

El último método fotografiado fue el WET, el cual se encuentra en la figura [32](#), este está teñido con cristal violeta con una magnificación de $4x$. Se distinguió una estructura muy porosa con el ordenamiento de las cadenas poliméricas aparentemente más definido. El diámetro promedio de los poros fue de $30.74 \pm 7.37 \mu m$. La definición

de los poros fue tal que se pudieron tomar fotografías con una magnificación de $10\times$ y obtener imágenes con un alto nivel de detalle, lo que se apreció en la figura 33

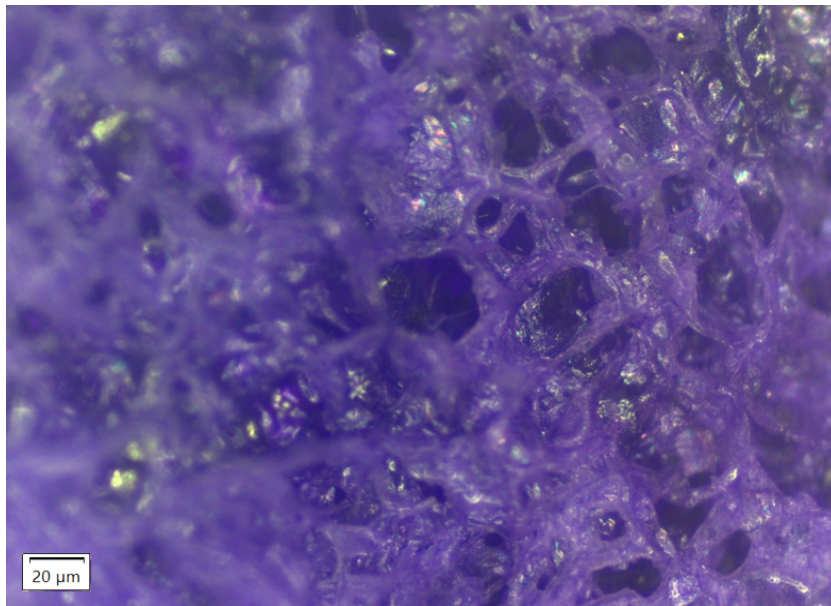


Figura 32. Fotografía del andamio WET con una magnificación de $4\times$ teñido con cristal violeta

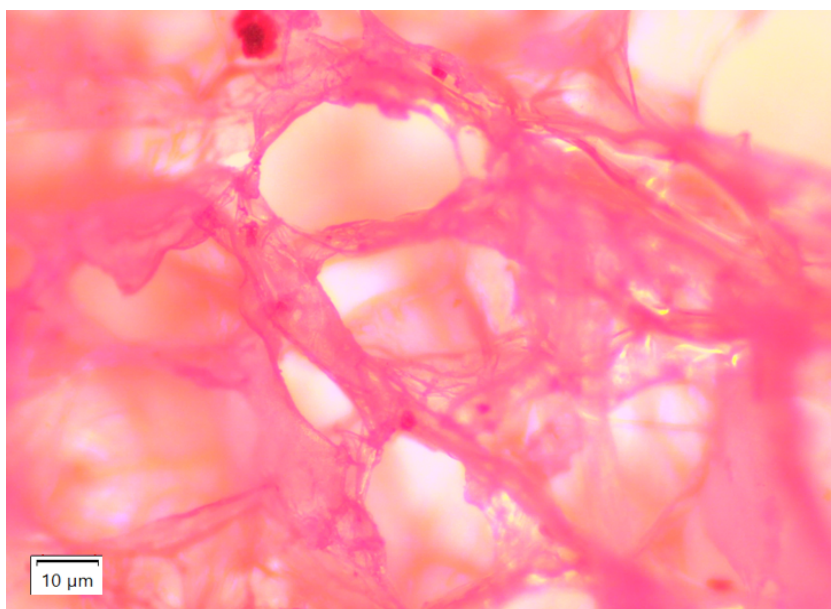


Figura 33. Fotografía del andamio VAP con una magnificación de $4\times$ teñido con rodamina

Los tres diferentes métodos de entrecruzamiento resultan en poros con distintas morfologías y características. Principalmente en el tamaño, en donde el andamio entrecruzado con el método WET tuvo el diámetro promedio más grande, por el contrario, el andamio VAP fue el de diámetro más pequeño. Lien y colaboradores^[63] encontraron que dependiendo del tipo de célula objetivo en el andamio, fueron diferentes los intervalos de tamaño de poros necesarios para un crecimiento celular óptimo, en el caso de condrocitos porcinos se encontró que la proliferación y actividad metabólica mejoró al incrementar el tamaño de los poros y su interconexión.^[64]

6.8. Pruebas de hinchamiento en los andamios ALG/GELAT

La capacidad de absorber agua (hinchamiento) es una de las propiedades importantes en los hidrogeles que planean utilizarse en aplicaciones biomédicas. La presencia de agua mejora las propiedades biológicas del sistema, ya que limita la energía libre superficial interfacial, además de que la hidratación de la estructura facilita el flujo de nutrientes, oxígeno y excreciones celulares a través de los poros del material.^[35] En la figura [34](#) se encuentra la gráfica correspondiente al %H de cada método de entrecruzamiento para los andamios ALG/GELAT- CaCl_2 , ALG/GELAT-VAP y ALG/GELAT-WET. Teniendo en cuenta que el hinchamiento se calculó a partir del aumento en peso en seco de cada hidrogel, a 30 min de incubación, tanto la muestra WET como CaCl_2 alcanzaron un hinchamiento del 100 % (el peso del andamio aumento en un 100 % respecto al peso inicial), mientras que la muestra VAP alcanzo 233 %. Posteriormente, hubo un incremento abrupto en el porcentaje de hinchamiento a los 60 min, de más de 8 veces para la muestra CaCl_2 y de 10 veces para la muestra WET, alcanzando porcentajes de 814 % y 1046 %, respectivamente. La tendencia del incremento en el porcentaje de hinchamiento se observa visualmente en la figura [34](#).

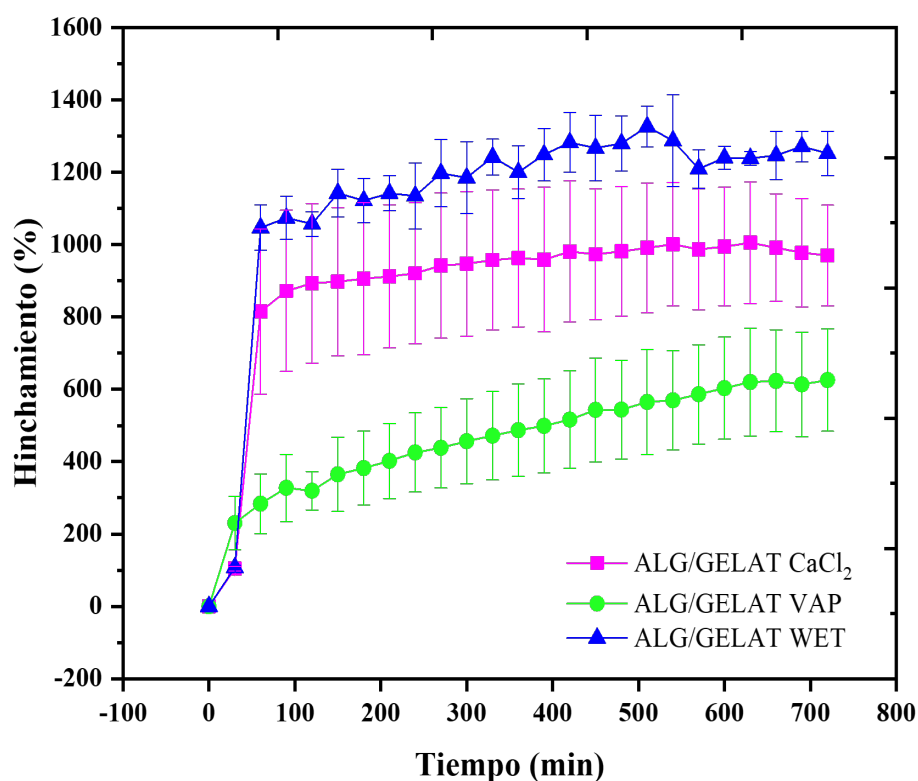


Figura 34. Gráfica del porcentaje de hinchamiento a 12 h de los andamios ALG/GELAT_ CaCl_2 , ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET

A partir de los 60 min también se observó que los porcentajes de hinchamiento no variaron mucho, logrando dibujar una línea con tendencia recta en la gráfica, indicando que los andamios CaCl_2 y WET alcanzaron su punto de equilibrio. En contraste, la muestra VAP alcanzó el equilibrio hasta aproximadamente 9.5 h (570 min). De acuerdo con los resultados que se obtuvieron, se dedujo que de las tres muestras la que tuvo una mayor capacidad de captar agua fue la de ALG/GELAT_WET, ya que alcanzó porcentajes de hasta 1322 %.

El proceso de captación de agua o hinchamiento se lleva a cabo en diferentes pasos. Primero el agua interacciona con los grupos más hidrofílicos presentes en el andamio, este porcentaje de agua se le denomina agua ligada primaria. En el segundo paso y gracias a la previa hidratación en el paso anterior, los grupos hidrofílicos del hidrogel

exponen a los grupos hidrofóbicos del mismo, los cuales comienzan a interactuar con el agua por medio de interacciones hidrofóbicas que se producen cuando al plegarse un polímero los radicales hidrófobos se acercan debido a que son excluidos por el agua, lo que se denomina moléculas de agua enlazadas secundarias. Una vez que ocurren estos dos pasos, la fuerza osmótica de las cadenas permite que la red absorba más agua. Sin embargo, a esta se opone la presencia uniones a través del entrecruzamiento covalente o iónico, ya que propician una mayor retracción de la red.^[35] Los resultados obtenidos en el FTIR mostraron que el andamio ALG/GELAT_VAP tuvo un entrecruzamiento mayor con el GTA que el andamio ALG/GELAT_WET, por lo que el hecho que tuviera una menor captación de agua se atribuye a una mayor oposición a la fuerza osmótica. El los trabajos de Azizian^[65] y Alizadeh^[66] se coincide en que una mayor porosidad en el andamio permite una mayor captación de agua.

6.9. Pruebas de retención de agua en los andamios ALG/GELAT

La habilidad de los andamios de mantener el agua y la permeabilidad de la misma es uno de los requerimientos básicos para su uso sustitutos de algunos tipos de tejidos. Estos es importante para la absorción de fluidos corporales y la transferencia de nutrientes y metabolitos a través del material^[66] (lo que se también se relaciona con la arquitectura interna del andamio y qué tamaño y qué tan interconectado sean sus poros). Los tres andamios llegaron a su equilibrio de hinchamiento (24 h) y posteriormente se midió cuanta agua perdieron después de ser centrifugados. En la tabla [6](#) se encuentran los valores obtenidos, siendo el andamio CaCl₂ el que tuvo una mayor retención de agua con 1294 %, siguiéndole el andamio VAP con 1150 % y el andamio WET con 1137 %.

Tabla 6: Hinchamiento de equilibrio de los andamios ALG/GELAT

Tipo de entrecruzamiento	VAP	CaCl ₂	WET
Retención de agua (%)	1150	1294	1137

Estos resultados indicaron que estos andamios pudieron retener grandes cantidades de agua, y retención de agua.

6.10. Evaluación de la interconexión de los poros en los andamios ALG/GELAT

Los poros interconectados en el andamio pueden incrementar la tasa de intercambio de nutrientes y desechos, con esto conducir el crecimiento celular. El objetivo fue observar las diferencias en cuanto al tiempo que tardaban en absorberse los $35\mu\text{L}$ de agua teñida con cristal violeta, y con ello la uniformidad y eficiencia de penetración.^[67] Se tomaron fotografías que muestran la tasa de tinción de gotas de cristal violeta disuelto en agua de cada andamio a los 0, 1, 2, s y 1 y 2 min.

En el caso del andamio ALG/GELAT- CaCl_2 se observó (figura 35) al tiempo de 1 s la primera gota que cayó de los $35\mu\text{L}$ se mantuvo en la superficie y se alcanzó a notar como una pequeña parte se iba adsorbiendo. Al tiempo de 2 s la totalidad de los $35\mu\text{L}$ pareció haber sido absorbido, después del minuto 1 y 2 no se mostraron cambios significativos, más que una disminución de la intensidad del color morado en el lapso de 2 s a 1 min, indicando una mayor absorción durante este periodo de tiempo.

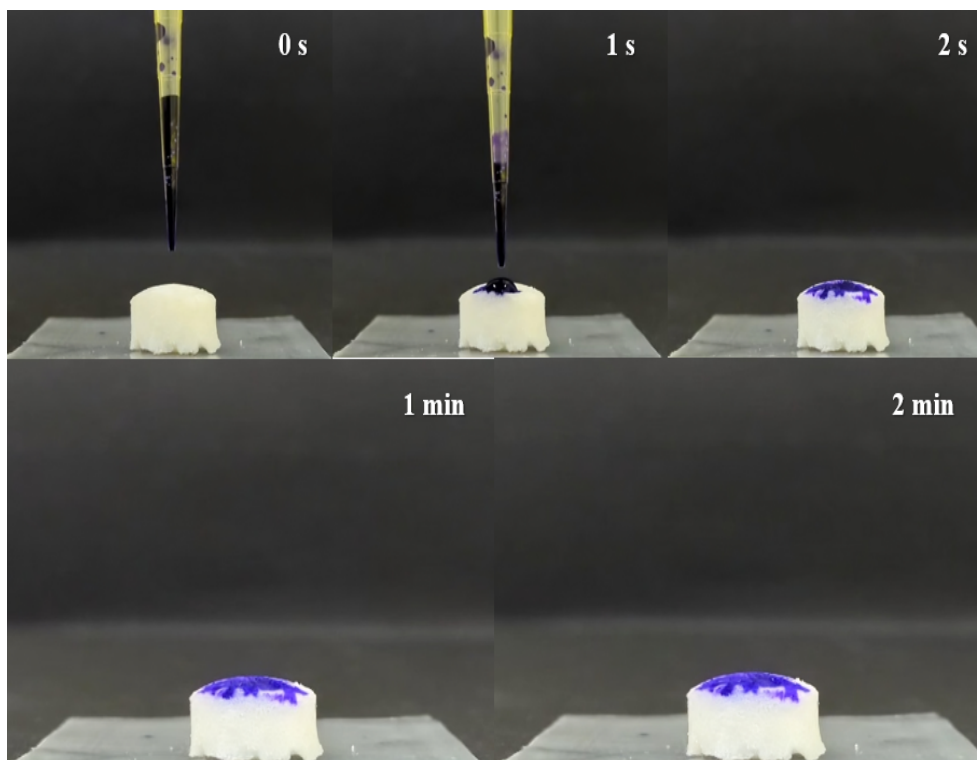


Figura 35. Imagen secuencial de la adsorción y absorción de la solución de cristal violeta en el andamio CaCl_2

En la figura 36 también fue posible visualizar el comportamiento del fluido en el andamio ALG/GELAT_VAP en el tiempo. Al tiempo 1 s se observó como una gota casi perfecta permanece inerte en la superficie del andamio, al tiempo 2 s aún no hubo indicios de una absorción del fluido por parte del andamio. Fue hasta que transcurrió 1 min que se observó como la solución de cristal violeta pasó de estar adsorbido únicamente a irse absorbiendo poco a poco. En el tiempo 2 s se distinguió como la forma de la gota se fue haciendo extendida y pareció disminuir su volumen, lo que indicó una mayor absorción del minuto uno al dos. Esta prueba se relacionó y complementa los resultados correspondientes a las pruebas de hinchamiento y de retención de agua.

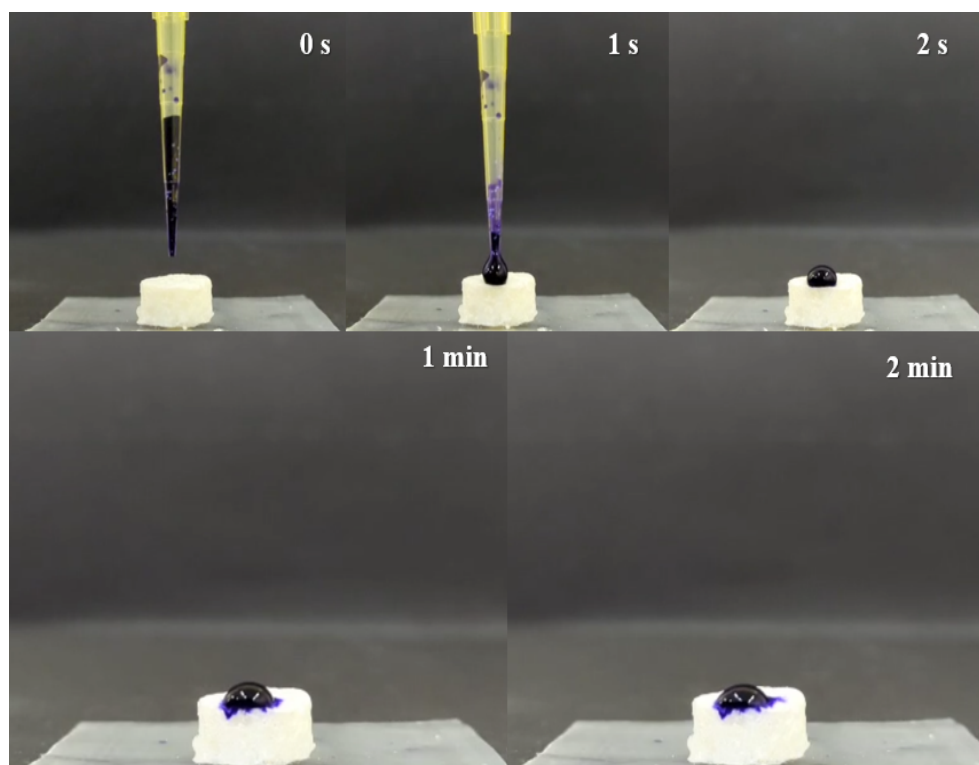


Figura 36. Imagen secuencial de la adsorción y absorción de la solución de cristal violeta en el andamio ALG/GELAT_VAP

La última muestra correspondiente al andamio ALG/GELAT_WET (figura 37) claramente mostró diferencias significativas respecto a las otras dos muestras, al tiempo 1 s se apreció que conforme la solución de cristal violeta era expulsada de la puntilla de micropipeta al instante esta empezó a absorberse en el andamio; para el tiempo de

2 s la totalidad de los 35 μL fueron absorbidos por el andamio. Al tiempo de 1 min se apreció de manera más clara la internalización de la solución a través del andamio. Del minuto uno al minuto dos no se observaron diferencias notables.

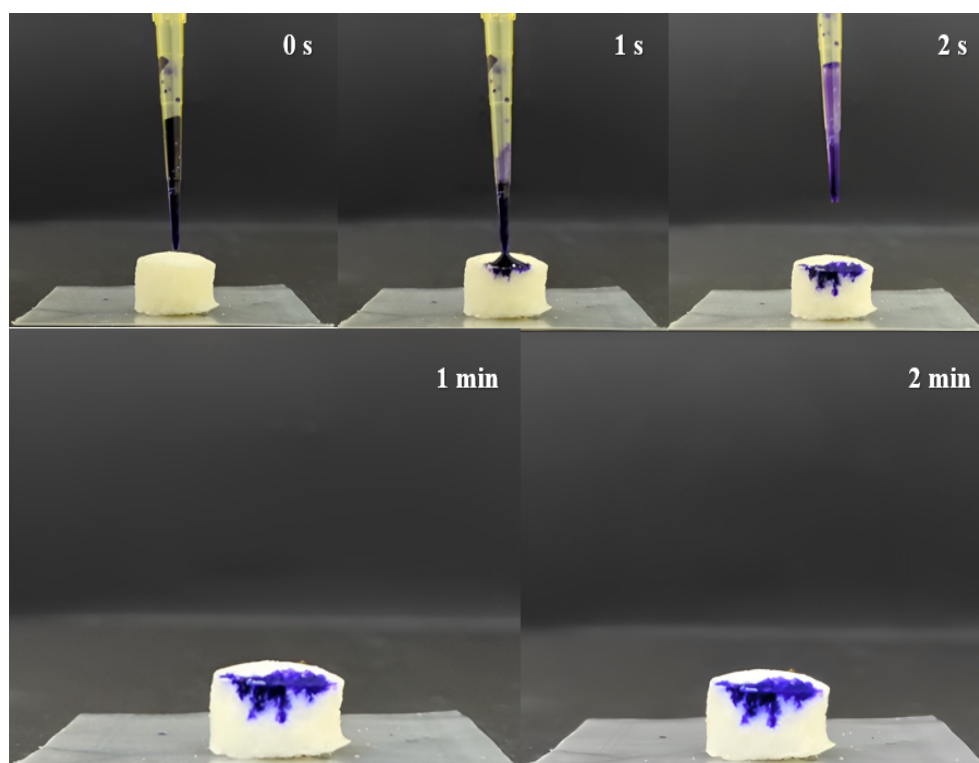


Figura 37. Imagen secuencial de la adsorción y absorción de la solución de cristal violeta en el andamio ALG/GELAT_WET

Estos resultados reafirman que el entrecruzamiento con GTA en vapor compri-
mió en gran medida los poros del andamio al grado de reducir la conexión entre ellos.
Caso opuesto con la muestra WET, donde la velocidad de penetración se distinguió
como la mayor, lo que demostró una mejor interconexión de poros que los demás.

6.11. Pruebas de degradación enzimática

Un requerimiento de suma importancia en matrices poliméricas o andamios para
aplicaciones en ingeniería de tejidos es una degradación controlada de estos materiales
con el tiempo y para eventualmente crear el espacio para que el nuevo tejido se desa-
rrolle *in vivo*.^{[45][68]} En la figura ^[38] se muestra las gráficas de la degradación enzimática
de los andamios ALG/GELAT_ CaCl_2 , ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET. No

fue posible concluir las pruebas de degradación en los andamios ALG/GELAT- CaCl_2 y ALG/GELAT-VAP debido a que al finalizar el día 3 y 5, respectivamente, ambos se desintegraron, dificultando la extracción del medio para su posterior congelación. El último dato a considerar fue una degradación de alrededor del 35 % (día 3) y del 50 % (día 5) en los andamios ALG/GELAT- CaCl_2 y ALG/GELAT-VAP, respectivamente. Con el andamio ALG/GELAT-WET la pérdida de masa del día 1 al 3 fue pequeña. A partir del día 5 cada a cada intervalo de tiempo la pérdida de masa fue mayor. En esta muestra si fue posible terminar la prueba al día 15, obteniendo un porcentaje de degradación de alrededor del 55%. Obteniendo una TD de 3.66 de porcentaje en peso/tiempo.

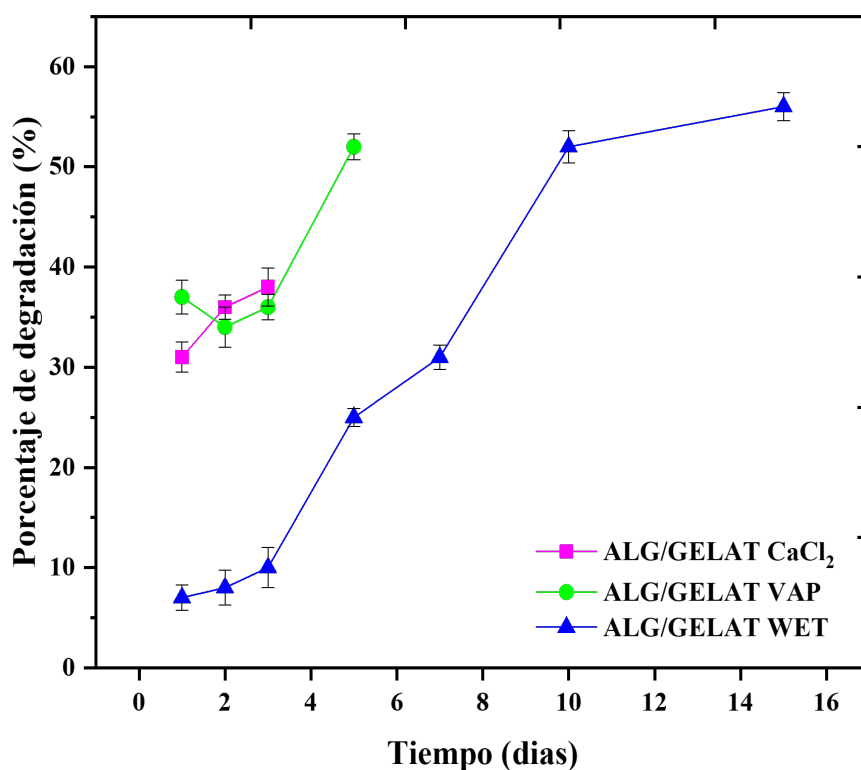


Figura 38. Gráfica de la degradación enzimática de 1 a 15 días de los andamios ALG/GELAT- CaCl_2 , ALG/GELAT-VAP y ALG/GELAT-WET.

Song y colaboradores realizaron andamios de ALG/GELAT impresos en 3D con diferentes relaciones de entrecruzantes ($CaCl_2$ y GTA), con estos llevaron a cabo ensayos de degradación con una duración de 15 días. Los resultados respecto al porcentaje de degradación que obtuvieron son comparables a los presentados en esta investigación (rondando el 20 %), específicamente en las muestras donde utilizaron la misma relación y concentración de GTA como entrecruzante de los andamios. Sin embargo, este grupo de trabajo utilizó una relación diferente entre el ALG y la GELAT (1:5) por lo que la concentración de GTA tiene una mayor influencia en la cinética de degradación de los mismos⁴⁵

6.12. Pruebas mecánicas de los andamios ALG/GELAT

Las propiedades mecánicas son importantes debido a que permiten verificar que el biomaterial al ser implantado para reparar defectos por trauma, quemaduras, enfermedades congénitas, etc, sea capaz de soportar los estímulos mecánicos que ocurren en el cuerpo. Por ello, se realizaron pruebas de compresión estáticas a los andamios ALG/GELAT_VAP, ALG/GELAT_WET y ALG/GELAT_CaCl₂. En la figura 39 se observa la gráfica con las curvas de esfuerzo contra deformación de los andamios ALG/GELAT_VAP, ALG/GELAT_WET y ALG/GELAT_CaCl₂ después de un ciclo de compresión al 80 % de deformación..³⁵

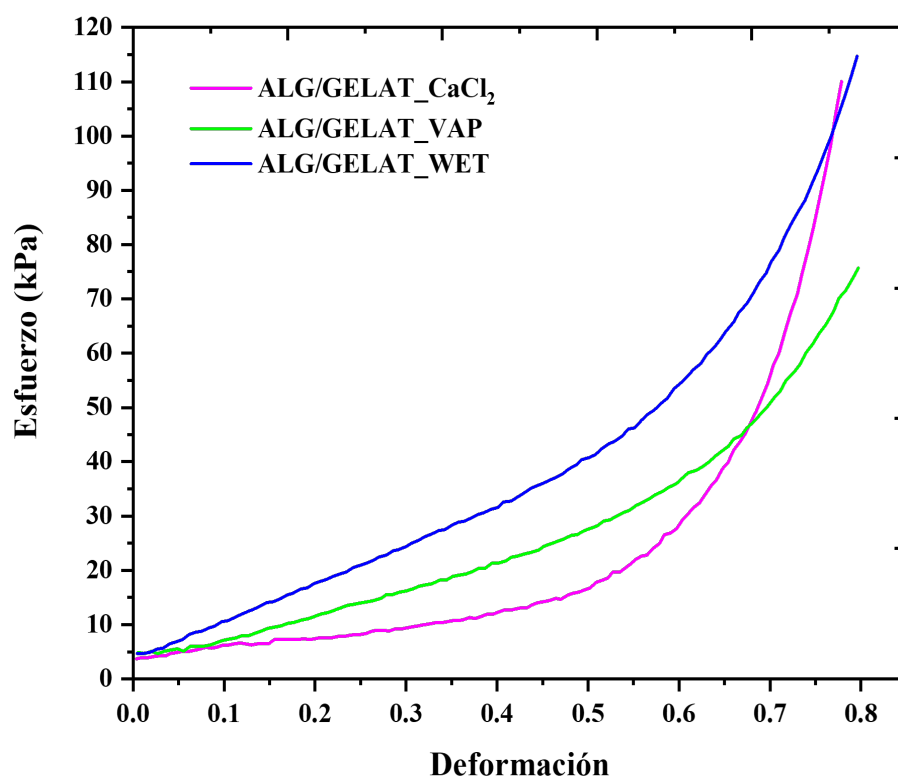


Figura 39. Gráfica de esfuerzo contra deformación hasta el 80 % de los andamios ALG/GELAT_CaCl₂, ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET.

El primer dato de interés que se obtuvo a partir de estas curvas de esfuerzo contra deformación (figura 39) fue el módulo de Young, también conocido como módulo elástico (E) el cual representa la rigidez del material (capacidad del material a resistir la deformación elástica cuando se aplica una fuerza externa). Enra mayor sea E, más rígido el material y menor será la deformación elástica que resulta de la aplicación de la fuerza. Los valores de E de los andamios se plasman en la figura 40. Comparando los valores de E obtenidos se observó que el correspondiente al andamio ALG/GELAT_WET fue el que presentó un E mayor con un valor de alrededor de 70 kPa. Siguiéndole la muestra ALG/GELAT_VAP con un E de alrededor de 40 kPa, y el andamio con el menor E fue el andamio ALG/GELAT_CaCl₂ con alrededor de 20 kPa. Estos resultados indicaron que el andamio ALG/GELAT_WET es el más resistente a la compresión, comparado con los otros andamios entrecruzados con el método CaCl₂

y VAP. Se aplicó el modelo estadístico ANOVA (una vía) a los resultados obtenidos, concluyendo que existe una diferencia significativa en el valor de E entre los andamios ALG/GELAT_WET y ALG/GELAT_VAP.

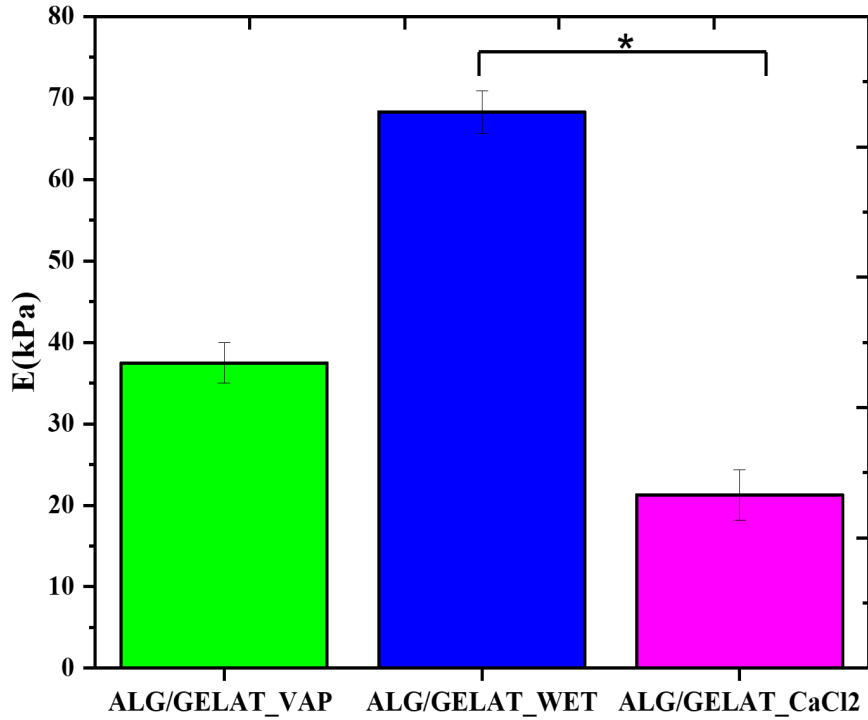


Figura 40. Gráfica de los valores del E correspondientes a los andamios ALG/GELAT_CaCl₂, ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET.

El segundo dato importante es el módulo de tenacidad (U_T). Este representa la fuerza que es capaz de absorber un material en el punto de fractura. En la figura 41 se observa el módulo de tenacidad de los andamios entrecruzados con los diferentes métodos. Sin embargo, es importante aclarar que debido a que ningún andamio se destruyó al finalizar la prueba, el módulo de tenacidad se calculó a partir del esfuerzo máximo de la curva (esfuerzo contra deformación de la figura 39) a una deformación del 80 %. Debido a lo anterior, en este proyecto referiremos el módulo de tenacidad como $*U_T$. Los valores obtenidos de $*U_T$ van de alrededor de 20, 17 y 16 kPa correspondientes a los andamios ALG/GELAT_WET, ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_CaCl₂, res-

pectivamente. Después de realizar un modelo estadístico ANOVA (1 vía) comparando los resultados obtenidos, se concluyó que no había una diferencia significativa respecto al $*U_T$ entre los andamios. Esto nos indicó que en un ciclo de compresión todas las muestras son capaces de almacenar casi la misma cantidad de energía.

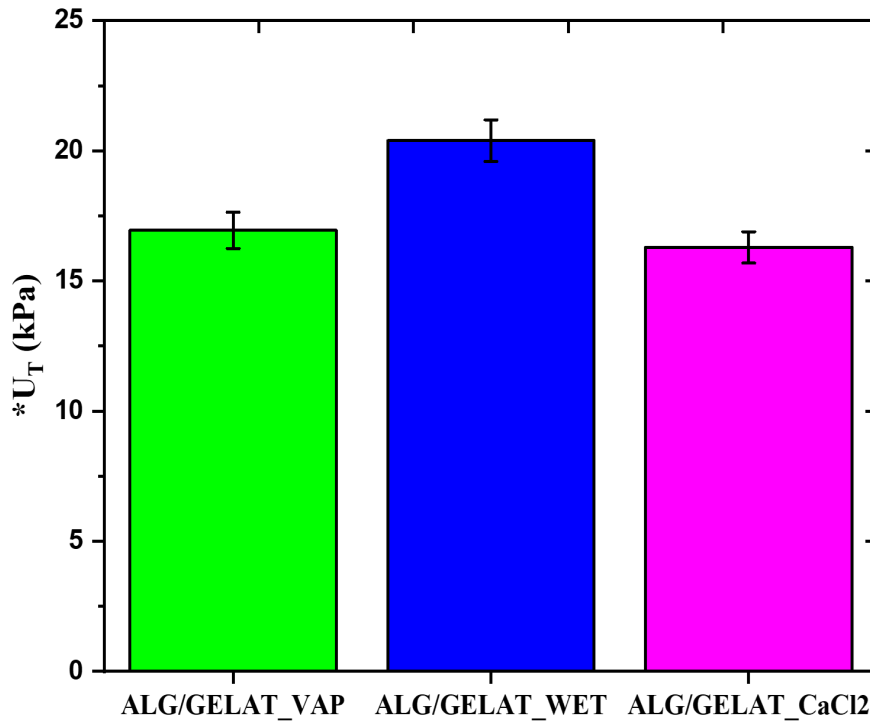


Figura 41. Gráfica de los valores de $*U_T$ correspondientes a los andamios ALG/GELAT_CaCl₂, ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET.

Debido al comportamiento de los andamios en respuesta a un ciclo de compresión al 80 % (no deformación), se decidió proceder con pruebas de fatiga, esto con la finalidad de conocer a más detalle las características y propiedades mecánicas de nuestros materiales.

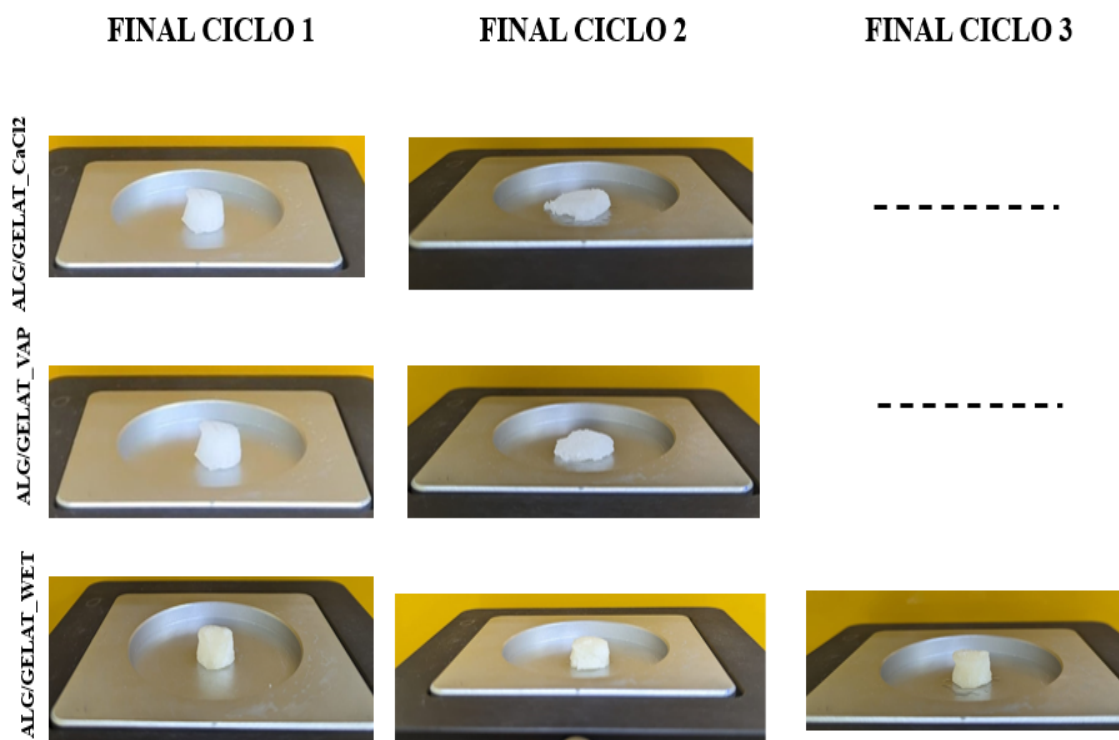
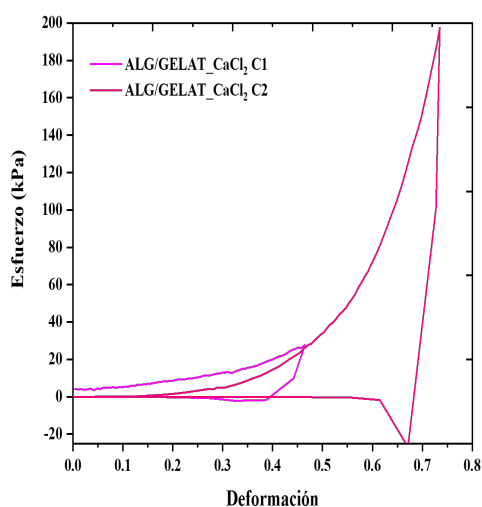


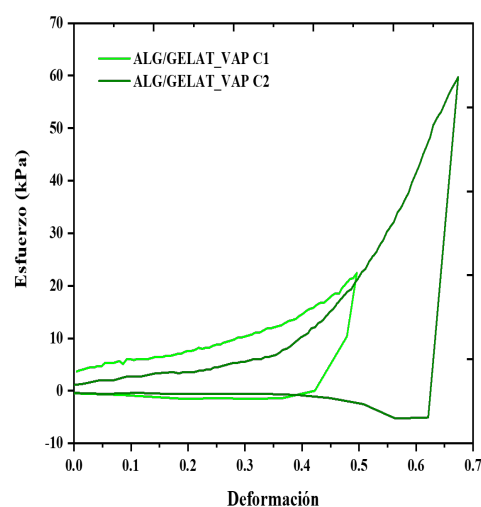
Figura 42. Imagen secuencial del efecto de los diferentes ciclos de compresión en los andamios ALG/GELAT en orden de arriba hacia abajo, ALG/GELAT_CaCl₂, ALG/GELAT_VAP y ALG/GELAT_WET.

Primeramente, se evidenció de manera fotográfica (figura 42) la forma de cada andamio después de cada ciclo de compresión. Se observó que tanto el andamio CaCl₂ como el VAP tuvieron una deformación plástica al terminar el segundo ciclo de compresión, mientras que la muestra del andamio WET sufrió una deformación mayoritariamente elástica pues preservó su forma original casi intacta aún después de tres ciclos de compresión a una deformación del 50 %. En la figura 43 se observan las gráficas correspondientes a las curvas de esfuerzo contra deformación de los andamios ALG/GELAT_CaCl₂ (figura 43a), ALG/GELAT_VAP (43b) y ALG/GELAT_WET (figura 43c). En esta última se muestran curvas con una forma que se mantiene casi constante en los 3 ciclos (comparándola con las curvas de los andamios de las figuras 43a y 43b). En la figura 43d se encuentran los valores de E correspondientes a cada andamio y ciclo de compresión correspondiente. En la muestra ALG/GELAT_WET se observó que el E iba descendiendo conforme aumentaban los ciclos de compresión, sin embargo no lo suficiente como para que el andamio sufriera una deformación plástica

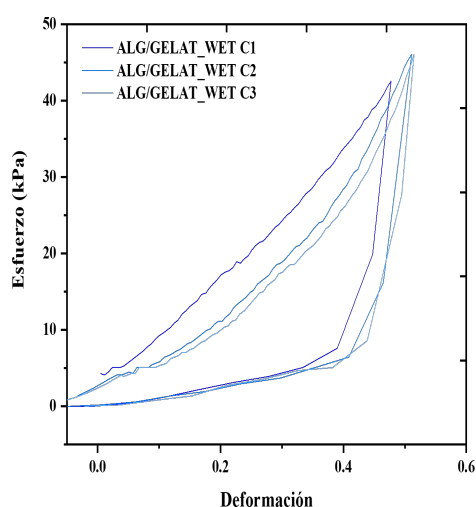
tan marcada como para que este se destruyera. Estos resultados se correlacionan con los porcentajes de hinchamiento y retención de agua obtenidos previamente, evidenciando nuevamente que la absorción de agua en el andamio juega un papel muy importante en las propiedades mecánicas de estos ya que el andamio que tuvo un porcentaje de hinchamiento mayor también fue el que tuvo un mejor desempeño en las pruebas de compresión (andamio ALG/GELAT_WET).⁶⁹



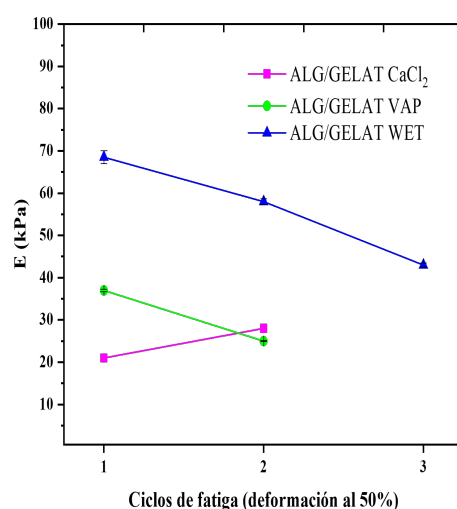
(a) Gráfica de esfuerzo contra deformación del andamio ALG/GELAT_CaCl₂.



(b) Gráfica de esfuerzo contra deformación del andamio ALG/GELAT_VAP.



(c) Gráfica de esfuerzo contra deformación del andamio ALG/GELAT_WET.



(d) Valor E en cada ciclo de compresión de los andamios correspondientes.

Figura 43. Gráficos correspondientes a las pruebas de fátiga de compresión en los andamios ALG/GELAT_CaCl₂ y ALG/GELAT_VAP, y ALG/GELAT_WET.

A causa de las propiedades mecánicas mejoradas presentadas por el andamio ALG/GELAT_WET (en comparación con las obtenidas de los andamios ALG/GELAT_CaCl₂ y ALG/GELAT_VAP) se resolvió realizar una prueba de fatiga más extensa a 20 ciclos de compresión, a fin de intentar alcanzar el punto de destrucción o fractura total del

andamio.

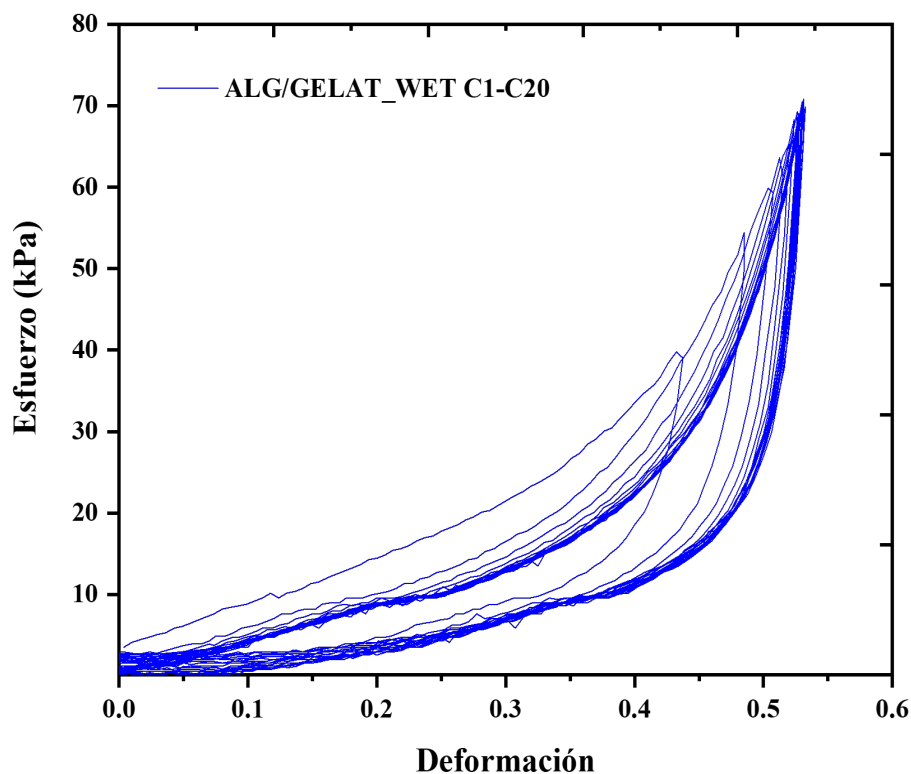


Figura 44. Gráfica de esfuerzo contra deformación de la prueba de fatiga a 20 ciclos del andamio ALG/GELAT_WET.

En la figura 44 se observan las curvas de esfuerzo contra deformación de 20 ciclos de este andamio. Mientras que en la figura 45 se presentan los valores E correspondientes a cada ciclo de compresión del andamio. En este se observó como se llegó a un equilibrio después de 3 ciclos de compresión, manteniendo la E con una tendencia semi-lineal. Después del ciclo 16 el valor de E comienza a disminuir muy gradualmente. En ningún momento se observó que el andamio no alcanzará a regresar a su estructura original después del ciclo de compresión, por lo que será necesario aumentar el número de ciclos a los que fue expuesto para tratar de alcanzar el número de ciclo con el cual alcanzaría la deformación plástica.

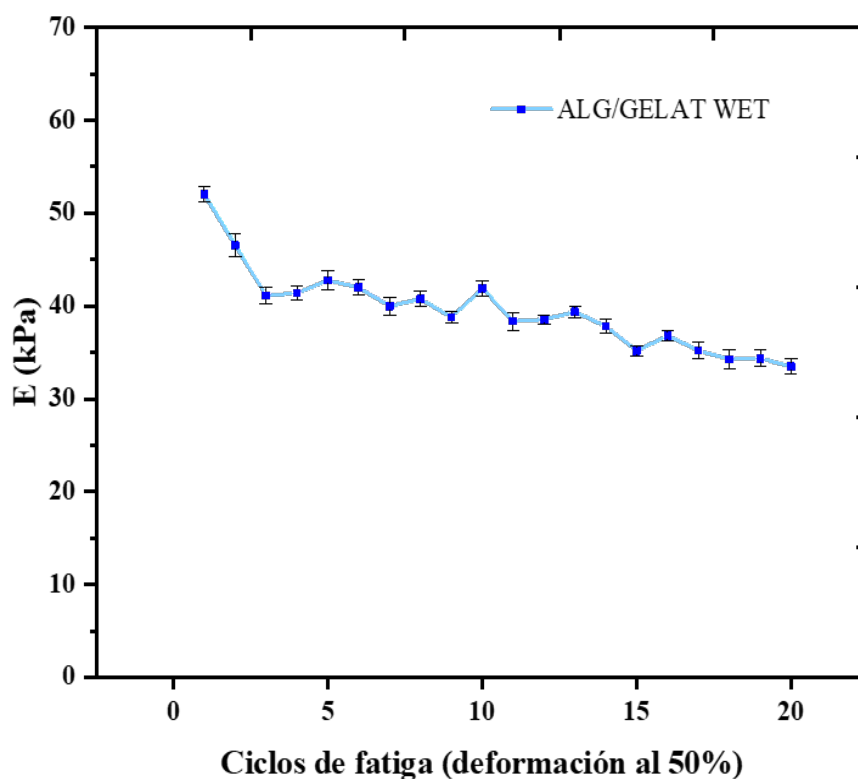


Figura 45. Gráfica de los valores E de la prueba de fatiga a 20 ciclos del andamio ALG/GELAT_WET.

6.13. Pruebas de liberación de ADN de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN

Medir la liberación de ADN contra el tiempo en los policomplejos tanto de QT/ADN y TMQ/ADN nos permite comparar el papel de cada vehículo en la retarda- ción o aceleración de la liberación del material genético y correlacionarla con las carac- terísticas obtenidas de cada policomplejo por los diferentes métodos de caracterización presentados anteriormente. En la figura 46 se presenta la gráfica correspondiente a la liberación acumulada del ADN de los policomplejos utilizando al policación QT y TMQ correspondiente. Se observó que el material genético de los policomplejos QT/ADN se liberó casi en su totalidad transcurrida una hora. Teniendo una liberación brusca de 30 a 45 min, donde el porcentaje de liberación acumulada en una diferencia de 15

min aumentó casi 50 %. En los policomplejos TMQ/ADN el ADN se liberó casi en su totalidad transcurridas cuatro horas. Teniendo entre una y 2 horas su liberación más súbita, donde la liberación acumulada aumentó alrededor de 25 %. Posterior a este periodo la liberación es fue más controlada. Es evidente que los policomplejos TMQ/ADN presentaron mejores condiciones de estabilidad en cuestión de la liberación de ADN, logrando retrasarla tres horas más con respecto a los policomplejos QT/ADN. Esto se puede correlacionar de manera directa con los resultados de electroforesis en gel (mayor compactación), AFM (morfología tipo esfera que presenta mejor estabilidad en el medio), %AE y %LC (mayor capacidad captación y asociación con el material genético), lo cual menciona Saka y colaboradores refiriéndose a que la encapsulación juega un papel crucial en la liberación de ADN, entre más condensado este el material genético el periodo de liberación del mismo será mas prolongado.⁷⁰

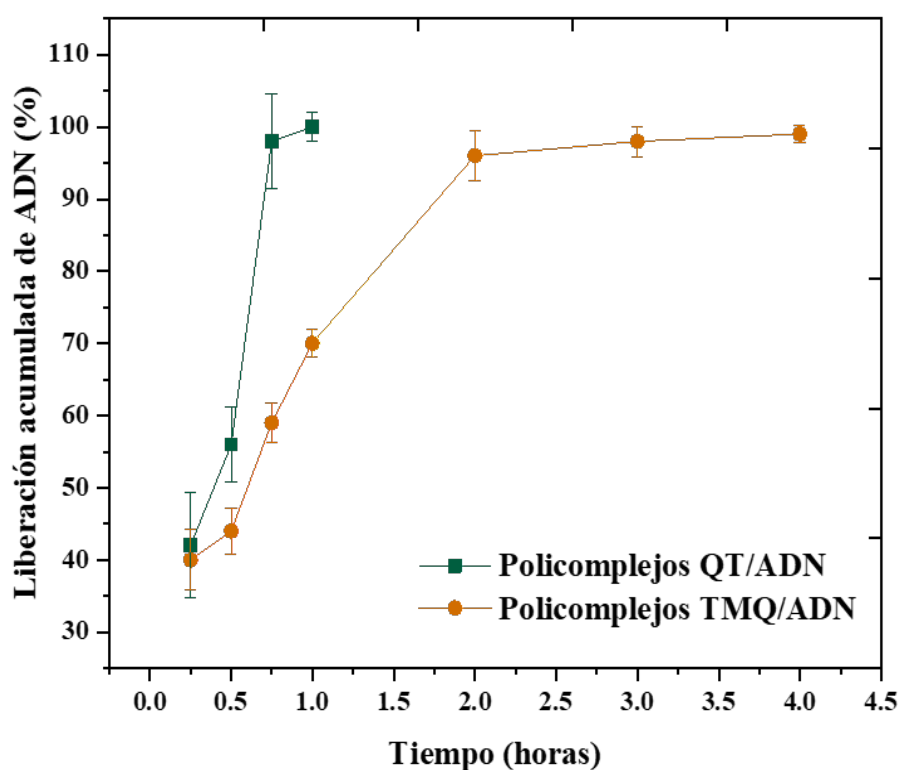


Figura 46. Gráfica de la liberación acumulada de ADN de los policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN.

El perfil cinético correspondiente a estos sistemas se explica por una liberación del ADN que se encuentra en la superficie de la partícula, mientras que el segundo ocurre de una liberación constante del núcleo del policomplejo (ADN encapsulado) a consecuencia de la hidratación e hinchamiento del QT y TMQ. Si bien existen diversos trabajos en donde la liberación del material genético se prolongo entre 20 y 96 h, la síntesis de los policomplejos cargados con ADN fue diferente, empleando un proceso con más pasos o utilizando otro tipo de reactivos como entrecruzantes, a diferencia de la simple complejación iónica utilizada en esta investigación^{[58][70][71]}

6.14. Pruebas de liberación de ADN de los andamios genéticamente activados

Debido a los resultados obtenidos de los andamios ALG/GELAT respecto a las características de sus poros, hinchamiento, retención de agua, degradación enzimática y sobre todo las propiedades mecánicas y comparando estas entre los tres métodos de entrecruzamiento, se concluyó que el andamio ALG/GELAT_WET fue el que presentó mejores propiedades y por lo tanto, el seleccionado para la prueba de liberación de ADN. Es importante analizar el papel que tiene el andamio y la liberación del material genético que se le fue cargado (policomplejos QT/ADN o TMQ/ADN) ya que es vital que el ADN sea liberado conforme pasa el tiempo para que el efecto terapéutico pueda llevarse a cabo. En la figura ^[47] se encuentra la gráfica correspondiente a la liberación de ADN complejoado con QT o TMQ en los AGA. En los AGA cargados con policomplejos QT/ADN el material genético se liberó casi en su totalidad a las 72 h, teniendo un mayor porcentaje de liberación entre las 48 y 72 h. En contraste los AGA cargados con policomplejos TMQ/ADN presentaron una liberación abrupta en las primeras cuatro horas llegando a una liberación de alrededor de 40 %. Sin embargo, posteriormente se muestra una liberación más controlada llegando a liberar alrededor del 70 % del material genético a las 96 h.

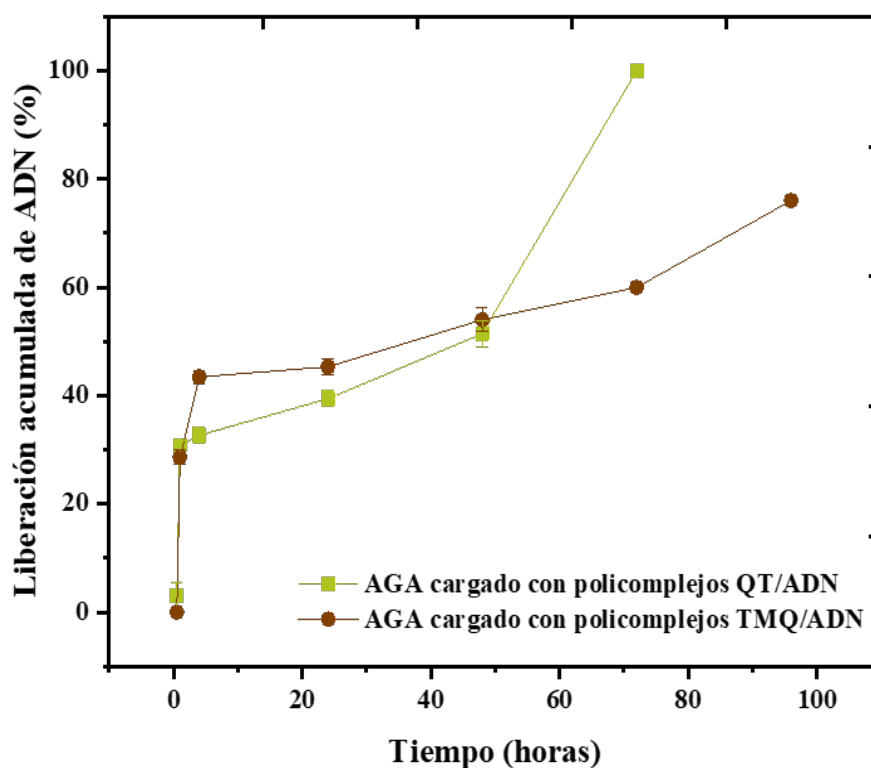


Figura 47. Gráfica de la liberación acumulada de los AGA cargados con policomplejos QT/ADN y TMQ/ADN

Estos resultados evidencian tres aspectos importantes. El primero, que al utilizar andamios ALG/GELAT_WET como un medio para la liberación de ADN es viable, ya que este se libera a través del tiempo, esto tiene relación directa con la tasa de degradación de los materiales de los cuales está conformado este andamio. La cual en este caso y bajo las condiciones en que se llevó a cabo esta prueba la tasa de degradación es de 3.66 % (respecto al peso inicial del andamio) por día. Esto permite que los policomplejos absorbidos en las paredes externas e internas del andamio sean liberados. El segundo, que la liberación más abrupta que se presentó en la figura 46 en comparación con la figura 47 se debe a la protección que brinda el andamio a los policomplejos, aislándolos de los factores externos que propician la erosión del vehículo del ADN, retardando su liberación. Y finalmente, que el papel del material con el cual se compacta el ADN (QT o TMQ) y la estabilidad en parámetros de liberación que este ofrece. Ya que los

resultados mostrados con anterioridad sugirieron que el TMQ es más estable, lo cual se comprueba con los resultados presentados respecto a la liberación acumulada de ADN. En el trabajo de Chang y colaboradores utilizaron andamios porosos de QT/GELAT cargados con plásmidos de ADN codificados para el factor de crecimiento $\beta 1$ para la proliferación de condrocitos, en donde la liberación de ADN contenido (peso) tuvo un máximo al día 3 y posteriormente fue disminuyendo. Esta liberación puede entregar mucho más ADN en los defectos locales y tener una expresión alta de proteínas en un intervalo de tiempo corto, en la etapa inicial de la implantación.^[72] Selvamurugan y colaboradores sintetizaron un andamio de ALG/GELAT para la liberación de fármaco (silibinina) donde alcanzaron una liberación del 60 % al día 15 explicando que el andamio actuó como una barrera al fármaco seguida de una liberación sostenida debido a la degradación del andamio, lo cual concuerda con el comportamiento de los andamios ALG/GELAT_WET para la liberación de ADN.^[37]

VII. CONCLUSIONES

1. En la síntesis de TMQ (condición 2), se logró obtener un %DQ de 35 %, el cual permitió la formación reproducible de policomplejos TMQ/ADN.
2. Se encontró una relación de compactación TMQ/ADN de $N/P \geq 3$, de acuerdo con los resultados de DLS, POT Z y electroforesis en gel.
3. Los policomplejos TMQ/ADN, $N/P=5$ y 10 exhibieron un diámetro hidrodinámico de alrededor de 300 y 290 nm, respectivamente, y aproximadamente 100 nm menor que los policomplejos QT/ADN. Asimismo, exhibieron valores de POT Z de alrededor de 20 mV.
4. Con respecto a los andamios ALG/GELAT, aunque el método de entrecruzamiento VAP demostró tener un mayor porcentaje de entrecruzamiento, dió lugar a hidrogeles con captación de agua y módulo elástico (E) bajos en comparación con los otros dos métodos de entrecruzamiento.
5. El entrecruzamiento por el método WET fue el que presentó mejores resultados, dando lugar a la formación de hidrogeles con mayor porosidad, interconexión de poros óptima y propiedades mecánicas mejoradas (en comparación con los otros dos métodos).
6. Los sistemas andamio-policomplejos TMQ/ADN ofrecieron una liberación más controlada del material genético en comparación con los sistemas andamio policomplejos QT/ADN.

REFERENCIAS

- (1) Gonzalez-Fernandez, T.; Kelly, D. J. y O'Brien, F. J. Controlled Non-Viral Gene Delivery in Cartilage and Bone Repair: Current Strategies and Future Directions. *Advanced Therapeutics* **2018**, *1*, 1-27.
- (2) Kelly, D. C.; Raftery, R. M.; Curtin, C. M.; O'Driscoll, C. M. y O'Brien, F. J. Scaffold-Based Delivery of Nucleic Acid Therapeutics for Enhanced Bone and Cartilage Repair. *Journal of Orthopaedic Research* **2019**, *37*, 1671-1680.
- (3) Yang, R.; Chen, F.; Guo, J.; Zhou, D. y Luan, S. Recent advances in polymeric biomaterials-based gene delivery for cartilage repair. *Bioactive Materials* **2020**, *5*, 990-1003.
- (4) Gantenbein, B.; Tang, S.; Guerrero, J.; Higuera-Castro, N.; Salazar-Puerta, A. I.; Croft, A. S.; Gazdhar, A. y Purmessur, D., *Non-viral Gene Delivery Methods for Bone and Joints*; November, 2020; vol. 8.
- (5) Vermeulen, L. M.; Brans, T.; Samal, S. K.; Dubruel, P.; Demeester, J.; De Smedt, S. C.; Remaut, K. y Braeckmans, K. Endosomal Size and Membrane Leakage Influence Proton Sponge-Based Rupture of Endosomal Vesicles. *ACS Nano* **2018**, *12*, 2332-2345.
- (6) Yuan, J.; Geng, J.; Xing, Z.; Shen, J.; Kang, I.-K. y Byun, H. Electrospinning of antibacterial poly(vinylidene fluoride) nanofibers containing silver nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* **2010**, *116*, 668-672.
- (7) Cao, Y.; Tan, Y. F.; Wong, Y. S.; Liew, M. W. J. y Venkatraman, S. Recent advances in chitosan-based carriers for gene delivery. *Marine Drugs* **2019**, *17*, DOI: [10.3390/md17060381](https://doi.org/10.3390/md17060381).
- (8) Chuan, D.; Jin, T.; Fan, R.; Zhou, L. y Guo, G. Chitosan for gene delivery: Methods for improvement and applications. *Advances in Colloid and Interface Science* **2019**, *268*, 25-38.
- (9) Al-Qadi, S.; Alatorre-Meda, M.; Zaghloul, E. M.; Taboada, P. y Remunán-López, C. Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles for gene silencing: The role of hyaluronic acid on the nanoparticles' formation and activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *103*, 615-623.

- (10) Mourya, V. K. e Inamdar, N. N. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2009**, *20*, 1057-1079.
- (11) Germershaus, O.; Mao, S.; Sitterberg, J.; Bakowsky, U. y Kissel, T. Gene delivery using chitosan, trimethyl chitosan or polyethyleneglycol-graft-trimethyl chitosan block copolymers: Establishment of structure-activity relationships in vitro. *Journal of Controlled Release* **2008**, *125*, 145-154.
- (12) Alatorre-Meda, M.; Taboada, P.; Hartl, F.; Wagner, T.; Freis, M. y Rodríguez, J. R. The influence of chitosan valence on the complexation and transfection of DNA: The weaker the DNA-chitosan binding the higher the transfection efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, *82*, 54-62.
- (13) Cucchiari, M. y Madry, H. Biomaterial-guided delivery of gene vectors for targeted articular cartilage repair. *Nature Reviews Rheumatology* **2019**, *15*, 18-29.
- (14) Farokhi, M.; Jonidi Shariatzadeh, F.; Solouk, A. y Mirzadeh, H. Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2020**, *69*, 230-247.
- (15) Shen, Z. S.; Cui, X.; Hou, R. X.; Li, Q.; Deng, H. X. y Fu, J. Tough biodegradable chitosan-gelatin hydrogels via in situ precipitation for potential cartilage tissue engineering. *RSC Advances* **2015**, *5*, 55640-55647.
- (16) Ip, K. T. Regenerative Medicine. *Encyclopedia of Applied Ethics: Volume 1-4, Second Edition* **2012**, *1-4*, 741-747.
- (17) Atala, A. Regenerative medicine strategies. *Journal of Pediatric Surgery* **2012**, *47*, 17-28.
- (18) Yu, Y.; Wang, Q.; Wang, C. y Shang, L. Living Materials for Regenerative Medicine. *Engineered Regeneration* **2021**, *2*, 96-104.
- (19) Mao, A. S. y Mooney, D. J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, 14452-14459.
- (20) Place, E. S.; Evans, N. D. y Stevens, M. M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature Materials* **2009**, *8*, 457-470.

- (21) Boháč, M.; Danišovič, Ľ.; Koller, J.; Dragúňová, J. y Varga, I. What happens to an acellular dermal matrix after implantation in the human body? A histological and electron microscopic study. *European Journal of Histochemistry* **2018**, *62*, 1-11.
- (22) Chen, J.; Wang, K.; Wu, J.; Tian, H. y Chen, X. Polycations for Gene Delivery: Dilemmas and Solutions. *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *30*, 338-349.
- (23) Verma, I. M. y Weitzman, M. D. Gene therapy: Twenty-first century medicine. *Annual Review of Biochemistry* **2005**, *74*, 711-738.
- (24) Ita, K. Polyplexes for gene and nucleic acid delivery: Progress and bottlenecks. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2020**, *150*, 105358.
- (25) Behr, J. P. The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia* **1997**, *51*, 34-36.
- (26) Vermeulen, L. M.; De Smedt, S. C.; Remaut, K. y Braeckmans, K. The proton sponge hypothesis: Fable or fact? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2018**, *129*, 184-190.
- (27) Thomas, M. y Klivanov, A. M. Non-viral gene therapy: Polycation-mediated DNA delivery. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2003**, *62*, 27-34.
- (28) Alonoso, J. M.; Goycoolea, F. M. e Higuera-Ciapara, I. Chitosan-polysaccharide blended nanoparticles for controlled drug delivery. *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications* **2008**, 644-679.
- (29) Mao, Z.; Lie, M.; Jiang, Y.; Yan, M.; Gao, C. y Shen, J. N,N,N-trimethylchitosan chloride as a gene vector: Synthesis and application. *Macromolecular Bioscience* **2007**, *7*, 855-863.
- (30) De Britto, D. y Assis, O. B. A novel method for obtaining a quaternary salt of chitosan. *Carbohydrate Polymers* **2007**, *69*, 305-310.
- (31) Hemming, E. B.; Masters, A. F.; Perosa, A.; Selva, M. y Maschmeyer, T. Single-step methylation of chitosan using dimethyl carbonate as a green methylating agent. *Molecules* **2019**, *24*, 1-6.
- (32) Wu, M.; Long, Z.; Xiao, H. y Dong, C. Preparation of N, N, N-trimethyl chitosan via a novel approach using dimethyl carbonate. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *169*, 83-91.

- (33) Wu, P.; Chen, H.; Jin, R.; Weng, T.; Ho, J. K.; You, C.; Zhang, L.; Wang, X. y Han, C. Non-viral gene delivery systems for tissue repair and regeneration. *Journal of Translational Medicine* **2018**, *16*, 1-20.
- (34) Raghunath, J.; Rollo, J.; Sales, K. M.; Butler, P. E. y Seifalian, A. M. Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2007**, *46*, 73.
- (35) Alatorre-Meda, M. y Mano, J. F. General Characterization of Physical Properties of Natural-Based Biomaterials. *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies* **2016**, 494-516.
- (36) Li, R.; Cheng, Z.; Yu, X.; Wang, S.; Han, Z. y Kang, L. Preparation of antibacterial PCL/PVP-AgNP Janus nanofibers by uniaxial electrospinning. *Materials Letters* **2019**, *254*, 206-209.
- (37) Leena, R. S.; Vairamani, M. y Selvamurugan, N. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Alginate / Gelatin scaffolds incorporated with Silibinin-loaded Chitosan nanoparticles for bone formation in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *158*, 308-318.
- (38) Snyman, D.; Hamman, J. H.; Kotze, J. S.; Rollings, J. E. y Kotzé, A. F. The relationship between the absolute molecular weight and the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers* **2002**, *50*, 145-150.
- (39) Pérez-Álvarez, L.; Ruiz-Rubio, L. y Vilas-Vilela, J. L. Determining the Deacetylation Degree of Chitosan: Opportunities to Learn Instrumental Techniques. *Journal of Chemical Education* **2018**, *95*, 1022-1028.
- (40) Nikmawahda, H. T.; Sugita, P. y Arifin, B. Synthesis and characterization of N-alkylchitosan as well as its potency as a paper coating material. *Advances in Applied Science Research* **2015**, *6*, 141-149.
- (41) Scharringhausen, T.; Lueßen, H. L. y Boer, A. G. D. Effect of degree of quaternization of N -trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal Caco-2 cell monolayers. **2000**, *64*, 15-25.
- (42) Mahajan, T.; Bangde, P.; Dandekar, P. y Jain, R. Greener approach for synthesis of N,N,N-trimethyl chitosan (TMC) using ternary deep eutectic solvents (TDESs). *Carbohydrate Research* **2020**, *493*, 108033.

- (43) Curti, E.; De Britto, D. y Campana-Filho, S. P. Methylation of Chitosan with Iodomethane: Effect of Reaction Conditions on Chemoselectivity and Degree of Substitution. *Macromolecular Bioscience* **2003**, *3*, 571-576.
- (44) Senra, T. D.; Santos, D. M.; Desbrières, J. y Campana-Filho, S. P. Extensive N-methylation of chitosan: Evaluating the effects of the reaction conditions by using response surface methodology. *Polymer International* **2015**, *64*, 1617-1626.
- (45) Pan, T.; Song, W.; Cao, X. y Wang, Y. 3D Bioplotting of Gelatin/Alginate Scaffolds for Tissue Engineering: Influence of Crosslinking Degree and Pore Architecture on Physicochemical Properties. *Journal of Materials Science and Technology* **2016**, *32*, 889-900.
- (46) Saarai, A.; Kasparkova, V.; Sedlacek, T. y Saha, P. On the development and characterisation of crosslinked sodium alginate / gelatine hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2013**, *18*, 152-166.
- (47) Robert M. Silverstein Francis X. Webster, D. J. K., *Spectrometric identification of organic compounds*, 7.^a ed.; Brennan, D., ed.; John Wiley & Sons, Ltd: 2005, pág. 499.
- (48) Mohammadzadehmoghadam, S. y Dong, Y. Fabrication and characterization of electrospun silk fibroin/gelatin scaffolds crosslinked with glutaraldehyde vapor. *Frontiers in Materials* **2019**, *6*, 1-12.
- (49) Matsuda, S.; Iwata, H.; Se, N. e Ikada, Y. Bioadhesion of gelatin films crosslinked with glutaraldehyde. *Journal of Biomedical Materials Research* **1999**, *45*, 20-27.
- (50) Cao, L.; Lu, W.; Mata, A.; Nishinari, K. y Fang, Y. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *242*, 116389.
- (51) Amaduzzi, F.; Bomboi, F.; Bonincontro, A.; Bordi, F.; Casciardi, S.; Chronopoulou, L.; Diociaiuti, M.; Mura, F.; Palocci, C. y Sennato, S. Chitosan-DNA complexes: Charge inversion and DNA condensation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *114*, 1-10.
- (52) Malvernpanalytical.com Dispersión de luz dinámica DLS.
- (53) Bravo-Anaya, L. M.; Fernández-Solís, K. G.; Rosselgong, J.; Nano-Rodríguez, J. L. E.; Carvajal, F. y Rinaudo, M. Chitosan-DNA polyelectrolyte complex:

- Influence of chitosan characteristics and mechanism of complex formation. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *126*, 1037-1049.
- (54) Dehousse, V.; Garbacki, N.; Jaspard, S.; Castagne, D.; Piel, G.; Colige, A. y Evrard, B. Comparison of chitosan/siRNA and trimethylchitosan/siRNA complexes behaviour in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules* **2010**, *46*, 342-349.
- (55) Galindo-Murillo, R. y Cheatham, T. E. Ethidium bromide interactions with DNA: An exploration of a classic DNA-ligand complex with unbiased molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Research* **2021**, *49*, 3735-3747.
- (56) Franklin, W. A. y Locker, J. D. Ethidium Bromide: A Nucleic Acid Stain for Tissue Sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **1981**, *29*, 572-576.
- (57) Turan, K. y Nagata, K. Chitosan-DNA nanoparticles: The effect of cell type and hydrolysis of chitosan on in vitro DNA transfection. *Pharmaceutical Development and Technology* **2006**, *11*, 503-512.
- (58) Strand, S. P.; Danielsen, S.; Christensen, B. E. y Vårum, K. M. Influence of chitosan structure on the formation and stability of DNA-chitosan polyelectrolyte complexes. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3357-3366.
- (59) Maurstad, G.; Danielsen, S. y Stokke, B. T. The influence of charge density of chitosan in the compaction of the polyanions DNA and xanthan. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1124-1130.
- (60) Danielsen, S.; Vårum, K. M. y Stokke, B. T. Structural analysis of chitosan mediated DNA condensation by AFM: Influence of chitosan molecular parameters. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 928-936.
- (61) Alatorre-Meda, M.; Taboada, P.; Krajewska, B.; Willemeit, M.; Deml, A.; Klösel, R. y Rodríguez, J. R. DNA-Poly(diallyldimethylammonium chloride) complexation and transfection efficiency. *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 9356-9366.
- (62) Rankin-Turner, S.; Vader, P.; O'Driscoll, L.; Giebel, B.; Heaney, L. M. y Davies, O. G. A call for the standardised reporting of factors affecting the exogenous loading of extracellular vesicles with therapeutic cargos. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2021**, *173*, 479-491.

- (63) Lien, S. M.; Ko, L. Y. y Huang, T. J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia* **2009**, *5*, 670-679.
- (64) Bhardwaj, T.; Pilliar, R. M.; Gryn timer, M. D. y Kandel, R. A. Effect of material geometry on cartilaginous tissue formation in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, *57*, 190-199.
- (65) Azizian, S.; Hadjizadeh, A. y Niknejad, H. Chitosan-gelatin porous scaffold incorporated with Chitosan nanoparticles for growth factor delivery in tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *202*, 315-322.
- (66) Alizadeh, M.; Abbasi, F.; Khoshfetrat, A. B. y Ghaleh, H. Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method. *Materials Science and Engineering C* **2013**, *33*, 3958-3967.
- (67) Haung, S. M.; Lin, Y. T.; Liu, S. M.; Chen, J. C. y Chen, W. C. In vitro evaluation of a composite gelatin–hyaluronic acid– alginate porous scaffold with different pore distributions for cartilage regeneration. *Gels* **2021**, *7*, 1-17.
- (68) Bouhadir, K. H.; Lee, K. Y.; Alsberg, E.; Damm, K. L.; Anderson, K. W. y Mooney, D. J. Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering. *Biotechnology Progress* **2001**, *17*, 945-950.
- (69) Rodríguez-Velázquez, E.; Silva, M.; Taboada, P.; Mano, J. F.; Suárez-Quintanilla, D. y Alatorre-Meda, M. Enhanced cell affinity of chitosan membranes mediated by superficial cross-linking: A straightforward method attainable by standard laboratory procedures. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 291-301.
- (70) Bozkir, A. y Saka, O. M. Chitosan Nanoparticles for Plasmid DNA Delivery: Effect of Chitosan Molecular Structure on Formulation and Release Characteristics. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents* **2004**, *11*, 107-112.
- (71) Masotti, A.; Bordi, F.; Ortaggi, G.; Marino, F. y Palocci, C. A novel method to obtain chitosan/DNA nanospheres and a study of their release properties. *Nanotechnology* **2008**, *19*, DOI: [10.1088/0957-4484/19/05/055302](https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/05/055302).

- (72) Guo, T.; Zhao, J.; Chang, J.; Ding, Z.; Hong, H.; Chen, J. y Zhang, J. Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor- β 1 for chondrocytes proliferation l. *Biomaterials* **2006**, *27*, 1095-1103.