

**Diseño de una metodología para la obtención de un hidrogel con potencial aplicación en la diferenciación de precursores de oligodendrocitos.**

Ana María Suarez Ortegón  
Astrid Gabriela Vargas Romero

Universidad El Bosque  
Facultad de ingeniería  
Bioingeniería  
Bogotá D.C.  
2023

Ana María Suarez Ortégón  
Astrid Gabriela Vargas Romero

Trabajo de grado presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Bioingeniero

Director: José Francisco Ibla Gordillo

Universidad El Bosque  
Facultad de ingeniería  
Bioingeniería  
Bogotá D.C.  
2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos primeramente a nuestros padres, familia y amigos por ser nuestro apoyo constante, darnos palabras de aliento cuando lo necesitábamos y hacer parte de esta etapa en nuestra vida.

A los docentes Gabriela Barrero, Angelica Velandia, Ronald Jimenez y técnicos de laboratorio, Natalia Nieto y Zandi Castellanos por su aporte al desarrollo de este proyecto y cooperación desinteresada.

De igual manera a la Universidad el Bosque por proporcionarnos los espacios para la ejecución del proyecto.

A nuestros jurados Lizeth Vega, Diego Vergara y Sandra Perdomo por sus contribuciones desde sus áreas de conocimiento.

Por último, a nuestro tutor Francisco Ibla por acompañarnos y guiarnos durante este proceso, creer en nosotras y motivarnos a seguir nuestras ideas. También por ayudarnos a afrontar los obstáculos que se presentaron, brindarnos tu conocimiento y apoyo para lograr obtener un producto de calidad en este trabajo de grado.

## TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción.....	13
2. Planteamiento del problema.....	15
3. Objetivos.....	17
3.1 Objetivo general .....	17
3.2 Objetivos específicos .....	17
4. Justificación .....	18
5. Marco de referencia .....	20
5.1 Marco conceptual .....	20
5.2 Marco teórico.....	38
5.3 Marco normativo .....	38
5.4 Estado del arte.....	39
6. Metodología, resultados y análisis de resultados.....	41
6.1 Primera etapa: Diseño conceptual.....	41
6.2 Segunda etapa: Diseño preliminar y detallado.....	55
6.3 Tercera etapa: Caracterización y evaluación de muestras.....	80
7. Conclusiones.....	107
Recomendaciones.....	108
Referencias .....	109
Anexos.....	116

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Factores que influyen en la regeneración de los Oligodendrocitos Adaptado de: (Lourenco, 2016 ) .....	16
<b>Figura 2.</b> Árbol del problema. Autoría propia.....	16
<b>Figura 3.</b> Microambiente mecánico del SNC en estado de salud y enfermedad (Jagielska et al., 2012).....	21
<b>Figura 4.</b> Imagen de OL maduro, por microscopía de fluorescencia (Jobling, 2023).....	22
<b>Figura 5.</b> El linaje oligodendrial (Barateiro y Fernandes, 2014).....	22
<b>Figura 6.</b> Micrografía óptica de POS y OLs.....	23
<b>Figura 7.</b> Vista esquemática de un oligodendrocito y su vaina de mielina.....	24
<b>Figura 8.</b> Remielinización de Oligodendrocitos (Franklin, et al., 2021).....	25
<b>Figura 9.</b> Factores que influyen en la remielinización (Gharagozloo, et al., 2022).....	26
<b>Figura 10.</b> Vías de señalización implicadas genéricamente en la mecanotransducción y modelo propuesto para la influencia de elementos biofísicos durante la diferenciación de OL (Lourenço, Grãos,2016).....	27
<b>Figura 11.</b> Estructura química de ácido L-gulurónico y ácido D-manurónico, componentes del alginato (Akbar, 2023).....	31
<b>Figura 12.</b> Estructura química del alginato de sodio (Foroughi, 2018).....	32
<b>Figura 13.</b> Ilustración esquemática de oportunidades sintéticas asociadas con PVA y conjugación utilizando los grupos hidroxilo del polímero (Alves, et al, 2011).....	32
<b>Figura 14.</b> Síntesis de O-CMC mediante ácido cloro acético e hidróxido de sodio (Yang, et al., 2022).....	33
<b>Figura 15.</b> Espectroscopia FTIR (A) Quitina. (B) O-CMC. Adaptado de Yang, et al., 2022.....	34
<b>Figura 16.</b> Reticulación de alginato de sodio con cloruro de calcio (Lu, et al. 2021).....	35
<b>Figura 17.</b> Gráficas de posibles diseños factoriales (Hanrahan, G.et al.,2005).....	35
<b>Figura 18.</b> Espectro infrarrojo del hidrogel de poliacrilamida con 1% y 10% de agente entrecruzante (Tomado de Ramirez, A, et al, 2016).....	37
<b>Figura 19.</b> Metodología para el desarrollo del proyecto basada en el cumplimiento de los objetivos específicos (Autoría propia).....	40
<b>Figura 20.</b> Diagrama de flujo de procedimiento a seguir en la etapa I (Autoría propia).....	41
<b>Figura 21 .</b> Estrategias de búsqueda a partir de las palabras clave obtenidas por el método Cochrane.....	42
<b>Figura 22.</b> Ponderación de variables críticas para la elaboración del hidrogel.....	48
<b>Figura 23.</b> Estructura de matriz QFD (Ruiz 2009).....	49
<b>Figura 24.</b> Estructura química Alginato + PVA .....	52
<b>Figura 25.</b> Imágenes máximas de proyección Z-stack de la tinción viva/muerta de NPC encapsulados en hidrogeles el día 12.....	52
<b>Figura 26.</b> Caracterizaciones mecánicas del hidrogel de alginato de sodio- PVA.....	53
<b>Figura 27.</b> Imagen MEB de geles de Alginato - O-Carboximetilquitosano.....	54
<b>Figura 28.</b> Diagrama de flujo de procedimiento a seguir en la etapa II (Autoría propia).....	54
<b>Figura 29.</b> Diagrama de flujo del procedimiento para obtención de hidrogeles de alcohol polivinílico-Alginato de sodio.....	55
<b>Figura 30.</b> Metodología empleada para la obtención de muestras preliminares.....	56
<b>Figura 31.</b> Diagrama de flujo del procedimiento para obtención del carboximetil quitosano..	58
<b>Figura 32.</b> Diagrama de flujo del procedimiento para obtención de hidrogeles de alginato-carboximetil quitosano.....	59
<b>Figura 33.</b> Reómetro Anton Paar MCR 92.....	61

<b>Figura 34.</b> Metodología de las pruebas reológicas.....	61
<b>Figura 35.</b> Imagen por estereoscopia de los resultados de las muestras AG.....	62
<b>Figura 36.</b> Comportamientos viscoelásticos de las pruebas preliminares de AG compuestas por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).....	62
<b>Figura 37.</b> Imagen por estereoscopia de los resultados de las muestras MG compuestas por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).....	63
<b>Figura 38.</b> Comportamientos viscoelásticos de las pruebas preliminares de MG compuestas por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).....	64
<b>Figura 39.</b> Comportamientos viscoelásticos de las pruebas preliminares de MG vs AG compuestas por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).....	65
<b>Figura 40.</b> Espectro de infrarrojo del Alginato, FT-IR compacto Alpha.....	65
<b>Figura 41.</b> Espectro de infrarrojo del PVA, FT-IR compacto Alpha.....	66
<b>Figura 42.</b> Espectro de infrarrojo de la muestra AG2, FT-IR compacto Alpha.....	66
<b>Figura 43.</b> Carboximetil quitosano obtenido.....	67
<b>Figura 44.</b> Imagen por estereoscopia de los resultados de las muestras P.....	67
<b>Figura 45.</b> Comportamientos viscoelásticos de las muestras P.....	68
<b>Figura 46.</b> Imagen por estereoscopia de los resultados de las muestras Q.....	69
<b>Figura 47.</b> Comportamientos viscoelásticos de las muestras Q.....	69
<b>Figura 48.</b> Comportamientos viscoelásticos de las pruebas preliminares P vs Q compuestas por Alginato de Sodio (AS) y Carboximetil Quitosano.....	70
<b>Figura 49.</b> Espectro de infrarrojo del Quitosano, FT-IR compacto alpha.....	70
<b>Figura 50.</b> Espectro de infrarrojo del Ácido monocloroacético.....	71
<b>Figura 51.</b> Espectro de infrarrojo del Carboximetil Quitosano.....	71
<b>Figura 52.</b> Niveles y subniveles del diseño experimental (Autoría propia).....	76
<b>Figura 53.</b> Diagrama de flujo de la metodología para obtención de geles definitivos de AS y PVA (Autoría propia).....	78
<b>Figura 54.</b> Ilustración del método de adición de CaCl <sub>2</sub> a la mezcla de AS:PVA (Autoría propia). .....	78
<b>Figura 55.</b> Diagrama de flujo de procedimiento a seguir en la etapa III (Autoría propia).....	79
<b>Figura 56.</b> Metodología de las pruebas reológicas.....	79
<b>Figura 57.</b> Pretratamiento del hidrogel para pruebas de estereoscopia, microscopía e hinchamiento.....	80
<b>Figura 58.</b> Microscopio OLYMPUS CX31.....	80
<b>Figura 59.</b> Pasos a seguir para realizar las pruebas de microscopía óptica.....	81
<b>Figura 60.</b> Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAG compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).....	82
<b>Figura 61.</b> Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAA compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio(AS).....	82
<b>Figura 62.</b> Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAF compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).....	83
<b>Figura 63.</b> Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAO compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).....	83
<b>Figura 64.</b> Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAG, DAA, DAF y DAO compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en relación 7:3 mL.....	84
<b>Figura 65.</b> Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAG, DAA, DAF y DAO compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en relación 5:5 mL.....	84

<b>Figura 66.</b> Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAG, DAA, DAF y DAO compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en relación 3:7 mL.....	85
<b>Figura 67.</b> Imágenes de estereoscopía del hidrogel DAG 1.....	88
<b>Figura 68.</b> Imágenes de estereoscopía del hidrogel DAG 2.....	88
<b>Figura 69.</b> Imágenes de estereoscopía del hidrogel DAG 3.....	88
<b>Figura 70.</b> Micrografías ópticas del hidrogel DAG 1.....	89
<b>Figura 71.</b> Micrografías ópticas del hidrogel DAG 2.....	89
<b>Figura 72.</b> Micrografías ópticas del hidrogel DAG 3.....	89
<b>Figura 73.</b> Imágenes de estereoscopía del hidrogel DAA 1.....	90
<b>Figura 74.</b> Imágenes de estereoscopía del hidrogel DAA 2.....	90
<b>Figura 75.</b> Imágenes de estereoscopía del hidrogel DAA 3.....	90
<b>Figura 76.</b> Micrografías ópticas del hidrogel DAA 1.....	91
<b>Figura 77.</b> Micrografías ópticas del hidrogel DAA 2.....	91
<b>Figura 78.</b> Micrografías ópticas del hidrogel DAA 3.....	91
<b>Figura 79.</b> Imágenes de estereoscopía del hidrogel DAF 1.....	92
<b>Figura 80.</b> Imágenes de estereoscopía del hidrogel DAF 2.....	92
<b>Figura 81.</b> Imágenes de estereoscopía del hidrogel DAF 3.....	92
<b>Figura 82.</b> Micrografías ópticas del hidrogel DAF 1.....	93
<b>Figura 83.</b> Micrografías ópticas del hidrogel DAF 2.....	93
<b>Figura 84.</b> Micrografías ópticas del hidrogel DAF 3.....	93
<b>Figura 85.</b> Imágenes de estereoscopía del hidrogel DAO 1.....	94
<b>Figura 86.</b> Imágenes de estereoscopía del hidrogel DAO 2.....	94
<b>Figura 87.</b> Imágenes de estereoscopía del hidrogel DAO 3.....	94
<b>Figura 88.</b> Micrografías ópticas del hidrogel DAO 1.....	95
<b>Figura 89.</b> Micrografías ópticas del hidrogel DAO 2.....	95
<b>Figura 90.</b> Micrografías ópticas del hidrogel DAO 3.....	95
<b>Figura 91.</b> Micrografías ópticas del hidrogel <b>a, b, c</b> (DAA 2), <b>d</b> (DAO 1) . 10X .....	96
<b>Figura 92.</b> Interfaz del software Image J.JS durante una medición de las fibras en una micrografía óptica del gel DAG 2.....	97
<b>Figura 93.</b> Imágenes de estereoscopia por infrarrojo a) Muestra DAG 1 húmeda. b) Muestra DAG 1 liofilizada.....	98
<b>Figura 94.</b> Imágen de estereoscopias por infrarrojo a) DAG 1 (verde). b) DAG 2 (azul). b) DAG 3 (roja).....	99
<b>Figura 95.</b> Imágen de estereoscopias por infrarrojo relaciones 70 PVA - 30 AS. a) DAG 1(verde) b) DAA 1 (rojo). c) DAF 1 (azul). d) DAO 1 (gris).....	99
<b>Figura 96.</b> Imágen de estereoscopias por infrarrojo relaciones 50 PVA - 50 AS. a) DAG 2 (morado) b) DAA 2 (verde). c) DAF 2 (rojo). d) DAO 2 (azul).....	99
<b>Figura 97.</b> Imágen de estereoscopias por infrarrojo relaciones 30 PVA - 70 AS. a) DAG 3 (rojo) b) DAA 3 (gris). c) DAF 3 (azul). d) DAO 3 (verde).....	100
<b>Figura 98.</b> Porcentajes de hinchamiento de las muestras 1.....	100
<b>Figura 99.</b> Porcentajes de hinchamiento de las muestras 2.....	101
<b>Figura 100.</b> Porcentajes de hinchamiento de las muestras 3.....	101
<b>Figura 101.</b> Promedio de la economía atómica de los triplicados por muestra.....	102
<b>Figura 102.</b> Relación entre la economía atómica y la relación de volumen de componentes en el gel.....	103
<b>Figura 103.</b> Relación entre la economía atómica y volumen de CaCl <sub>2</sub> .....	103
<b>Figura 104.</b> Relación entre la economía atómica y el tiempo de agitación.....	103
<b>Figura 105.</b> Metodología de obtención del hidrogel DAA 2 (Autoría propia).....	106

## LISTA DE ECUACIONES

(1) Cálculo de la masa necesaria de alginato de sodio para una solución en 50 mL de agua destilada.....	56
(2) Cálculo de la masa necesaria de alcohol polivinílico para una solución en 50 mL de agua destilada.....	56
(3) Cálculo de la masa necesaria de Cloruro de calcio para una solución en 50 mL de agua destilada.....	56
(4) Cálculo corregido de la masa necesaria de Cloruro de calcio para una solución en 50 mL de agua destilada para el ensayo preliminar 3.....	57
(5) Fórmula para calcular la economía atómica (%rendimiento).....	72
(6) Fórmula para calcular la masa de un reactivo en el gel.....	72
(7) Ejemplo para el cálculo de la masa de alginato presente en el gel.....	73
(8) Ejemplo para el % de rendimiento del gel.....	73
(9) Porcentaje de hinchamiento.....	81
(10) Cálculo de economía atómica.....	102

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Criterios y propiedades para el diseño de hidrogeles en ingeniería tisular (Chyzy and Plonsk Brzezinska, 2020; Burdick and Stevens, 2005).....	30
<b>Tabla 2.</b> Ventajas y desventajas de las estrategias actuales de regeneración neuronal en OL. Adaptado de (Marinval, 2021).....	39
<b>Tabla 3.</b> Preguntas y palabras clave Cochrane.....	42
<b>Tabla 4.</b> Artículos seleccionados y su año de publicación.....	44
<b>Tabla 5.</b> Pruebas preliminares de PVA-AS muestras AG.....	57
<b>Tabla 6.</b> Pruebas preliminares de PVA-AS muestras MG.....	57
<b>Tabla 7.</b> Pruebas preliminares muestras P de Alginato de sodio - Carboximetil Quitosano.....	60
<b>Tabla 8.</b> Pruebas preliminares muestras Q de Alginato de sodio - Carboximetil Quitosano.....	60
<b>Tabla 9.</b> Criterios de selección del material y su justificación.....	73
<b>Tabla 10.</b> Matriz de selección para el material definitivo.....	75
<b>Tabla 11.</b> Factores del Diseño experimental.....	77
<b>Tabla 12.</b> Conversión de valores de viscosidad.....	85
<b>Tabla 13.</b> Viscosidad en kPa·s de los promedios de los hidrogeles DAG, DAA, DAF y DAO compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).....	87
<b>Tabla 14.</b> Longitud de fibras obtenida por ImageJ.J.....	97

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> Matriz QFD para priorización de requerimientos.....	116
<b>Anexo 2.</b> Matriz de decisión para selección de materiales.....	118

## RESUMEN

Los oligodendrocitos (OL) son las células gliales encargadas de la producción de mielina en los axones. Estos se ven directamente afectados por las enfermedades desmielinizantes que impiden que se lleve a cabo de manera correcta la diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos (POS) a OL mielinizantes por factores como las características físicas de la matriz extracelular (MEC) (Lourenco, 2016). Lo anterior se debe a que los OL son mecanosensibles. Entre las variables más relevantes en este proceso, se encuentran la rigidez y la topografía presentes en su microambiente (Jagielska, 2012).

Los biomateriales han sido una alternativa usada frecuentemente para la regeneración de tejido nervioso, en especial los hidrogeles, debido a su alta compatibilidad y su adaptabilidad a diferentes características fisicoquímicas. Actualmente existen propuestas de biomateriales que propician un mejor entorno para la diferenciación de los POS, sin embargo, no presentan sinergia entre las variables fisicomecánicas anteriormente nombradas (Carvalho, 2020), lo que genera una deficiencia en su funcionalidad. Según Makhija, et al., la rigidez que debe cumplir un biomaterial destinado a la regeneración y diferenciación de OL es de 1 a 7 kPa y algunas de las características topográficas importantes son la geometría, la isotropía y la composición.

Teniendo en cuenta esta problemática, se planteó como objetivo de este trabajo el desarrollo de una metodología de obtención de un biomaterial tipo hidrogel con características de rigidez y topografía con potencial aplicación en el desarrollo de andamios que promuevan la diferenciación de precursores de oligodendrocitos. Este objetivo se compone de tres etapas principales de diseño desde la ingeniería y de evaluación: el diseño conceptual del hidrogel, el diseño detallado o de obtención del biomaterial y la caracterización de las muestras obtenidas. Primeramente se establecieron las variables críticas y los requerimientos del hidrogel, para la posterior selección y obtención de las dos propuestas de material (Polivinil alcohol-Alginato de Sodio y Alginato de sodio-Carboximetil quitosano) que cumplieran con los parámetros requeridos. El resultado después de evaluar las propuestas de material fue un hidrogel compuesto de Polivinil alcohol-Alginato de sodio, el cual para su obtención se llevó a cabo un diseño experimental factorial estableciendo tres diferentes niveles: relación de volumen en mL entre los componentes respectivamente (7:3, 5:5 y 3:7), variación del tiempo y volumen del agente reticulante  $\text{CaCl}_2$ . Por último, se caracterizaron y evaluaron las muestras con el fin de establecer la metodología de obtención del hidrogel con resultados favorables teniendo en cuenta las condiciones necesarias para promover la diferenciación de los precursores de oligodendrocitos como producto del proyecto. La metodología seleccionada corresponde a la muestra compuesta por igual cantidad de volumen de la solución AS-PVA con un tiempo de agitación de 8 horas y una adición de volumen de la solución de  $\text{CaCl}_2$  de 2,5 ml.

**Palabras clave:** Oligodendrocitos, biomaterial, hidrogel, rigidez, topografía, metodología de obtención

## ABSTRACT

Oligodendrocytes (OL) are the glial cells responsible for the production of myelin in axons. These are directly affected by demyelinating diseases that prevent the differentiation of oligodendrocyte precursor cells (POS) to myelinating OLs due to factors such as the physical characteristics of the extracellular matrix (ECM) (Lourenco, 2016). This is because OLs are mechanosensitive. Among the most relevant variables in this process are the stiffness and topography present in its microenvironment (Jagielska, 2012).

Biomaterials have been a frequently used alternative for the regeneration of nervous tissue, especially hydrogels, due to their high compatibility and adaptability to different physicochemical characteristics. There are currently proposals for biomaterials that promote a better environment for the differentiation of POS, however, they do not present synergy between the physicochemical variables previously named (Carvalho, 2020), which generates a deficiency in their functionality. According to Makhija, et al., the stiffness that a biomaterial intended for OL regeneration and differentiation must meet is 1 to 7 kPa and some of the important topographic characteristics are geometry, isotropy and composition.

Taking into account this problem, the objective of this work was the development of a methodology for obtaining a hydrogel-type biomaterial with characteristics of stiffness and topography with potential application in the development of scaffolds that promote the differentiation of oligodendrocyte precursors. This objective consists of three main stages of design from engineering and evaluation: the conceptual design of the hydrogel, the detailed design or obtaining of the biomaterial and the characterization of the samples obtained. First, the critical variables and requirements of the hydrogel were established, for the subsequent selection and obtaining of the two material proposals (Polyvinyl alcohol-Sodium Alginate and Sodium Alginate-Carboxymethyl chitosan) that met the required parameters. The result after evaluating the material proposals was a hydrogel composed of Polyvinyl alcohol-Sodium alginate, which to obtain a factorial experimental design was carried out establishing three different levels: volume ratio in mL between the components respectively (7:3, 5:5 and 3:7), variation of time and volume of the crosslinking agent CaCl<sub>2</sub>. Finally, the samples were characterized and evaluated in order to establish the methodology for obtaining the hydrogel with favorable results taking into account the necessary conditions to promote the differentiation of oligodendrocyte precursors as a product of the project. The selected methodology corresponds to the sample composed of equal volume amount of SA-PVA solution with a stirring time of 8 hours and an addition of volume of CaCl<sub>2</sub> solution of 2.5 ml.

**Key words:** Oligodendrocytes, biomaterial, hydrogel, stiffness, topography, methodology of obtaining.

## 1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central se compone de células gliales como lo son los astrocitos, la microglía y los oligodendrocitos (OL) (Reyes, et al., 2014). Los oligodendrocitos (OL) son los encargados de la producción de vainas de mielina alrededor de los axones (Herbert, Monk, 2017). Estas células presentan diferentes procesos dentro de su desarrollo como la migración, proliferación y la diferenciación, mediante los cuales los precursores de oligodendrocitos (POS) maduran a OL mielinizantes (Medina, 2015).

La primera etapa de la diferenciación (POS) se ve afectada por las enfermedades desmielinizantes, las cuales generan pérdida o deformación de la vaina de mielina y a su vez ocasionan un daño axonal interrumpiendo las conexiones neuronales (Jaramillo, 2019). Una de estas enfermedades es la esclerosis múltiple (EM), siendo considerada la más frecuente en todo el mundo (Jaramillo, 2019), pues 2.8 millones de personas la padecen. Esta enfermedad tiene una incidencia mayor de 2 a 3 veces en mujeres que en hombres, según datos de la Federación Internacional de Esclerosis Múltiple.

Los OL cuentan con la capacidad de regenerarse, sin embargo, al presentarse este tipo de afectaciones, no llegan a su etapa madura mielinizante debido a cambios en su microentorno. Estos cambios pueden ser biofísicos, como la rigidez y topografía de la matriz (Jagielska, 2011). Actualmente se han propuesto diferentes tecnologías que promuevan la diferenciación oligodendrial sin embargo, presentan limitaciones en la sinergia de propiedades mecánicas desde el microambiente influyentes en dicho proceso. Por tanto, teniendo en cuenta el impacto que ocasionan las enfermedades neurodegenerativas y después de realizar una revisión en cuanto a alternativas de acción, se establece que el desarrollo de un producto que logre brindar un ambiente de potencial regenerativo, más específicamente en las células gliales oligodendrocitos cuando ocurre una lesión en el sistema nervioso central que afecte su funcionalidad, puede generar una gran contribución en esta área de estudio.

En este documento se plantearon 7 secciones, en las cuales se describe cronológicamente la concepción del proyecto y la obtención del producto. Introducción, planteamiento del problema donde se describe el problema desde el ámbito social, biológico y tecnológico. Los objetivos de este trabajo. La justificación, que busca explicar la razón del proyecto desde el campo de la bioingeniería y cuál es su impacto a corto y largo plazo. El marco de referencia, que brinda el contexto necesario de los conceptos, teorías y normas en que se basó el proyecto. La metodología donde se desglosa el paso a paso para el cumplimiento de los objetivos y los resultados de acuerdo a las etapas de diseño y su respectivo análisis. Por último las conclusiones.

Se propone una metodología de obtención de un biomaterial tipo hidrogel con características de rigidez y topografía con potencial aplicación en el desarrollo de andamios que promuevan la diferenciación de precursores de oligodendrocitos, tras un proceso diseño de biomateriales y la evaluación de los mismos en características físicas y mecánicas que respecta al comportamiento viscoelástico y propiedades topográficas. Dichas características fueron

determinadas de acuerdo a las necesidades propias del proceso biológico para el cual está dirigido este trabajo.

El diseño de biomateriales para la implementación en la fabricación de biotintas o directamente andamios destinados a la regeneración de tejido, se considera cada vez más relevante, ya que, durante este proceso de diseño se puede modular o mejorar las características propias del material, con el fin de que brinde un ambiente propicio para la proliferación celular. De esta manera posteriormente pueden realizarse estudios biológicos con un material que ya ha tenido en consideración los requerimientos del sistema. Además pueden verse reflejada la economía atómica y eficiencia energética al tener en cuenta los criterios de química verde durante el planteamiento de la metodología, lo que proporciona una mayor eficiencia en la obtención del hidrogel.

Lo anteriormente mencionado genera un aporte significativo al desarrollo de biomateriales para regeneración celular, específicamente en tejido nervioso que es una de las áreas que menos desarrollo tiene actualmente, y que promete ser una alternativa para el tratamiento de afectaciones en la funcionalidad de los oligodendrocitos.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema nervioso es el sistema biológico encargado del procesamiento y análisis de información, y como producto genera una respuesta según el estímulo detectado. Dentro de sus principales funciones se encuentra la relación con el entorno y el control sobre los órganos del ente biológico. De esta manera logra coordinar las funciones dentro de un organismo. Este sistema se divide en dos partes, la primera es el sistema nervioso central (SNC) y la segunda el sistema nervioso periférico (SNP) (Fernández, 2010).

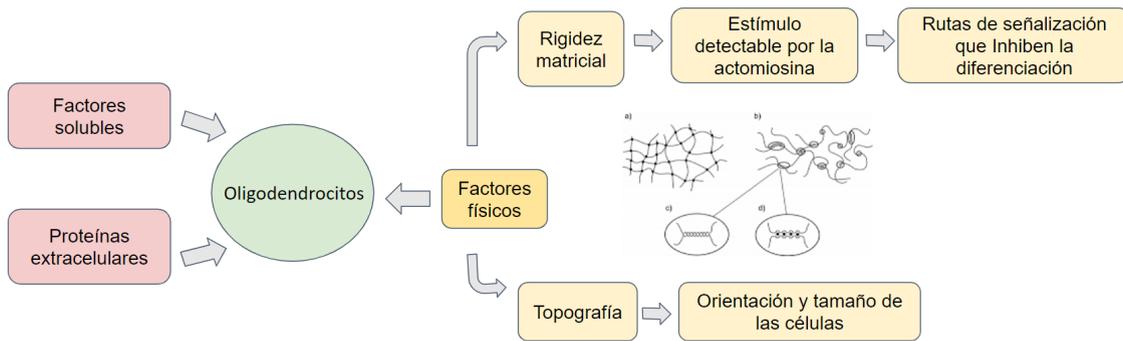
El SNC está conformado por el encéfalo y la médula espinal. Su función está dirigida a establecer la relación de la información sensorial y la creación de su respuesta (Fernández, 2010). En el SNC existen diversos tipos de células, entre ellas, la glía es el grupo celular más numeroso en el cerebro; y existen diferentes tipos según su morfología, funcionalidad y ubicación: Microglía, Oligodendrocitos, Glía NG2 y Astrocitos (Reyes, et al., 2014).

Los oligodendrocitos (OL) son los encargados de la producción de vainas de mielina alrededor de los axones (Herbert, Monk, 2017). Estas células presentan diferentes procesos dentro de su desarrollo como la migración, la proliferación, la diferenciación, por el cual los precursores de oligodendrocitos (POS) maduran a OL con capacidad mielinizante, y la mielinización (Jaramillo, 2019). Esta última etapa de mielinización se ve afectada específicamente por las enfermedades desmielinizantes que generan pérdida o deformación de la vaina de mielina, lo que produce un daño axonal interrumpiendo las conexiones neuronales (Jaramillo, 2019). Algunas de las enfermedades propiamente desmielinizantes son: la Enfermedad de Devic o Neuromielitis Óptica, la Esclerosis Múltiple (EM) y Enfermedad de Schilder. Dentro de este grupo la EM es considerada la más frecuente en todo el mundo (Jaramillo, 2019), 2.8 millones de personas presentan EM, teniendo una incidencia mayor de 2 a 3 veces en mujeres que en hombres, según datos de la Federación Internacional de Esclerosis Múltiple.

Posterior a una afectación desmielinizante provocada por una enfermedad degenerativa, los oligodendrocitos llevan a cabo un proceso de regeneración buscando de esta manera compensar la pérdida de vainas de mielina (Franklin, 2002). A este proceso de formación de nuevas vainas de mielina se le denomina remielinización. Y a pesar de que puede resultar satisfactorio y regenerar el tejido celular y generar nuevas vainas de mielina, tras una lesión de la EM los OL no son capaces de cumplir adecuadamente con esta función (Jaramillo, 2019).

Según investigaciones encontradas en bibliografía, la disfuncionalidad de los OL con respecto a las enfermedades desmielinizantes se produce gracias a que sus etapas de diferenciación no se llevan a cabo correctamente o se dan de manera incompleta. Un factor importante es el daño presente en el entorno de la célula por la lesión, la cual inhibe la diferenciación de los POS (Precursores de oligodendrocitos) a OL maduros (Ziabreva et al., 2010).

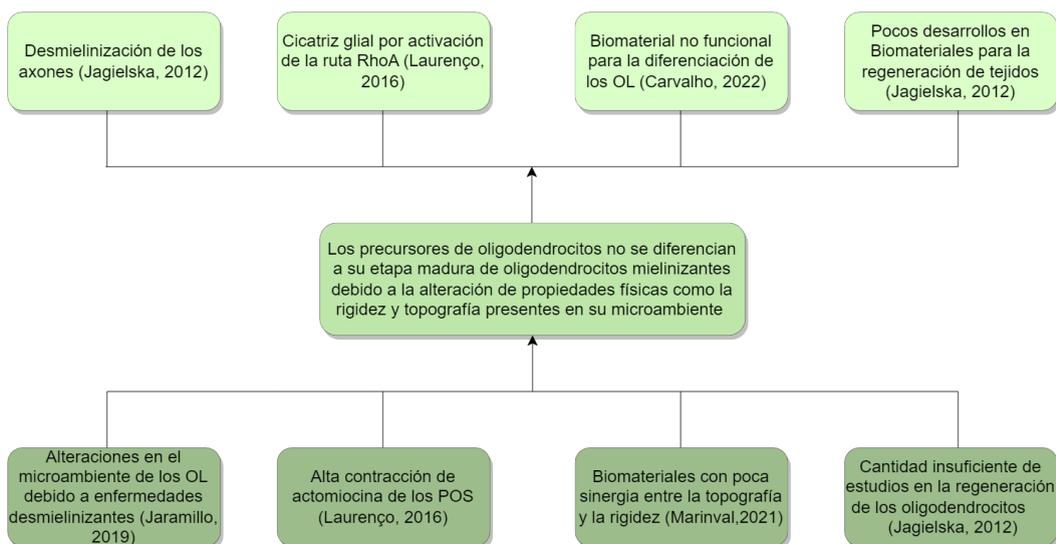
El proceso de diferenciación se ve influenciado por distintos factores bioquímicos, y en principio se creía que era la única causa de este fenómeno. Sin embargo Jagielska et al. demostraron en un trabajo de investigación acerca de la adhesión celular que los POS, son mecanosensibles, y que esta sensibilidad tenía influencia directa en la maduración y diferenciación de OL. Desde ese momento las propiedades biofísicas fueron tomando relevancia en el estudio de la regeneración de los OL, y se determinó que aquellas que tienen más importancia dentro del proceso, son la rigidez y la topografía (Lourenço, Grãos, 2016).



**Figura 1.** Factores que influyen en la regeneración de los Oligodendrocitos Adaptado de: (Lourenco, 2016 )

El efecto de los estímulos mecánicos de la rigidez en el microambiente de los oligodendrocitos se encuentra relacionado con la activación o desactivación de la ruta de señalización RhoA, cuando está activa fomenta la producción de una cicatriz glial lo que inhibe la diferenciación de los OL. A pesar de que se han identificado las características físicas influyentes en la diferenciación de OL, hasta el momento no se ha documentado la existencia de materiales que cumplan con esas especificaciones y que además presente una sinergia entre rigidez y topografía, para su potencial aplicación en regeneración de células gliales de OL (Marnival, 2021).

Teniendo en cuenta la función que cumplen los oligodendrocitos en la producción de mielina y su importancia. Se identifica el problema en la diferenciación incompleta o nula de los precursores de oligodendrocitos, debido a características mecánicas presentes en su microentorno después de una lesión de esclerosis múltiple. Además se evidencian limitaciones en los materiales desarrollados para estimular la regeneración de OL, respecto a sus propiedades físicas, como la sinergia entre variables de rigidez y topografía. En el siguiente diagrama se desglosan las causas y los efectos mencionados anteriormente, que surgen del problema identificado.



**Figura 2.** Árbol del problema (Autoría propia).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Diseñar una metodología de obtención de un biomaterial tipo hidrogel con características de rigidez y topografía con potencial aplicación en el desarrollo de andamios que promuevan la diferenciación de precursores de oligodendrocitos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Establecer los parámetros de composición química, rigidez y topografía del biomaterial considerando los requerimientos físicos, químicos y biológicos de la diferenciación de oligodendrocitos.
- Obtener bajo un diseño experimental factorial el biomaterial propuesto desde el diseño conceptual.
- Evaluar las variables de viscosidad dinámica, topografía y capacidad de hinchamiento del hidrogel obtenido.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo al boletín poblacional de las personas que presentan algún tipo de discapacidad, expedido por el ministerio de salud de Colombia. La segunda discapacidad más común en el país está relacionada con el sistema nervioso debido a las enfermedades neurodegenerativas. Dentro de dichas afecciones se encuentra la esclerosis múltiple, la enfermedad huérfana que tiene más pacientes en el territorio nacional.

La Esclerosis Múltiple es la enfermedad crónica inflamatoria neurodegenerativa desmielinizante más frecuente del sistema nervioso central. (Noseworthy et al., 2000). La prevalencia del deterioro cognitivo de pacientes con esclerosis múltiple fluctúa entre el 40 al 70%. Esta disfunción cognitiva puede interferir con las actividades diarias, que implican la interacción social, las relaciones familiares y la capacidad para realizar tareas domésticas; y es la responsable de que los pacientes tengan dificultad para conseguir y mantener un empleo (Noseworthy et al., 2000).

Teniendo en cuenta el impacto que ocasionan las enfermedades neurodegenerativas y después de realizar una revisión en cuanto a alternativas de acción y estudio, se establece que sería de gran contribución un producto que logre brindar un ambiente de potencial regenerativo, más específicamente en las células gliales oligodendrocitos cuando ocurre una lesión en el sistema nervioso central que afecte su funcionalidad. Es por ello que se propone el diseño de una metodología para el diseño de un hidrogel que cumpla con una serie de requerimientos y aporte a este campo de estudio.

El proceso para la obtención de este producto se planteó a partir de las variables de rigidez y topografía que estimulan la diferenciación en los precursores de oligodendrocitos, lo que genera en el material una potencial aplicación en la diferenciación de estas células a oligodendrocitos maduros. Por medio de fases de diseño de un proyecto en ingeniería, donde se establecen las variables físicas, químicas y biológicas para la fabricación de un material con potencial aplicación en la diferenciación de precursores de oligodendrocitos, teniendo en cuenta los criterios de química verde como la economía atómica, la disminución de consumo energético, y toxicidad mínima o nula para su fabricación.

El desarrollo de este proyecto se llevó a cabo en tres etapas. En la primera etapa se realizó el diseño conceptual basado en un levantamiento de información que parte de una revisión bibliográfica sistemática, mediante la cual se determinaron los requerimientos de la propuesta de solución. Con base a estos requerimientos se evaluaron 7 propuestas de material, de las cuales 2 fueron seleccionadas para realizar pruebas preliminares. En donde se evaluó la metodología de obtención, su comportamiento reológico y su composición mediante espectroscopía infrarroja, además de su caracterización morfológica por estereoscopia. De acuerdo con los resultados obtenidos y su relación con los requerimientos establecidos se seleccionó un material definitivo para realizar el diseño experimental donde se obtuvieron diferentes muestras, con niveles y subniveles de variables determinantes en la obtención del hidrogel las cuales, en la tercera etapa, serán sometidas a pruebas de microscopía óptica y de reología, evaluando así las variables físicas de rigidez y topografía para proceder a la elección del material que cumpla con el objetivo del proyecto. Teniendo claro esto, se dispone a diseñar el producto final del proyecto, la metodología de obtención del hidrogel, que garantice su repetibilidad y reproducibilidad.

No se realizó ningún análisis de tipo biológico ya que, el acceso a líneas celulares y a los

materiales para un estudio *in vitro* es limitado, además de que aumenta variables condicionales en este proyecto como el tiempo de desarrollo, el alcance, y los costos; lo que le resta viabilidad a la propuesta.

Destacando la importancia del desarrollo de este proyecto, la obtención de un biomaterial que ofrezca las características físicas de rigidez y topografía adecuadas para potenciar el desarrollo de los precursores de oligodendrocitos, ofrece en el área de terapia regenerativa una herramienta de estudio respecto a interacción de los oligodendrocitos con su microambiente de desarrollo, lo que a su vez, aporta significativamente al estudio del sistema nervioso central al presentarse una lesión degenerativa como la esclerosis múltiple.

El proyecto se encuentra dentro del área focal de tecnología para la salud de sistemas biológicos, bajo el acompañamiento del semillero de Biomateriales y el Programa de Bioingeniería de la Universidad El Bosque, que tiene como misión el diseño y análisis de materiales compuestos para desarrollar propuestas orientadas a la terapia regenerativa. Es por esta razón que se destaca el aporte desde este proyecto al objetivo de desarrollo sostenible número 3 “Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades” ya que a largo plazo se espera que la metodología propuesta en este trabajo pueda ser implementada en el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.

## 5. MARCO DE REFERENCIA

En esta sección se encuentran conceptos necesarios para la ejecución y entendimiento del proyecto, desde el marco conceptual al marco teórico, además se exponen los antecedentes y regulaciones del mismo (marco normativo y estado del arte).

### 5.1 Marco conceptual

#### 5.1.1 Sistema nervioso central

El sistema nervioso central es un conjunto de estructuras nerviosas que proporcionan interacciones con nuestro entorno, lo que genera reacciones ante estímulos externos. Está clasificado en dos subsistemas, sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está compuesto por el encéfalo y la médula espinal y en su mayoría lo conforman la glía (Medina, 2015).

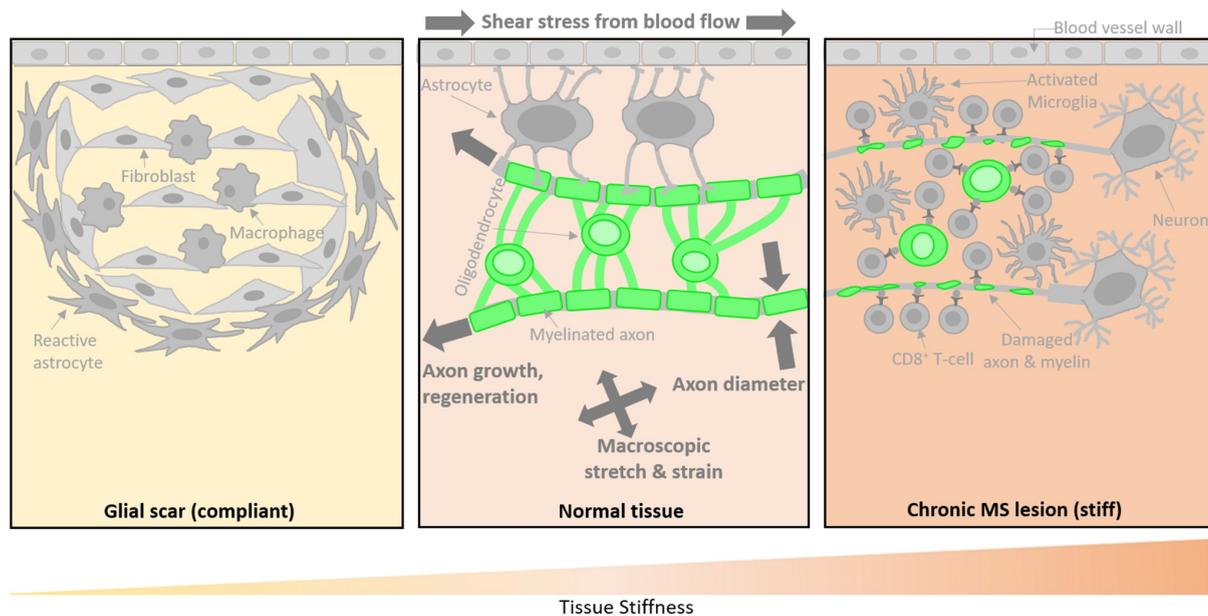
La glía es un grupo de células heterogéneo de células nerviosas que son consideradas el soporte del SNC, recientemente se ha descubierto que intervienen en la comunicación y actividad neural, además de que son las encargadas de mantener un ambiente sano para las neuronas, amortiguando daños por agentes químicos presentes en su microambiente o proporcionando estructura e interconexión (Jobling, 2023). Al conocer su importancia en la operación y modulación de circuitos sinápticos, los estudios con el fin de caracterizar estas células y su funcionamiento han aumentado considerablemente. De acuerdo a su morfología, localización y fisiología pueden encontrarse diferentes tipos: microglía; oligodendroglia; glía NG2; y astrogliá (Reyes, 2014).

#### 5.1.2 Microambiente del sistema nervioso central.

Los oligodendrocitos se desarrollan y cumplen su función en el microambiente del tejido circundante del sistema nervioso central, el cual comprende cerebro y médula espinal. Este entorno se encarga de proporcionar señales bioquímicas y físicas que regulan la biología y función de los OL, como el proceso de mielinización de las neuronas.

En la actualidad existe una creciente evidencia experimental que muestra que la mayoría de las etapas del desarrollo de los OL mielinizantes, responden a señales mecánicas externas. Estímulos como la rigidez del tejido o de la MEC, la topografía, la tensión mecánica y el apiñamiento macromolecular afectan la migración, la proliferación, la diferenciación y la mielinización de los axones de las células del linaje OL (Makhija, E. P, 2020).

Debido a la presencia de enfermedades y al envejecimiento, las propiedades mecánicas del SNC se pueden ver afectadas. En la figura 3 a continuación, se muestran tres escenarios diferentes en el tejido del SNC, donde la rigidez del tejido se muestra utilizando el mapa de color amarillo-naranja y los oligodendrocitos y la mielina se muestran en verde. En el recuadro de la izquierda se observa una cicatriz glial formada después de una lesión, las cicatrices gliales son más flexibles que el tejido normal del SNC, carecen de axones, neuronas y oligodendrocitos, e incluyen fibroblastos, macrófagos y astrocitos reactivos (AR Hackett , JK Lee, 2019), en el recuadro del medio se encuentra un tejido normal y en la de la derecha una lesión de esclerosis múltiple crónica, donde se exhibe la mielina, axones y oligodendrocitos dañados, e incluyen células TCD8 + y microglía activada (Makhija, E. P, 2020).



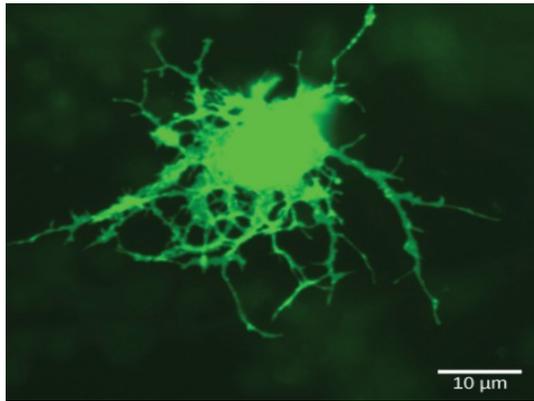
**Figura 3.** Microambiente mecánico del SNC en estado de salud y enfermedad (Jagielska et al., 2012)

La mielinización se ve directamente influenciada por factores externos del microentorno celular, como la maduración, forma y tamaño de los axones e incluso la ubicación de los OL, si se ubican en áreas corticales superficiales tiene menos capacidad mielinizante que si se encuentran en capas más profundas.

Es importante tener en cuenta que los OL están relacionados con las demás células gliales, y estas a su vez logran interferir directa o indirectamente con su funcionalidad mielinizante. Las neuronas son las células que llegan a tener una mayor interacción con los OL, ya que ellos envuelven sus axones para la conexión entre ellas lo que permite una conexión sináptica. Estas influyen en la proliferación y diferenciación de OL y POS, ya que además de tener contacto físico con ellos, son capaces de modular factores bioquímicos que logran inhibir la diferenciación de POS y la producción de mielina. Las neuronas liberan glutamato cuando los axones no tienen el nivel suficiente de mielina, ya sea por una enfermedad o algún otro factor intrínseco. Este es percibido por los OL y dependiendo la etapa en la que los OL lo asimilen tiene consecuencias positivas o negativas. Si el receptor es un POS el glutamato genera una saturación de calcio y lleva a apoptosis a la célula, mientras que si el OL es maduro, puede llegar a inducir un proceso de mielinización (Prisca, et al., 2018).

Los astrocitos, estos se unen a los OL mediante conexinas, su influencia más directa en el proceso mielinización es la secreción de factores de crecimiento como neurotrofinas. (Prisca, et al., 2018). Por último se encuentra la microglía una célula que en estado de inflamación llega a liberar moléculas potencialmente tóxicas, en un ambiente de enfermedad el ambiente llega a ser más hostil, lo que imposibilita la diferenciación de POS; mediante la liberación de factores solubles cuando se encuentra en estado antiinflamatorio llega a mejorar la maduración y mielinización de los OL, e impide la apoptosis de los POS (Prisca, et al., 2018)

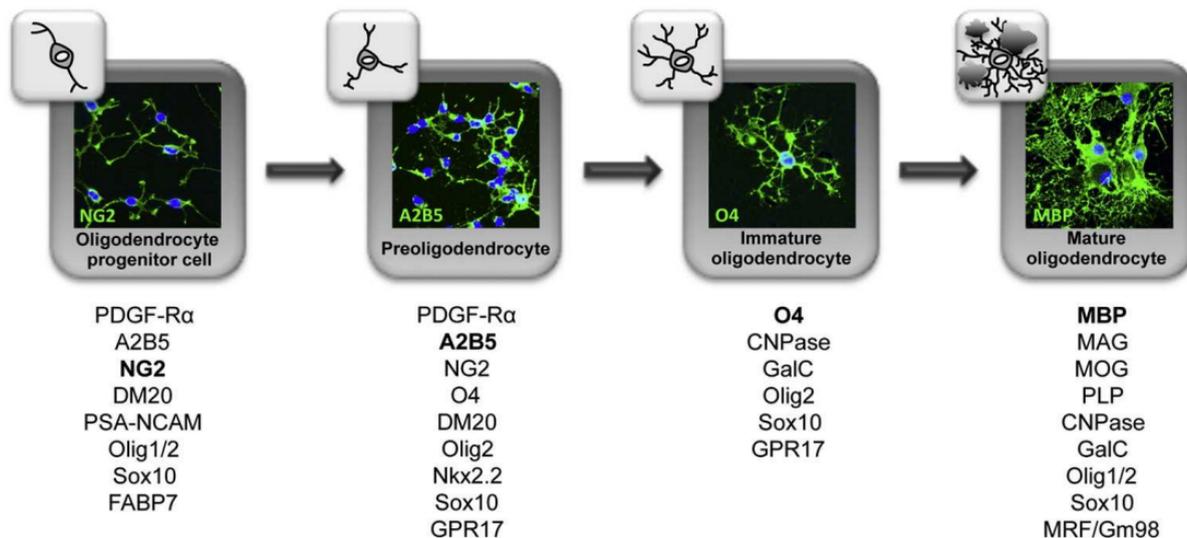
### 5.1.3 Oligodendrocitos



Los oligodendrocitos son las células gliales que cumplen como función la formación de las vainas de mielina que envuelven los axones en el SNC, lo que les proporciona el aislamiento para una rápida conducción de señales eléctricas (Medina Rodríguez, E. M, 2015).

**Figura 4.** Imagen de OL maduro, tomada por microscopía de fluorescencia (Jobling, 2023)

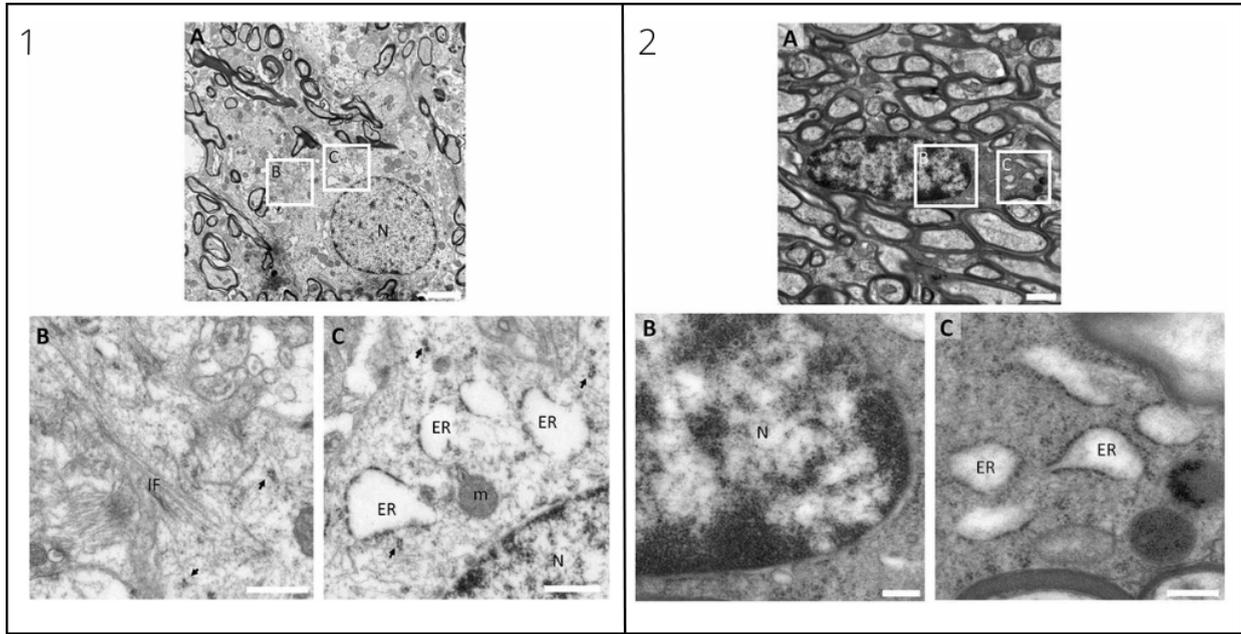
En el linaje oligodendrial se encuentran cuatro fases de maduración (figura 5). En la primera se encuentran los precursores de oligodendrocitos (POS), las cuales presentan morfología bipolar, cuentan con capacidad de migración y proliferación. En las siguientes etapas estos POS empiezan a diferenciarse y a perder su capacidad proliferativa y migratoria. Los pre oligodendrocitos se forman a partir de los POS y presentan más cantidad de ramificaciones cortas y expresan marcadores nuevos como O4 y GPR17. En la tercera fase se encuentran los oligodendrocitos inmaduros, producto de la diferenciación de los pre oligodendrocitos, estos pierden la expresión de marcadores como PDGFR $\alpha$ , A2B5 y NG2 pero expresan nuevos como GalC y CNPase lo que las convierte en células postmitóticas con ramificaciones largas. En la última fase, se encuentran los oligodendrocitos maduros, estos expresan componentes de la mielina como lo son como PLP, MBP, MAG y MOG, también extienden sus membranas para formar envueltas compactas, por lo que adquieren la capacidad de mielinizar axones. (Barateiro y Fernandes, 2014)



**Figura 5.** El linaje oligodendrial (Barateiro y Fernandes, 2014)

Los POS se identifican por núcleo transparente a los electrones y abundante eucromatina no condensada (Figura 6. 1(A)). Su cuerpo celular se caracteriza por tener estructuras filamentosas (Figura 6.1(B)) y también por su citoplasma electro lúcido que contiene cisternas de retículo endoplásmico corto dilatado, mitocondrias y ribosomas.

Los OLs maduros morfológica y fisiológicamente presentan grandes diferencias con los POS. Los OLs están distribuidos por la sustancia blanca, gracias a sus ramificaciones se unen a los axones envolviendolos de mielina (Figura 6. 2(A)), en su etapa madura presentan una estructura de membrana nuclear interna que sucede junto con la condensación de cromatina (Figura 6. 2(B)). Otra de sus características es su organización citoplasmática, donde se evidencia el retículo endoplasmático dilatado, mitocondrias, vesículas de degradación densa y polirribosomas, en poca cantidad (Figura 6. 2(C)) (Ulloa, et al., 2021) .



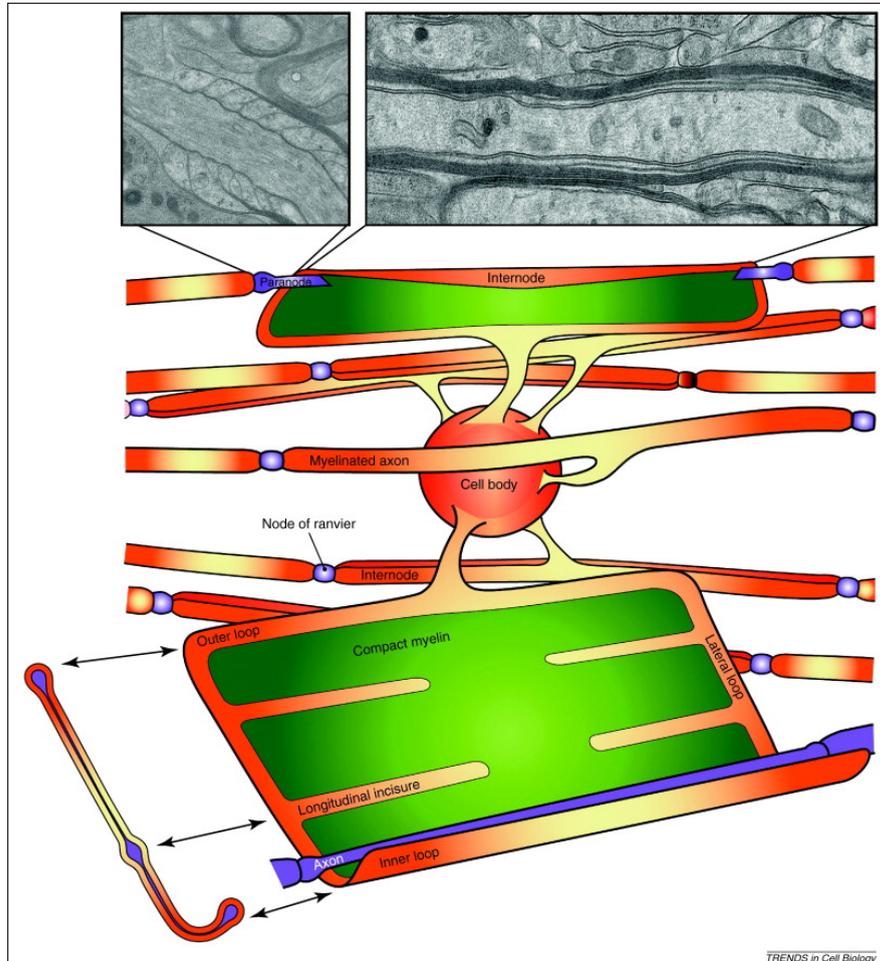
**Figura 6.** Micrografía óptica de POS y OLs. **1.** Micrografía Óptica de un POS proveniente de sustancia blanca de un varón de 27 años. (A) Micrografía panorámica de POS. (B) Filamentos presentes en POS. (C) Citoplasma translúcido de un POS. **2.** Micrografía Óptica de un OL maduro proveniente de sustancia blanca de un varón de 6 años. (A) Micrografía panorámica de OL. (B) Membrana nuclear interna de OL. (C) Organización endoplasmática de los OLs. (Ulloa, et al., 2021).

#### 5.1.4. Mielina

Los OLs producen las vainas de mielina encargadas de brindar soporte estructural, homeostático y metabólico a las neuronas, y tienen como función principal garantizar una efectiva conducción saltatoria de potenciales de acción, facilitando su dispersión por los nódulos de ranvier (Zlomuzica, et al., 2023)

La mielina está compuesta principalmente de lípidos, entre ellos se encuentran lípidos neutros, fosfoglicéridos y esfingolípidos. Los componentes de estos lípidos son principalmente ácidos grasos, lo cuales se caracterizan por su elevado contenido en ácidos grasos saturados de cadena larga (20-24 átomos de carbono), y la mayoría se encuentran presentes como esfingolípidos, en particular, galactolípidos –C (Gal-C) (Estela, C. D. M, 2002). Estructuralmente también cuenta con capas compactas de membrana plasmática y proteínas de mielina especializadas como la enzima fosfodiesterasa de nucleótido cíclico y la glicoproteína asociada a mielina, que aseguran la adhesión funcional de la vaina de mielina.

La vaina de mielina es elemental para que el sistema nervioso funcione correctamente y de manera eficaz; en el caso de las enfermedades desmielinizantes, éstas se caracterizan por invalidez debido al bloqueo de conducción de las fibras nerviosas lesionadas (Estela, C. D. M, 2002). Lo que puede incurrir en afectaciones en la locomoción, deglución, respiración, cognición y percepción. Teniendo en cuenta que los oligodendrocitos son los encargados de la formación de las vainas de mielina, a continuación se muestra un esquema que permite entender de mejor manera.



**Figura 7.** Vista esquemática de un oligodendrocito y su vaina de mielina. Los oligodendrocitos forman hasta ~40 procesos diferentes que envuelven diferentes axones para formar múltiples entrenudos de mielina. La vaina de mielina se muestra sin envolver, con canales citoplasmáticos en su borde. Estos canales que forman los bucles paranodales y el espacio ad- y ab axonal son continuos entre sí. Las micrografías electrónicas muestran (derecha) una sección longitudinal de la mielina compacta y (izquierda) las asas paranodales. ( Aggarwal et al. 2011)

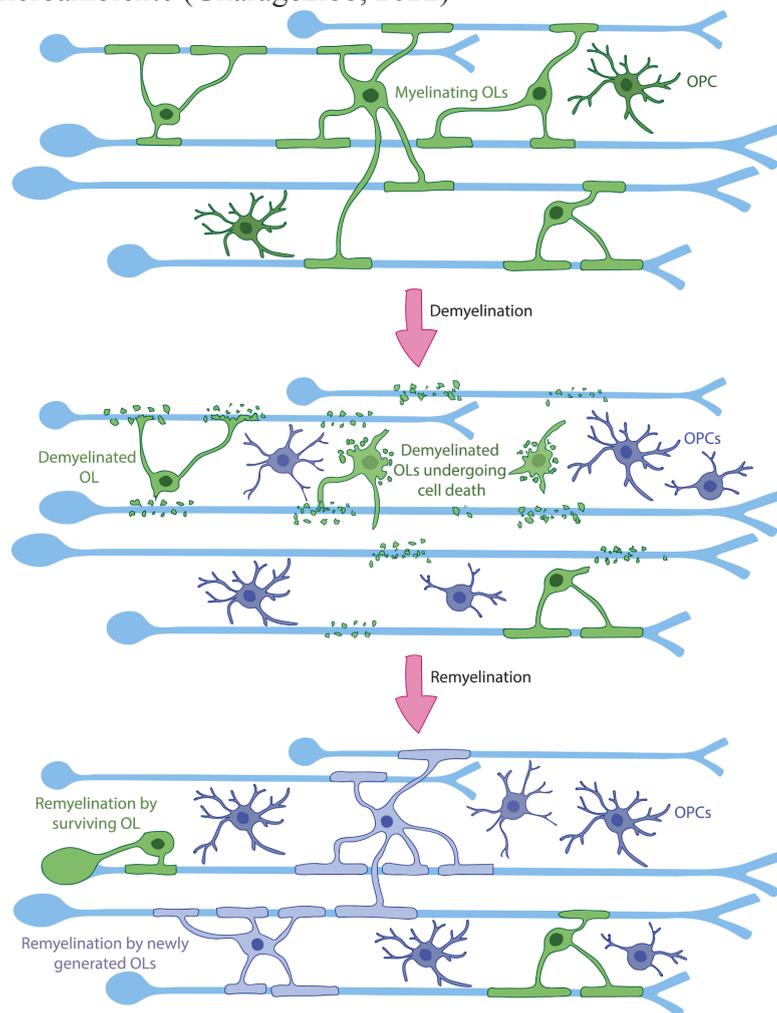
### 5.1.5 Remielinización

Cuando ocurre un daño en la membrana de mielina debido a una lesión o enfermedad nerviosa, se ve afectada significativamente la capacidad del sistema nervioso para comunicarse y se pueden presentar una serie de síntomas debilitantes y una pérdida final de función. En el SNC la desmielinización se relaciona con la pérdida de oligodendrocitos. Por lo que una vez ocurre la desmielinización, se induce a los POS a diferenciarse y remielinizar, para así reemplazar a

los oligodendrocitos perdidos, pero la capacidad de remielinización es limitada y falla en presencia de una desmielinización crónica (Jaramillo Merchán, J. A, 2021).

Si bien no se tiene conocimiento con certeza del porqué el SNC no mantiene esta capacidad de reparar la mielina, es posible que la presencia de un ambiente desmielinizante sea la causa de inhibir el proceso de diferenciación (Calabresi, 2021).

En el momento en el que el SNC sufre una afectación directa a las vainas de mielina es capaz de regenerarse, mediante la formación de nuevos OL mielinizantes que sufren un proceso de diferenciación desde los POS, o incluso por regeneración de mielina a partir de ol existentes en el medio a pesar de que estén afectados en alguna medida. Sin embargo cuando la afectación a la mielina es debido a una lesión de esclerosis múltiple los axones se encuentran expuestos a un estrés fisiológico que causa en ellos degeneración, y por condiciones del micro entorno para los POS es muy difícil llegar a diferenciarse en OL maduros gracias a señales inhibitorias presentes en el microambiente (Gharagozloo, 2022)

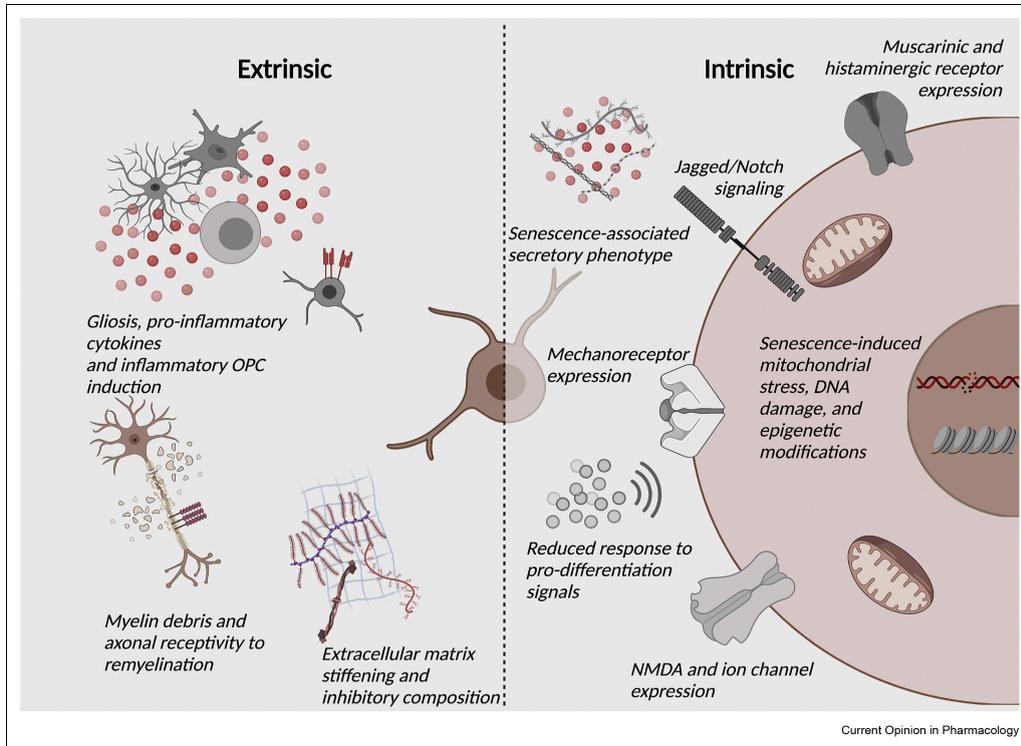


**Figura 8.** Remyelinización de Oligodendrocitos (Franklin, et al., 2021)

### 5.1.6 Matriz extracelular

La matriz extracelular es una red de proteínas y glucanos que brinda soporte estructural y bioquímico a las células circundantes. Esta matriz tiene una participación importante en el proceso de maduración y diferenciación de los OL debido a las integrinas que posee, lo que le

permite a las células adherirse a la superficie de la misma. En estudios in vivo se ha evidenciado el papel de la N-cadherina en la migración de POS, y cómo estimula la oligodendrogenesis (Prisca, et al., 2018)



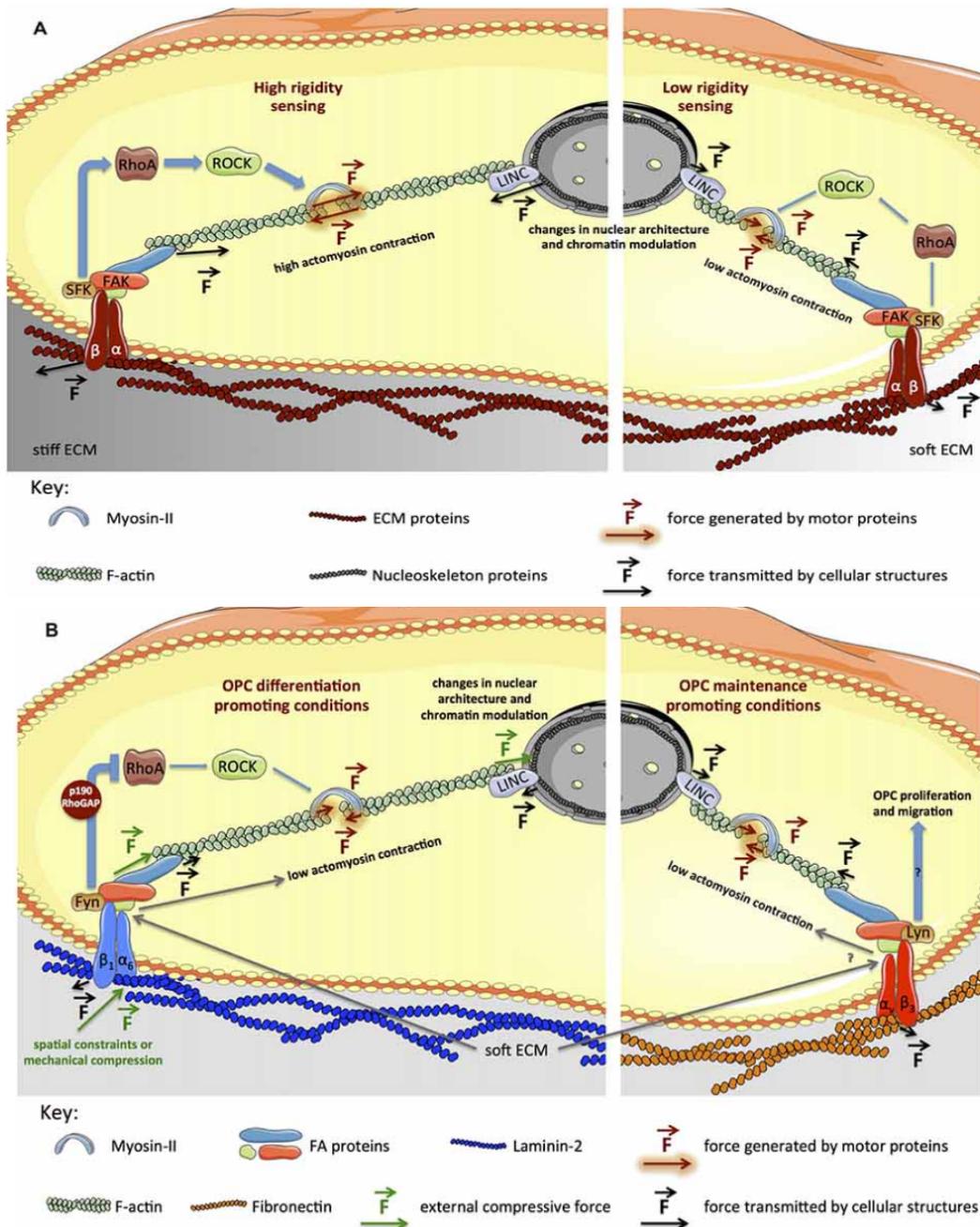
**Figura 9.** Factores que influyen en la remielinización (Gharagozloo, et al., 2022)

La remielinización es influenciada por factores intrínsecos como la capacidad de proliferación de los POS, el envejecimiento, el estrés mitocondrial entre otros, mientras que los extrínsecos se refieren a neurotransmisores inhibitorios, gliales residentes, composición y características mecánicas de la matriz extracelular (Gharagozloo, et al., 2022).

### 5.1.7 Mecanotransducción y vías de señalización

Las células gliales tienen la capacidad de percibir las señales mecánicas impulsadas por cambios en el microambiente. Estas se adaptan al contexto fisiológico o patológico utilizando la mecano detección a través de la maquinaria de mecanotransducción.

La mecanotransducción se puede definir como el resultado de la detección celular, la integración y la conversión de señales mecánicas externas en señales bioquímicas. Algunos estímulos mecánicos que se derivan de la rigidez del sustrato celular y la tensión superficial, afectan la tensión de la membrana plasmática celular y dan como resultado la afluencia de iones y la activación de las vías de señalización (Marinval. N, Yian Chew. S, 2020).



**Figura 10.** Vías de señalización implicadas genéricamente en la mecanotransducción y modelo propuesto para la influencia de elementos biofísicos durante la diferenciación de OL (Lourenço, Grãos,2016).

Las células ejercen una fuerza sobre el entorno extracelular, esto debido a la acción de la contractilidad de la actomiosina. Las integrinas, receptores heterodímeros transmembranales que se encargan de unir las células adherentes a la MEC (Matriz extracelular), transmiten la tensión al medio extracelular. Esta tensión depende del tipo de célula, pero también se ve influenciada por las propiedades físicas de la MEC de un tejido particular o sustrato. De igual manera, es proporcional a la resistencia que ofrece el sustrato a la deformación y está determinada por la rigidez del tejido o del material (Lourenço, Grãos,2016).

En la figura 10 se observa como las integrinas interactúan con proteínas de la MEC en la región extracelular, reclutando proteínas adaptadoras intracelulares, las cuales se unen al citoesqueleto de la actina. Una vez dada la activación de la integrina se reclutan y activan algunas proteínas de adhesión focal (SKF y FAK) lo que promueve el citoesqueleto y la dinámica celular. En sustratos más rígidos (panel izquierdo), se refuerzan las adherencias focales, ocasionando una mayor activación de las vías RhoA, Rock y miosina-II, lo que a su vez aumenta la tensión en el citoesqueleto. Por otro lado, en los más blandos (panel derecho) la tensión es menor debido a la reducción de la maduración de los ácidos grasos y la menor activación de RhoA, ROCK y miosina-II.

En la parte B de esta misma figura se muestra un modelo (panel izquierdo) que propone que la inactivación de la vía RhoA causada por la activación de Fyn como respuesta a la participación de la integrina  $\alpha6\beta1$  por laminina-2, al ser combinada con sustratos blandos, contribuye a niveles bajos de actomiosina, lo que favorece la diferenciación del oligodendrocito. La interacción de la integrina  $\alpha v\beta3$  con la fibronectina conduce a la activación de Lyn (panel derecho), favoreciendo el mantenimiento de los POS en sustratos blandos.

### **5.1.8 Enfermedades desmielinizantes**

Las enfermedades desmielinizantes son todas aquellas que generan un deterioro en la mielina, lo que a su vez produce afectaciones para las células gliales implicadas y los propios axones. Este es un proceso patológico que influye en la maduración de los POS, además de causar disfunción y apoptosis de los OLs quienes se ven relacionados con la respuesta inflamatoria del microambiente de los axones. La afectación de los OLs puede llegar a ocasionar un aumento en la producción de N-dimetilileftingosina que promueve la sensibilidad de las neuronas y la respuesta inflamatoria de astrocitos, que puede terminar en cicatriz glial alterando en entorno de los POS (Skater, 2019).

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurodegenerativa y desmielinizante del sistema nervioso central. Es una enfermedad autoinmune que ocurre cuando las células del sistema inmune, como los linfocitos T, atacan las vainas de mielina. Esto se da gracias a una reacción de hipersensibilidad mediada por células que secretan citoquinas en el microentorno del SNC, esto atrae macrófagos y células B, que además de formar parte de la reacción inflamatoria, afectan el medio de los OLs y a su vez su funcionalidad. Lo que genera una ruptura entre las conexiones neuronales y conlleva a déficits sensoriales y motores (Wang, et al., 2020).

Algunas características de esta patología es la desmielinización, la inflamación, inmunización y lesión axonal. Aún no es muy clara la razón por la que se desarrolla esta enfermedad, pero lo que sí se ha logrado determinar es que es una enfermedad progresiva que va desde la afección funcional de los OLs hasta provocar la muerte de estas células; y a su vez genera una susceptibilidad en los axones afectados (Wang, et al., 2020).

### **5.1.9 Biomaterial**

Un biomaterial se puede definir como una sustancia que ha sido diseñada con el fin de tomar forma, donde sola o formando parte de un sistema complejo, es utilizado para dirigir, ya sea por control o componentes vivos del sistema, el curso de algún procedimiento terapéutico o de diagnóstico (Hudecki, A., Kiryczyński, G., & Łoś, M. J., 2019).

Los biomateriales pueden ser clasificados en dos grandes categorías:

- Materiales reabsorbibles, los cuales se desintegran y reabsorben en el entorno tisular después de la implantación (Hudecki, A., Kiryczyński, G., & Łoś, M. J.,2019).
- Materiales no reabsorbibles, los cuales no se desintegran ni tienen capacidad de reabsorción (Hudecki, A., Kiryczyński, G., & Łoś, M. J.,2019).

Los biomateriales pueden clasificarse en diferentes tipos, como se muestra a continuación (Duffó, 2005):

- Metales: Son materiales que presentan una fácil deformación en su estado natural, característica que los clasifica como blandos. Sin embargo por medio de diferentes aleaciones se puede incrementar su dureza.

Se debe considerar el grado de metal que liberan estos materiales, para determinar su biocompatibilidad como implantes, además es importante conocer la respuesta de corrosión al estar en un medio hostil con altas temperaturas, como el cuerpo humano.

- Cerámicas: Son uno de los materiales más duros, pero al mismo tiempo tienen un grado de fragilidad demasiado alto. Presentan una gran resistencia y respuesta a la temperatura, incluso aumentan con ella su rigidez.
- Polímeros: Este tipo de material se obtiene a partir del petróleo, suelen deformarse con temperaturas muy altas. Son incluso más blandos que los metales

La función que cumple un biomaterial en la regeneración de tejidos es la de proporcionar soporte y andamiaje para el crecimiento celular. La base de naturaleza para el biomaterial es la matriz extracelular, la MEC es la que proporciona el soporte físico, la organización espacial y un microambiente bioactivo que respalda y promueve las funciones celulares (Keane, TJ y Badylak, SF, 2014).

Los materiales que son utilizados en sistemas biológicos deben cumplir con ciertas propiedades:

- Propiedades biológicas

Con el fin de asegurar que los biomaterial sean biocompatibles, estos deben: ser no tóxicos, no causar efectos inflamatorios, ser no alergénicos y tener compatibilidad con el tejido, órgano o superficie de contacto (Hudecki, A., Kiryczyński, G., & Łos, M. J.,2019).

- Propiedades mecánicas

Los biomateriales suelen estar sometidos a fuerza y cargas mecánicas cuando se implementan en una solución, estas fuerzas pueden disminuir su función, por tal razón es importante analizar sus propiedades mecánicas, en cuanto a la relación entre los esfuerzos aplicados y las deformaciones que se generan. De acuerdo al análisis de sus propiedades se clasifican en dúctiles, rígidos, o resistentes; mediante pruebas de tracción, cizalladura, torsión y compresión (Duffó, 2005).

### 5.1.10 Hidrogel

Los hidrogeles son Biomateriales que cuentan con una alta capacidad de absorción de agua debido a su estructura hidrofílica y pueden ser incorporados en el cuerpo humano sin generar una perturbación en el ecosistema neuronal, y a su vez promover distintos procesos celulares (Molino, J., Revete, A., Aparicio, A., & Reginensi, D, 2021).

Son geles poliméricos hidrofílicos compuestos por una red tridimensional con capacidad de absorción de agua, hincharse y aumentar su volumen sin perder sus características mecánicas originales. Sin presencia de agua el gel se denomina xerogel, y puede tener una consistencia rígida, mientras que en contacto con una solución acuosa se hidrata hasta su mayor grado de hinchamiento. Estas propiedades lo identifican como un material inteligente y propicio para el uso de tecnologías a disposición de la salud humana, además de que presenta una gran respuesta a cambios de su entorno como, pH y Temperatura (Ramirez, 2016)

Algunas ventajas de los hidrogeles son las siguientes:

- Cuentan con un largo periodo de vida útil
- poseen un alto grado de flexibilidad comparable al del tejido natural
- Tienen un alto nivel de biocompatibilidad
- Elevada biodegradabilidad
- Su estructura es superficial de tipo porosa
- Adecuada integración en distintos espacio tisulares

Tabla 1

*Criterios y propiedades para el diseño de hidrogeles en ingeniería tisular.*

<i>Propiedades</i>	<i>Fisicoquímicas</i>	<i>Mecánicas</i>	<i>De transporte</i>	<i>Biológicas</i>
	<i>Tasa de gelación, mecanismos y dinámica de formación de gel, porosidad.</i>	<i>Rigidez, viscoelasticidad</i>	<i>Difusión de nutrientes y metabolitos.</i>	<i>Biodegradabilidad, biocompatibilidad, promoción de la adhesión, proliferación, y diferenciación celular</i>

*Adoptado de Chyzy and Plonsk Brzezinska, 2020; Burdick and Stevens, 2005*

Polímeros naturales se han implementado en la síntesis de hidrogeles debido a su presencia en estructuras y procesos biológicos. Por ejemplo, el colágeno, el hialuronato y la fibrina permiten un mejor reconocimiento del tejido por la presencia de ligandos de unión a receptores presentes

en el polímero natural. Los hidrogeles naturales cuentan con una desventaja a pesar de su biocompatibilidad y se debe a su carencia de propiedades mecánicas, como su módulo elástico de orden 10 kPa (Martin and Youssef, 2018).

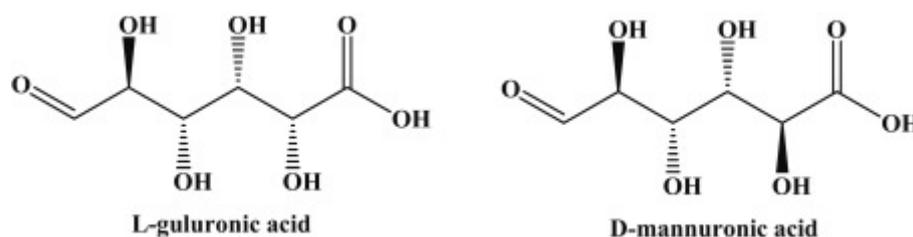
Se encuentran también los hidrogeles compuestos, los cuales contienen dos polímeros diferentes y cuentan con propiedades mecánicas mejoradas, las cuales pueden ser adaptables, además de una gran absorción de agua. El módulo de elasticidad de este tipo de hidrogeles tiene valores de 0,1 a 1,0 MPa y un contenido de agua de hasta 90% en peso. Para la síntesis de un hidrogel, además de contar con un monómero, se necesita implementar un iniciador que es quien forma radicales libres para la extensión de las cadenas, y un agente entrecruzante para lograr la reticulación propia de un hidrogel. (Katime, et al., 2005).

Los hidrogeles pueden clasificarse entre físicos y químicos según su reticulación. Cuando la reacción genera uniones por fuerzas no covalentes es un hidrogel físico, el material es susceptible al ambiente ya que sus enlaces no son suficientemente fuertes; Mientras que los hidrogeles químicos se forman a partir de enlaces covalentes, esto permite el control de propiedades físicas del material como el hinchamiento y su rigidez (Revete et al., 2021).

Los pasos esenciales para la síntesis de un hidrogel homogéneo y funcional son la solubilización de los materiales a su composición monomérica y su neutralización ya sea por temperatura o pH. Además la formación del hidrogel implica un proceso de reticulación que se refiere a la reacción química que se produce entre las cadenas poliméricas (Revete et al., 2021).

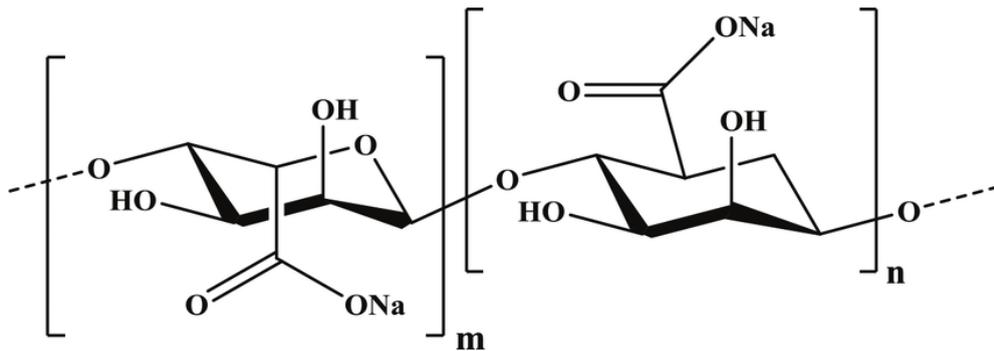
- Alginato de sodio (AS)

El alginato de sodio ( $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$ ) es un polisacárido aniónico de cadena lineal que está compuesto de unidades de ácido L-gulurónico y ácido D-manurónico unidos por un enlace glucosídico 1-4. Este polímero natural es extraído de la pared celular de algas pardas del mar. Dentro de las propiedades que posee se encuentra la sensibilidad al pH, hidrofilia, biocompatibilidad, biodegradabilidad, capacidad gelificante y adhesión (Akbar, 2023)..



**Figura 11.** Estructura química de ácido L-gulurónico y ácido D-manurónico, componentes del alginato (Akbar, 2023).

Es soluble en agua, en donde forma una solución viscosa, es insoluble en sustancias alcohólicas. Las soluciones de alginato son pseudoplásticas, y presentan un comportamiento no newtoniano, gracias a sus cadenas largas. Debido a los grupos iónicos en su estructura el alginato es capaz de formar geles por la interacción electrostática, con por ejemplo,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$  (Akbar, 2023).



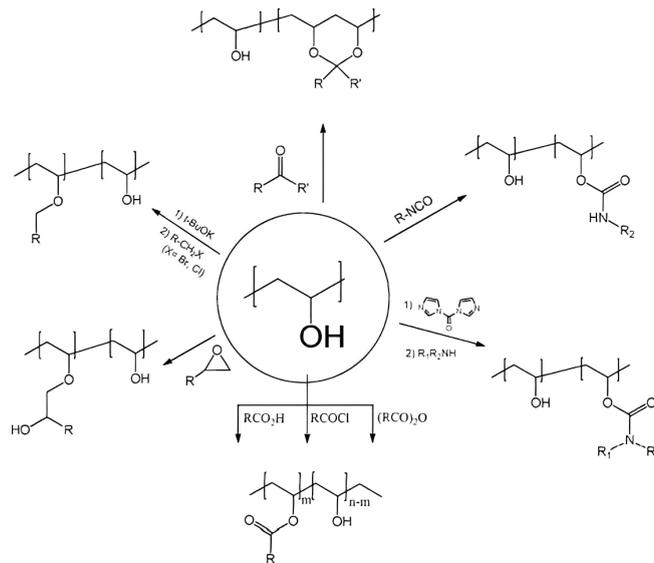
**Figura 12.** Estructura química del alginato de sodio (Foroughi, 2018).

Teniendo en cuenta sus propiedades biocompatibles el AS y el alginato de calcio, son materiales empleados frecuentemente en el área de ingeniería de tejidos, cicatrización de heridas, administración de fármacos, entre otras aplicaciones biomédicas. (Hasnain, et al., 2020)

- Alcohol polivinílico (PVA)

El poli (Alcohol Vinílico) es un polímero hidrofílico biológicamente inerte y biocompatible, el cual tiene la capacidad de convertirse en hidrogel al entrecruzar físicamente las moléculas a través de un enlace de hidrógeno o por reticulación química a través de un enlace covalente (Mori, H., & Hara, M., 2016).

La gelificación física del PVA se debe a numerosas interacciones entre cadenas de enlaces de hidrógeno entre grupos hidroxilo e interacciones de Van der Waals del polímero de hidrocarburos. Ossipov et al. han estudiado ampliamente la funcionalización de PVA a través de enlaces carbamato utilizando 1,1-carbonildiimidazol (CDI) como agente activador. En la figura 13 se puede observar la estrategia utilizada, esta implica la formación de intermedio de éster reactivo O-(imidazol-1-ilcarbonylo) y una reacción adicional con especies nucleófilas como aminas primarias o secundarias (Alves, et al, 2011).



**Figura 13.** Ilustración esquemática de oportunidades sintéticas asociadas con PVA y conjugación utilizando los grupos hidroxilo del polímero (Alves, et al, 2011).

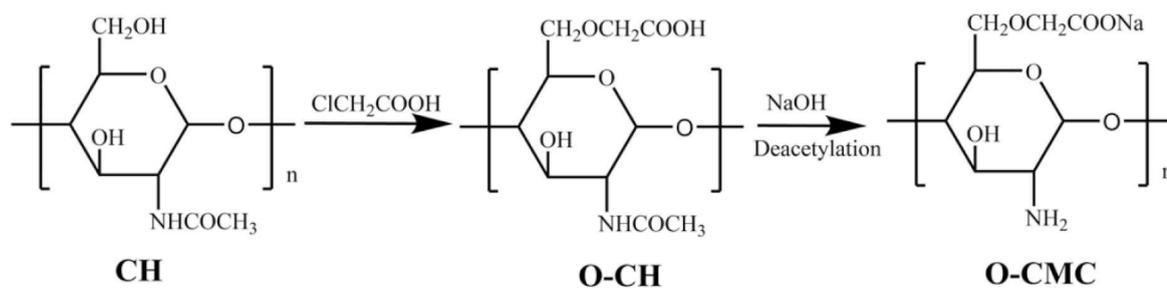
El hidrogel de PVA posee características que lo hacen una gran opción en el área de regeneración de tejidos y demás. Es hidrofílico, no es tóxico para muchos tipos de células y no

se adhiere a ellas excepto cuando se conjuga con péptidos que imitan los sitios de unión de integrinas en la matriz extracelular (Mori, H., & Hara, M., 2016).

- Quitosano - Carboximetil quitosano.

La quitina es el segundo material natural más abundante y usado en agricultura, biomedicina y otras áreas de investigación científica. Está presente en algunos hongos, levaduras y exoesqueletos de insectos, cangrejos y otros moluscos. El quitosano es producto de la desacetilación de la quitina, este polisacárido es utilizado debido a su estabilidad térmica, baja permeabilidad y retención de agua. Lo que lo convierte en un material óptimo para el desarrollo de hidrogeles (Yang, 2022).

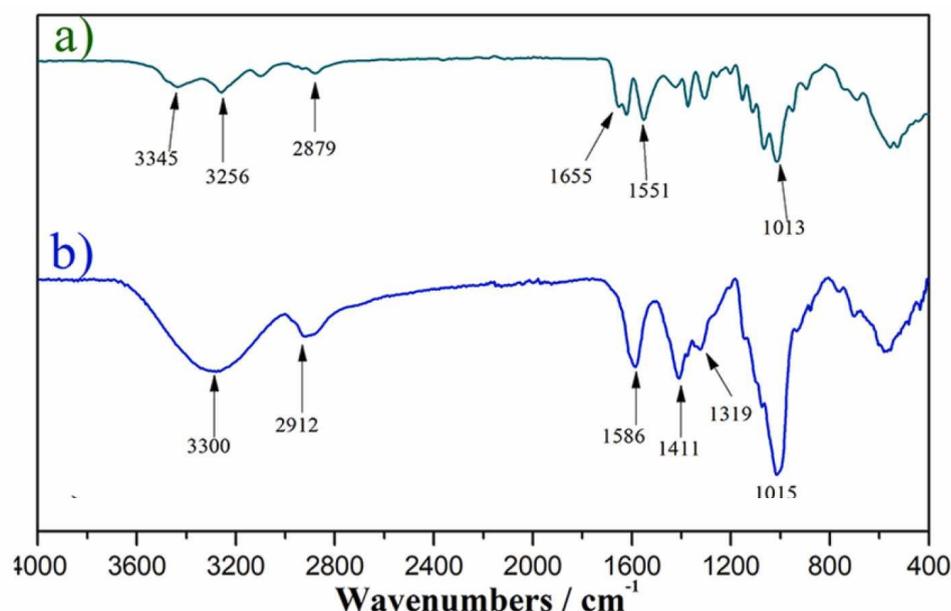
Recientemente los derivados del quitosano han sido estudiados por ciertas propiedades que los convierten en potenciales alternativas con soluciones a limitaciones existentes como la insolubilidad de la quitina en agua, o la resistencia del quitosano para ser empleado como inyectable. Uno de estos derivados es el O-carboximetil quitosano (O-CMC), este material cuenta con grupos carboxilos disociables lo que mejora su solubilidad significativamente, además de que no es tóxico, es bioactivo y antibacteriano (Yang, 2022).



**Figura 14.** Síntesis de O-CMC mediante ácido cloro acético e hidróxido de sodio (Yang, et al., 2022).

Según Yang, et al., el carboximetil quitosano (CMC) logra una buena interacción con las células, lo que ha llevado al crecimiento y regeneración celular.

En el espectro infrarrojo de quitina se evidencian los picos de absorción en 1655 y 1551  $\text{cm}^{-1}$ . Estos corresponden a la vibración de estiramiento de los grupos carboxilo en amidas, mientras que en estos mismos puntos de la longitud de onda la fuerza de absorción disminuye para el O-CMC. Esto indica el proceso de desacetilación.

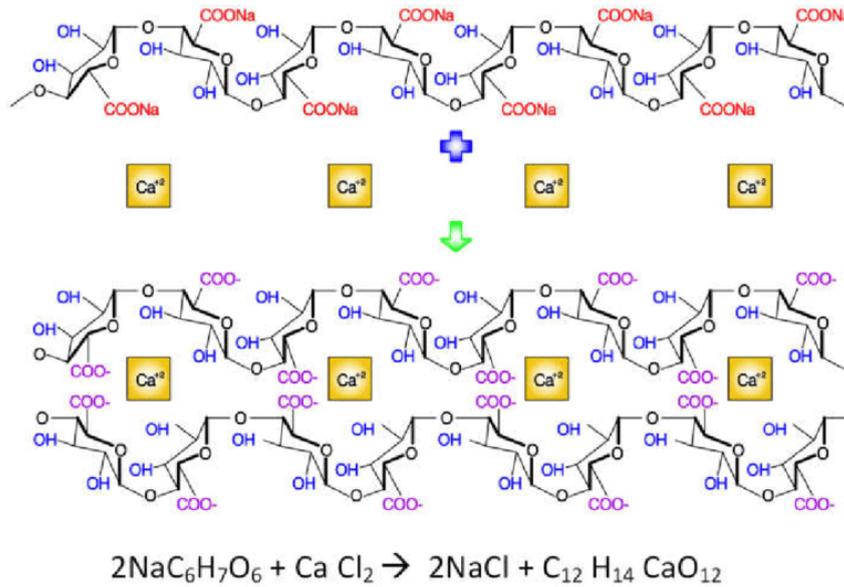


**Figura 15.** Espectroscopia FTIR (A) Quitina. (B) O-CMC. Adaptado de Yang, et al., 2022

- Reticulación iónica

Esta reacción ocurre entre dos moléculas con cargas opuestas, generalmente ocurre entre dos polímeros o un polímero y un agente reticulante, de esta manera se forma una red tridimensional. Dicha interacción permite la gelificación del gel, claro está que esta también depende de factores como el pH, la densidad de carga y el tipo de contra anión. El alginato como se mencionó anteriormente logra complejos iónicos con cationes divalentes como el  $Ca^{2+}$ ; mientras que el quitosano los forma con polianiones como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliacrílico, Alginato, entre otros (Vinchhi, et al., 2021).

Entre los agentes reticulantes iónicos se encuentra el cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ) que puede establecer interacciones con alginato gracias a el catión  $Ca^{2+}$  y el grupo ácido carboxílico propio de este polímero. Cuando se realiza una mezcla entre AS y  $CaCl_2$ , los cationes de calcio se unen al alginato gelificando el material y el ión sodio (Na) interactúa con el ión cloruro ( $Cl^-$ ) quedando el hidróxido de sodio en solución (Lu, et al. 2021).

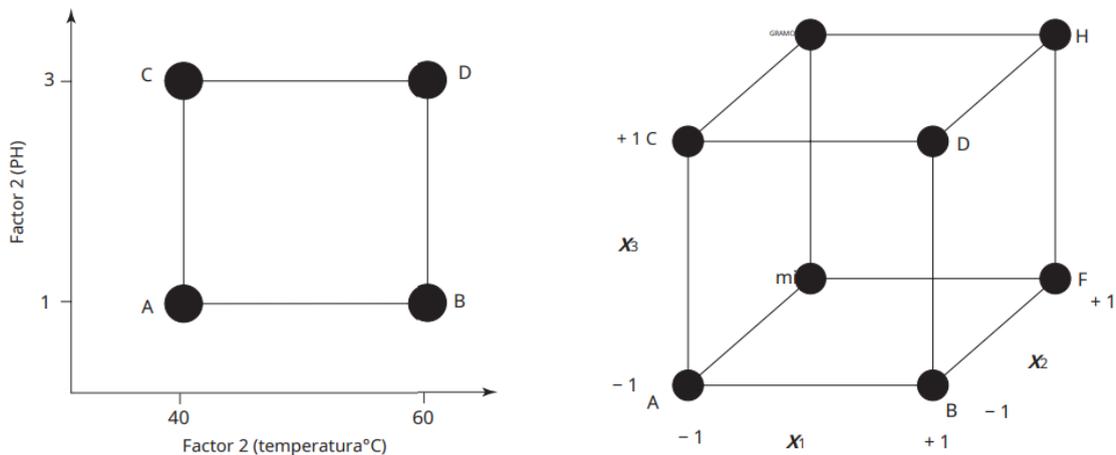


**Figura 16.** Reticulación de alginato de sodio con cloruro de calcio (Lu, et al. 2021)

### 5.1.12 Diseño factorial

El diseño experimental factorial es una técnica estadística en donde se efectúan una serie de variaciones en diferentes factores que inducen cambios deliberados y se espera ver su influencia o no en una variable de estudio. Este método permite comprender la dependencia de factores entre sí y su influencia en el sistema.

Con esta clase de diseño de experimentos se logran evaluar dos o más factores simultáneamente. Los tratamientos son combinaciones de niveles de los factores. A continuación se muestra un ejemplo de diseño factorial uno de  $2^2$  y uno de  $2^3$ , la gráfica a la izquierda refleja una variable categórica estudiada en un experimento, por ejemplo, pH en función de la temperatura.



**Figura 17.** Gráficas de posibles diseños factoriales (Hanrahan, G. et al., 2005)

Es importante definir los factores controlables presentes en el experimento, al igual que establecer niveles de importancia entre ellos. Esta clase de diseño se utiliza cuando se necesitan evaluar dos o más variables en el experimento y que en esta evaluación se pueda llevar a cabo

el método de varianza (Hanrahan, G. y Lu, K, 2006). Según el diseño seleccionado deben definirse las fuentes de variación. Los factores y sus niveles son las variables críticas que se tienen como objeto de estudio. (Fernandez, 2020)

### 5.1.11 Caracterizaciones

- Estereoscopia

La visión estereoscópica o estereoscopia es un proceso que se realiza de manera natural cuando un observador mira simultáneamente dos imágenes de un mismo objeto, las cuales han sido captadas desde dos posiciones distintas. Cada ojo ve una imagen y como resultado se da la percepción de la profundidad o tercera dimensión.

Este proceso no solo se logra de manera natural, sino mediante el empleo de algunos instrumentos o equipos, como los sistemas de visión paralela, visión cruzada, anaglifos, polarización, obturación, cascos de realidad virtual y monitor lenticular (Cárdenas Quiroga, E. A, 2015).

El propósito de realizar esta caracterización es ayudar a capturar e identificar características y rasgos que no se logran por medios tradicionales

- Reología

La reología hace referencia al estudio de los principios físicos que regulan el movimiento de los fluidos.

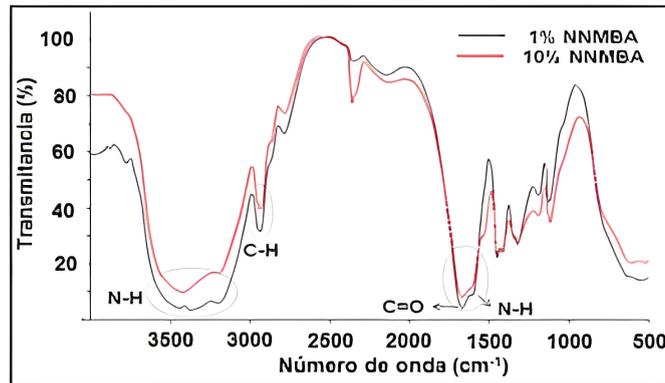
La propiedad que define la mayor o menor dificultad para poner en movimiento un fluido es la viscosidad. Esta propiedad está relacionada con la resistencia que opone un fluido a ponerse en movimiento cuando se aplican sobre él esfuerzos cortantes. Por ello, un aspecto relevante en el transporte de fluidos es el valor de viscosidad (Monsalve, A, 2010)

- Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La FTIR es una técnica que permite observar la presencia de los grupos funcionales característicos de cada monómero, en hidrogeles, es utilizada con el fin de estudiar y verificar la incorporación de monómeros a la estructura de los mismos.

Un ejemplo de esta técnica se muestra en la figura 18, donde se presentan los espectros infrarrojos de hidrogeles de poliacrilamida, los cuales fueron entrecruzados con 1% y 10% de N, N'-metilen-bis-acrilamida. En los espectros se destacan: dos bandas en la región de 1.650

a  $1.670 \text{ cm}^{-1}$ , las cuales corresponden a la vibración de estiramiento asociada con el grupo carbonilo (C=O) de las funciones amida y a movimientos de flexión del grupo N-H, así como bandas de absorción en la región de 3.200 a  $3.600 \text{ cm}^{-1}$  las cuales son atribuidas a estiramientos de los enlaces N-H. También se observa una banda a  $2.940 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento de los enlaces C-H (Ramirez, A, et al, 2016).



**Figura 18.** Espectro infrarrojo del hidrogel de poliacrilamida con 1% y 10% de agente entrecruzante (Tomado de Ramirez, A, et al, 2016).

## 5.2 Marco teórico.

### 5.2.1 Rigidez y topografía

#### → Rigidez

Se comprende como rigidez la capacidad que tiene un material para resistir una fuerza aplicada sobre él externamente antes de sufrir una deformación. (Cervera, 2015)

Se entiende por reología al estudio del flujo de la materia, es una relación que se da entre los esfuerzos y las deformaciones. El instrumento empleado en este tipo de pruebas mecánicas es el reómetro, pueden realizarse ensayos de acuerdo a rampas de temperatura o de tiempo. El reómetro aplicará un esfuerzo de cizalladura en el material, y de acuerdo al tiempo de su deformación, se pueden establecer los límites de viscoelasticidad. Esto permite evaluar las condiciones del material respecto a su rigidez (Velasco, 2013).

#### → Topografía

En el sustrato, la topografía (forma y dimensión de las características físicas) afecta el tamaño, orientación y distribución de adherencias focales, de igual manera se ve afectada la fuerza y orientación del citoesqueleto, por lo que también las fuerzas que genera el citoesqueleto terminan viéndose afectadas (Makhija, 2020).

## 5.3 Marco normativo

Si bien este proyecto tiene foco en el área de la salud, en Colombia existen una serie de decretos que establecen parámetros de uso, comercialización, entre otros, con respecto a equipos médicos o que tengan acción en este ámbito. Por ejemplo el decreto 1036 de 2018, para el uso de reactivos presentes en el desarrollo del biomaterial y teniendo en cuenta el propósito del producto, este decreto establece los requisitos que se deben cumplir para la importación y comercialización de reactivos de diagnóstico *in vitro* huérfanos, *in vitro* grado analítico, analito específico, los reactivos de uso general en laboratorio y reactivos *in vitro* en investigación utilizados en muestras de origen humano.

A nivel internacional se encuentran normas que abarcan el tema de nanotecnologías y uso de materiales con fines de investigación, entre otros, como lo es la ISO/TC 229, la cual establece la normalización en el campo de las nanotecnologías que incluye: Utilizar las propiedades de los materiales a nanoescala que difieren de las propiedades de los átomos individuales, las moléculas y la materia a granel, para crear materiales, dispositivos y sistemas mejorados que exploten estas nuevas propiedades.

Con respecto al uso de biomateriales y regeneración tisular en relación al desarrollo del proyecto aplican la norma ASTM F2150-02, guía estándar para la caracterización y prueba de andamios de biomateriales utilizados en productos médicos de ingeniería tisular, la cual es un recurso de los métodos de prueba actualmente disponibles para la caracterización de andamios de biomateriales utilizados para desarrollar y fabricar productos médicos de ingeniería tisular (TEMP). También la norma ASTM WK21927, guía para la caracterización de hidrogeles utilizados en medicina regenerativa.

#### **5.4 Estado del arte**

Se considera que la mayoría de las células del sistema nervioso dependen únicamente de señales químicas, sin embargo recientemente se han publicado una gran cantidad de estudios sobre el efecto de las propiedades biofísicas en la diferenciación celular (Lourenco, 2016). Debido a la relevancia que tienen los procesos de mecano detección se habla acerca de un desequilibrio en la fuerzas del microambiente de la célula y su contribución en los trastornos del SNC (Carvalho, 2022)

La rigidez del sustrato ha sido objeto de estudio en la diferenciación de los OL, empezando por la explicación de su relación con las vías moleculares (Jagielska et al., 2012). Mediante cultivo celular de POS se evaluó el comportamiento de las células con diferentes valores de rigidez, de acuerdo a los resultados se logró determinar que la diferenciación en estas células estaba directamente relacionada con la contracción de la actomiosina ya que en los ensayos donde se utilizaron inhibidores de este complejo como la blebbistatina, se obtuvieron OL maduros (Kippert et al., 2009). Luego se confirmó en una investigación de adhesión celular por medio de poli-D-lisina, que los POS eran realmente mecanosensibles, y que esta sensibilidad influía en su supervivencia, migración, proliferación, maduración y diferenciación (Jagielska et al., 2012).

Las primeras investigaciones en la modulación topográfica de la diferenciación de OL, se realizó a partir de la imitación de las características de geometría y disposición en los axones (Webb et al., 1995 ).

Recientemente el uso de biomateriales en la regeneración de tejido nervioso ha presentado un gran auge. Jagielska et al. Desarrolló geles PAAM con rangos de rigidez entre 0,1 y 70 kPa, indicando el potencial de diferenciación modulado por la rigidez que cambia a través de la edad animal y su diferencia en ambientes normales y algunos con lesión.

Shah et al., 2014 implementaron andamios de nanofibras de grafeno para la señalización de células de OL y la emulación de señales espaciales de los axones, ya que de acuerdo a su diámetro es la producción de vaina de mielina de los OL. Se demostró que implementando características geométricas axonales, diámetros de 2 a 4  $\mu\text{m}$  se puede fomentar la diferenciación de los OL.

A continuación se muestra una tabla adaptada de la revisión de ensayos de mecanotransducción para estrategias de regeneración neuronal realizada por Marinval y Chew.

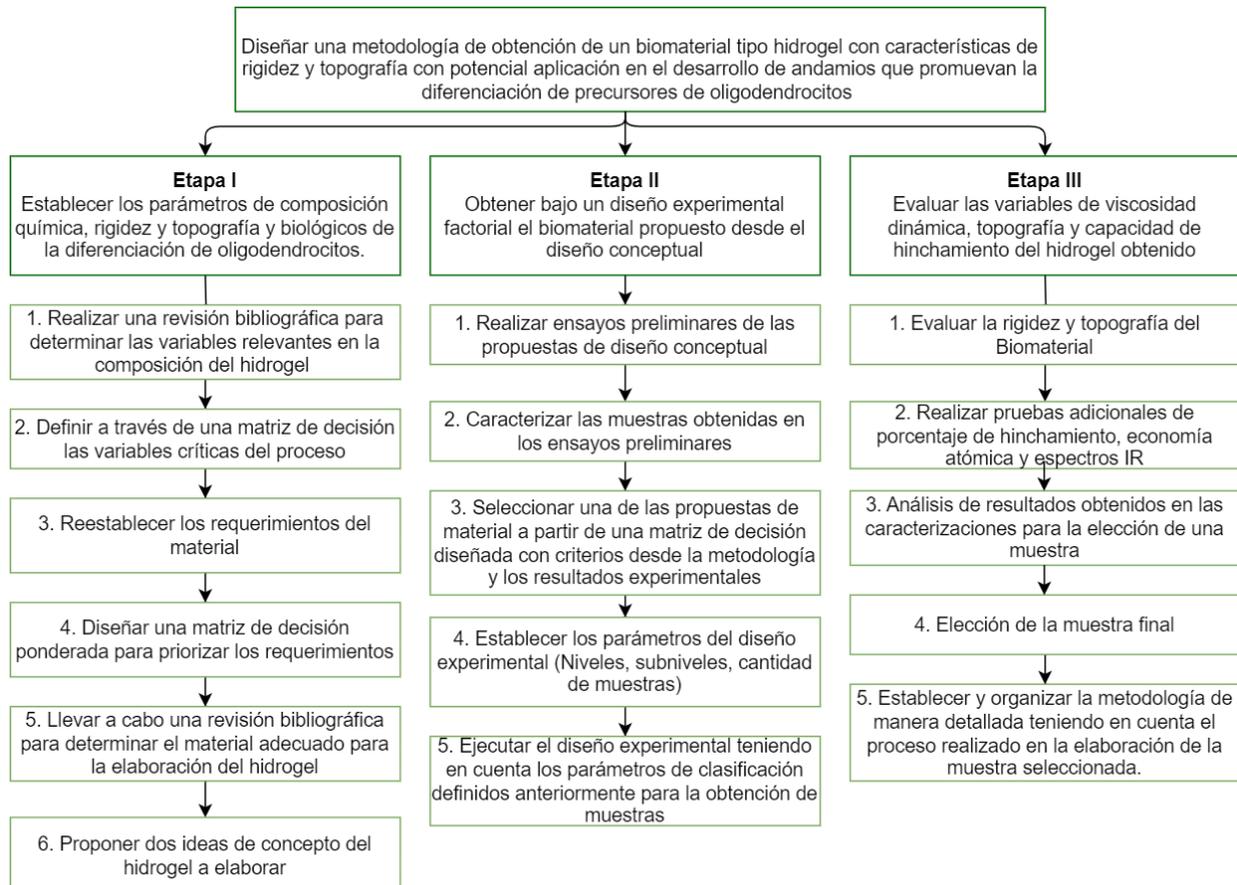
Tabla 2

Ventajas y desventajas de las estrategias actuales de regeneración neuronal en OL.

<i>Sustratos</i>	<i>Material</i>	<i>Resultados</i>	<i>Límite</i>
<i>Hidrogel biológico</i>	<i>Láminas de silicona estirada</i>	<i>Estimulación de la diferenciación de OL por la formación de heterocroma estaño a través de Syne1 (Hernández et al, 2016)</i>	<i>Presenta una limitación espacial para el desarrollo de las células.</i>
<i>Hidrogel biológico</i>	<i>Poliestireno Grueso</i>	<i>Andamio que emula las condiciones de desarrollo de las células gliales (Katiyar, 2017)</i>	<i>Necesidad de adaptación de las células en resiliencia y capacidad de crecimiento, además enfatiza en el efecto heterogéneo de la tensión mecánica</i>
<i>Hidrogel Sintético</i>	<i>PAA PDMS Sulfo-SANPAH</i>	<i>Inhibición de la ruta YAP, esta permanece en baja densidad celular y se reubica en el citoplasma bajo tratamiento con nistatina (Poitelon, 2016)</i>	<i>Estimulación a corto plazo, no se tiene en cuenta la topografía del material.</i>
<i>Hidrogel sintético</i>	<i>Fibronectina</i>	<i>La diferenciación temprana en OL investigada bajo estímulo mecánico muestra una reducción en la migración celular y micro red de túbulos reorganización. (Makhija, 2018)</i>	<i>No abarca las pruebas de tensión necesarias para validar su aplicación en diferenciación de OL.</i>
<i>Hidrogel sintético</i>	<i>Laminina fibronectina</i>	<i>El estiramiento impacta en la diferencia de OPS iniciación en OL, pero no en neuronas o astrocitos, y depende de la integrina ECM vínculos. (Arulmoli, 2015)</i>	<i>El rango de rigidez es alto y no imita un ambiente propicio para la maduración de OL.</i>
<i>Hidrogel sintético</i>	<i>Láminas de silicio.</i>	<i>El estiramiento mecánico favorece la adhesión focal, sin embargo, los esfuerzos de cizalladura disminuyeron la funcionalidad de OL. (Shimizu, 2017)</i>	<i>Adecuado únicamente para la diferenciación temprana de OL, pero no contempla las señales topográficas para estudiar la maduración de OL y mielinización</i>

## 6. METODOLOGÍA, RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

La distribución de la metodología se realizó en tres etapas a partir de los objetivos específicos (figura 7). En los cuales se evidencia el diseño conceptual, el diseño preliminar y el diseño detallado, que corresponden a las fases de un modelo lineal del proceso de diseño en ingeniería (Chaur, 2005). Además de la selección de información por medio de una revisión bibliográfica sistemática y la evaluación de las muestras del material después de su obtención.

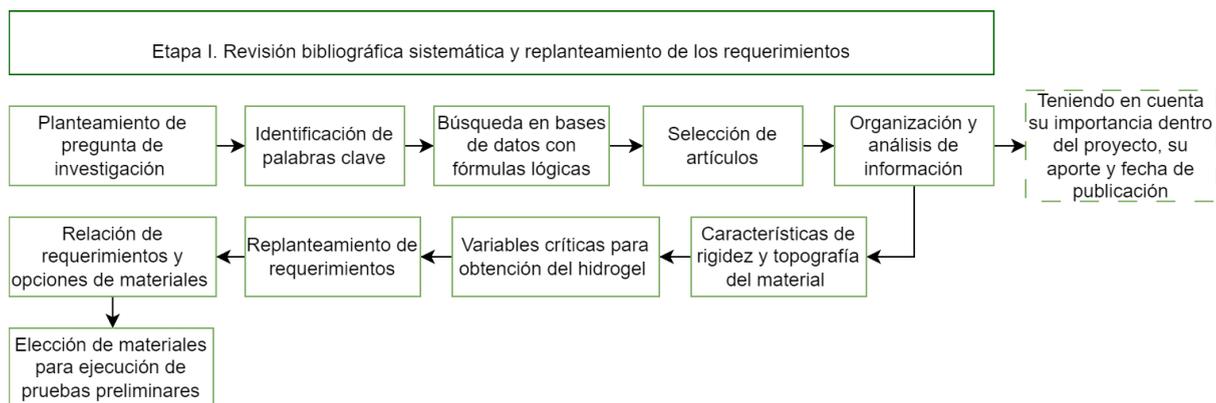


**Figura 19.** Metodología para el desarrollo del proyecto basada en el cumplimiento de los objetivos específicos (Autoría propia).

### 6.1 Primera etapa: Diseño conceptual

La primera etapa buscó establecer los parámetros de composición del hidrogel adecuados para la regeneración celular de oligodendrocitos, específicamente para su diferenciación. Para ello se propuso una revisión bibliográfica que permitió resolver una pregunta de investigación sobre un tema en específico, con una serie de pasos que optimizaron la búsqueda y selección de información relevante en el desarrollo del proyecto (Moreno et al., 2018).

Se realizó un levantamiento de información robusto, con el fin de identificar las características físicas de topografía, rigidez y la composición necesaria para el biomaterial, al mismo tiempo se tuvieron en cuenta estos parámetros para plantear los requerimientos propios de la matriz extracelular de los precursores de oligodendrocitos que promuevan su diferenciación (figura 8).



**Figura 20.** Diagrama de flujo de procedimiento a seguir en la etapa I (Autoría propia)

El diseño de un biomaterial parte de la identificación de variables relevantes en su composición, variables químicas, biológicas y físicas que determinan la funcionalidad del material. Con el fin de establecer dichas variables se propuso el desarrollo de una revisión bibliográfica sistemática, que a diferencia de otro tipo de revisiones, permite contestar una pregunta de investigación basada en la recopilación de información proveniente de libros, artículos científicos, entre otras fuentes primarias. Además se caracteriza por sus filtros de calidad, la disminución de los sesgos y la evaluación de los estudios encontrados para la resolución de la pregunta de investigación. Optimizando así la búsqueda y selección de información relevante en el desarrollo del proyecto (Armstrong, et al., 2011).

### 6.1.1 Revisión bibliográfica por método Cochrane

La revisión cochrane es empleada en la investigación clínica, ofrece información detallada acerca de tratamientos y diagnósticos para diferentes tipos de patologías, sin embargo, es un método aplicable a otros campos como la ingeniería.

La metodología partió de la identificación de 4 criterios (PICO): población, intervención, comparación y opciones de desenlace. La población se refiere al criterio de interés en el estudio, en este caso son las variables críticas de composición del hidrogel; la intervención está relacionada con características más específicas de la forma en que se va a abordar el problema; en tercer lugar se encuentra la comparación en donde se busca identificar las propiedades que han establecido otros estudios que permiten determinar características propias del producto, y finalmente las opciones de desenlace que es aquello que se espera del producto.

Para cada criterio PICO, se diseñó una pregunta de investigación de dónde se extrajeron palabras clave que posteriormente se utilizan en la búsqueda de información. A continuación se puede observar en la tabla 1, las preguntas de investigación planteadas y sus respectivas palabras clave.

Tabla 3

Preguntas y palabras clave método Cochrane

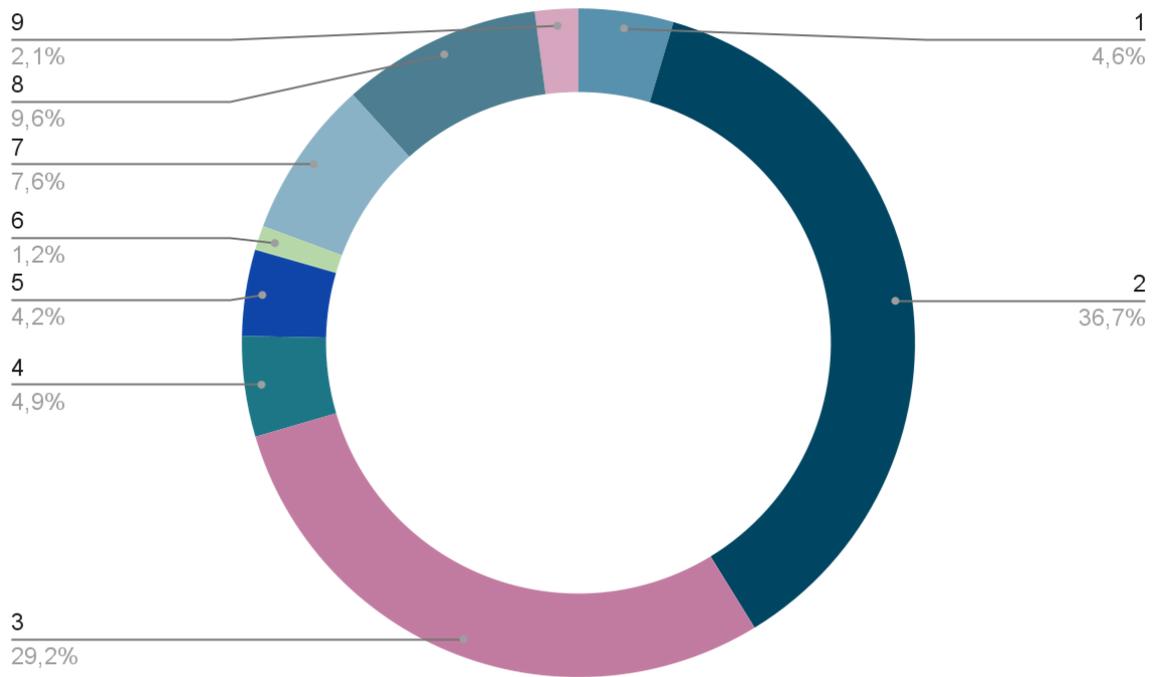
<b>Dimensión Cochrane</b>	<b>Pregunta de investigación</b>	<b>Palabras clave</b>
<b>P</b>	<i>¿Cuáles son las variables críticas que determinan la efectividad de un biomaterial tipo hidrogel en la regeneración y diferenciación de oligodendrocitos?</i>	<i>Hidrogel, oligodendrocitos, biomaterial, regeneración, diferenciación.</i>
<b>I</b>	<i>¿Qué características de rigidez y topografía son necesarias para que un hidrogel actúe como soporte y entorno apropiado para la diferenciación de precursores de oligodendrocitos a oligodendrocitos maduros?</i>	<i>Diferenciación, Rigidez, Topografía, entorno, andamio, Oligodendrocitos maduros, precursores de oligodendrocitos</i>
<b>C</b>	<i>¿Qué composición física de un hidrogel promueve la diferenciación de precursores de oligodendrocitos a oligodendrocitos maduros sin afectar su mecanotransducción, y cuales propiedades físicas debe tener?</i>	<i>Estudios mecánicos, composición química, propiedades físicas, hidrogel, oligodendrocitos, mecanotransducción. <u>No</u> Estudios in vivo, otra diferenciación</i>
<b>O</b>	<i>¿Qué resultado se espera que pueda ofrecer el biomaterial teniendo en cuenta su composición y requerimientos que debe cumplir para promover la diferenciación de oligodendrocitos?</i>	<i>Rigidez, Diferenciación, Microentorno SNC, topografía, activación celular.</i>

*Autoría propia*

De las palabras claves identificadas por el método PICO (Tabla 3) se seleccionaron aquellas repetentes y/o condicionales; y fueron enlazadas con conectores lógicos que permiten unificar conceptos en la búsqueda, denominados booleanos. De esta manera se diseñaron 8 frases como estrategias de búsqueda, con el fin de obtener información específica y confiable según el tema de interés en la investigación.

Para la recopilación de información se definieron 5 bases de datos que brindan acceso a documentos médicos, científicos e ingenieriles. De acuerdo a la cantidad y al tipo de documento encontrado en cada una de las bases se definieron dos para la profundización de la

información recopilada de las estrategias de búsqueda, Science Direct y Proquest, ya que las principales fuentes de información se referían a artículos científicos y patentes.



**Figura 21.** Estrategias de búsqueda a partir de las palabras clave obtenidas por el método Cochrane.

1. Oligodendrocyte AND mechanotransduction
2. Oligodendrocyte AND “mechanical properties” AND regenerative tissue
3. Oligodendrocyte AND “mechanical properties” AND hydrogel
4. Topography AND “oligodendrocyte differentiation” AND biomaterial
5. Stiffness AND “oligodendrocyte differentiation” AND biomaterial
6. “Oligodendrocyte differentiation” AND hydrogel AND composition
7. Oligodendrocyte AND hydrogel AND stiffness NOT “in vivo studies”
8. Oligodendrocyte AND mechanobiology AND hydrogel
9. Oligodendrocyte AND hydrogel AND “regenerative tissue”

Se realizó un tamizaje de la información de acuerdo al año de publicación, ya que debido a los avances tecnológicos actuales, los desarrollos recientes tienen más relevancia. El rango se definió entre el año 2018 y 2023.

Tabla 4

Artículos seleccionados y su año de publicación

<i>Nombre del artículo</i>	<i>Año</i>
Materials and extracellular matrix rigidity highlighted in tissue damages and diseases: Implication for biomaterials design and therapeutic targets.	2023
A review of the structural and physical properties that govern cell interactions with structured biomaterials enabled by additive manufacturing.	2022
A paradigm shift: Bioengineering meets mechanobiology towards overcoming remyelination failure.	2022
Anisotropic scaffolds for peripheral nerve and spinal cord regeneration.	2021
Mechanical regulation of oligodendrocyte biology.	2020
The influence of microenvironment and extracellular matrix molecules in driving neural stem cell fate within biomaterials, Brain Research Bulletin.	2019
The Healthy and Diseased Microenvironments Regulate Oligodendrocyte Properties: Implications for Regenerative Medicine.	
Topography, Cell Response, and Nerve Regeneration.	2011

### 6.1.2 Variables críticas del hidrogel

A partir de los estudios encontrados en literatura por el método Cochrane (Tabla 3), se construyó una matriz de información en donde se evidenció la influencia que presentan las variables fisicoquímicas en el proceso de diferenciación o que incluso lo condicionan. Sin embargo no todas cuentan con la misma relevancia dentro de esta situación, por lo cual se elaboró una matriz de decisión en donde según bibliografía se establecieron ponderaciones, a continuación se explica su importancia en la diferenciación glial y su respectiva ponderación:

#### → Rigidez

La rigidez del material tiene gran influencia en las actividades celulares como la migración, la apoptosis, la proliferación y la diferenciación en múltiples tipos de tejidos (Guilak et al., 2009 Tomado de Whilems et al, 2019).

Esta variable se considera un sello distintivo de la matriz extracelular con la que las células interactúan con el fin de decidir sus respuestas en diversas actividades como las mencionadas

anteriormente. Estos comportamientos celulares también se encuentran estrechamente relacionados con los fenómenos observados en muchas condiciones fisiológicas y patológicas (Park, et al., 2023).

A continuación se presentan unos valores de rigidez que dieron resultados satisfactorios en la diferenciación de los precursores de oligodendrocitos:

- Los progenitores de oligodendrocitos (cultivados en geles de poliacrilamida con módulos de  $\sim 1000$  Pa) dieron como resultado una mayor proliferación, migración y diferenciación en oligodendrocitos. El rango de módulos del biomaterial que parece favorecer la diferenciación de oligodendrocitos (mielinización) y la diferenciación neuronal imita el rango de rigidez de la sustancia blanca (entre 500 y 2000 Pa) (Weickenmeier et al., 2016 ; Budday et al., 2015 ; Christ et al., 2010 tomado de Whilems et al, 2019).
- La rigidez mecánica de la matriz del gel es una de las propiedades que influye en los procesos celulares. Se demostró antes que las matrices blandas similares a las del cerebro (1,5 kPa) mejoraron la ramificación del progenitor OL en comparación con sustratos más rígidos (30 kPa) (Leferink, et al., 2018).
- Se evidenció que la diferenciación neuronal aumentaba hasta diez veces en un sustrato blando y se razonó que el mecanismo de mecanotransducción era la señalización Hippo/YAP (proteína asociada al Sí) y la contractilidad de la actomiosina. Este fenómeno tuvo aún mayor soporte con las NSC, en las cuales se descubrió que la inducción de la diferenciación neuronal depende de la rigidez. Pues al parecer, el canal iónico mecanosensible piezo 1 es la principal molécula sensora responsable de esta diferenciación. Piezo 1 se expresa en células madre/progenitoras neurales derivadas del cerebro humano, y los autores revelaron que la diferenciación neuronal fue muy elevada cuando Piezo 1 fue estimulado por la alteración de la rigidez (Park, et al., 2023)

Los complejos de actomiosina presentes en el entorno de los OL se contraen dependiendo de la detección de rigidez que detecten. Cuando los niveles de rigidez en el ambiente se encuentran entre 0,1 kPa y 10 kPa que corresponden al módulo de elasticidad del cerebro, se promueve la diferenciación de los POS, mientras que si supera este rango, los complejos de actomiosina tienden a contraerse, activando de esta manera la ruta de señalización RhoA que produce una cicatriz glial e inhibe el proceso de diferenciación (Lourenco, 2016).

Makhija en el 2020 concluyó mediante ensayos experimentales que 6,5 kPa era una rigidez propicia para la diferenciación de oligodendrocitos, y la relajación contráctil de la actomiosina.

→ *Topografía.*

La matriz extracelular es de vital importancia en la determinación de las propiedades biomecánicas de un tejido, así mismo actúa en la mecanotransducción de señales a las células a través de complejos de adhesión focal cuyos citoesqueletos se encuentran unidos a ella. Las adherencias focales pueden constar de más de 100 proteínas y sirven como canales para la transducción de señales en respuesta a fuerzas físicas (DuFort et al., 2011b ; Stukel y Willits, 2016 )

La topografía del sustrato de la MEC también afecta el destino celular, la forma de la célula al regular la adhesión celular y la disposición del citoesqueleto, esto aplicando fuerzas mecánicas a la célula que luego se traducen en una respuesta química. Las células detectan señales topográficas que incluyen entornos 3D y 2D, dimensiones del sustrato y geometría en escalas nano y micro ( Guilak et al., 2009).

Teniendo en cuenta lo anterior, por ejemplo, las fibras electrohiladas de diámetro de fibra y alineación variables también afectan la diferenciación de las células. Cuando se cultivaron en fibras electrohiladas recubiertas de laminina, las NSPC adultas derivadas de hipocampo de rata mostraron un aumento del 40 % en la diferenciación de oligodendrocitos en fibras de ~300 nm y un aumento del 20 % en la diferenciación neuronal en fibras de 750 nm en comparación con una superficie de poliestireno de cultivo tisular recubierta de laminina. Las NSPC en fibras de 300 nm también mostraron una morfología estirada que es similar a los oligodendrocitos y se extendieron en múltiples direcciones para seguir las fibras subyacentes (Whilems et al, 2019).

Las características topográficas axonales son fundamentales para fomentar la funcionalidad mielinizante de los OL, ya que según el diámetro de los axones se generan las longitudes de vainas de mielina. Estas células gliales interactúan de forma directa con los axones para envolver y mantener las vainas de mielina que facilitan la comunicación entre ellos (Makhija, 2020).

El espacio no debe ser una limitación para la regeneración de OL, por esto se recomienda generar un microambiente del tamaño de los oligodendrocitos maduros (Lourenco, 2016).

#### → *Organización*

Diversos estudios han demostrado que una orientación definida en la composición del hidrogel favorece la migración y proliferación celular, generando un estímulo mecanosensible en el microentorno celular. Sin embargo Whilems, et al., concluyeron que la diferenciación de las células a OL responde a superficies sin patrones, es decir, que no presente secuencias repetidas. Al presentarse patrones se produjo una disminución de las tasas de supervivencia y unión de los oligodendrocitos diferenciados, los cuales por el contrario, sí tuvieron una respuesta satisfactoria en fibras aleatorias (Whilems, 2019).

#### → *Isotropía*

Si bien es importante la estructura 2D o 3D y las dimensiones del sustrato, de igual manera lo es su geometría, pues esta última también afecta el destino celular. Por ejemplo, Moe et al. utilizaron arreglos de múltiples arquitecturas con el fin de introducir múltiples topografías distintas en un solo sustrato. Como resultado los surcos anisotrópicos (surcos de 250 nm o 2  $\mu$ m de ancho) promovieron la diferenciación neuronal de las células madre murinas primarias, mientras que el sustrato isotrópico con orificios de 2  $\mu$ m de diámetro o pilares de 1  $\mu$ m de diámetro promovió la diferenciación glial ( Moe et al., 2012 tomado de *Whilems, 2019*).

→ *Tamaño de la matriz*

Según estudios realizados sobre la interacción mecánica con el tejido neural, la variación espacial de rigidez, se genera en longitudes pequeñas de ~50–100  $\mu\text{m}$  o del tamaño del linaje celular (Makhija, et al, 2020)

→ *Geometría*

La principal funcionalidad de los oligodendrocitos, es la mielinización de los axones (cilindros geoméricamente) , con los cuales se encuentra interaccionando físicamente la mayoría del tiempo cuando es maduro, y de los cuales dependen variables como cantidad y tamaño de mielina. Además son reconocidos por los precursores de oligodendrocitos (POS) quienes modulan su tamaño según el diámetro y longitud del axón. Y una de las características topográficas a tener en cuenta en el desarrollo de un biomaterial para su diferenciación es la imitación de su matriz extracelular, incluyendo su geometría. Gracias a esto se demostró que los POS detectan señales geométricas que inducen a la mielinización (Makhija, et al, 2020).

→ *Tiempo*

Una de las limitaciones en desarrollo de este trabajo es la secuencialidad de las actividades metodológicas, lo que genera una ruta crítica determinante. Además se tiene un tiempo máximo establecido para la terminación del proyecto, por lo cual resulta de suma importancia que la obtención de muestras del biomaterial no exceda los tiempos dispuestos para el desarrollo del mismo, teniendo en cuenta algunos días de holgura, por imprevistos o errores en su ejecución.

→ *Costo*

Los costos de los biomateriales varían según su origen, algunos como el ácido hialurónico, un biopolímero natural, sobrepasan los costos establecidos por el proyecto. Es por esto que se decidió tener en cuenta como variable crítica teniendo, y teniendo en cuenta el alcance, los polímeros no deberán superar el presupuesto establecido inicialmente

→ *Biodegradabilidad*

Se considera que los materiales biodegradables promueven la señalización y proliferación celular , favoreciendo el metabolismo y la respuesta celular. (Zaeri, et al., 2022). La degradación de los biomateriales debe concordar con la célula incrustada, en este caso los OL, para generar una gran similitud respecto a su propia matriz extracelular y a su vez disminuyen los subproductos con toxicidad. Además deben permitir el flujo y difusión de nutrientes y subproductos de desecho. (Zue, et al., 2021)

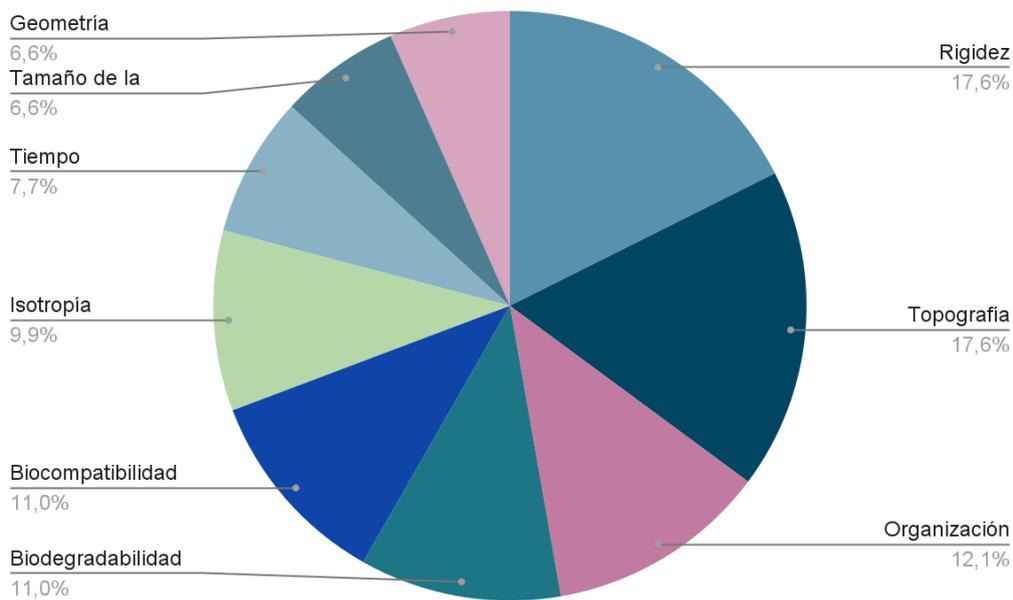
→ *Biocompatibilidad*

La biocompatibilidad es una propiedad intrínseca de los biomateriales, necesaria para su interacción con entes biológicos, debe garantizarse con el fin de no obtener ningún rechazo por parte del mismo. Se han desarrollado matrices biocompatibles basadas en hidrogeles para imitar la rigidez del tejido neural de origen natural o sintética (Makhija, et al., 2020).

→ *Naturaleza del material*

Los hidrogeles pueden ser naturales, sintéticos, o híbridos, una integración de ambos. Los tres tipos han mostrado efectividad en su implementación en el sistema nervioso central, desde que sean biocompatibles y biodegradables, muestran una respuesta satisfactoria y adecuada para la obtención de biotintas. Y no intervienen en los procesos de proliferación, y diferenciación de las células. Actualmente se considera un reto la modulación de propiedades físicas en los polímeros naturales, ya que cuentan con propiedades bioactivas, en cambio sobre los polímeros sintéticos se logra controlar las propiedades mecánicas, gracias al aumento del control en los pesos moleculares y la distribución de concentración en el hidrogel (Zaeri, et al., 2022).

Estas variables fueron ponderadas según la dependencia del proceso biológico, tal como se establece en el siguiente gráfico:



**Figura 22.** Ponderación de variables críticas para la elaboración del hidrogel.

De acuerdo a la búsqueda sistemática y la justificación anteriormente mostrada, se evidencia que las características más relevantes dentro del desarrollo del hidrogel, para este proyecto, teniendo en cuenta que se busca promover la diferenciación de oligodendrocitos, son la rigidez y la topografía; propiciando las señales topográficas y mecánicas que recibe de su microentorno

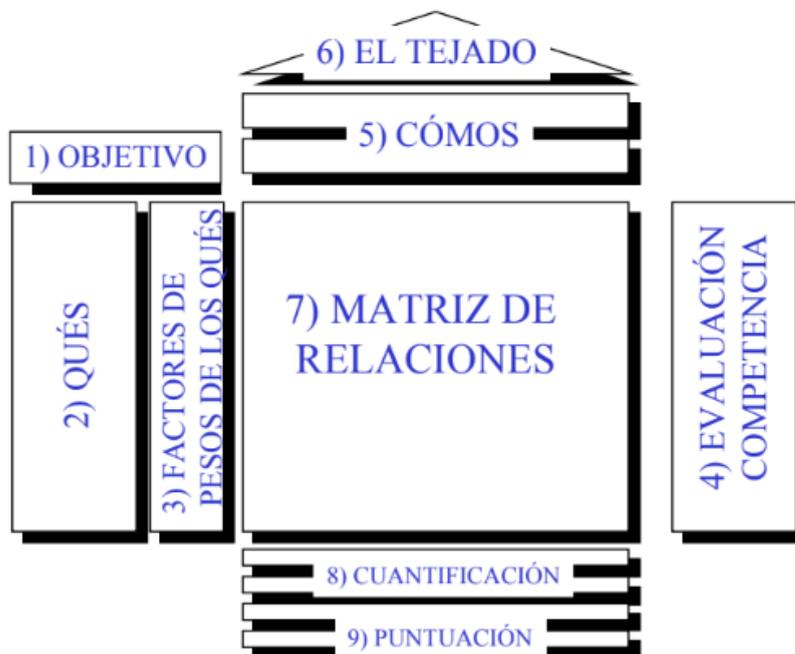
### 6.1.3 Requerimientos

Mediante el análisis de la información de las publicaciones anteriormente mencionadas (Tabla 4), se determinaron las variables críticas para la obtención del hidrogel, a partir de las cuales se establecieron los requerimientos del biomaterial.

De acuerdo a las variables críticas establecidas y su puntuación porcentual se determinaron las necesidades del sistema y las posibles soluciones a estas, factores con los cuales se redactaron los requerimientos del proyecto. Cada requerimiento refleja su impacto de manera diferente, algunos tienen mayor predominio en el producto final, y tienden a considerarse más relevantes durante el diseño del mismo. Para identificar la importancia de cada uno se optó por diseñar

matriz de despliegue de función de calidad (QFD). Esta se define como “un sistema detallado para transformar las necesidades y deseos del cliente en requisitos de diseños de productos o servicios”. Se implementa comúnmente como herramienta de planificación, que puede ser usada en ingeniería para la priorización de requerimientos y selección de propuestas de solución que cumplan con los mismos, a través de una evaluación de relación con el producto. (Ruiz, 2009)

Uno de los aspectos más importantes de esta herramienta se ubica en la matriz de relaciones, la sección central de la casa de la calidad como se indica en la figura 23. En donde se establece una relación entre los ¿QUÉ?, que son necesidades del beneficiario, en este caso la diferenciación de los oligodendrocitos; pueden ser físicas, biológicas y químicas. y los ¿CÓMO?, que determinan la manera de cumplir cada necesidad. Ambos parámetros fueron concebidos a partir de los requerimientos finales.



**Figura 23.** Estructura de matriz QFD (Ruiz 2009)

La relación se establece mediante una escala, y esta difiere de acuerdo al método empleado. El método japonés sugiere símbolos, mientras que el tradicional emplea numeración ascendente. Para la matriz que se desarrolló se seleccionó el método tradicional, con una numeración del 1 al 5, donde el 1 se refiere a la relación nula o más baja, el 3 a una relación indirecta y el 5 a una relación directa o incluso condicional (Anexo 1).

### Requerimientos funcionales

1. El biomaterial debe cumplir con un rango de rigidez entre 1,5 y 7 kPa, rangos similares a la rigidez de la matriz extracelular de los oligodendrocitos de acuerdo a los resultados satisfactorios obtenidos en estudios. (Makhija, 2020)
2. La estructura del hidrogel no debe tener patrones, para promover la diferenciación de los oligodendrocitos (Whilems, 2019).
3. El hidrogel debe tener una topografía isotrópica. (Moe et al., 2012 tomado de Whilems, 2019).

4. La geometría del hidrogel debe ser cilíndrica, modelando la estructura de los axones (Makhija, et al, 2020).
5. El hidrogel debe ser biocompatible y biodegradable. Esto soportándose en revisión bibliográfica del material a implementar (Zue, et al., 2021).
6. La naturaleza del biomaterial puede ser sintética, natural o híbrida (Zaeri, et al., 2022).

### **Requerimientos de calidad**

1. La metodología como producto final deberá ofrecer las condiciones óptimas en términos de rigidez y topografía con el fin de promover la diferenciación de los precursores de oligodendrocitos.
2. Teniendo en cuenta la biología de los oligodendrocitos, se procura ofrecer un ambiente controlado de variables previamente establecidas, el cual en un futuro pueda ofrecer diferentes funciones en esta área.

### **Requerimientos de restricción**

1. Los oligodendrocitos presentan mejor diferenciación en superficies aleatorias, no alineadas.(*Whilems, 2019*)
2. La evaluación del material será netamente física y mecánica.
3. Las variables físicas que se evaluarán en el material serán únicamente la rigidez y la topografía.
4. Se evaluarán características físicas y químicas del material.
5. El biomaterial debe permitir la difusión de nutrientes y la interacción de OL con otras células, según la bibliografía.
6. El tiempo empleado en la metodología de obtención de las muestras del hidrogel no debe superar los 45 días, teniendo en cuenta imprevistos.
7. Los materiales y reactivos no deben superar el precio de 3,400,000 según lo presupuestado.

#### **6.1.4 Conceptos de material: Revisión bibliográfica, selección y propuesta**

Al obtener los resultados de la matriz de requerimientos mencionada anteriormente, se realizó la búsqueda bibliográfica de materiales que funcionaran como opción para la elaboración de hidrogeles en el sistema en el que se encuentran los oligodendrocitos (SNC). Esta revisión estuvo dirigida a los materiales que se han implementado para el tratamiento de deficiencia de oligodendrocitos o de su funcionalidad. Se utilizaron estrategias de búsqueda específicas, algunas similares a las diseñadas para la revisión sistemática de las variables, y otras totalmente nuevas. En el tamizaje de la información se tuvo en cuenta el mismo rango de años y el idioma, sin embargo, el aspecto determinante fue el contenido, en metodología de obtención, composición, y del comportamiento mecánico de los materiales específicos para la regeneración de Oligodendrocitos. Una de las mayores limitantes en esta búsqueda fue encontrar artículos científicos que se enfocarán en OL, ya que, como se ha mencionado anteriormente los OL son células que cuentan con pocos estudios a su favor, con respecto a otro tipo de células. Y las características fisicomecánicas del material varían de acuerdo a la línea celular para la cual se desarrollen, Incluso es diferente para cada fase de maduración de los OL.

Para definir las propuestas de material, fue necesario evaluar diferentes tipos de hidrogeles según su naturaleza, esta es una de las variables que se contemplaron desde el inicio del diseño conceptual del hidrogel; Durante el levantamiento de requerimientos se evidenció que el material podría ser sintético, natural o híbrido y no afectaría el proceso de diferenciación, desde que cumpliera con los demás parámetros establecidos para cada una de las variables críticas. Sin embargo, que el material sea compuesto puede llegar a optimizar los procesos de degradabilidad y permitir una modulación en sus características mecánicas (Zaeri, et al., 2022). Los biomateriales naturales comprenden propiedades mecánicas que no son tan favorables por sí mismas, y cuentan con una tasa de biodegradabilidad más alta que uno sintético, y en cambio los biomateriales sintéticos permiten ajustar propiedades como la viscosidad, la capacidad de hinchamiento, la rigidez y su disposición. Los biomateriales híbridos serían ideales ya que cuentan con características bioactivas del biomaterial natural, y la versatilidad fisicomecánica del sintético (Zaeri. et al, 2022).

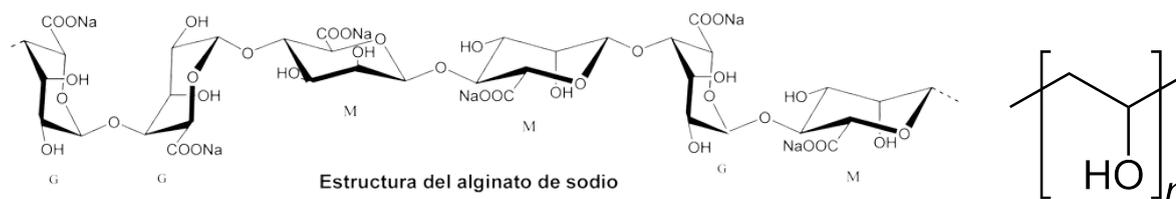
Teniendo en cuenta lo anterior se encontraron 7 posibles materiales idóneos para la fabricación de un hidrogel con potencial aplicación en la diferenciación de OL, los cuales son poliacrilamida, ácido hialurónico, alginato - alcohol polivinílico (PVA), colágeno, polietilenglicol (PEG) - metacrilamida, metacrilamida quitosano y alginato - O- carboximetil quitosano (O-CMC).

La selección de los materiales para las pruebas preliminares, se realizó mediante una evaluación de competencia, según como la denomina Ruiz, 2009. En ella se estableció una relación entre requerimiento (teniendo en cuenta la priorización anterior) y material, que fue determinada por una escala de 0, 1 y 3. 0 en caso de que la propuesta no cumpliera con el requerimiento, 1 si en la revisión bibliográfica no se encontraba la información específica, pero no se negaba la posibilidad de cumplir con el requerimiento, y 3 en caso de que cumpliera.

Tal como se logra observar en el anexo 2., las 7 propuestas llegaban a cumplir una gran parte porcentual de los requerimientos establecidos, de 86 a 93%. Exceptuando el ácido hialurónico, que a pesar de que Unal, et al. lograron evidenciar el crecimiento de OL en pruebas *in vitro*, no cumplió con los requerimientos preestablecidos para esta elección, específicamente los de topografía que cuentan con un alto peso de acuerdo a la priorización, como la isotropía y la superficie renderizada, además de que su alto costo podría afectar directamente la viabilidad del proyecto. Los puntajes más altos fueron obtenidos en el siguiente orden: Alginato O-CMC, Metacrilamida - quitosano, PEG - metacrilamida y Alginato - PVA. Sin embargo para la obtención de los geles metacrilamida, era necesario anhídrido metacrílico que es el compuesto que reacciona con los grupos alcohol terminales del PEG y así generar un reticulado que permite la formación del gel, y no se logró tener acceso a este reactivo dentro de los tiempos destinados a la etapa de diseño preliminar. Por lo cual la propuesta de PEG - Metacrilamida y Metacrilamida quitosano, fueron descartadas.

El alginato - O-CMC que fue la propuesta que mayor cumplimiento obtuvo con un 93,3% fue seleccionado para las pruebas preliminares, este es material compuesto entre 2 materiales naturales que según la evaluación de competencia, cumple con la mayoría de los requerimientos, solo 2 de ellos obtuvieron una puntuación de 1 por no estar descritos en bibliografía. Seguido a este la segunda propuesta seleccionada fue Alginato- PVA, un material híbrido que cuenta con propiedades naturales y sintéticas al mismo tiempo.

- Alginato- PVA

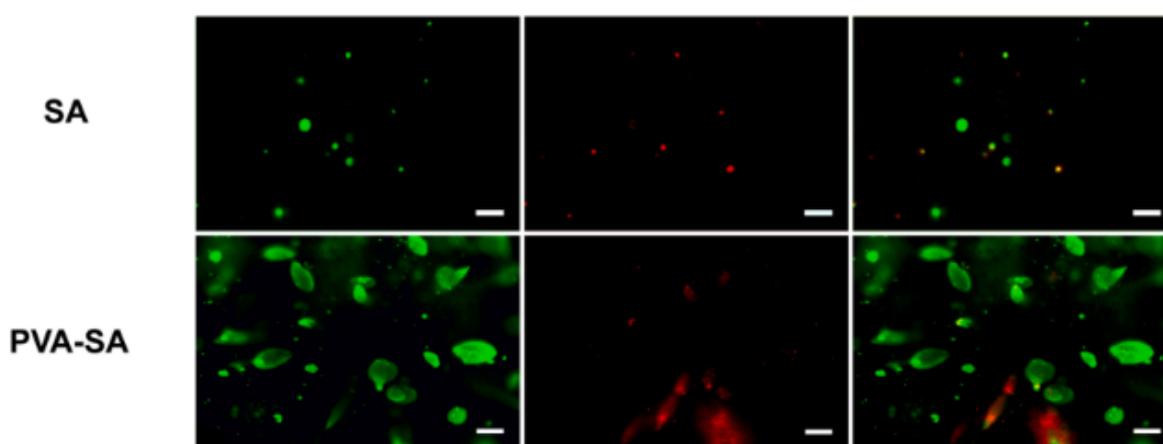


**Figura 24.** Estructura química Alginato + PVA

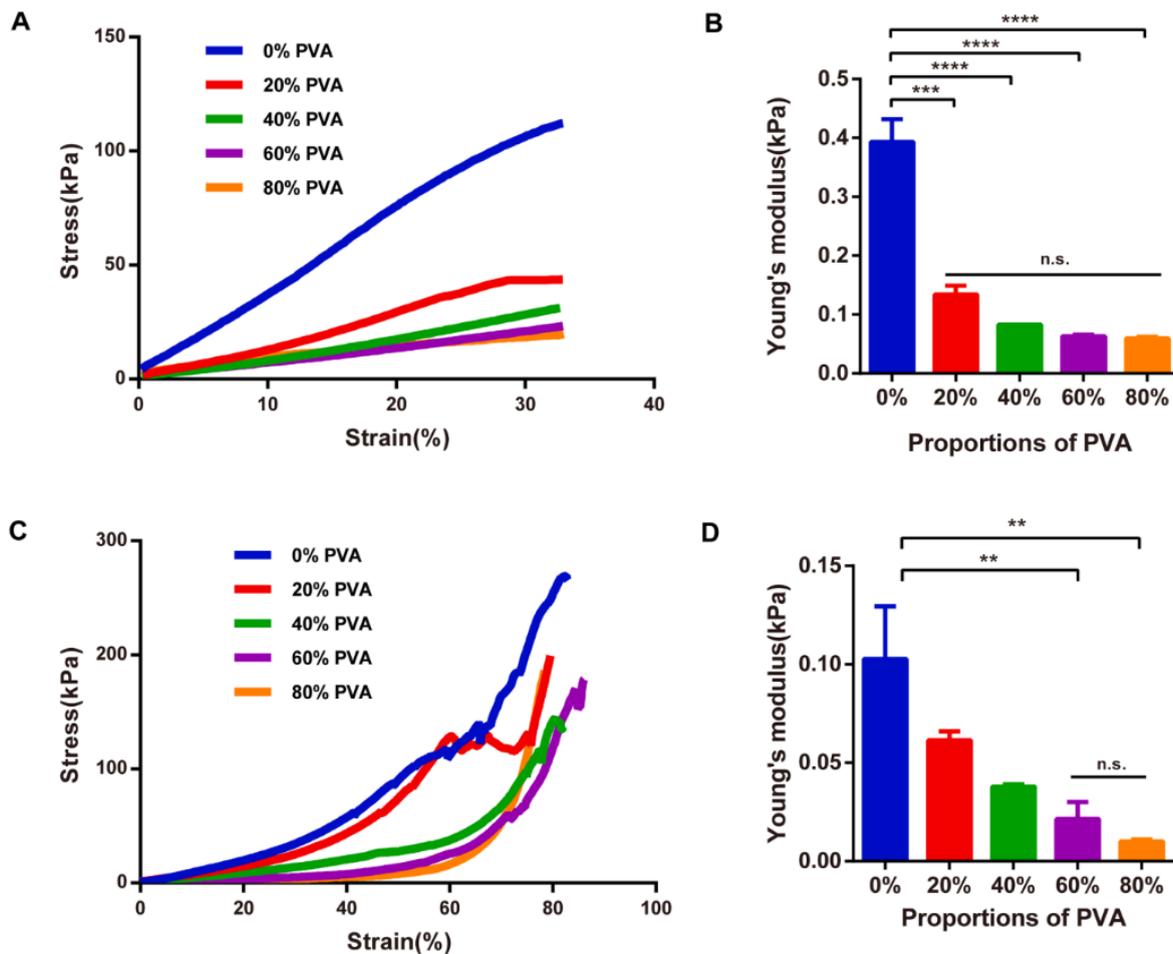
Este es un material híbrido entre un biomaterial natural y otro sintético. El alginato es un biomaterial natural, implementado en la ingeniería de tejidos, gracias a su biocompatibilidad, su biodegradabilidad, similitud con la matriz extracelular y capacidad de respuesta celular (Revete, 2021). El PVA es un polímero hidrosoluble, considerado un biomaterial sintético con propiedades de flexión que permiten modular propiedades mecánicas.

La reticulación del alginato de calcio con cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), puede formar en sí un hidrogel, sin embargo Siqi, et al. afirman que la ruptura dinámica del entrecruzamiento iónico entre estas sustancias es muy lenta, y esto dificulta la difusión de nutrientes y gases que requiere el sistema biológico para su proliferación y correcto desarrollo. Es por esto que decidieron realizar un reticulado de AS-  $\text{CaCl}_2$  más PVA.

De este material híbrido evaluaron su comportamiento mecánico por medio del módulo de almacenamiento, el módulo de Young, aumentos en la tasa de hinchamiento y el tamaño de los poros.



**Figura 25.** Imágenes máximas de proyección Z-stack de la tinción viva/muerta de NPC encapsulados en hidrogel el día 12 (verde: células viables, rojo: células muertas). Las barras de escala representan 200  $\mu\text{m}$ ; (Siqi, et al 2021)



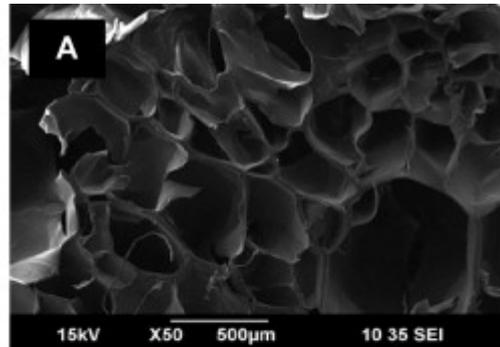
**Figura 26.** Caracterizaciones mecánicas del hidrogel de alginato de sodio- PVA. Curva de deformación de tensión (A) y compresión (C) . módulo de Young de acuerdo a las gráficas de esfuerzos. (Siqi, et al 2021)

Tal como se evidencia en la figura 26, el módulo de Young, y al mismo tiempo la rigidez del material es inversamente proporcional a la cantidad añadida de PVA. Por lo que se infiere que el PVA afecta directamente en el comportamiento elástico del material, y aumenta su zona plástica. Además se evidencia que el PVA aceleró la proliferación celular debido a la adecuación de los poros dentro del hidrogel, que permiten el intercambio de nutrientes y gases (Siqi, et al 2021).

- Alginato de sodio - O-Carboximetilquitosano (O-CMC)

El alginato es un biomaterial que se caracteriza por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y fácil preparación, actualmente es usado comúnmente en lo que a regeneración de tejidos se refiere, sin embargo presenta una limitación y es su carencia de adhesión celular. Con el fin de mejorar el rendimiento del alginato se ha complementado con otros polímeros que le permitan tener una mejor eficacia. En este caso es mezclado con el O-Carboximetilquitosano una carboximetilación del quitosano que presenta buena viscosidad, solubilidad y biocompatibilidad. La razón de no usar solo quitosano es debido a su baja solubilidad en solventes fisiológicos por un fuerte enlace de hidrógeno, lo que impide que se emplee como inyectable.

Una de las ventajas en la metodología de Jaikumar et al, es que el biomaterial está pensado con características mecánicas propias de un inyectable, y por sus componentes es compatible con el sistema nervioso. Según los resultados en las evaluaciones mecánicas del material, este llega a presentar un valor de rigidez dentro del rango establecido en este proyecto para la diferenciación de los oligodendrocitos, sin embargo los estudios propios de esta metodología responden a la regeneración de tejido adiposo.

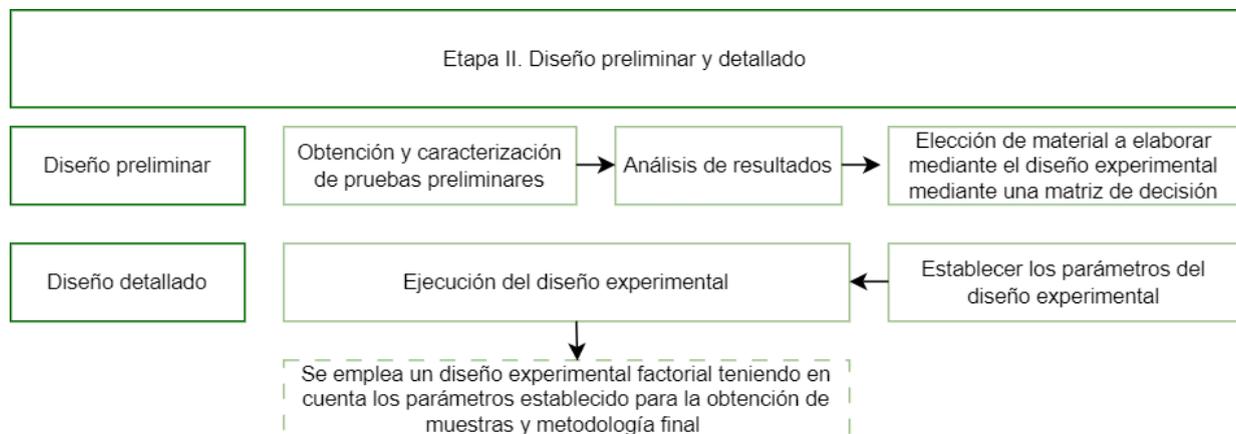


**Figura 27.** Imagen MEB de geles de Alginato - O-Carboximetilquitosano

En las caracterizaciones de microscopía electrónica se logró observar una alta porosidad en los geles, incluso en comparación con otras composiciones. Y se determinó por medio de pruebas de hinchamiento que es un gel con alta capacidad de retener agua gracias a la alta solubilidad de sus componentes.

## 6.2 Segunda etapa: Diseño preliminar y detallado

En este diseño se establece la metodología de obtención a partir de la composición seleccionada; los parámetros para su selección se basaron en los criterios de química verde, las técnicas (eficiencia y acceso), el tiempo y el alcance del proyecto (Chaur, 2005). Adicionalmente se realizaron pruebas preliminares con las que se buscó comprender las variables implicadas en el desarrollo de esta metodología. Para la obtención de estas pruebas se tuvieron en cuenta las dos propuestas de material seleccionadas durante el diseño conceptual.



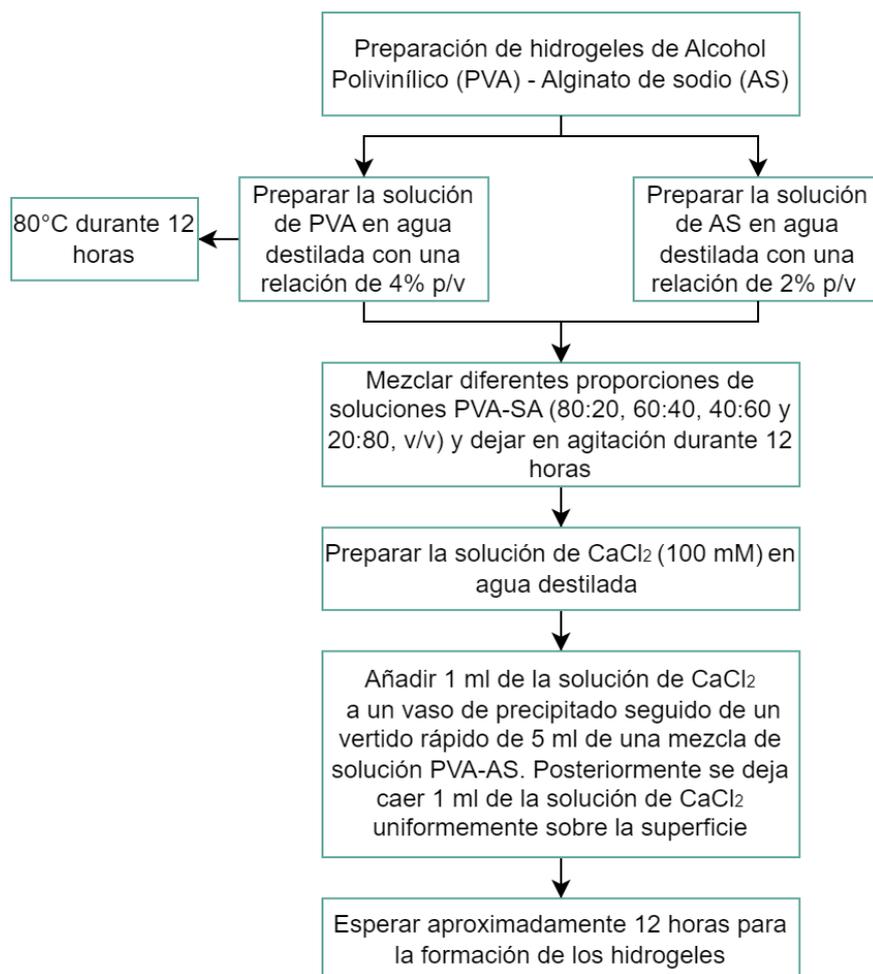
**Figura 28.** Diagrama de flujo de procedimiento a seguir en la etapa II (Autoría propia)

El diseño preliminar experimental consistió en la elaboración experimental y caracterización mediante estereoscopia (estereoscopio Olympus), espectroscopia por infrarrojo (Alpha), reología (Reometro Anton Paar MCR 92) de cada una de las dos opciones de material que surgieron de los resultados obtenidos en la etapa de diseño conceptual: PVA-Alginato de sodio y alginato de sodio-Carboximetil Quitosano.

### 6.2.1 Metodología para la obtención de muestras preliminares

#### Primera opción de material: PVA-Alginato de sodio

Para la obtención de los hidrogeles compuestos de PVA-AS se realizaron tres ensayos teniendo como base la metodología plasmada en la figura 29. En el primer ensayo se obtuvieron tres hidrogeles (muestras AG). Luego de este ensayo se decidió duplicar las cantidades mezcladas, logrando hidrogeles de 20 mL de mezcla de PVA-AS más 4 mL de agente reticulante, sin embargo el  $\text{CaCl}_2$  se agregó en una concentración (0.28% p/v) insuficiente para la reticulación de los 20 mL de mezcla. En consecuencia los geles obtenidos no llegaron a gelificar, a pesar de dejarlos en refrigeración de  $-5^\circ\text{C}$  durante una semana. Por lo cual los hidrogeles elaborados en este ensayo fueron descartados y no se sometieron a pruebas de caracterización. En el ensayo dos se obtuvieron cinco hidrogeles (muestras MG),



**Figura 29.** Diagrama de flujo del procedimiento para obtención de hidrogeles de alcohol polivinílico-Alginato de sodio (Tomado de Ma, S, et al. 2021)

- Ensayo 1

Para iniciar el procedimiento se realizaron los cálculos con el fin de determinar la cantidad de cada reactivo en masa, para preparar las soluciones en las concentraciones que indica Ma, S., et al en un volumen de 50 mL.

- Alginato de sodio

$$2\% \times \frac{g \text{ soluto}}{50 \text{ mL}} \times 100$$

$$\frac{2\%}{100} \times 50 \text{ mL} = 1 \text{ g de Alginato de sodio} \quad (1)$$

- PVA

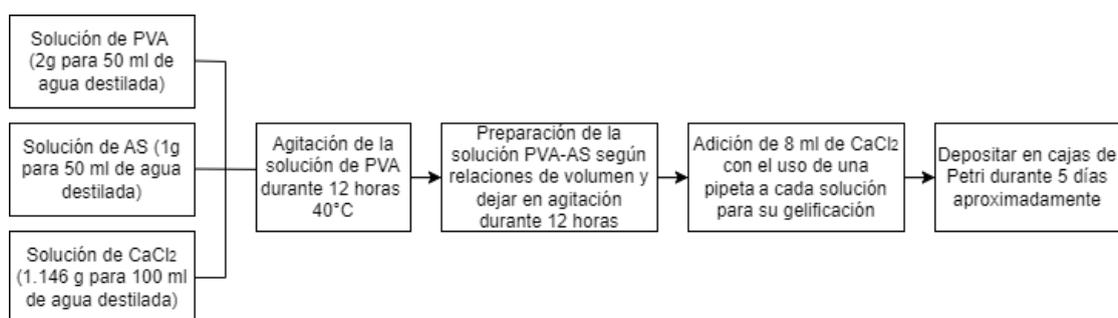
$$4\% \times \frac{g \text{ soluto}}{50 \text{ mL}} \times 100$$

$$\frac{4\%}{100} \times 50 \text{ mL} = 2 \text{ g de PVA} \quad (2)$$

- Cloruro de calcio

$$\frac{1 \times 10^{-3} \text{ mol}}{1 \text{ L}} \times \frac{146 \text{ g CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}}{1 \text{ mol CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}} \times 50 \text{ mL} = 0,0013 \text{ g} \times 100 \text{ mL} = 0.146 \text{ g de CaCl}_2 \quad (3)$$

Las pruebas preliminares se realizaron siguiendo los pasos plasmados en la figura 30 :



**Figura 30.** Metodología empleada para la obtención de muestras preliminares.

Una vez se tuvieron las cantidades necesarias para las soluciones, se procedió a elaborar los hidrogeles. Las relaciones v/v de la solución PVA-AS que se emplearon fueron 4:6 mL (AG1), 6:4 mL (AG2) y 8:2 mL (AG3), de manera que fueron obtenidos 3 hidrogeles. Las cantidades empleadas fueron el doble de las indicadas en el artículo, por lo que los hidrogeles en vez de 6 mL tenían en total 12 mL de solución de PVA-AS y CaCl<sub>2</sub>.

Tabla 5

Pruebas preliminares de PVA-AS muestras AG

Relación de volúmenes de PV:Alginato (mL)		CaCl <sub>2</sub> [ p/v]
AG1	4:6	0,28%
AG2	6:4	
AG3	2:8	

- Ensayo 2

Para llevar a cabo este ensayo se realizaron nuevamente los cálculos debido a que se encontraron algunos errores después de realizar otras muestras de hidrogeles después del ensayo 1. La solución de cloruro de calcio se preparó en una concentración menor a la adecuada. Los cálculos corregidos se muestran a continuación:

• Cloruro de calcio

$$\frac{100 \text{ mmol CaCl}_2}{1\text{L}} \times 0,0500 \text{ L} \times \frac{1 \text{ mol CaCl}_2}{1000 \text{ mmol CaCl}_2} \times \frac{148 \text{ g CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}}{1 \text{ mol CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}} = 0,734 \text{ g de CaCl}_2 \quad (4)$$

Con la solución de CaCl<sub>2</sub> en una concentración (1,4% p/v) se prepararon 5 hidrogeles de 20 mL de mezcla PVA-AS y 4 mL de CaCl<sub>2</sub>, en las siguientes relaciones: PVA-AS v/v de 4:16 (MG1), 8:12 (MG2), 12:8 (MG4) y 16:4 (MG5). Además se agregó una nueva relación (12mL PVA:12mL AS) (MG3) con el fin de evidenciar el comportamiento del material con proporciones iguales de los polímeros.

Tabla 6

Pruebas preliminares de PVA-AS muestras MG

Relación de volúmenes de PV:Alginato (mL)		CaCl <sub>2</sub> [ p/v]
MG1	4:16	1,4 %
MG2	8:12	
MG3	12:12	

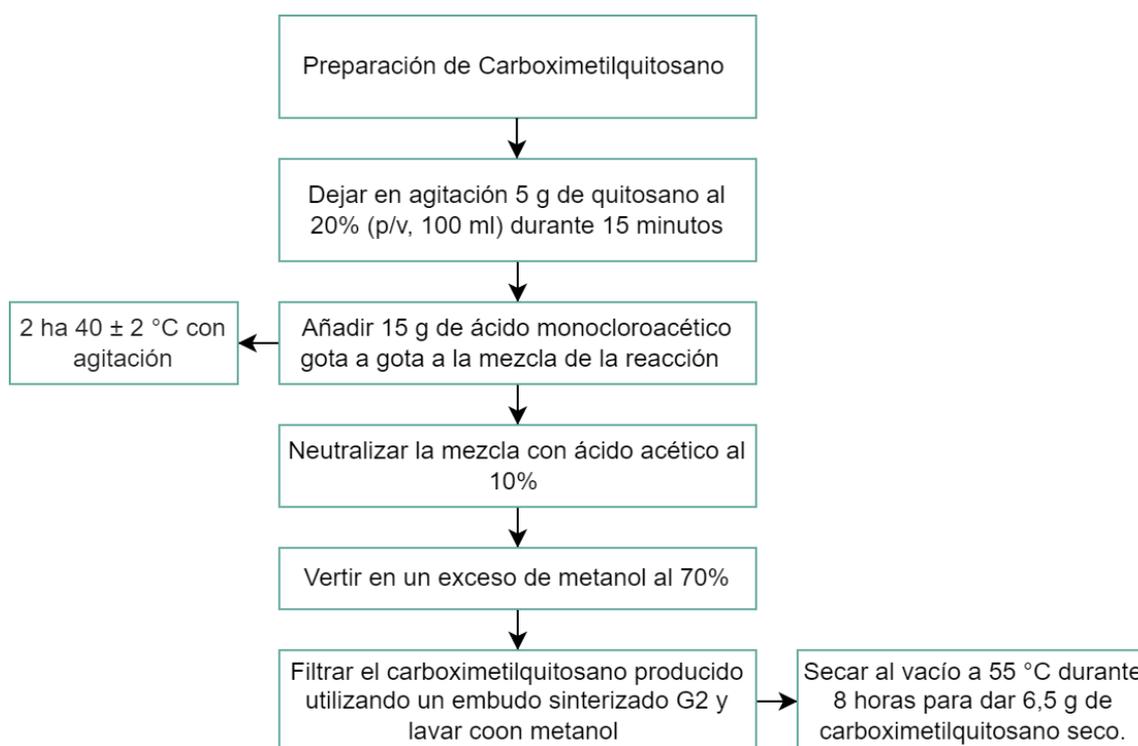
MG4	12:8	
MG5	16:4	

Para elaborar las muestras en el ensayo 3 se emplearon los mismo parámetros que en el ensayo 1, a excepción de la cantidad de cloruro de calcio, la cual fue de 0,734 g para 50 mL de agua destilada.

### Opción 2 de material: Alginato de sodio - Carboximetil Quitosano (O-CMC)

Para la obtención de los hidrogeles compuestos por Alginato de sodio y carboximetil quitosano, lo primero que se llevó a cabo fue la obtención del O-CMC propiamente, teniendo como base la metodología que se muestra a continuación

#### Preparación de carboximetil quitosano

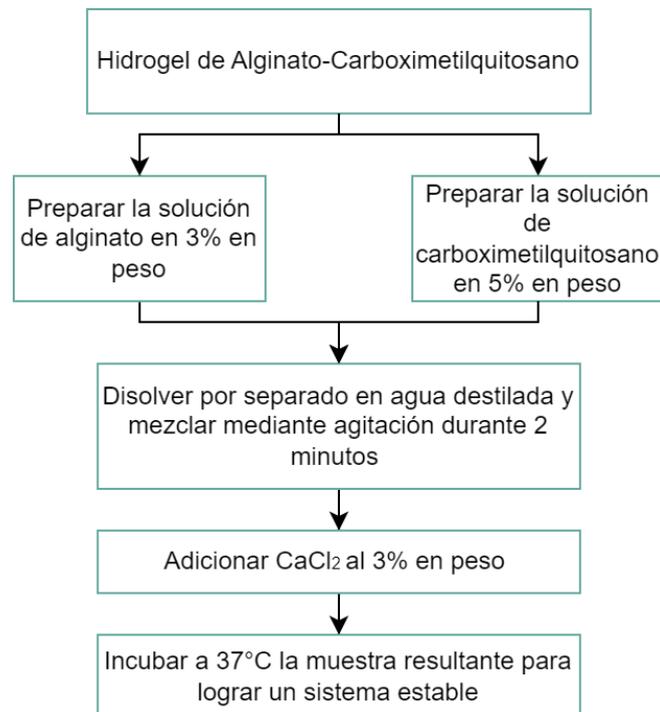


**Figura 31.** Diagrama de flujo del procedimiento para obtención del carboximetil quitosano.

Se preparó la solución con 1 g quitosano en 50 mL de NaOH, y se dejó en agitación a 300 rpm, con una temperatura ambiente entre 17 y 18° C un poco más del tiempo encontrado por bibliografía (20 min). Cuando ya estuvo disuelto se agregó lentamente el ácido monocloroacético (3 g) y de esta manera se colocó en agitación con 600 rpm por 2 horas a temperatura ambiente y 1 hora adicional a 40°C. Luego se agregó ácido acético en una concentración del 5% con el fin de neutralizar la solución.

Posteriormente se adicionaron 60 mL de metanol al 70%, se agitó manualmente y se dejó en reposo durante 30 min. Al momento de realizar la filtración al vacío no se obtuvo lo esperado, ya que, al ser una solución tan viscosa no se logró obtener una separación a pesar de estar en este proceso alrededor de 3 horas. Como una alternativa a esta situación, se realizó una separación por medio de evaporación, la solución de quitosano se dispuso en una plancha a 40°C y poco a poco se le agregó metanol en exceso hasta que se obtuvo una consistencia seca o incluso con viscosidad pero mucho más rígido que el inicial. Finalmente se dejó en el congelador a -80°C por 12 horas para posteriormente liofilizar en el liofilizador lyovapor L-200 por 48 horas. El producto resultante fueron 2,94 g de Carboximetil Quitosano.

### Preparación del hidrogel



**Figura 32.** Diagrama de flujo del procedimiento para obtención de hidrogeles de alginato-carboximetil quitosano.

Se realizaron 2 empleando el método anterior variando las relaciones de volumen entre AS y O-CMC, el volumen de la solución de CaCl<sub>2</sub> se mantuvo. El tiempo de agitación real fue de 10 minutos a 300 rpm.

#### - Ensayo 1

En este ensayo, siguiendo la metodología plasmada en la figura 32 se obtuvieron tres hidrogeles. Dos de ellos, se elaboraron con relación de 15: 10 mL de Alginato de Sodio Carboximetil Quitosano respectivamente y el último con una relación de 10:15.

Tabla 7

*Pruebas preliminares muestras P de Alginato de sodio - Carboximetil Quitosano*

Relación de volúmenes de AS:O-CMC (mL)		CaCl <sub>2</sub> [ p/v]
P21	15:10	3%
P22	15:10	
P23	10:15	

- *Ensayo 2*

En el ensayo 2 se elaboraron dos hidrogeles, uno de relación 10:10 mL y un segundo de relación 15:10 mL de Alginato de Sodio Carboximetil Quitosano.

Tabla 8

*Pruebas preliminares muestras Q de Alginato de sodio - Carboximetil Quitosano*

Relación de volúmenes de AS:O-CMC (mL)		CaCl <sub>2</sub> [ p/v]
Q21	10:10	3%
Q22	15:10	

### 6.2.2 Caracterizaciones mediante reología y estereoscopia de pruebas preliminares

Las muestras obtenidas de ambos materiales fueron caracterizadas por estereoscopia con el fin de observar más detalladamente la superficie del hidrogel, y reología donde se evaluó la viscosidad dinámica de cada material.

#### *Estereoscopia*

Para la realización de esta prueba se empleó el equipo Olympus SZX7, el cual permite adaptar una cámara al lente para obtener fotografías de una alta calidad para un posterior análisis.

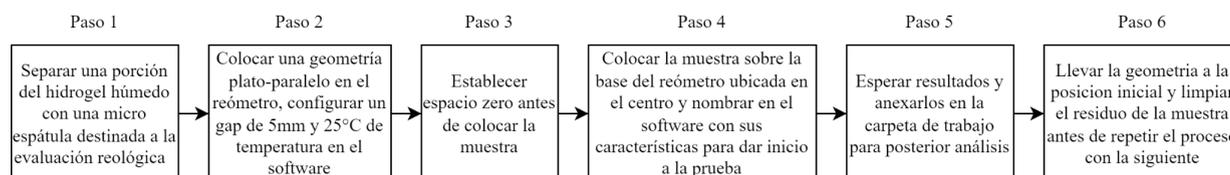
## Viscosidad dinámica

Para las evaluaciones de viscosidad dinámica se utilizó el reómetro Anton Paar MCR 92 (figura 33), este proporcionó por cada muestra una gráfica en escala logarítmica según la tendencia del comportamiento del material ante un esfuerzo de compresión y su viscosidad. Además de las gráficas de relación de comportamientos reológicos que permite inferir el comportamiento newtoniano de los hidrogeles.



**Figura 33.** Reómetro Anton Paar MCR 92

Para esta caracterización se llevó a cabo el siguiente proceso:



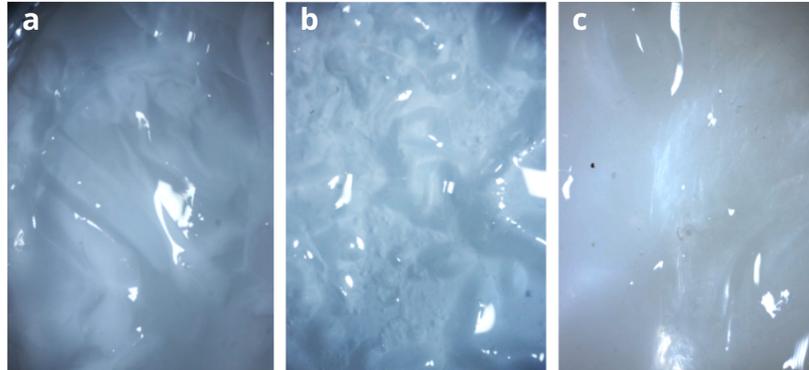
**Figura 34.** Metodología de las pruebas reológicas.

También se realizaron pruebas de espectroscopia por infrarrojo empleando el espectrómetro FTIR compacto Alpha con el fin de caracterizar la composición de los hidrogeles obtenidos comparados directamente con los reactivos utilizados en su obtención.

## Opción 1 de material: PVA-Alginato de sodio

- Ensayo 1

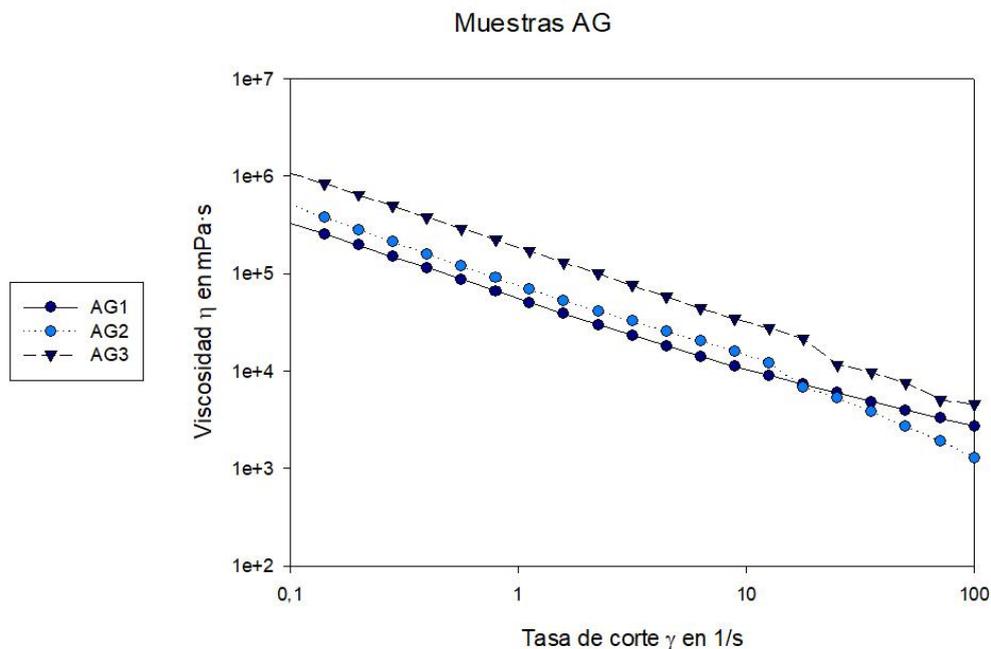
Estereoscopia



**Figura 35.** Imagen por estereoscopia de los resultados de las muestras AG. **a** corresponde a la muestra 1 (4:6 PVA-AS), **b** muestra 2 (6:4 PVA-AS) y **c** a la muestra 3 (8:2 PVA-AS).

Viscosidad dinámica

En la toma de datos con el reómetro, existen ciertas variables que llegan a afectar las gráficas resultantes, algunas son: La cobertura del material en toda geometría del instrumento, la distancia mínima entre la geometría y la base del reómetro (GAP), la homogeneidad del material y la ubicación de la muestra en el reómetro. La geometría usada fue de 5 cm de diámetro y el GAP de 0,1 mm para muestras AG y 1 mm para muestras MG, con el fin de garantizar el cubrimiento completo de la geometría por la muestra.



**Figura 36.** Comportamientos viscoelásticos de las muestras AG compuestas por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).

### *Análisis de resultados muestras AG (ensayo 1)*

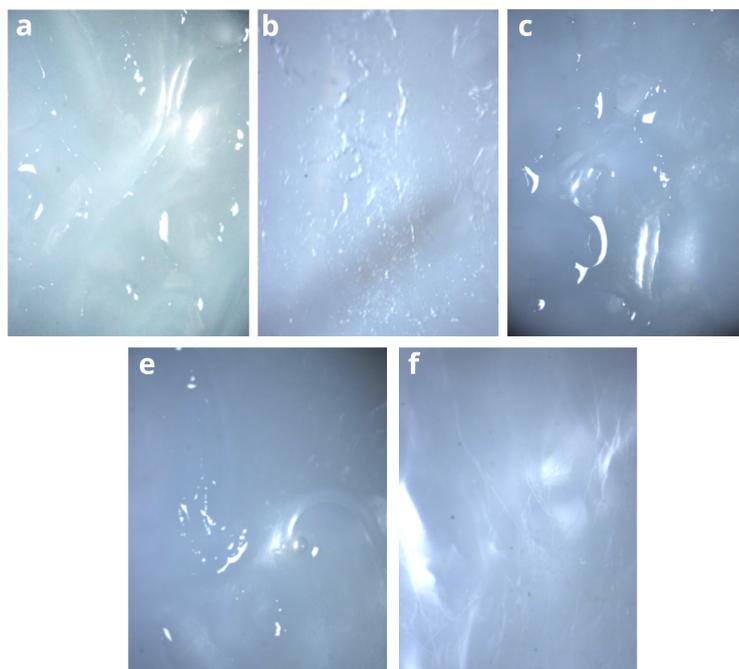
Con respecto a la muestra AG1, este hidrogel presentó homogeneidad y uniformidad, se tornó de un color blanquecino y su grosor no superó 1 mm. Su morfología era lisa y distribuida como una película. La viscosidad inicial fue de  $3,288 \times 10^5$  mPa·s, la final de 2,718 mPa·s y la viscosidad sin sufrir daños estructurales de 3,962.3 mPa·s.

La muestra AG2 en particular no tuvo el agente reticulante en contacto con toda la mezcla de PVA-AS, el área que retuvo más  $\text{CaCl}_2$  presentó un color blanco y su consistencia era más compacta. A diferencia de la muestra AG1 este material no era completamente liso, en cambio presentaba protuberancias en su superficie. Su viscosidad inicial fue  $1,105 \times 10^6$  mPa·s,  $1,001 \times 10^4$  como viscosidad final y la viscosidad máxima del material 14,429 mPa·s.

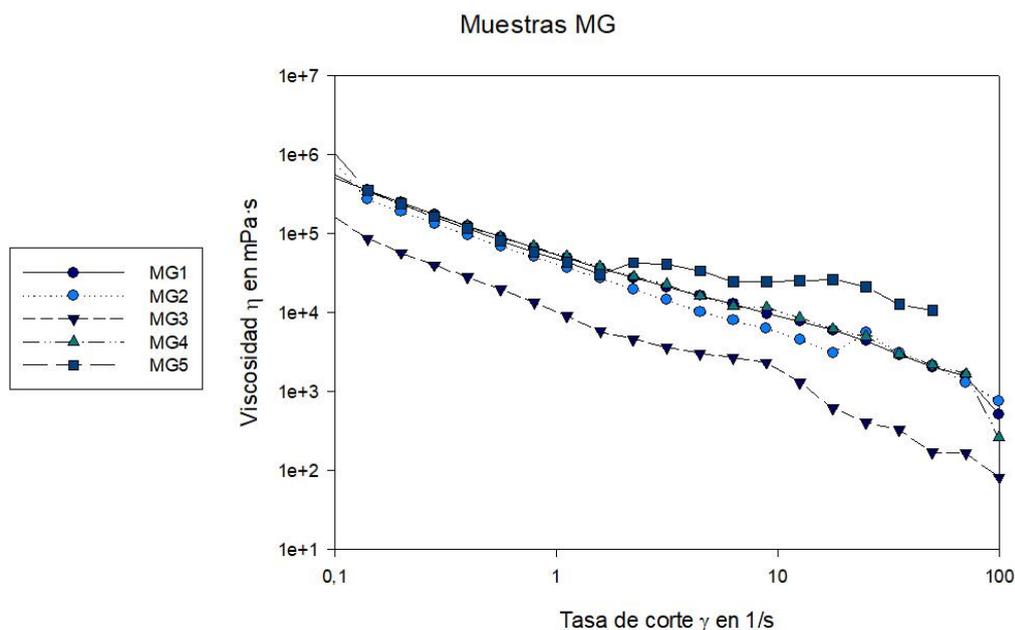
La muestra AG3, a diferencia de las anteriores, todas las demás pruebas presentaron un color translúcido. La consistencia de este gel era mucho más gelatinosa que las anteriores. Su viscosidad inicial fue  $1,07 \times 10^6$  mPa·s, viscosidad final de 4563 mPa·s y la viscosidad máxima del material 7526,3 mPa·s. Siendo la muestra con mayor valor inicial de viscosidad.

### *- Ensayo 2*

#### *Estereoscopia*



**Figura 37.** Imagen por estereoscopia de los resultados de las muestras MG. **a** corresponde a la muestra 1 (4:16 PVA-AS), **b** muestra 2 (8:12 PVA-AS), **c** muestra 3 (12:12 PVA-AS), **e** muestra 4 (12:8 PVA-AS) y **f** a la muestra 5 (16:4 PVA-AS).



**Figura 38.** Comportamientos viscoelásticos de las muestras MG compuestas por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).

*Análisis de resultados muestras MG (ensayo 2)*

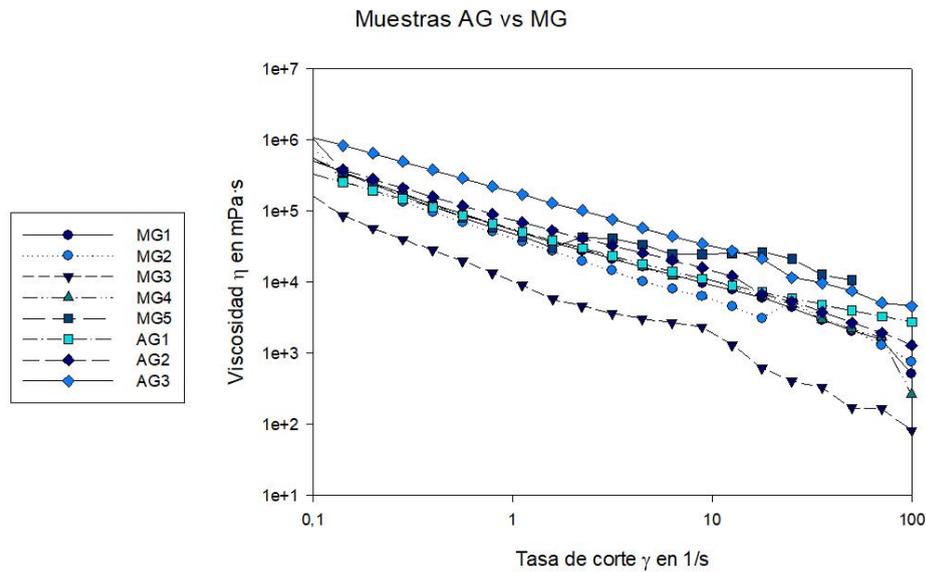
Los hidrogeles obtenidos en el ensayo 2 (MG) presentaron un grosor significativo entre 2 y 5 mm, la muestra MG1 tuvo el grosor más alto de 5 mm. El gel presentaba orificios debido a la disposición del reticulante en su etapa de obtención. Viscosidad inicial:  $5,069 \times 10^5$  mPa·s, viscosidad final: 510,7 mPa·s y viscosidad máxima 2059,2 mPa·s

La mayoría de las gráficas de viscosidad que se obtuvieron, mostraron un comportamiento lineal, sin embargo en la figura 38 con respecto a la muestra MG2 se observa un pico en la gráfica, antes de que el material llegue a su valor final de viscosidad. Esto se puede atribuir a la incorrecta disposición de la muestra en el reómetro o la inconsistencia en la uniformidad de la muestra. Este tipo de alteraciones afectan la confiabilidad de los puntos siguientes. El grosor del hidrogel fue de 0,2 mm. Viscosidad inicial:  $7,998 \times 10^5$  mPa·s, viscosidad final: 751,5 mPa·s, y viscosidad del material: 2153,1 mPa·s

La muestra MG3 no se gelificó uniformemente y además presentó protuberancias y perforaciones. El grosor fue de 2 mm. Su viscosidad inicial:  $1,629 \times 10^5$  mPa·s, final: 81,79 mPa·s, máxima del material: 169,69 mPa·s

La muestra MG4 morfológicamente fue muy similar a (MG3) la gelificación no fue homogénea, y es un factor que se ve reflejado en la gráfica de viscosidad. Su grosor fue de 3 mm y sus valores respectivos de viscosidad son: Inicial:  $5,585 \times 10^5$  mPa·s, Final: 262,1 mPa·s y Máxima: 2175,2 mPa·s y la Muestra MG5 presentó los siguientes valores en su evaluación: inicial:  $1,067 \times 10^6$  mPa·s final: 3133 mPa·s, máxima: 10647 mPa·s. Respecto a esta última muestra se destaca que no se dieron los 21 puntos resultantes de la gráfica, esto puede deberse a que el material salió de la base del reómetro y no se tomaron la totalidad de puntos correctamente en la prueba.

- Comparación entre muestras AG Y MG

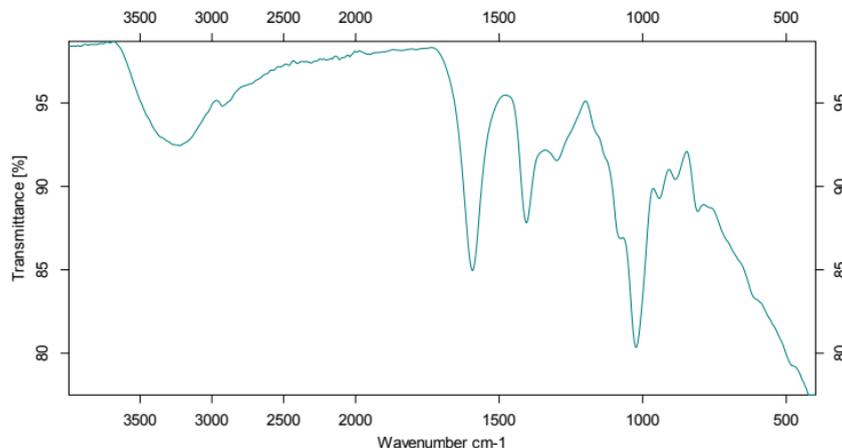


**Figura 39.** Comportamientos viscoelásticos de las muestras MG vs AG compuestas por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).

La viscosidad inicial es más alta en aquellos hidrogeles que tienen mayor proporción de alginato con respecto al PVA (AG1, AG3, MG1, MG2) y la más baja corresponde al hidrogel que se preparó con la misma proporción de PVA y de AS. Sorprendentemente las muestras del primer ensayo, con una concentración más baja de  $\text{CaCl}_2$  cuentan con una viscosidad inicial alta respecto a las del ensayo 3 y la viscosidad final es muy similar.

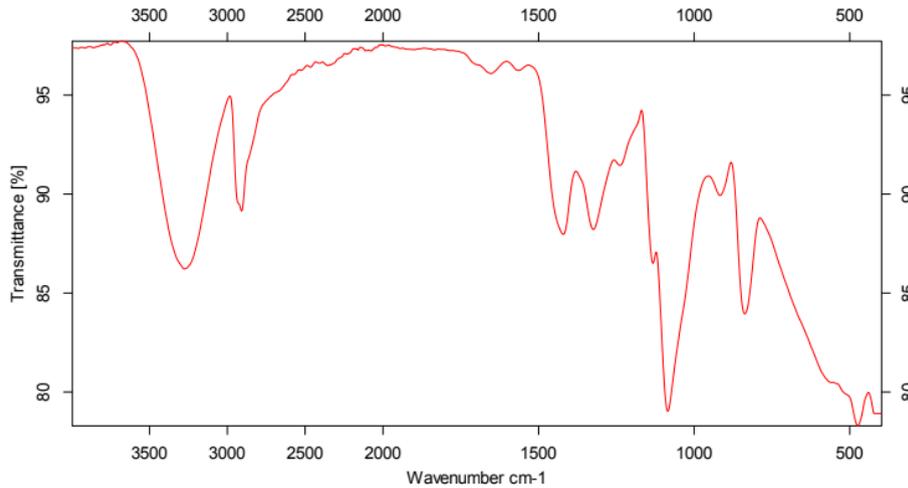
*Infrarrojo*

Se sometieron a la prueba de evaluación cualitativa de espectroscopía infrarroja los reactivos empleados en la elaboración de ambas pruebas preliminares con el fin de realizar un análisis del mismo y posteriormente una comparación con los resultados obtenidos de esta prueba en los hidrogeles elaborados.



**Figura 40.** Espectro de infrarrojo del Alginato, FT-IR compacto Alpha.

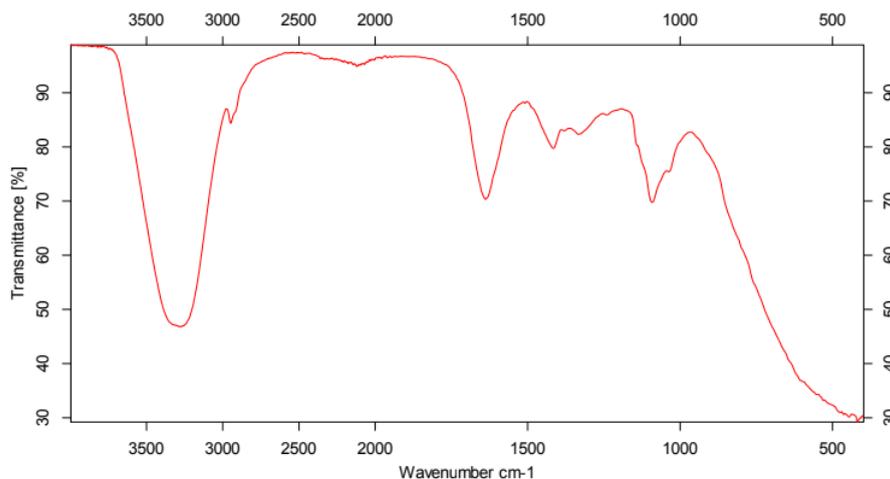
En la espectroscopia del alginato Figura 40, el primer pico que se observa al lado izquierdo equivale a una longitud de onda de  $3247\text{ cm}^{-1}$  que según Mohamed, et al., corresponde a la vibración de un enlace O-H, grupos funcionales como fenoles o alcoholes. El segundo pico indica un valor de  $1593\text{ cm}^{-1}$  para la vibración de grupos aromáticos.  $1405\text{ cm}^{-1}$  que es el tercer pico fluoruro,  $1300\text{ cm}^{-1}$  se interpreta como alcohol, éteres, ácidos carboxílicos y ésteres.



**Figura 41.** Espectro de infrarrojo del PVA, FT-IR compacto Alpha.

De la gráfica resultante de espectroscopía FTIR del PVA se puede observar que el pico entre los  $3500$  y  $3000\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un enlace O-H, el pico en el valor de  $1638\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la presencia de alcanos. El tercer pico, ubicado en un valor de  $1091\text{ cm}^{-1}$ , indica la presencia de grupos funcionales como alcoholes, éteres, ésteres, ácidos carboxílicos o anhídridos.

A continuación se muestran los resultados de IR obtenidos en la evaluación de uno de los hidrogeles resultantes de la prueba preliminar uno PVA-Alginato de sodio, la muestra AG2. Se seleccionó esta debido a que su consistencia se mostraba más firme y gelificada en comparación a las demás.



**Figura 42.** Espectro de infrarrojo de la muestra AG2, FT-IR compacto Alpha.

Según esta prueba infrarroja la banda presente en la gráfica del alginato también está en esta muestra de hidrogel  $3291\text{ cm}^{-1}$  (fenoles). El segundo pico  $2947\text{ cm}^{-1}$ , corresponde a un aldehído y  $1638\text{ cm}^{-1}$  a un alqueno, además del  $1333$  que se define como un sulfato.

### Opción 2 de material: Carboximetil Quitosano-Alginato de sodio

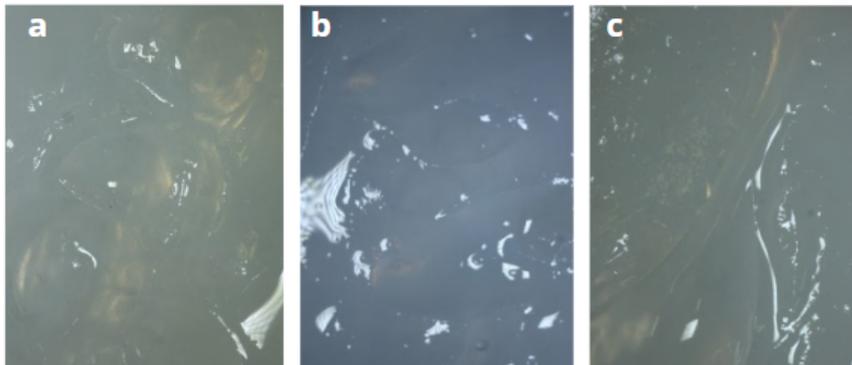
*Obtención del carboximetil quitosano*



**Figura 43.** Carboximetil quitosano obtenido

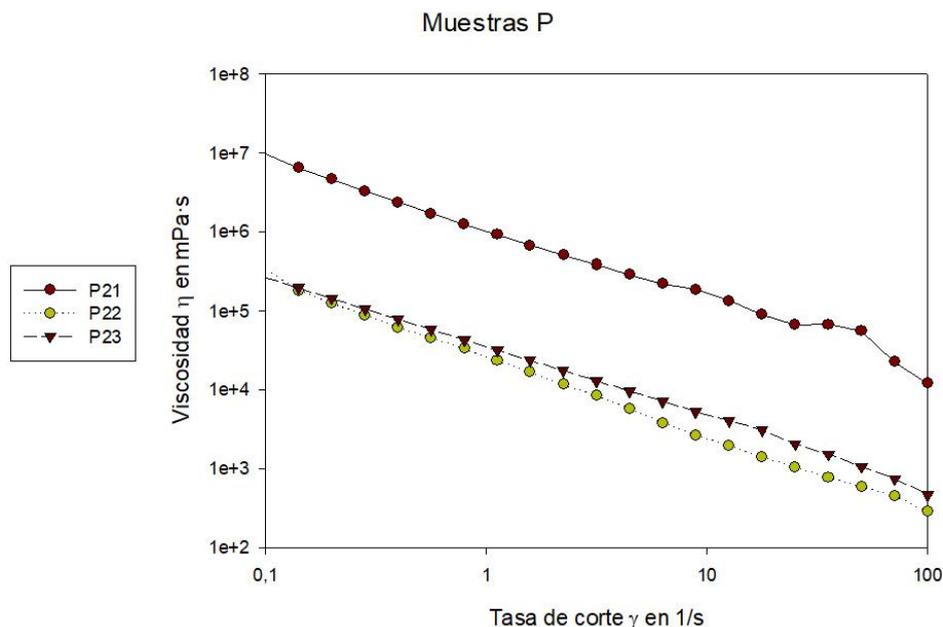
- *Ensayo 1*

*Estereoscopia*



**Figura 44.** Imagen por estereoscopia de los resultados de las muestras P. **a** corresponde a la muestra P21 (15:10 AS:O-CMC), **b** muestra P22 (15:10 AS:O-CMC), **c** muestra P23 (10:15 AS:O-CMC)

## Viscosidad dinámica



**Figura 45.** Comportamientos viscoelásticos de las muestras P compuestas por Alginato de Sodio (AS) y Carboximetil Quitosano.

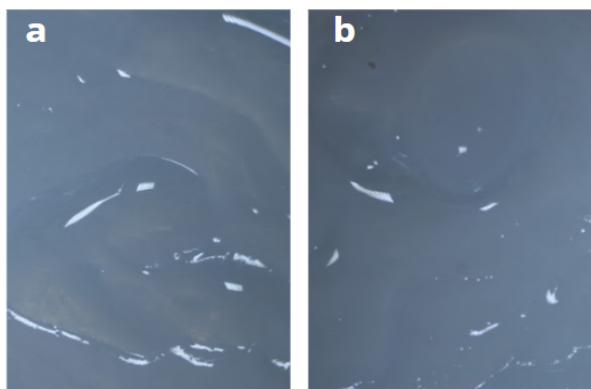
### *Análisis de resultados de las muestras P*

De las imágenes obtenidas en estereoscopia se pudo observar que los hidrogeles son gruesos, presentan algunas divisiones y protuberancias, esta última característica se atribuye a los lugares donde se presenta de manera directa el proceso de reticulación.

Con respecto al comportamiento viscoelástico de los geles del primer ensayo de AS-OCMC presentó niveles de viscosidad altos entre  $9,606 \times 10^6$  mPa·s y  $2,629 \times 10^5$  mPa·s, donde la muestra P1 fue la más viscosa entre ellas, debido al entrecruzamiento de  $\text{CaCl}_2$  y el alginato, y a pesar de que la relación de AS-OCMC para la muestra P2 era igual, se evidenció una viscosidad mucho menor. Esto puede deberse a errores sistemáticos en la disposición del gelificante sobre el gel, lo que no permitió que reaccionara completamente con el alginato, o que no hubiera una distribución uniforme sobre el material; estos factores influyen directamente en la medida reológica, ya que si la muestra no es uniforme durante la prueba de viscosidad dinámica, el área de contacto de la geometría con el gel no será suficiente para arrojar una gráfica precisa de su comportamiento, y en caso de que la reticulación no se lleva a cabo con todo el alginato dispuesto en el gel, la viscosidad se verá reducida, ya que como se evidencia en la figura 45 entre más alginato contiene una muestra mayor es su viscosidad dinámica.

- Ensayo 2

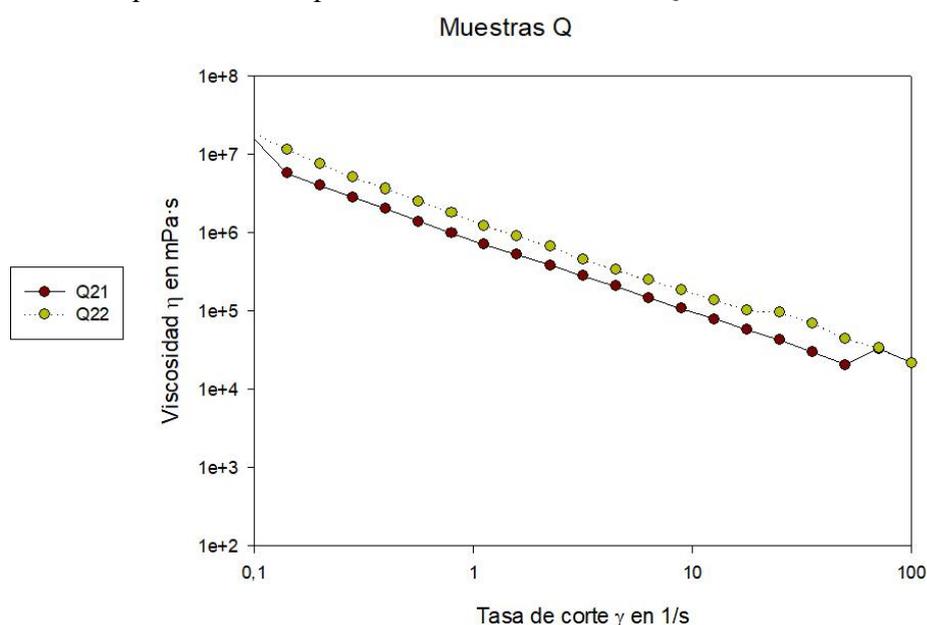
*Estereoscopia*



**Figura 46.** Imagen por estereoscopia de los resultados de las muestras Q. **a** corresponde a la muestra Q21 (10:10 AS:OCMC), **b** muestra Q22 (15:10 AS:OCMC)

*Viscosidad dinámica*

Durante este ensayo se realizó un duplicado de la relación de volúmen con mayor viscosidad obtenida anteriormente (15:10 AS-OCMC ) y una en igual proporción que corresponde a la muestra Q21. Igual que en el primer ensayo los valor de viscosidad fueron altos, desde  $1,894 \times 10^7$  mPa·s que fue el comportamiento de la muestra Q22.



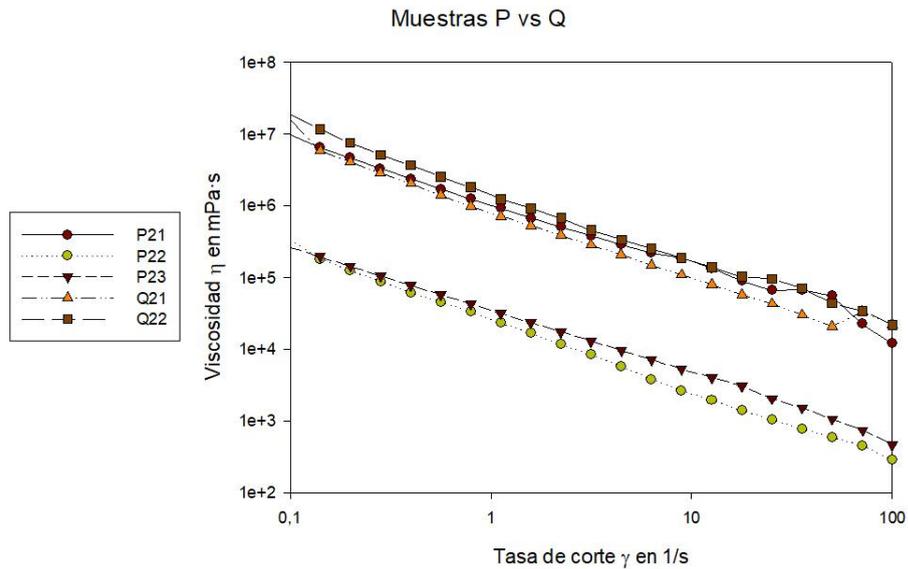
**Figura 47.** Comportamientos viscoelásticos de las muestras Q compuestas por Alginato de Sodio (AS) y Carboximetil Quitosano.

*Análisis de resultados de las muestras Q*

En las imágenes de estereoscopia se observaron pequeñas líneas en el hidrogel de nuevo algunas protuberancias, sin embargo no se dieron las separaciones que sí presentaron las muestras P, estas muestras se vieron más homogéneas en su superficie.

El comportamiento en cuanto a viscosidad de las muestras Q21 y Q22 los valores iniciales son de  $1,81E+07$  y  $1,41E+07$  respectivamente. Siendo la Q21, muestra con igual cantidad de la solución de Alginato de Sodio y de Carboximetil Quitosano la más viscosa tomando en cuenta todos los puntos.

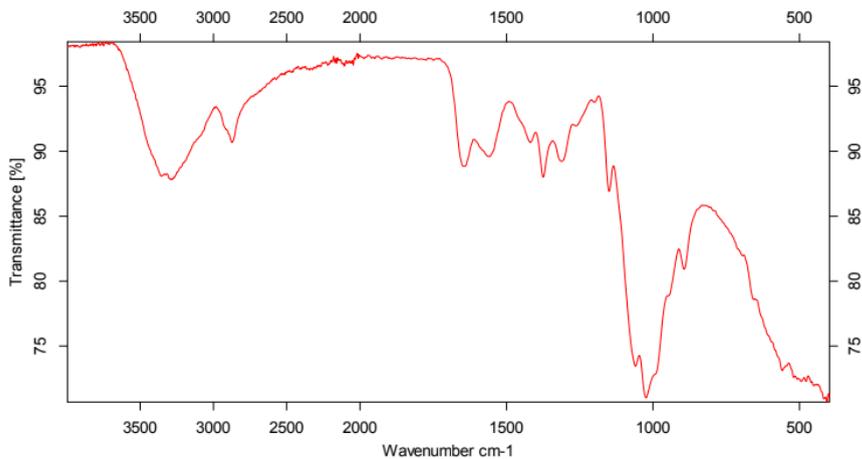
- *Comparación reológica entre P Y Q*



**Figura 48.** Comportamientos viscoelásticos de las muestras P vs Q compuestas por Alginato de Sodio (AS) y Carboximetil Quitosano.

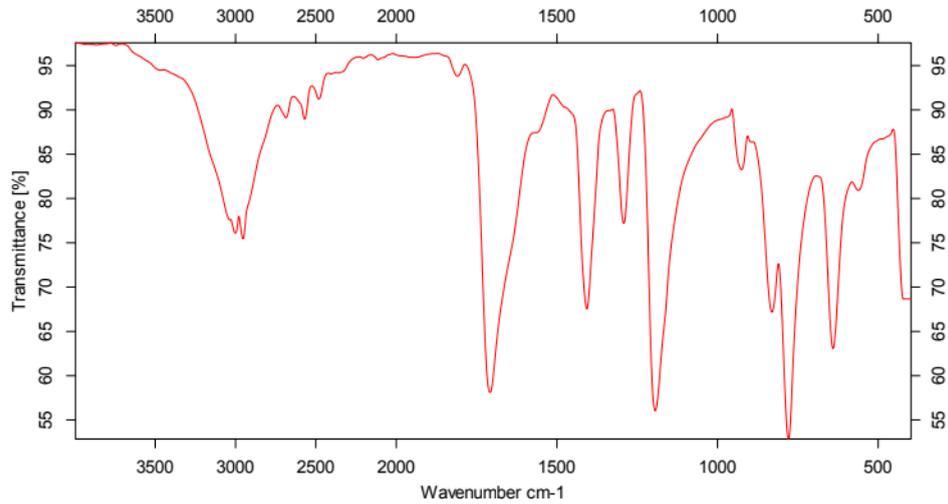
Como se mencionó anteriormente las muestras con una mayor cantidad de alginato reflejaron en las gráficas reológicas una mayor viscosidad dinámica, gracias a la reticulación con el  $CaCl_2$ . Sin embargo la muestra Q21 con una proporción de 50:50 entre AS y OCMC también presentó altos niveles de viscosidad. Todos los ensayos mostraron regularidad en las gráficas logarítmicas, gracias a la uniformidad del gel obtenido.

*Infrarrojo*



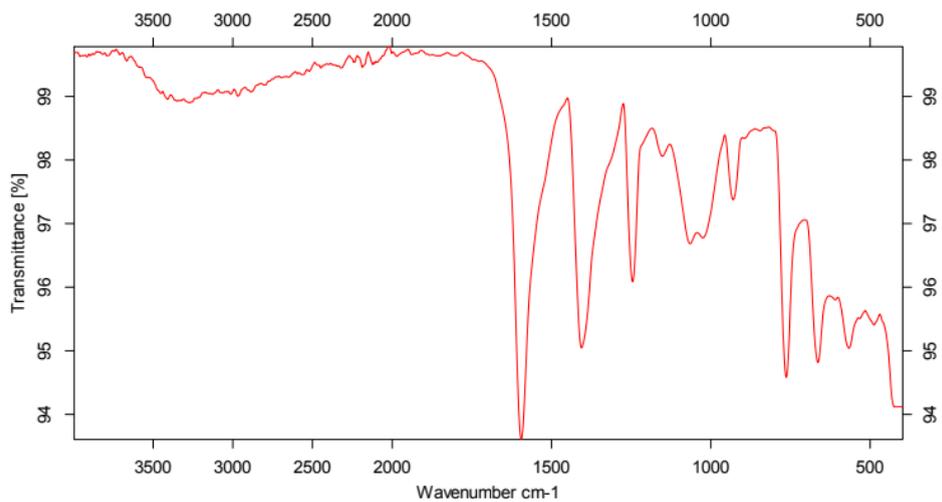
**Figura 49.** Espectro de infrarrojo del Quitosano, FT-IR compacto alpha.

La gráfica resultante de la espectroscopia FTIR del quitosano muestra un pico en el rango de 3500 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde al estiramiento de alcanos, un segundo pico en un valor de 2873  $\text{cm}^{-1}$  que indica la presencia de aldehídos, un tercero en el valor de 1420  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a alcanos: curva  $-\text{CH}_3$ . Se destaca también un pico en un valor de 1085  $\text{cm}^{-1}$  que muestra la presencia de grupos funcionales como alcoholes, éteres, ésteres, ácidos carboxílicos o anhídridos



**Figura 50.** Espectro de infrarrojo del Ácido monocloroacético.

En los resultados de espectroscopia IFTR del ácido monocloroacético se destacan bandas en valores de 3001 y 2953  $\text{cm}^{-1}$



**Figura 51.** Espectro de infrarrojo del Carboximetil Quitosano.

Para el análisis de la espectroscopia por infrarrojo al O-CMC se realizó una comparación entre las bandas obtenidas por Yang et., Figura 15. La primera banda que se puede observar y que se deba a estiramiento de alcanos es de una longitud de onda de 3,300  $\text{cm}^{-1}$ , como lo vemos también en esta figura 49. Luego Yang et al., resaltan los dos siguientes picos de ondas entre 1586 y 1411  $\text{cm}^{-1}$  que son bandas menos pronunciadas que en el infrarrojo de la quitina e

indican la desacetilación, y son dos picos que en la figura actual se diferencian aún más que la reportada en literatura.

### 6.2.3 Elección del material

Una vez realizadas las pruebas preliminares, se llevó a cabo una caracterización de las muestras obtenidas. Fueron sometidas a reología, en una prueba de viscosidad dinámica a 5 mm de GAP; en donde se observó su comportamiento ante un esfuerzo y su viscosidad, estereoscopia, que permitió visualizar los materiales de manera detallada a un nivel macroscópico y espectroscopia infrarroja por transformada de fourier con la cuál se determinó la composición de los materiales y reactivos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las caracterizaciones anteriormente mencionadas, se realizó la elección de una de las propuestas mediante una matriz de selección donde se definieron criterios según los requerimientos establecidos, y a cada uno de ellos se le asignó un valor porcentual según su relevancia en el proceso de obtención del material. A continuación se realiza la descripción de cada criterio según el orden de prioridad:

1. Requerimientos (25%): El cumplimiento de los requerimientos por parte de las muestras realizadas, es un factor que condiciona la funcionalidad del producto propuesto.
2. Comportamiento de la viscosidad (20%): Mediante las evaluaciones reológicas de los materiales preliminares, se estableció un rango adecuado de viscosidad dinámica de 10,000 a 25,000 Pa.s. Teniendo en cuenta los rangos de rigidez que se determinaron en el levantamiento de requerimientos, de 1 a 7 kPa.
3. Economía atómica (15%): La economía atómica fue seleccionada como uno de los criterios más relevantes al momento de presentar una propuesta metodológica para la obtención de un material, ya que mediante esta se logra calcular el rendimiento de las reacciones durante la síntesis de cada hidrogel. Para ello se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Economía Atómica (\% rendimiento)} = \frac{\text{peso molecular / peso en masa del producto}}{\text{suma de los pesos m/ masa de los reactivos}} \times 100 \quad (5)$$

Los hidrogeles obtenidos en las pruebas preliminares se pesaron con el fin de obtener la masa total de material gelificado, puesto que durante la reticulación iónica se genera tanto producto como residuo. Y para hallar la cantidad en masa que se encontraba de cada reactivo en los hidrogeles, se aplicó la ecuación que se muestra a continuación.

$$RG(g) = VR (mL) * CR (\%p/v) \quad (6)$$

RG= Reactivo en el gel.

VR= Volumen del reactivo en el gel.

CR= Concentración del reactivo.

Teniendo en cuenta el volumen requerido de cada reactivo (VR) para la obtención del gel y su concentración (CR), es posible calcular la masa de cada reactivo (RG) en los productos finales.

Como se muestra a continuación para calcular el rendimiento de un hidrogel de 14 mL de PVA y alginato de sodio.

$$RG(g) \text{ alginato} = 6 \text{ mL} * 2 \% \text{ g/mL} \quad (7)$$

$$RG(g) \text{ alginato} = 0.12 \text{ g}$$

De la misma forma se halla la masa de cloruro de calcio y PVA presente en el gel, para aplicarlo en la ecuación de economía atómica

$$\%Rendimiento = \frac{0,6773 \text{ g Hidrogel}}{(0.12 \text{ g } (C_6H_7O_6Na) + 0.16 \text{ g } (C_2H_3OR)_n + 0.012 \text{ g } (CaCl_2))} \times 100$$

$$\%Rendimiento = 232.206 \quad (8)$$

4. Consumo de energía (15% ): El consumo de energía fue calculado según el tiempo que requirió cada metodología para su desarrollo. y los equipos empleados. En el caso de los dos hidrogeles la plancha de calentamiento, nevera y adicionalmente en los materiales de AS-OCMC el liofilizador.

5. Tiempo total de obtención del biomaterial (10%): Se tuvo en cuenta el tiempo de elaboración del gel y de gelificación.

6. Costos y acceso a los materiales y reactivos: Los costos fueron calculados según la masa empleada de cada reactivo para la obtención de un gel y el acceso fue puntuado según la disponibilidad y restricción de los reactivos en el mercado.

*Tabla 9*

*Criterios de selección del material y su justificación.*

<i><b>Criterios</b></i>	<i><b>Medición</b></i>	<i><b>Rangos</b></i>
Tiempo total de obtención del biomaterial	(Σ) Sumatoria del tiempo empleado en cada proceso para la metodología completa.	< 24 horas
Comportamiento de viscosidad dinámica	La viscosidad se definió a partir de los requerimientos de rigidez y se evidencio en las gráficas reológicas.	10.000 - 25.000 Pa.S
Acceso a los materiales y reactivos	Se consideró como un factor limitante en la obtención del biomaterial.	N/A

<i><b>Crterios</b></i>	<i><b>Medición</b></i>	<i><b>Rangos</b></i>
Economía atómica	$\%Rendimiento = \frac{g\ producto}{g\ reactivos} * 100$	>50%
Costos	( $\Sigma$ ) Costos de cada reactivo * g usados	>3,000 COP
Requerimientos	<i>Evaluación en la matriz QFD.</i>	> 250

Las características de cada material fueron evaluadas según los anteriores criterios por medio de una escala de 1 a 3, donde 1 significa que no cumple, 2 que está cercano a los rangos óptimos, y 3 que cumple totalmente con los rangos establecidos para ese criterio. Posteriormente esta evaluación fue relacionada con el porcentaje de ponderación de cada criterio para hallar el porcentaje de cumplimiento de cada material con respecto a los requerimientos de la matriz.

El hidrogel de PVA-AS requiere de 36 horas para su obtención, 24 horas de agitación y 12 de refrigeración, mientras que en el caso del AS-OCMC se requieren 81 para obtener el O-CMC por los procesos de congelación y liofilización, pero una vez se tiene este reactivo el tiempo de elaboración de cada gel es de aproximadamente 15 horas, donde 12 son de refrigeración, esto a su vez se relaciona directamente con el consumo energético de cada propuesta.

El comportamiento de viscosidad dinámica se evaluó por medio de la comparación de las gráficas obtenidas de los ensayos de reología, y estableciendo un rango donde se encontraban dos muestras de PVA-AS y solo una de AS-OCMC, por ello la diferencia en su puntuación. La economía atómica presentó un mejor porcentaje de rendimiento para las muestras de PVA-AS, esto puede atribuirse a la solubilidad de los componentes de los hidrogeles AS-OCMC. y a pesar de que los reactivos empleados en estas metodologías son accesibles, para obtener O-CMC se necesita el metanol que es un reactivo controlado.

La suma de las puntuaciones fue más alta para el gel Polivinil alcohol y Alginato de sodio porque mostró un mejor desempeño en criterios como el comportamiento de viscosidad, la accesibilidad de los reactivos, el consumo energético y la economía atómica que son de los más relevantes. Cabe resaltar que el material compuesto por Carboximetil Quitosano- Alginato de sodio tiene bastante potencial para ser empleado en esta misma área.

Tabla 10

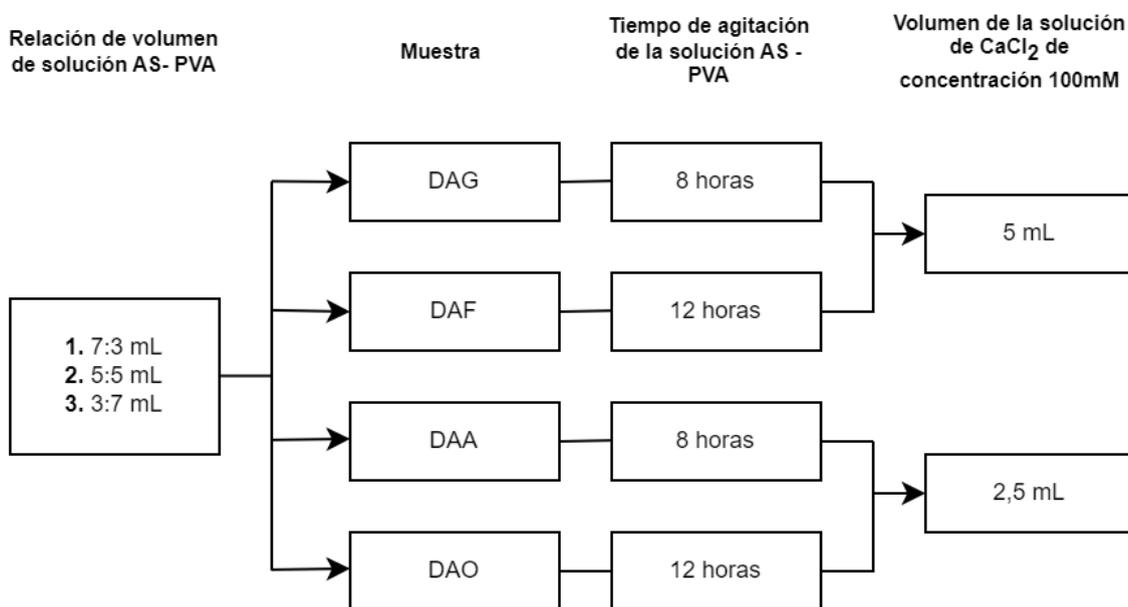
Matriz de selección para el material definitivo

Peso según relevancia	Criterios	PVA-AS		Relación material - criterio	AS-OCMC		Relación material - criterio
		Descripción	Puntaje		Descripción	Puntaje	
10%	Tiempo total de obtención del biomaterial	36 horas	2	0,2	81 horas (Obtención carboxi) 15 horas (elaboración de hidrogeles)	3	0,3
20%	Comportamiento de viscosidad dinámica Rango= 10.000 - 25.000 Pa.S	2 muestras	2	0,4	1 muestra	1	0,2
6%	Acceso a los materiales y reactivos	Accesible	3	0,18	Accesible	2	0,12
15%	Consumo energético	21600 W = Bajo	3	0,45	73800 W = Medio	2	0,3
15%	Economía atómica (Rendimiento)	67,4	3	0,45	58,3	2	0,3
9%	Costos	2787 pesos = Bajo	3	0,27	2792 pesos = Bajo	3	0,27
25%	Requerimientos		3	0,75		3	0,75
1,00	<b>Total</b>		19	2,7		16	2,24

### 6.2.3 Diseño detallado

El diseño experimental empleado es uno de tipo factorial. Este cuenta con dos aplicaciones principales, la selección, donde se identifican los factores que influyen en el experimento, y la optimización, en la que se encuentran los escenarios o condiciones óptimas para un experimento (Hanrahan, G. y Lu, K, 2006). Es decir, cuenta con niveles y subniveles establecidos para obtener un total de número de muestras a obtener.

En primer lugar, para establecer los niveles, se enlistaron las variables involucradas en la metodología de obtención del hidrogel, tales como, tiempos de agitación, temperatura, concentración, cantidad de reactivos, entre otras; y se analizó tanto su influencia en el procedimiento como su comportamiento al realizar pequeñas variaciones. Estas variaciones fueron tomadas como subniveles. En consecuencia del diseño experimental factorial se obtuvieron las muestras definitivas del hidrogel.



**Figura 52.** Niveles y subniveles del diseño experimental (Autoría propia).

Teniendo en cuenta los niveles y subniveles establecidos, el número de muestras con características diferentes es de doce y para cada una se realizaron triplicados, por lo que el total de muestras a obtener es de treinta y seis. Una vez establecido el diseño experimental, se realizó la organización de muestras en cuatro grupos mediante códigos para diferenciar los que cuentan con diferentes parámetros.

Tabla 11

Factores del diseño experimental

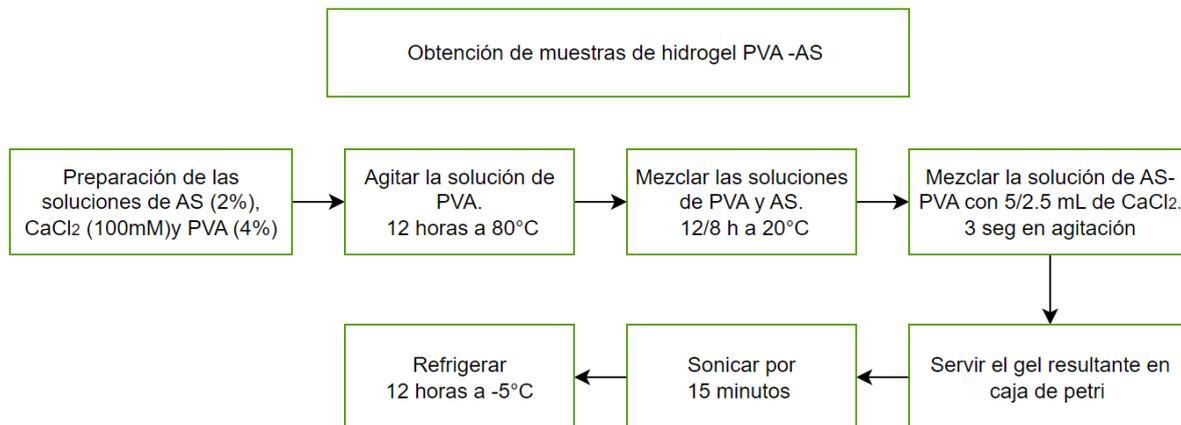
<i>Código de muestra</i>	<i>Número según relación de volúmenes</i>	<i>Relación de volúmenes en mL PVA [4% p/v] AS [2% p/v]</i>	<i>Volumen en mL de la solución de CaCl<sub>2</sub> [100 mM]</i>	<i>Tiempo de agitación de la solución PVA [4% p/v] AS [2% p/v]</i>
DAG	1.1	7:3	5 mL	8 horas
	1.2	7:3		
	1.3	7:3		
	2.1	5:5		
	2.2	5:5		
	2.3	5:5		
	3.1	3:7		
	3.2	3:7		
	3.3	3:7		
DAA	1.1	7:3	2,5 mL	8 horas
	1.2	7:3		
	1.3	7:3		
	2.1	5:5		
	2.2	5:5		
	2.3	5:5		
	3.1	3:7		
	3.2	3:7		
	3.3	3:7		
DAF	1.1	7:3	5 mL	12 horas
	1.2	7:3		
	1.3	7:3		
	2.1	5:5		
	2.2	5:5		
	2.3	5:5		
	3.1	3:7		
	3.2	3:7		
	3.3	3:7		
DAO	1.1	7:3	2,5 mL	12 horas
	1.2	7:3		
	1.3	7:3		
	2.1	5:5		
	2.2	5:5		
	2.3	5:5		
	3.1	3:7		
	3.2	3:7		
	3.3	3:7		

- Metodología de obtención

Para elaborar los hidrogeles definidos en el diseño experimental se siguió la metodología de las pruebas preliminares (Figura 30), pero adicionalmente se realizaron modificaciones según los

resultados obtenidos en estos ensayos. La concentración de las soluciones no se varió, ni el tiempo y temperatura del PVA específicamente.

La mezcla de las soluciones se realizó de acuerdo a las cantidades establecidas en el diseño experimental, como se expone en la tabla 11, y para garantizar uniformidad tanto en la agitación como en la temperatura, las muestras se colocaron en una cámara termostática TS 606-g/2 con agitación constante y temperatura de 20° C.

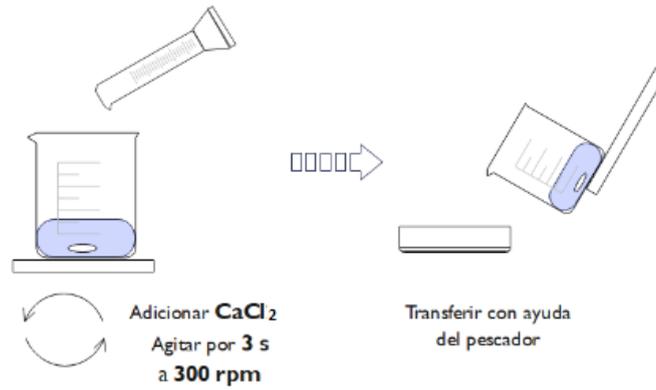


**Figura 53.** Diagrama de flujo de la metodología para obtención de geles definitivos de AS y PVA (Autoría propia)

Una de las deficiencias que se evidenciaron en las pruebas preliminares de este material es que cuando se agregó CaCl<sub>2</sub> en la superficie afectaba el lugar donde se depositaba generando deformidades en el gel que afectaron los resultados reológicos y de topografía esperados, además de que se obtenía un alto contenido de residuo líquido, de lo que se infiere que el reticulante no llegaba a reaccionar completamente con el alginato.

Con el fin de garantizar dicha reacción de reticulación iónica y además la uniformidad en el gel, se propuso una alternativa diferente para mezclar y servir los hidrogeles con el CaCl<sub>2</sub>. Esta estrategia consistió en realizar la mezcla de los polímeros y el reticulante en un vaso de precipitado con ayuda de una placa de agitación a 300 rpm. Gracias a que la gelificación de este material es demasiado rápida se agregó el CaCl<sub>2</sub> mientras el vaso aún seguía en agitación y se dejó allí únicamente 3 segundos, para lograr trasvasar a una caja de petri. En el trasvase del material se usó un pescador para evitar que el agitador magnético cayera dentro del gel, como se observa en la figura 54.

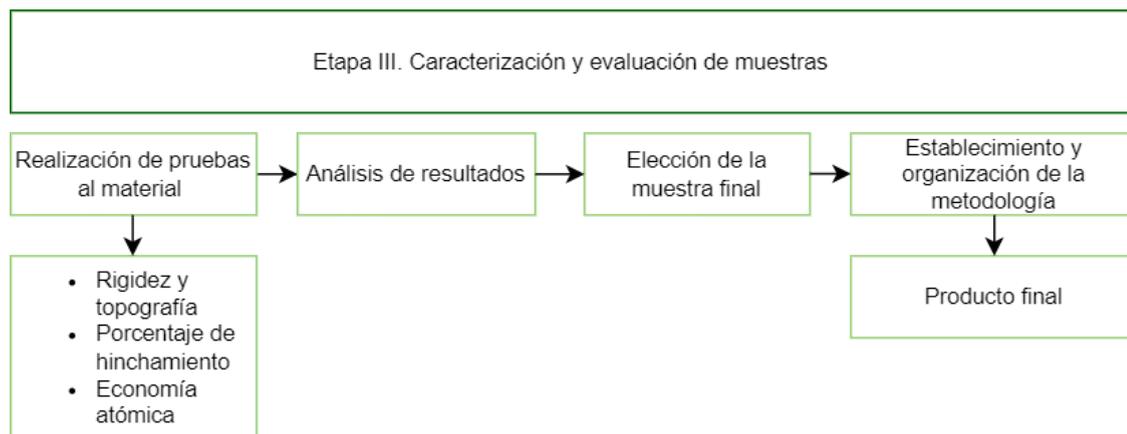
El tiempo del trasvase también debía ser muy corto, ya que la intención era que la mezcla ocupara todo el área de la caja de petri y así tener suficiente material para las caracterizaciones. Por último, se dejaron las muestras en una nevera a -5°C durante 12 horas.



**Figura 54.** Ilustración del método de adición de  $\text{CaCl}_2$  a la mezcla de AS:PVA (Autoría propia).

### 6.3 Tercera etapa: Caracterización y evaluación de muestras

La tercera etapa comprende la evaluación de las muestras obtenidas en el diseño experimental, con el fin de seleccionar la propuesta de solución más efectiva de acuerdo a la problemática identificada.



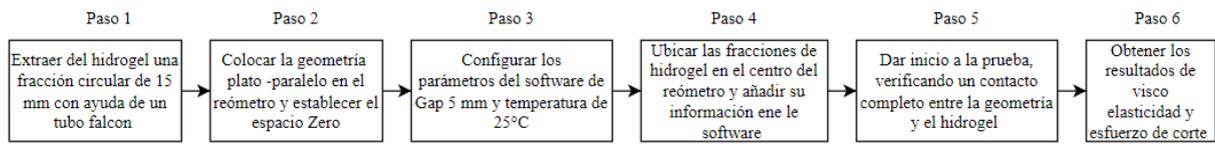
**Figura 55.** Diagrama de flujo de procedimiento a seguir en la etapa III (Autoría propia).

La evaluación constó de dos tipos de pruebas específicas: la microscopía óptica para analizar la topografía y las pruebas reológicas para determinar su rigidez. Adicionalmente se realizaron pruebas de porcentaje de hinchamiento, Economía atómica y análisis de espectros IR.

#### 6.3.1 Metodología para la obtención de muestras definitivas

##### *Viscosidad dinámica*

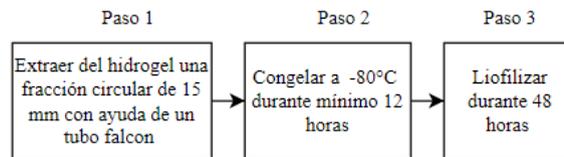
Las evaluaciones reológicas se realizaron según la metodología descrita en la figura 35, pero como se mencionó en el apartado de caracterizaciones de las pruebas preliminares uno de los factores que influye en los resultados de la viscosidad dinámica es la homogeneidad del gel. Así que para garantizar que la geometría del reómetro estuviese en contacto al mismo tiempo con toda la muestra, se extrajo una fracción circular de 15 mm de diámetro, destinada a esta prueba y otra de las mismas características para las evaluaciones de topografía.



**Figura 56.** Metodología de las pruebas reológicas

### *Liofilizado*

Para determinar la morfología de la superficie del hidrogel, se debe realizar un proceso de gelificación, en la mayoría de casos se realiza mediante nitrógeno líquido, sin embargo la congelación para estas muestras se llevó a cabo en un congelador Duo Free U300 a  $-80^{\circ}\text{C}$ , posterior a eso se llevó a cabo el proceso de liofilización en el equipo Lyovapor L-200 para deshidratar el material, esto se realizó a una temperatura de  $-60^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas (Chen et al., 2013). Al momento de obtener las imágenes se realizó un análisis por microscopía óptica y estereoscopia para la evaluación de los requerimientos en el material.



**Figura 57.** Pretratamiento del hidrogel para pruebas de estereoscopia, microscopía e hinchamiento.

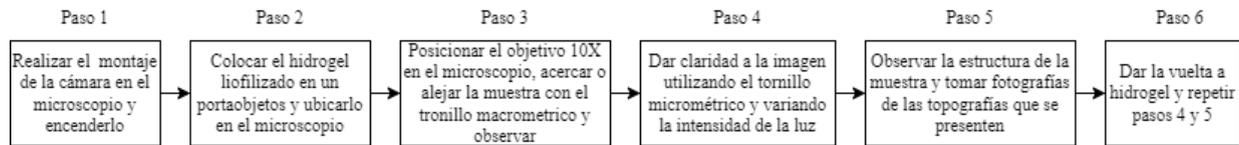
### *Microscopía óptica*

Para una observación clara de la superficie de los hidrogeles se empleó la técnica de estereoscopia utilizada anteriormente en las pruebas preliminares. Después, con el fin de observar los hidrogeles a un nivel mucho más detallado y poder evaluar su topografía, se empleó la técnica de microscopía óptica. Esta se llevó a cabo empleando el microscopio OLYMPUS CX31 el cual permite tomar fotos directamente de una cámara fotográfica permitiendo así una mayor visibilidad y claridad de la imagen.



**Figura 58.** Microscopio OLYMPUS CX31.

El proceso empleado para llevar a cabo esta prueba se muestra a continuación:



**Figura 59.** Pasos a seguir para realizar las pruebas de microscopía óptica.

### *Hinchamiento*

El hinchamiento es una característica fundamental en la elaboración de hidrogeles, ya que algunas de sus propiedades mecánicas y de biocompatibilidad, están dadas por su capacidad de absorber y retener agua. El porcentaje de hinchamiento es una prueba básica para lo cual se extrajo una fracción de los geles ya liofilizados con una masa mínima de 10 mg, esta fue pesada por triplicado y dispuesta en un tubo eppendorf de 2 mL anteriormente pesado. Posteriormente se añadió agua destilada de tal forma que cubriera completamente el hidrogel, en este caso se aforó hasta 1 mL del tubo.

Con el fin de determinar el porcentaje de hinchamiento en función del tiempo de exposición del gel directamente al agua, se procedió a dejarlos inmersos en el agua dentro del tubo por un tiempo específico, empezando por 15 min hasta completar 5 horas.

En el momento en que se cumplía el tiempo de inmersión los tubos se colocaron en una centrifugadora de tubos eppendorf durante 6 minutos a 3,8 rpm sin temperatura definida. así al retirarlos del equipo la extracción del agua restante que no fue absorbida por el gel, se lograba remover con mayor facilidad, y el hidrogel ya hinchado se pesó por triplicado.

Con el proceso descrito anteriormente se obtuvieron las masas de los hidrogeles en diferentes tiempos ya establecidos, sin embargo para calcular el porcentaje de hinchamiento se utilizó la siguiente ecuación:

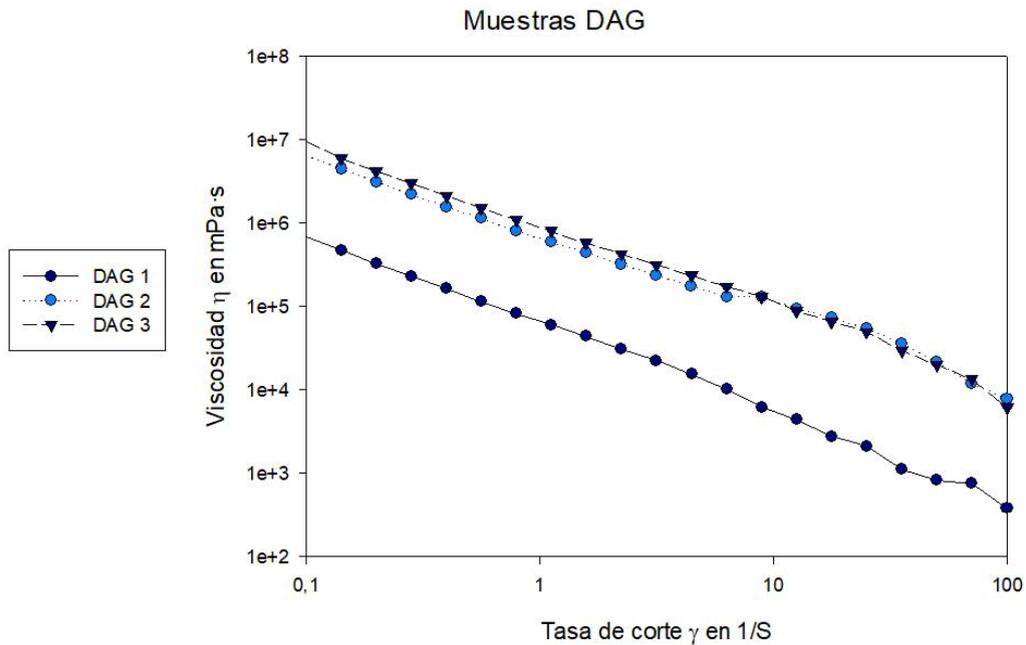
$$\%Hinchamiento(b. s) = \frac{Mx - Mi}{Mi} * 100 \quad (9)$$

Donde Mx se refiere a la masa del hidrogel en un tiempo determinado y Mi a la masa inicial.

### 6.3.2 Caracterizaciones de rigidez y topografía de las muestras definitivas

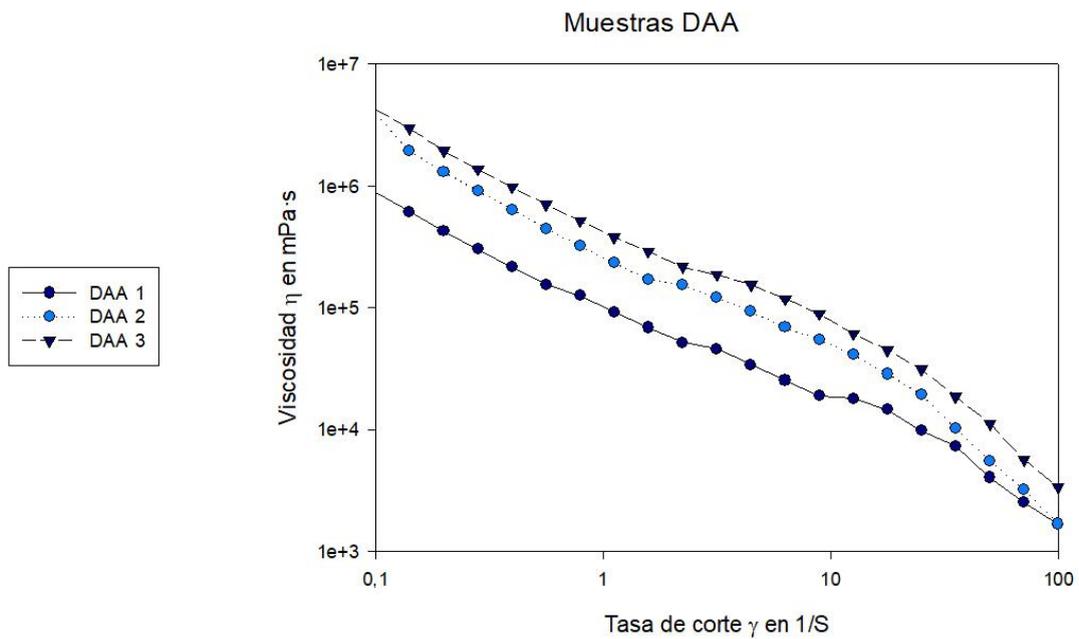
#### Rigidez

#### DAG



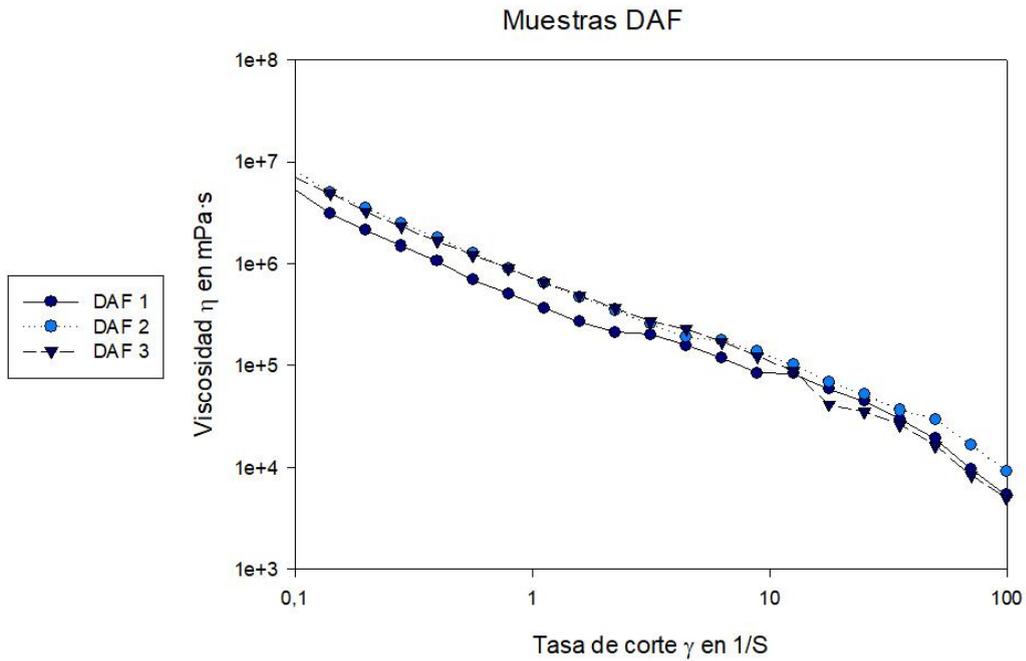
**Figura 60.** Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAG compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).

#### DAA



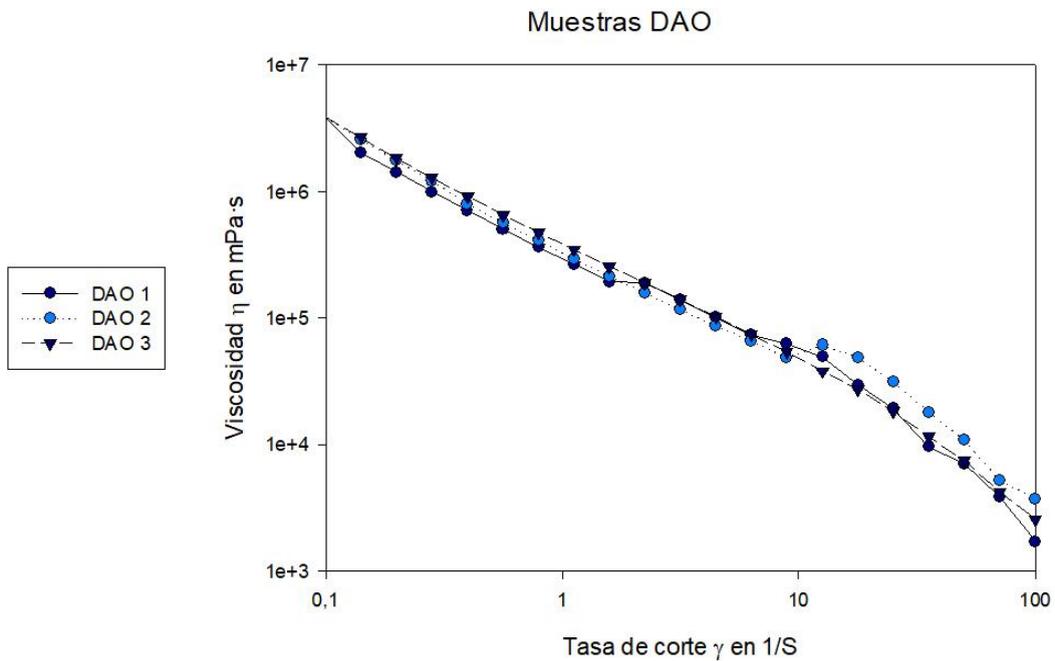
**Figura 61.** Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAA compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS)

## DAF



**Figura 62.** Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAF compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).

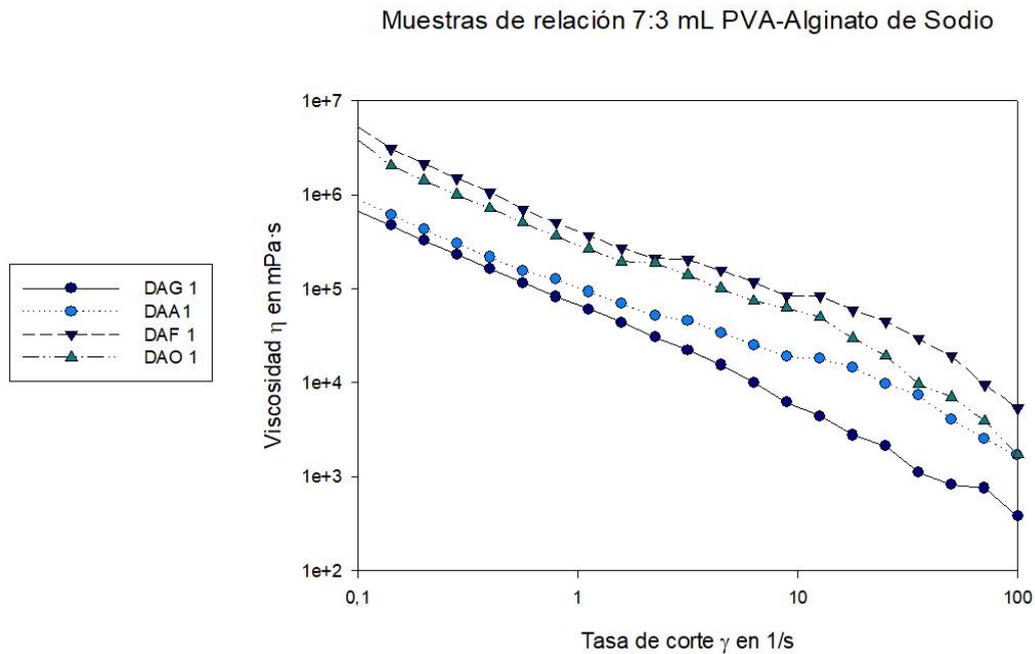
## DAO



**Figura 63.** Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAO compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS).

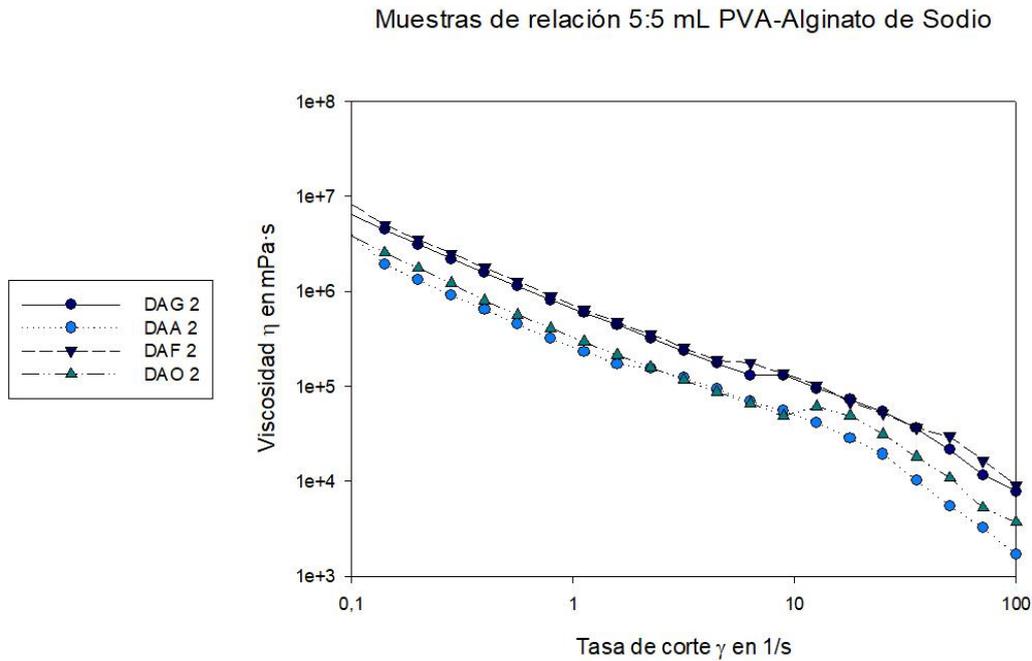
## Resultados generales

### Comparación de muestras 1



**Figura 64.** Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAG, DAA, DAF y DAO compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en relación 7:3 mL.

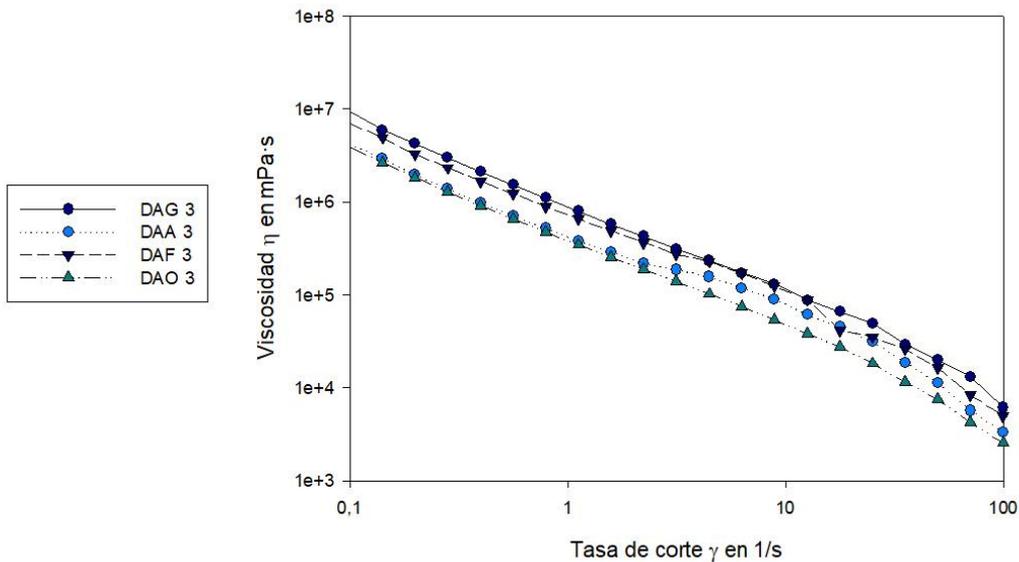
### Comparación de muestras 2



**Figura 65.** Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAG, DAA, DAF y DAO compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en relación 5:5 mL.

### Comparación de muestras 3

Muestras de relación 3:7 mL PVA-Alginato de Sodio



**Figura 66.** Comportamientos viscoelásticos de los promedios de los hidrogeles DAG, DAA, DAF y DAO compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en relación 3:7 mL.

Una vez se tuvieron los valores de cada punto en mPa·s que arroja la prueba de viscosidad para cada una de las treinta y seis muestras, se procedió a tomar el valor del primer punto para realizar la conversión a kPa para poder llevar a cabo el análisis de resultados (Tabla 12).

Tabla 12

Conversión de valores de viscosidad

Muestra	Viscosidad en mPa·s	Viscosidad en kPa·s
DAG 1.1	3,00E+05	0,3
DAG 1.2	1,03E+06	1,03
DAG 1.3	6,96E+05	0,696
DAG 2.1	2,34E+06	2,34
DAG 2.2	6,25E+06	6,25
DAG 2.3	1,07E+07	10,7
DAG 3.1	7,54E+06	7,54
DAG 3.2	1,62E+07	16,2
DAG 3.3	4,63E+06	4,63
DAA 1.1	7,40E+05	0,74
DAA 1.2	1,26E+06	1,26

DAA 1.3	6,69E+05	0,669
DAA 2.1	2,96E+06	2,96
DAA 2.2	1,85E+06	1,85
DAA 2.3	6,97E+06	6,97
DAA 3.1	5,88E+06	5,88
DAA 3.2	4,51E+06	4,51
DAA 3.3	2,25E+06	2,25
DAF 1.1	8,52E+06	8,52
DAF 1.2	5,56E+06	5,56
DAF 1.3	1,84E+06	1,84
DAF 2.1	4,45E+06	4,45
DAF 2.2	1,51E+07	15,1
DAF 2.3	5,25E+06	5,25
DAF 3.1	5,47E+06	5,47
DAF 3.2	5,43E+06	5,43
DAF 3.3	1,09E+07	10,9
DAO 1.1	1,58E+06	1,58
DAO 1.2	3,30E+06	3,3
DAO 1.3	6,60E+06	6,6
DAO 2.1	4,84E+06	4,84
DAO 2.2	2,15E+06	2,15
DAO 2.3	4,53E+06	4,53
DAO 3.1	5,75E+06	5,75
DAO 3.2	2,91E+06	2,91
DAO 3.3	3,02E+06	3,02

Una vez se realizó la conversión de mPa's a kPa's del punto inicial de cada muestra se tomó el resultado del promedio de cada triplicado y se resaltaron los valores que se encontraban en el rango establecido en los requerimientos de 1,5 a 7 kPa.

Tabla 13

Viscosidad en kPa·s de los promedios de los hidrogeles DAG, DAA, DAF y DAO compuestos por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS)

Muestra 1	Viscosidad en kPa·s	Muestra 2	Viscosidad en kPa·s	Muestra 3	Viscosidad en kPa·s
DAG	0,68	DAG	6,43	DAG	9,46
DAA	0,89	DAA	3,93	DAA	4,21
DAF	5,31	DAF	8,27	DAF	7,27
DAO	3,83	DAO	3,84	DAO	3,89

### Análisis de resultados

De las gráficas de viscosidad vs tasa de corte de cada una de las muestras con sus diferentes relaciones de volumen de la solución se pudo observar que el comportamiento es lineal y que en común, todas presentaron valores de viscosidad mayores en la muestra 3, la cual tiene mayor cantidad de alginato de sodio.

En cuanto a la comparación por relación de volúmenes de la solución PVA-AS, las muestras DAF y DAG, las cuales contienen mayor cantidad de solución de cloruro de  $\text{CaCl}_2$ , presentaron valores de viscosidad más altos que los de las muestras DAA y DAO. Lo anterior se confirma en la tabla 13 donde se muestran los promedios en kPa·s de cada muestra según su relación de volumen, pues si se observa por ejemplo la muestra DAA en comparación a la DAF, la primera presenta valores de 0,89 kPa·s y la segunda de 5,31 kPa·s cuando hay mayor cantidad de PVA, lo mismo sucede en las relaciones de igual cantidad de volumen y cuando hay mayor cantidad de Alginato de sodio en la muestra.

Las muestras DAA y DAO mostraron buenos resultados en esta prueba ya que al menos dos de sus relaciones de volumen de la solución PVA-AS se encuentra en el rango de 1,5 a 7 kPa necesario para que se promueva la diferenciación de los precursores de oligodendrocitos.

### Topografía

Para llevar a cabo la evaluación de topografía se seleccionó una muestra de cada triplicado correspondiente a cada grupo: DAG, DAA, DAF y DAO, es decir, se evaluaron un total de 12 muestras.

Los resultados obtenidos de las pruebas de estereoscopía y microscopía óptica para cada una de las 12 pruebas se muestran a continuación:

## DAG

### - Estereoscopia

1.



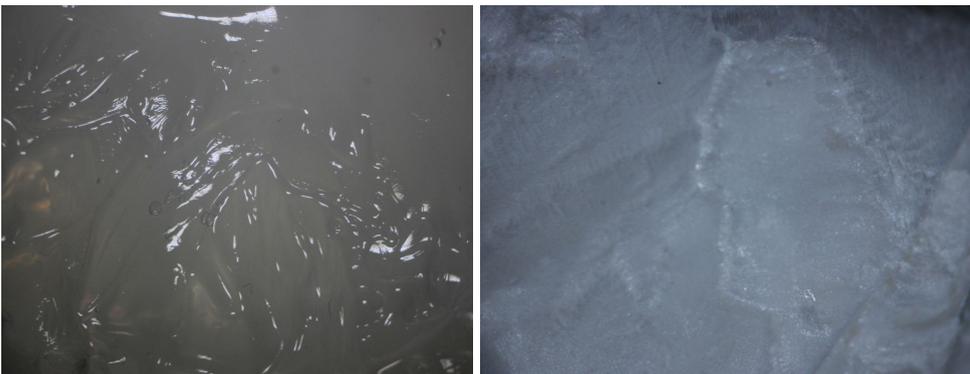
**Figura 67.** Imágenes de estereoscopia del hidrogel DAG compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 7 y 3 mL respectivamente en su estado normal y después del proceso de liofilizado.

2.



**Figura 68.** Imágenes de estereoscopia del hidrogel DAG compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 5:5 mL en su estado normal y después del proceso de liofilizado.

3.



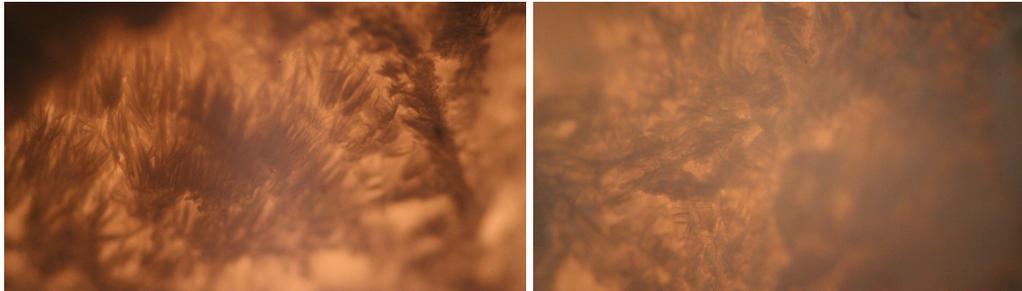
**Figura 69.** Imágenes de estereoscopia del hidrogel DAG compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 3 y 7 mL respectivamente en su estado normal y después del proceso de liofilizado.

Las muestras DAG se llegaron a gelificar en muy poco tiempo por lo que al ser transferidas a las cajas de petri no ocupó toda el área si no que se concentró en el centro, y fue mucho más

rígido en comparación a los demás, debido a la cantidad de  $\text{CaCl}_2$  . Por esta misma razón se observa en la imagen 64, donde es mayor la proporción de alginato, que el gel que se obtuvo fue mucho más denso y en relación a las figuras 63 y 62 no presentó porosidades.

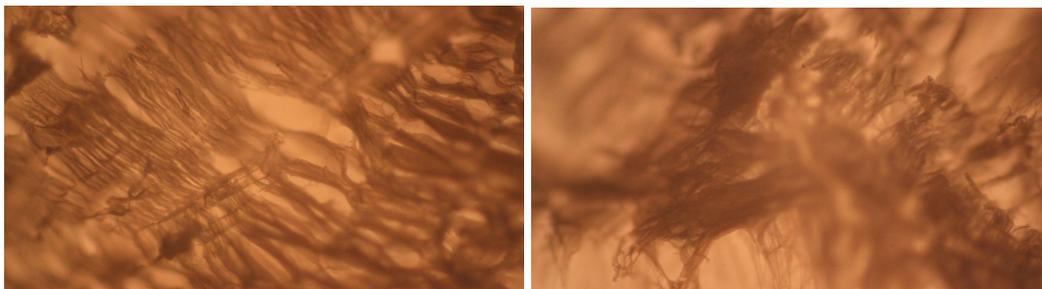
- **Microscopía óptica**

1.



**Figura 70.** Micrografías ópticas del hidrogel DAG compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 7 y 3 mL respectivamente.

2.



**Figura 71.** Micrografías ópticas del hidrogel DAG compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 5:5 mL .

3.



**Figura 72.** Micrografías ópticas del hidrogel DAG compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 3 y 7 mL respectivamente.

De las imágenes obtenidas en las muestras DAG se puede observar que en las del nivel 1 se presentan pequeñas fibras adheridas a la superficie pero no conectadas entre sí. También se presentan entrecruzamientos, los cuales evidencian la reacción del agente reticulante y la solución compuesta. En el nivel 2 se observan las fibras orientadas e interconectadas entre sí. Estas se encuentran en la mayoría del hidrogel, lo que puede afectar de manera positiva a los oligodendrocitos, ya que estas células responden favorablemente a este tipo de topografía. Por último, en el nivel 3 se presentan fibras alineadas pero en ciertas partes del hidrogel, no en su mayoría, pues se hay dominancia de entrecruzamientos, esto puede deberse a la composición

de este, pues cuenta con un 70% de alginato de sodio como componente, por lo que reacciona de manera más notoria con el cloruro de calcio al momento de la gelificación.

## DAA

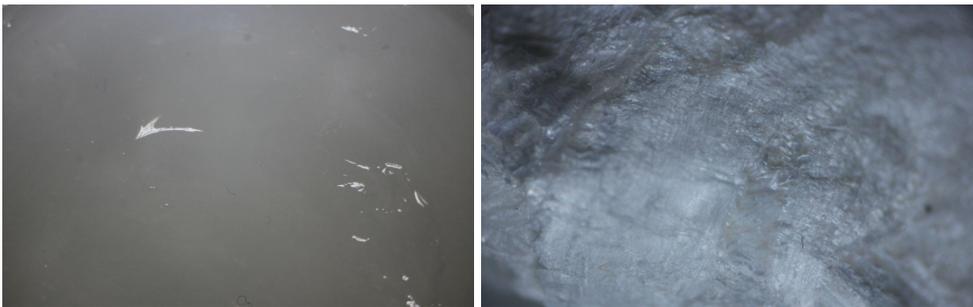
### - Estereoscopia

1.



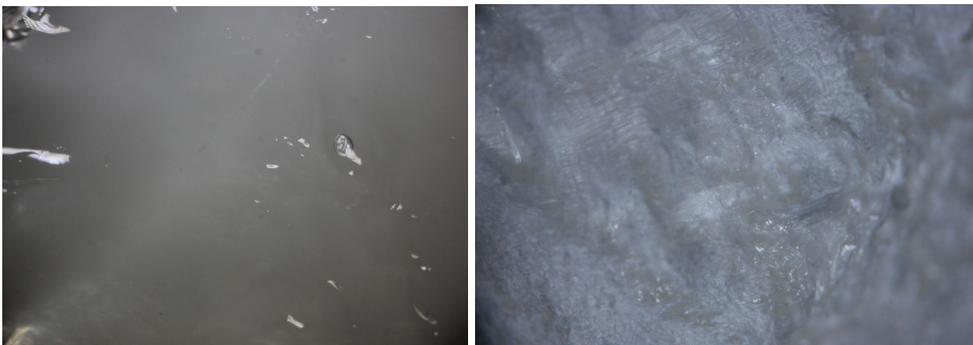
**Figura 73.** Imágenes de estereoscopia del hidrogel DAA compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 7 y 3 mL respectivamente en su estado normal y después del proceso de liofilizado.

2.



**Figura 74.** Imágenes de estereoscopia del hidrogel DAA compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 5:5 mL en su estado normal y después del proceso de liofilizado.

3.



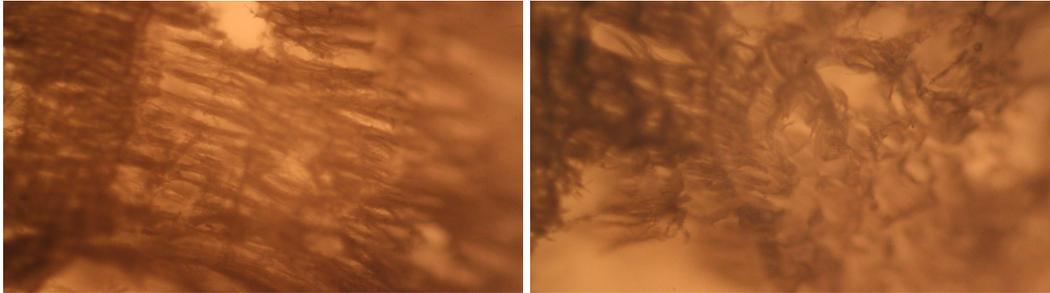
**Figura 75.** Imágenes de estereoscopia del hidrogel DAA compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 3 y 7 mL respectivamente en su estado normal y después del proceso de liofilizado.

En las imágenes de estereoscopia del hidrogel en su estado húmedo de las tres muestras se puede observar que son bastante lisas en su superficie, lo que indica que la mayoría de la

solución compuesta logró en su mayoría reaccionar con el agente reticulante  $\text{CaCl}_2$  de manera uniforme. Por otro lado, las muestras liofilizadas muestran pequeñas arrugas en la parte superficial del hidrogel y a detalle se pueden observar la estructura de las fibras que lo componen.

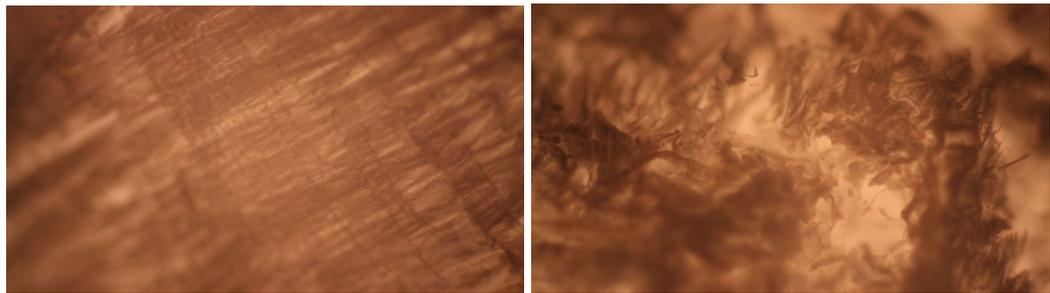
- **Microscopía óptica**

1.



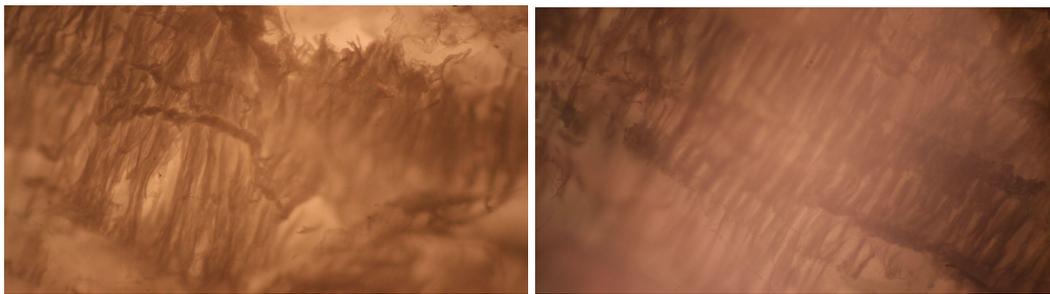
**Figura 76.** Micrografías ópticas del hidrogel DAA compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 7 y 3 mL respectivamente.

2.



**Figura 77.** Micrografías ópticas del hidrogel DAA compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de sodio (AS) en una relación 5:5 mL.

3.



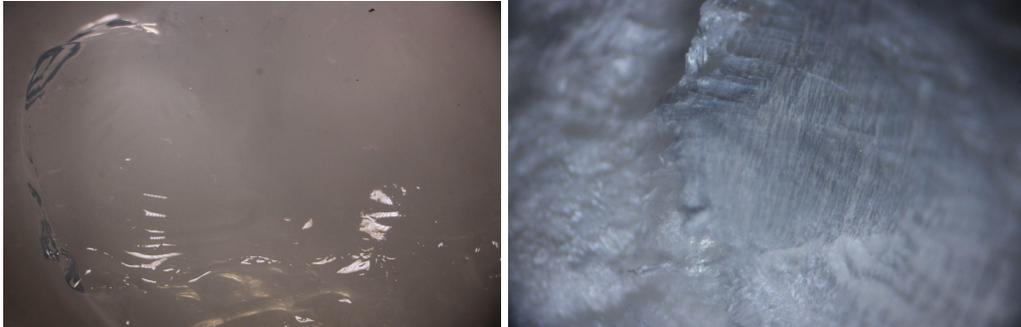
**Figura 78.** Micrografías ópticas del hidrogel DAA compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 3 y 7 mL respectivamente.

Teniendo en cuenta las imágenes obtenidas en los hidrogeles DAA se puede observar que el que corresponde al nivel 1 presenta fibras alineadas en su morfología, al igual que interconexiones entre sí en la mayoría del mismo. En los hidrogeles del nivel 2 y 3 también se observan las fibras alineadas, que como se mencionó anteriormente, llegan a brindar un buen entorno de crecimiento celular.

## DAF

### - Estereoscopia

1.



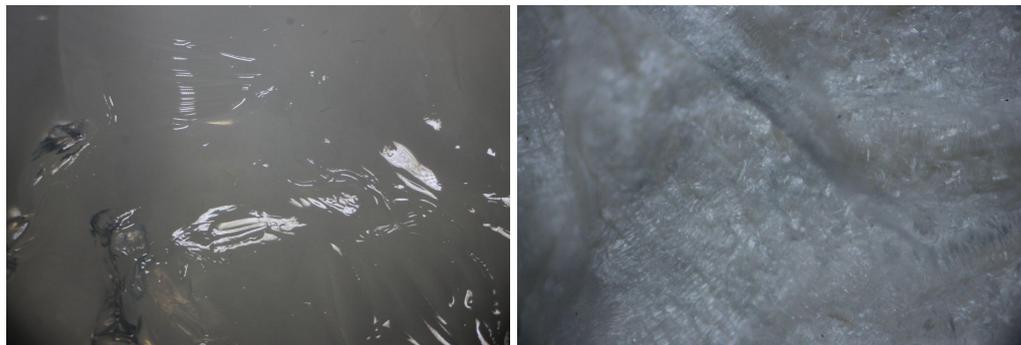
**Figura 79.** Imágenes de estereoscopia del hidrogel DAF compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 7 y 3 mL respectivamente en su estado normal y después del proceso de liofilizado.

2.



**Figura 80.** Imágenes de estereoscopia del hidrogel DAF compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 5:5 mL en su estado normal y después del proceso de liofilizado.

3.



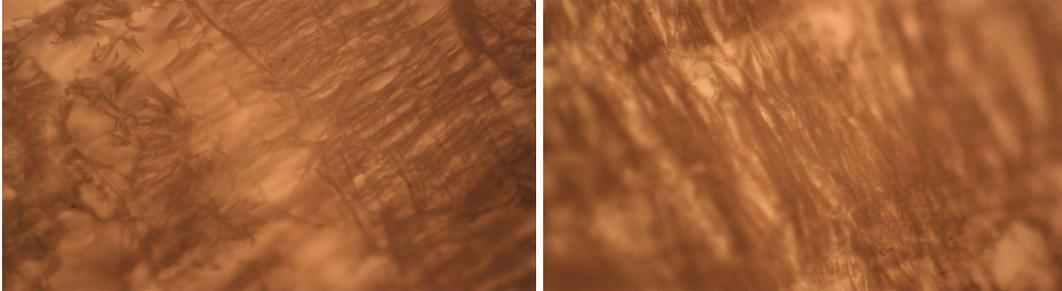
**Figura 81.** Imágenes de estereoscopia del hidrogel DAF compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 3 y 7 mL respectivamente en su estado normal y después del proceso de liofilizado.

Los tres hidrogeles en su estado húmedo presentan rugosidad en la superficie, por lo que se puede afirmar que no se dio una gelificación uniforme y se presentan un tipo de montañas mucho más duras que otras partes del hidrogel, esto es más evidente en la muestra 3. Una vez

liofilizados se puede ver que en la muestra 1 se presentan fibras muy finas, mientras que en las muestras 2 y 3 hay mayor presencia de surcos y rugosidad.

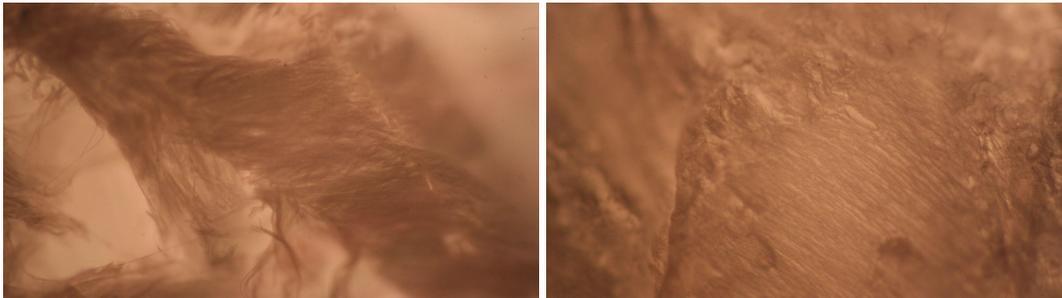
- **Microscopía óptica**

1.



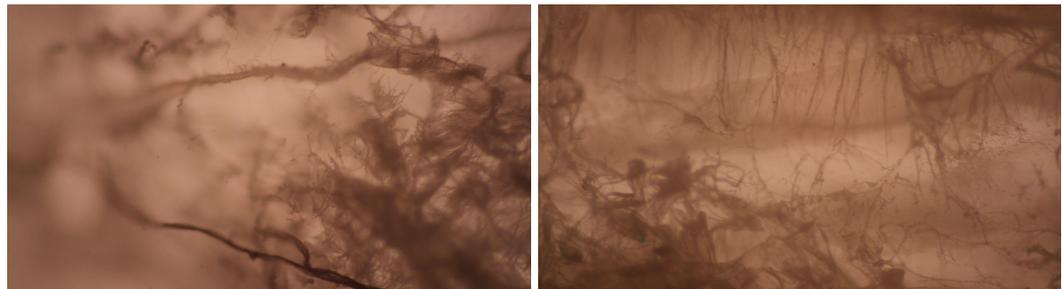
**Figura 82.** Micrografías ópticas del hidrogel DAF compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 7 y 3 mL respectivamente.

2.



**Figura 83.** Micrografías ópticas del hidrogel DAF compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 5:5 mL.

3.



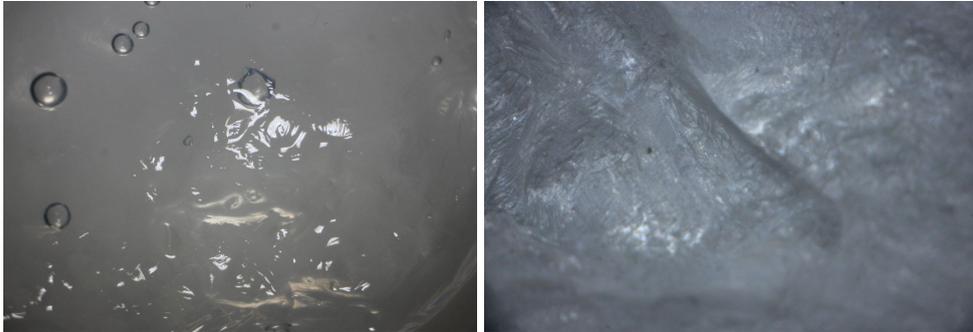
**Figura 84.** Micrografías ópticas del hidrogel DAF compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 3 y 7 mL respectivamente.

En las imágenes obtenidas se destacan fibras largas, sin embargo varía de acuerdo a la relación de volúmenes entre PVA y AS, entre mayor porcentaje de alginato menor es la orientación y organización de las fibras, en el nivel 3 no se logran distinguir con tanta claridad como en las demás, pero se evidencia un entrecruzamiento. Las fibras del nivel 1 son significativamente más delgadas y organizadas que las del nivel 2.

## DAO

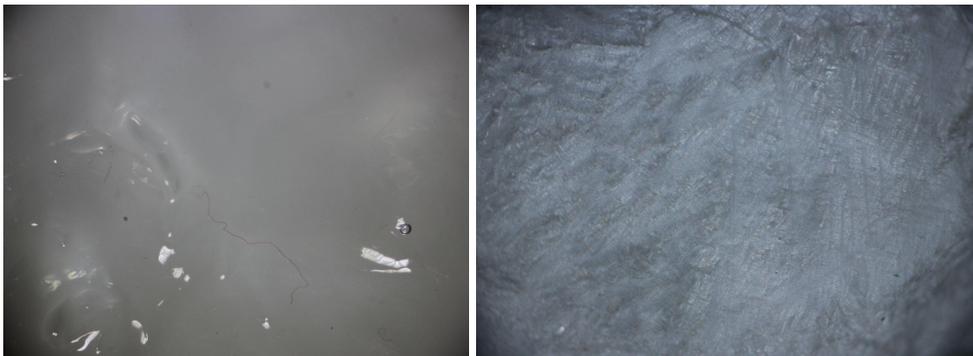
### - Estereoscopia

1.



**Figura 85.** Imágenes de estereoscopia del hidrogel DAO compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 7 y 3 mL respectivamente en su estado normal y después del proceso de liofilizado.

2.



**Figura 86.** Imágenes de estereoscopia del hidrogel DAO compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 5:5 mL en su estado normal y después del proceso de liofilizado.

3.



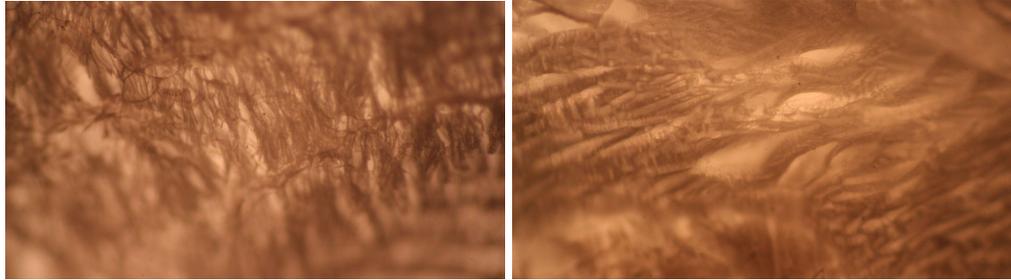
**Figura 87.** Imágenes de estereoscopia del hidrogel DAO compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 3 y 7 mL respectivamente en su estado normal y después del proceso de liofilizado.

Durante el proceso de servida, el grupo DAO no presentó protuberancias y se expandió por toda la caja de petri. La superficie fue uniforme y ligeramente plana. En las imágenes del gel

liofilizado se logran observar surcos en diferentes direcciones y de diferentes áreas, más no porosidades.

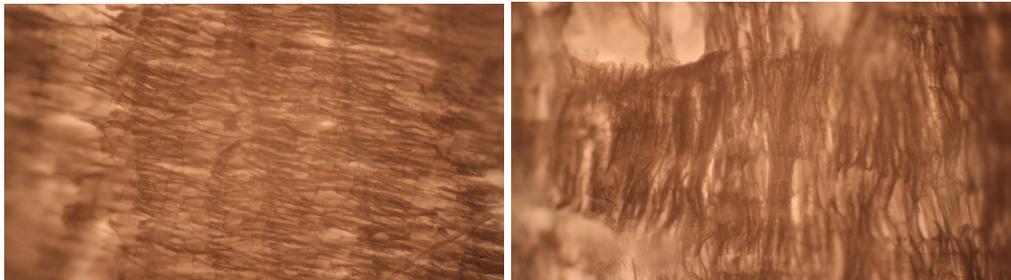
- **Microscopía óptica**

1.



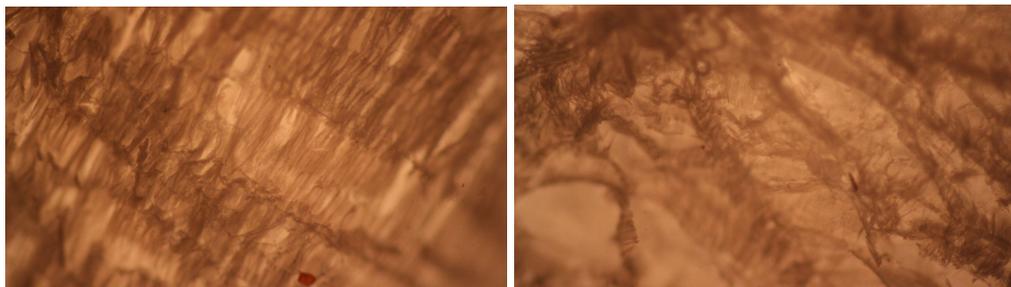
**Figura 88.** Micrografías ópticas del hidrogel DAO compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 7 y 3 mL respectivamente.

2.



**Figura 89.** Micrografías ópticas del hidrogel DAO compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 5:5 mL.

3.



**Figura 90.** Micrografías ópticas del hidrogel DAO compuesto por Polivinil Alcohol (PVA) y Alginato de Sodio (AS) en una relación de 3 y 7 mL respectivamente.

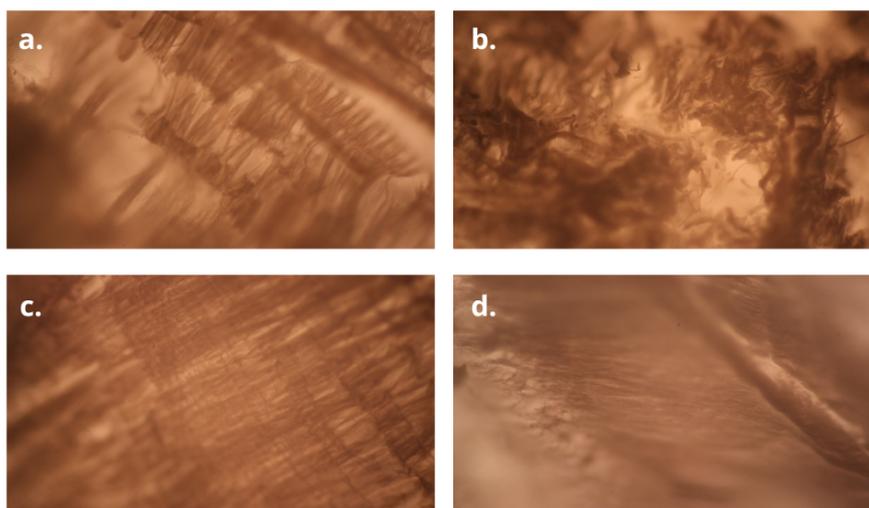
Este grupo de muestras presenta una orientación muy clara en sus fibras, incluso a pesar de las diferentes composiciones de cada una. Las fibras son delgadas y están muy unidas entre sí, no se logran ver espacios tan grandes, ni protuberancias en la superficie. Además son largas y continuas, no logra evidenciar alguna interrupción en su organización. Entre ellas la superficie más homogénea que se llega a observar es la del nivel 2 donde el volumen de PVA y AS son iguales.

- *Topografías obtenidas*

Cada muestra presentó diferentes superficies que se observaron por medio de microscopía óptica, sin embargo incluso dentro de un mismo gel se encontraron diferentes topografías. En la figura 86 se muestra un ejemplo de diferentes regiones del gel DAA 2, donde en la Figura 86 a se observan fibras cortas y con espacio entre ellas, mientras que en la Figura 86 c se evidencian fibras largas, con un grosor más delgado y se reduce el espacio entre cada una. Mientras que en la Figura 86 b. no se logran observar fibras tan definidas, solo el entrecruzamiento entre los materiales y poros entre sí.

Además de las fotografías mencionadas, se obtuvieron imágenes de micrografías con fibras alineadas, con un grosor muy fino y orientación definida como se evidencia en la figura 86 d. Donde a parte de unos surcos representativos del entrecruzamiento, presenta una superficie plana de fibras ordenadas.

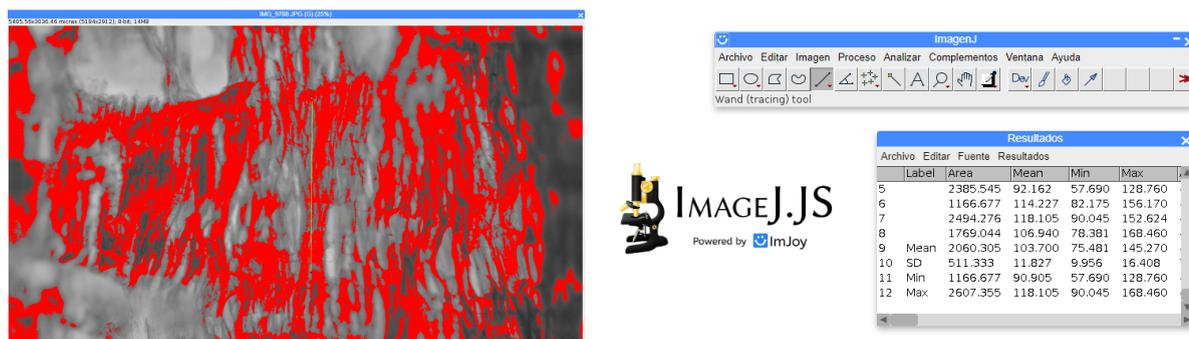
Estas imágenes son evidencia de que existe una organización entre las fibras, sin embargo no hay una secuencia repetitiva que se clasifique como un patrón, cumpliendo uno de los requerimientos establecidos en el diseño conceptual. La mayor organización se presentó en las muestras DAO y DAA, muestras que tenían en común la cantidad de  $\text{CaCl}_2$  (2,5 mL), mientras que los entrecruzamientos fueron más prominentes en las muestras DAF y DAG, ya que son generados tras la reticulación del alginato de sodio, cuando existe un mayor volumen de agente reticulante con la misma cantidad del polímero, las interacciones entre las cadenas poliméricas son más estables por lo cual la viscosidad aumenta y los entrecruzamientos son más evidentes.



**Figura 91.** Micrografías ópticas del hidrogel **a, b, c** (DAA 2), **d** (DAO 1) . 10X

- *Análisis de longitud de fibras*

Se analizaron las micrografías obtenidas en el software image J.JS, en el cual se calcularon las longitudes de fibras continuas que lograron observar en las imágenes. Esto se realizó basado en una calibración de escala según las micras observadas en un objetivo de 10X por un microscopio óptico. De esta manera se seleccionaron las fibras visibles y el programa realizó un promedio de las medidas tomadas en cada imagen.



**Figura 92.** Interfaz del software Image J.JS durante una medición de las fibras en una micrografía óptica del gel DAG 2.

Las muestras con una longitud de fibra más alta fueron DAF 2 y DAA 1 y 3; mientras que DAG 1 fue la que menos longitud presentó, tal como se logra evidenciar en las microscopías, Figura 65.

*Tabla 14*

*Longitud de fibras obtenida por ImageJ.JS*

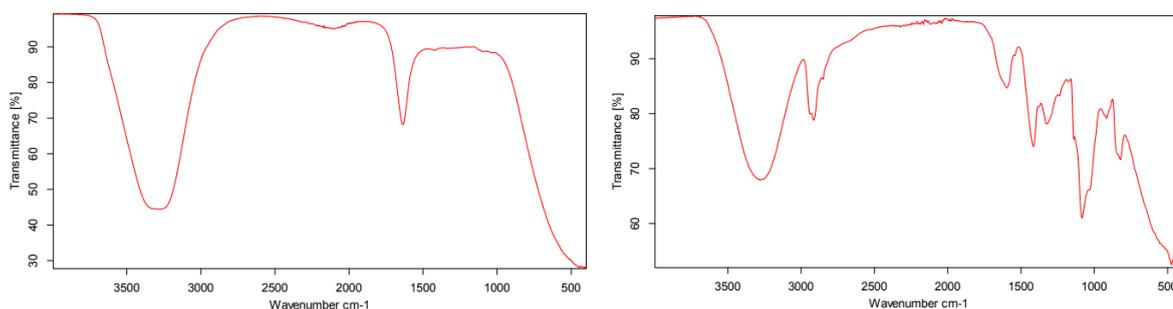
Muestra	Promedio de longitud de fibras (mm)
DAG 1	0.771
DAG 2	1.137
DAG 3	0.673
DAA 1	1.155
DAA.2	2.277
DAA 3	1.058
DAF 1	1.680
DAF 2	2,900
DAF 3	2,271
DAO 1	2,023
DAO 2	1,975
DAO 3	1,118

### 6.3.3 Pruebas adicionales

Además de las caracterizaciones reológicas y topográficas, se realizaron 3 pruebas más para lograr caracterizar no solo el hidrogel, si no la metodología de obtención, teniendo en cuenta los criterios de química verde. Se llevó a cabo espectroscopia por infrarrojo, capacidad de hinchamiento y economía atómica.

## Espectroscopia infrarrojo

Una muestra de cada triplicado, en total 12 muestras distintas, fueron sometidas a una espectroscopia infrarroja en estado húmedo y posteriormente liofilizado, ya que como se logra observar en la figura 99 los grupos funcionales pueden observarse en el gel seco mientras que debido a la retención de agua en el gel húmedo se obtuvieron solo resultados del agua y una banda propia del alginato. La banda en la región entre 3,500 y 3.000  $\text{cm}^{-1}$  en el gel húmedo es mucho mayor que cuando la muestra liofilizada, esto se debe a que en este espectro existen más grupos hidroxilo, provenientes en este caso del agua que ha almacenado el gel. En cambio de 500 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  en la imagen liofilizada se alcanza a observar la presencia de enlaces propios de los componentes, lo que se conoce como huella digital. Se muestran enlaces simples, triples o dobles del hidrogel (Berthomieu, et al., 2009).

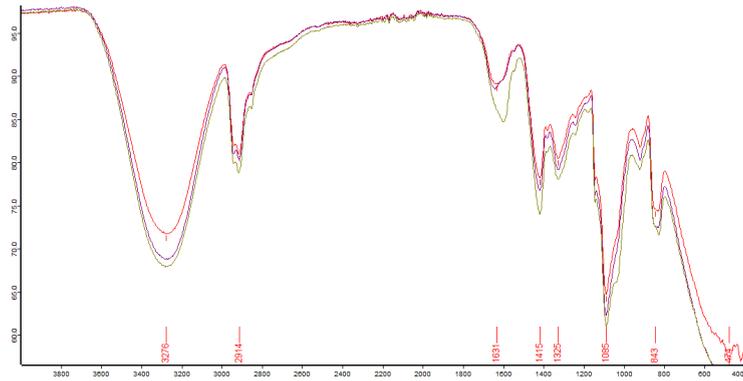


**Figura 93.** Imágenes de estereoscopia por infrarrojo a) Muestra DAG 1 húmeda. b) Muestra DAG 1 liofilizada.

Las bandas entre 3,300  $\text{cm}^{-1}$  y 2,800  $\text{cm}^{-1}$  surgen como consecuencia del PVA, como se observa en la figura 99, Es por esa razón que en la figura 99, donde la relación de volumen contiene una mayor proporción de PVA presenta picos más pronunciados que aquella donde el volumen de alginato es mayor, figura 99. Igualmente en la huella digital se observan dos picos entre los valores de 1,100 y 1,400  $\text{cm}^{-1}$  gracias al estiramiento de grupos alcohol C-OH del PVA. Y respecto al alginato se observaron bandas entre 1,700 y 1,400  $\text{cm}^{-1}$  debido a los estiramientos de los grupos éster (Gómez, et al., 2018).

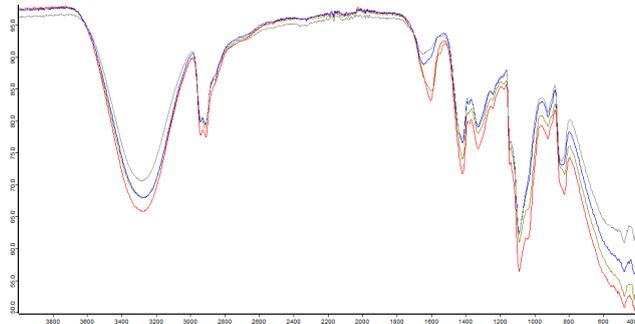
Las relaciones de volúmenes dispuestas en los geles, generan una respuesta diferente que se logra observar mediante esta prueba, como se muestra en la figura 101 la muestra DAG 1 70% PVA -30% AS presenta picos más marcados que las otras composiciones. Sin embargo, no solo las cantidades de los polímeros afectan el resultado de la estereoscopia, si no también sus condiciones.

Se compararon las muestras con las mismas relaciones de volúmenes con variables del diseño experimental diferentes, como el tiempo de agitación y la cantidad de  $\text{CaCl}_2$ . Allí se observó que las muestras DAA, con 2,5 mL de  $\text{CaCl}_2$  cuentan con picos predominantes en la relación 70- 30 PVA:AS, Mientras que las muestras DAO lo son en la relación 50:50 PVA:AS. Y para la relación con más porcentaje de alginato corresponde la muestras DAF con una alta cantidad de  $\text{CaCl}_2$  y un tiempo máximo de 12 horas.



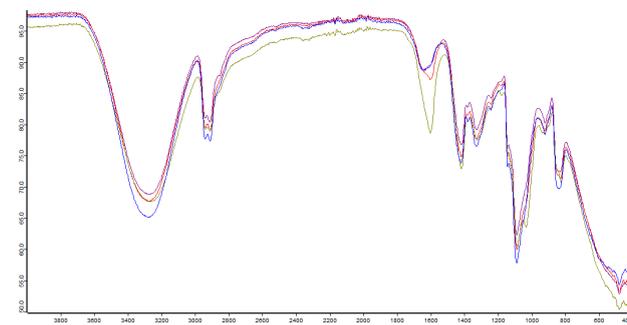
**Figura 94.** Imágen de estereoscopias por infrarrojo a) DAG 1 (verde). b) DAG 2 (azul). b) DAG 3 (roja).

70-30

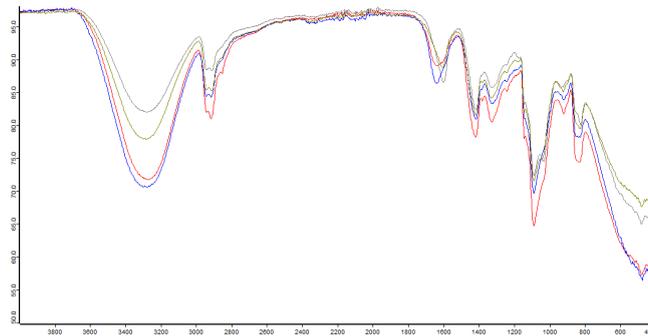


**Figura 95.** Imágen de estereoscopias por infrarrojo relaciones 70 PVA - 30 AS. a) DAG 1(verde) b) DAA 1 (rojo). c) DAF 1 (azul). d) DAO 1 (gris).

50-50

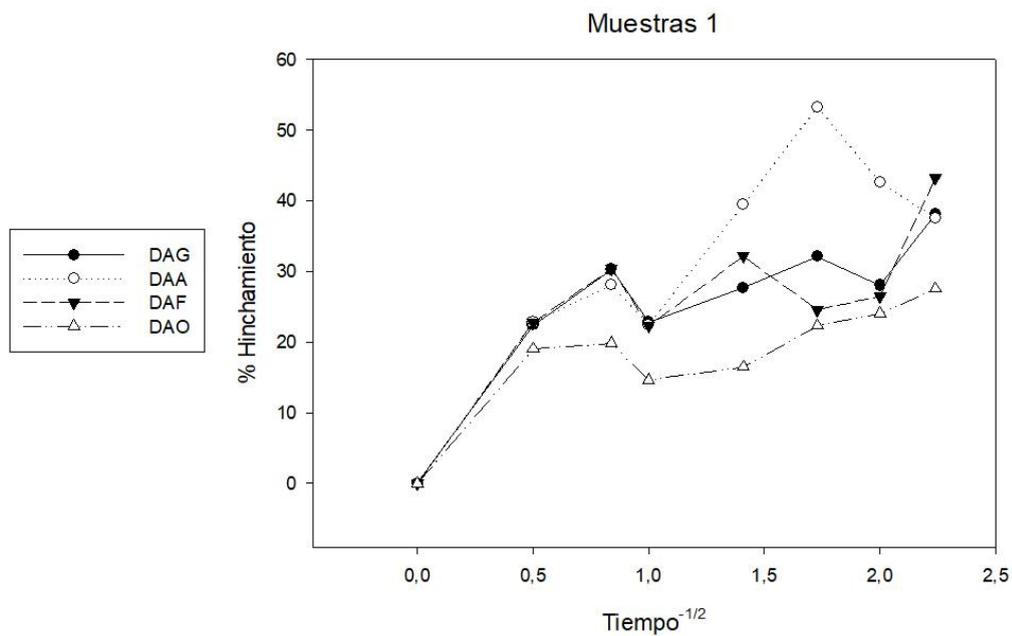


**Figura 96.** Imágen de estereoscopias por infrarrojo relaciones 50 PVA - 50 AS. a) DAG 2 (morado) b) DAA 2 (verde). c) DAF 2 (rojo). d) DAO 2 (azul).

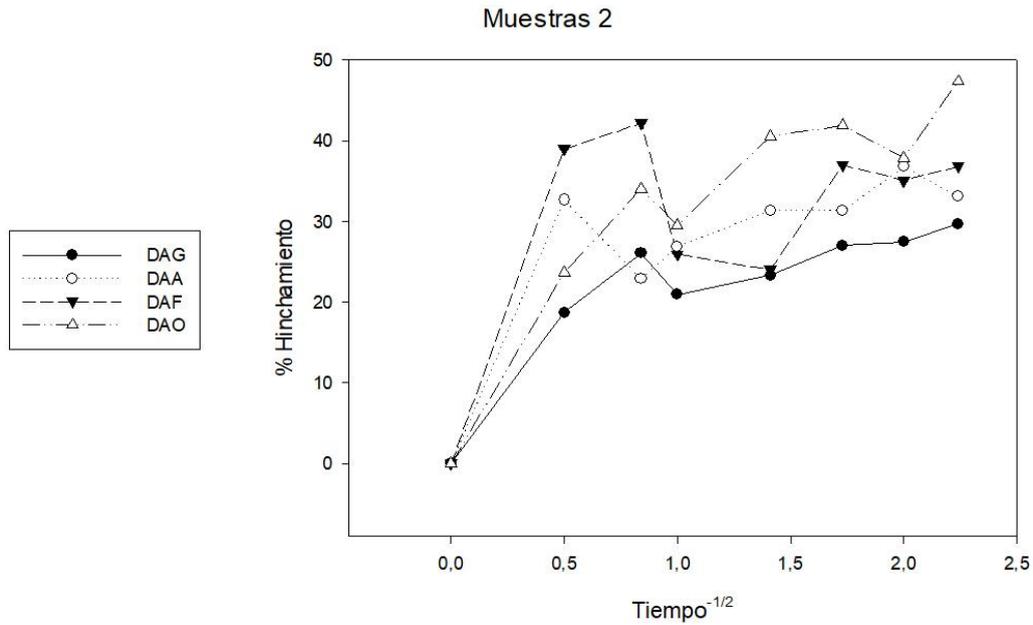


**Figura 97.** Imágen de estereoscopias por infrarrojo relaciones 30 PVA - 70 AS. a) DAG 3 (rojo) b) DAA 3 (gris). c) DAF 3 (azul). d) DAO 3 (verde).

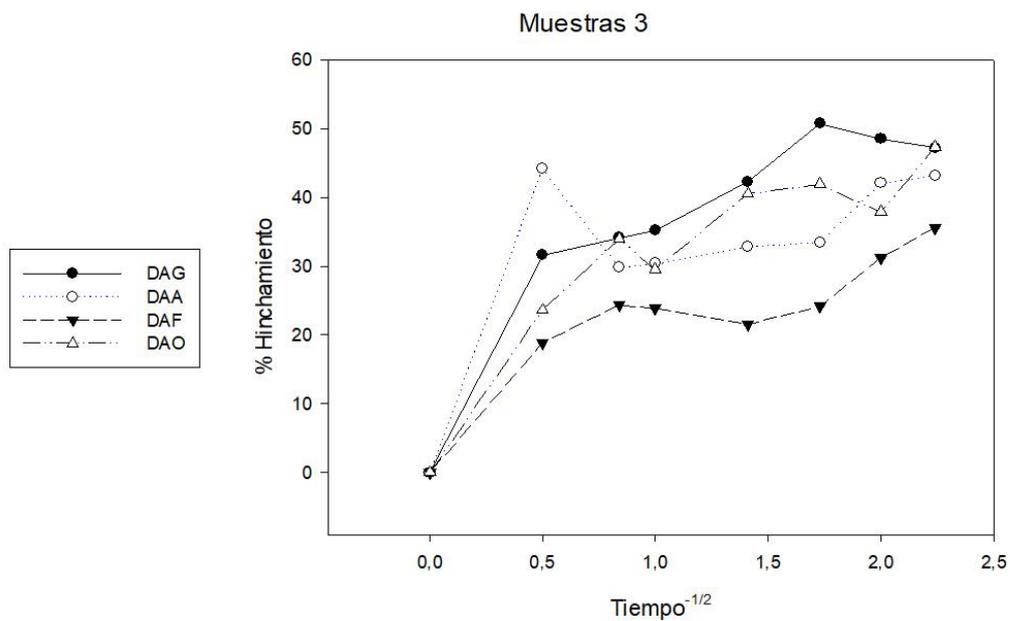
**Capacidad de hinchamiento**



**Figura 98.** Porcentajes de hinchamiento de las muestras 1



**Figura 99.** Porcentajes de hinchamiento de las muestras 2



**Figura 100.** Porcentajes de hinchamiento de las muestras 3

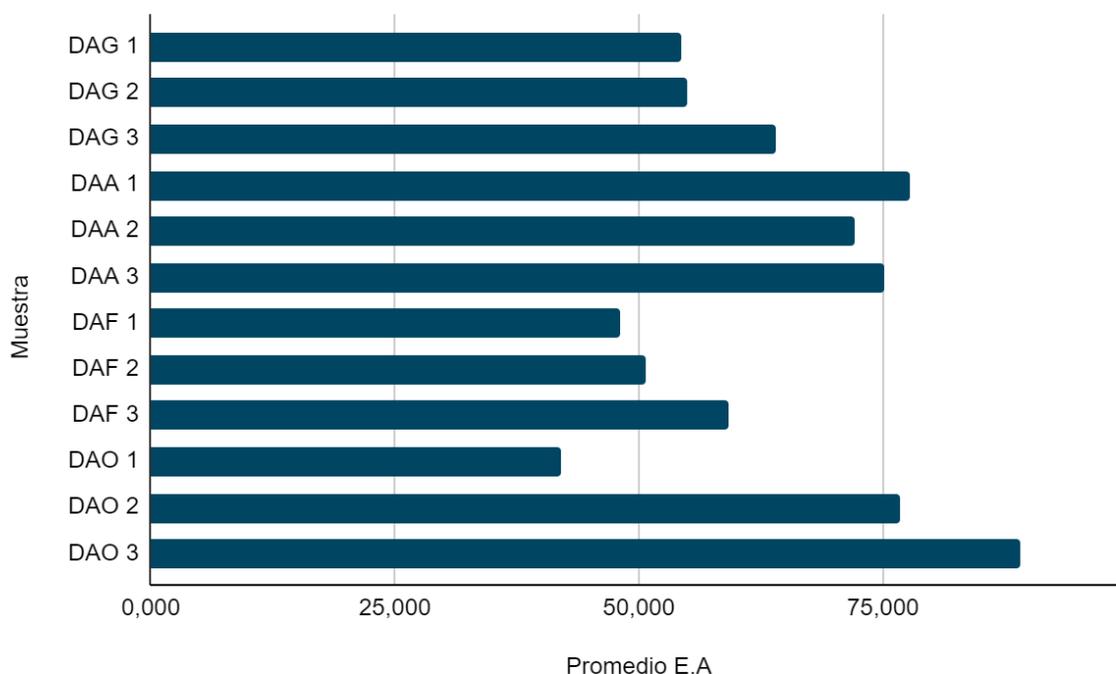
El porcentaje de hinchamiento final de todos los geles se encontró dentro del 30 y el 50%. Y se observó que la relación de 70% PVA y 30% Alginato presenta uno de los comportamientos más uniformes y altos porcentajes de hinchamiento, como lo es en el caso de la muestra DAA 1 y DAF 3 con valores de 50% y 42% respectivamente. Mientras que las muestras que menos lograron hincharse fueron la DAG 3 y la DAO 2.

## ***Economía atómica***

La economía atómica es un factor que permite relacionar de forma másica, los productos obtenidos mediante una reacción, esto incluyendo también los residuos del proceso, con el producto deseado obtenido, y así conocer la eficiencia de la reacción al incluir la mayoría de los reactivos en el producto final; mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Economía atómica} = \frac{\text{Masa del hidrogel}}{\text{Masa total de los productos}} * 100 \quad (10)$$

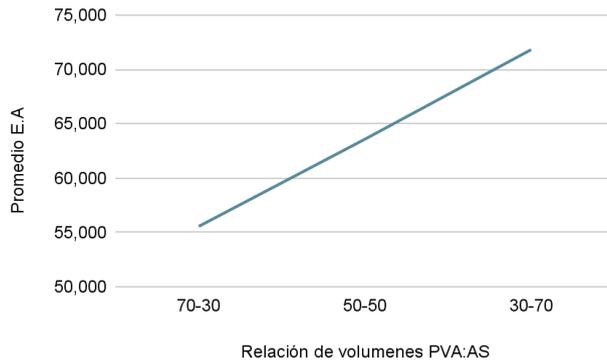
Los hidrogeles fueron pesados después de dejarlos en refrigeración durante por lo menos 12 horas, esta masa corresponde al resultado másico del producto completo, sin embargo estos hidrogeles generaron un residuo líquido, el cual se retiró posteriormente para conocer la masa neta del hidrogel. Este residuo podría ser agua o cloruro de calcio sin reaccionar por estar en exceso dentro la solución.



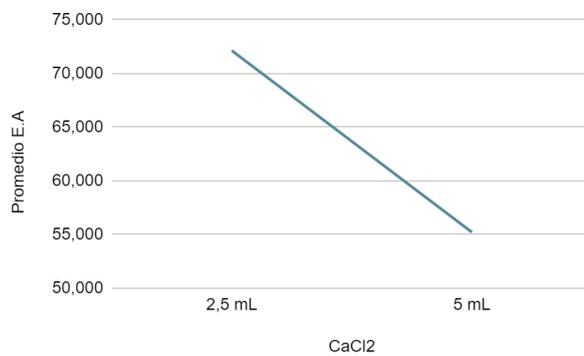
**Figura 101.** Promedio de la economía atómica de los triplicados por muestra.

Según la figura 101 las muestras que presentan una mayor economía atómica son la DAO 3, DAA 1 y DAA 3 que son aquellas que coinciden el volumen de la solución de  $\text{CaCl}_2$  (2,5 mL), y en las cuales se podría inferir que hubo una reacción eficiente entre el alginato y el  $\text{CaCl}_2$ .

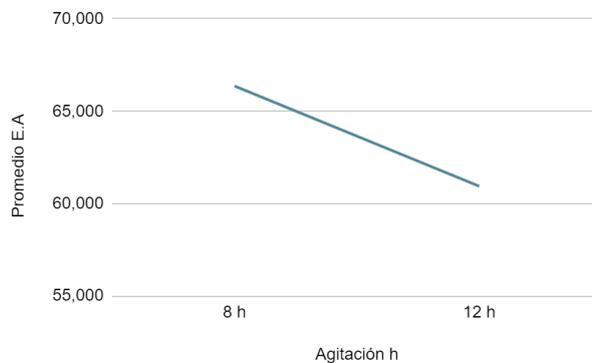
Se realizó un análisis de la economía atómica según las diferencias en cada grupo de hidrogeles, que corresponde a los niveles del diseño experimental. Respecto al tiempo de agitación se observó que es inversamente proporcional a la economía atómica, entre mayor tiempo menor economía, mientras que en las relaciones de volúmenes es directamente proporcional a la cantidad de alginato presente en el gel, lo cual se enlaza a la reticulación iónica entre el agente gelificador y la mezcla de los polímeros, es decir, el hidrogel va a presentar menor residuo entre mayor sea la reacción del  $\text{CaCl}_2$ , contrario a si está en exceso. Que es lo que reitera la figura \_ donde se relaciona la economía con el volumen de cloruro de calcio.



**Figura 102.** Relación entre la economía atómica y la relación de volumen de componentes en el gel.



**Figura 103.** Relación entre la economía atómica y volumen de  $\text{CaCl}_2$ .



**Figura 104.** Relación entre la economía atómica y el tiempo de agitación.

### 6.3.4 Elección de la muestra

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las caracterizaciones de micrografía óptica y reología, se eligieron los mejores comportamientos de cada grupo, como se muestra a continuación:

DAG → 2 (Relación 5:5 PVA-AS)

Se destaca el hidrogel compuesto de 5 mL de PVA y 5 mL de Alginato de sodio ya que dos de las muestras de este nivel cumplen con el rango de rigidez establecido con valores de 2,34 y

6,25 kPa. También al realizar la observación de las imágenes de microscopía se evidenció que presenta fibras orientadas y en mayor cantidad en comparación a los otros de este grupo.

DAA → 2 (Relación 5:5 PVA-AS)

Del grupo DAA este nivel de proporciones iguales entre PVA y AS, mostró resultados satisfactorios tanto en la prueba de reología, microscopía, e hinchamiento. Su viscosidad dinámica fluctúa entre 1,85 y 6,87 kPa\*s un rango que se encuentra dentro de lo esperado, mientras que en las imágenes obtenidas por microscopía se evidencian fibras interconectadas, alineadas y finas.

DAF → 1 (Relación 7:3 PVA-AS)

El hidrogel correspondiente al nivel 1 de relación de volumen es el que se encuentra más cercano a los rango de rigidez necesarios en comparación a los otros dos. En imágenes de microscopía se pueden observar claramente la presencia de fibras alineadas, finas y que forman redes entre sí a lo largo de la mayoría del hidrogel.

DAO → 3 (Relación 3:7 PVA-AS)

Se evidenció una gran respuesta por parte de las muestras DAO incluso con diferentes relaciones volumétricas de PVA y AS, sin embargo en la obtención de DAO 1 uno de los triplicados no llegó a una gelificación completa, y otro de ellos presentó errores durante la medición reológica. Como se observa en las imágenes de microscopía tanto DAO 2 como DAO 3 muestran fibras orientadas, sin embargo en la prueba de hinchamiento DAO 3 presentó uno de los porcentajes más altos de la prueba.

Teniendo en cuenta que estas 4 muestras obtuvieron resultados satisfactorios en las caracterizaciones más relevantes según la naturaleza del proyecto, se procedió a realizar una comparación entre ellas. Los resultados de promedio de viscosidad dinámica obtenida en los triplicados arrojó lo siguiente:

1. DAG 2: 6,430 kPa\*s
2. DAF 1: 5,300 kPa\*s
3. DAA 2: 3,920 kPa\*s
4. DAO 3: 3,0893 kPa\*s

Donde se evidencia que todas cumplen con el rango establecido en los requerimientos que es de 1 a 7 kPa.

Respecto a las observaciones micrográficas se determina que la muestra DAA cumple con los requerimientos establecidos inicialmente, acerca de topografía, abarcando la orientación, geometría y alineación, ya que los OL's responden a materiales isotrópicos, y con geometría cilíndrica que es la que presentan las fibras existentes en el gel. La muestra DAO 3 tiene fibras alineadas y una superficie compacta lo que no permitiría una correcta disposición de la célula dentro del material, ya que es necesario que el oligodendrocito sea capaz de abarcar todo el material, incluso dentro de él, y no tan solo en su superficie. La DAF 1 en cambio también presenta tanto fibras orientadas como espacios entre ellas que brinda viabilidad en la diferenciación celular.

El porcentaje de hinchamiento es un factor relevante en la fabricación de hidrogeles porque garantiza una mayor aceptación por parte del sistema biológico, y permite una difusión correcta de nutrientes. Durante esta prueba los mejores resultados de las muestras seleccionadas son la DAO 3 y la DAA 2 llegando a un porcentaje cercano al 50%, así como también se destacan en el análisis de economía atómica.

De acuerdo a lo anterior la muestra definitiva seleccionada es la DAA 2 por que se encuentra dentro del rango de rigidez esperado, cumple con los requerimientos topográficos y tiene una alta capacidad de hinchamiento. Además de ser una propuesta en la cual sus condiciones propician la economía atómica, debido a la reducción del tiempo durante la agitación de las mezclas y en la cantidad de cloruro de calcio que se adiciona a la solución, ya que el volumen empleado garantiza una gelificación uniforme en los geles de PVA:AS y no produce un residuo tan significativo en comparación a aquellas muestras que emplearon más cantidad para su obtención, y en cambio mejora el rendimiento de la reacción.

### **6.3.5 Metodología para la elaboración de muestra final**

Se definió una metodología para obtener un hidrogel con potencial aplicación en la diferenciación de oligodendrocitos, a partir de los requerimientos biológicos y mecánicos de su microambiente en el caso de una lesión neurodegenerativa, posterior a realizar un análisis riguroso de los comportamientos de muestras de PVA:AS a diferentes condiciones.

Primeramente se preparan las soluciones de Alginato de Sodio (2% p/v), PVA (4% p/v) y  $\text{CaCl}_2$  (100 mM). La solución de PVA se lleva a agitación durante 12 horas a 80°C. Pasado este tiempo se mezclan las soluciones de PVA y Alginato de Sodio en una proporción de 5mL y 5mL (50%-50% p/v) y se dejan en agitación a 200 rpm durante 8 horas a una temperatura de 20°C. Una vez esté lista la solución compuesta, se adiciona lentamente la solución de cloruro de calcio mientras la muestra aún se encuentra en agitación a 300 rpm, pasados 3 segundos se transfiere rápidamente a una caja de petri con ayuda de un pescador que sostiene el agitador magnético que se encuentra en el vaso de precipitado. Terminado este proceso se somete la muestra al ultrasonido durante 15 minutos. Por último, se lleva a refrigeración.

Para el proceso de liofilización se refrigera la muestra a una temperatura de -80°C por 12 horas y posteriormente se lleva al liofilizador a una temperatura de -60°C durante 48 horas. El proceso anteriormente descrito se presenta a continuación:

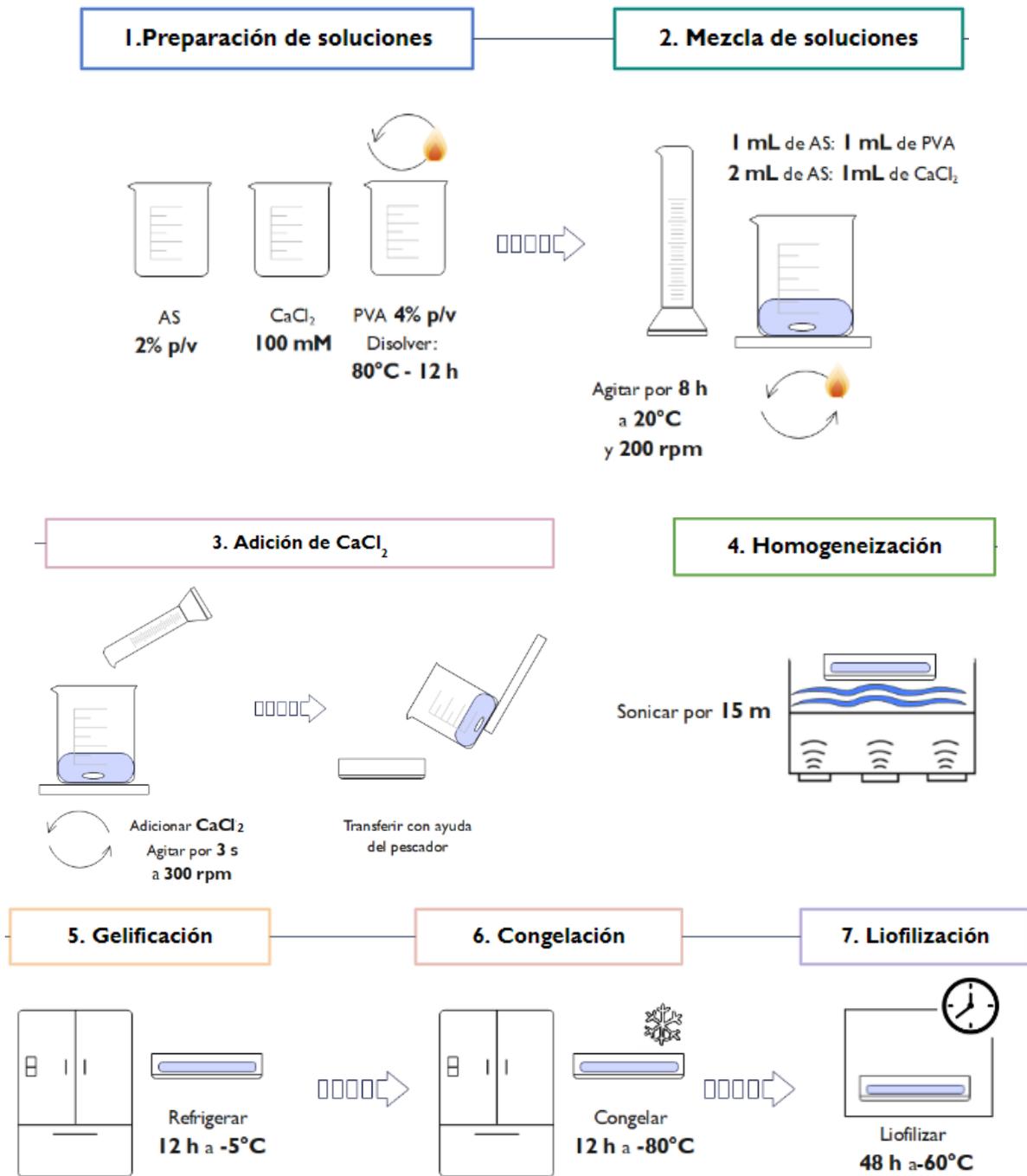


Figura 105. Metodología de obtención del hidrogel DAA 2 (Autoría propia)

## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo a las variables críticas y requerimientos establecidos mediante revisión bibliográfica se seleccionaron dos ideas de concepto de materiales para la realización de pruebas preliminares. Los cuales fueron Alginato de Sodio - Alcohol polivinílico y Alginato de sodio - Carboximetil Quitosano, y se empleó el método de reticulación iónica para la síntesis de un hidrogel a partir de estos biopolímeros.

Se obtuvieron los hidrogeles de PVA-AS y AS-O-CMC durante las pruebas preliminares del diseño conceptual, y se determinó por medio de una matriz de selección que los hidrogeles de alginato de sodio y polivinil alcohol cumplieron tanto los requerimientos establecidos como las características de química verde, por lo cual se definió como material definitivo para el diseño experimental. Además se evidenció que los materiales con mayor proporción de alginato cuentan con un rango de viscosidad más amplio gracias a la reticulación iónica con el cloruro de calcio.

En las pruebas preliminares se observó que los geles de PVA-AS presentan comportamientos diferentes según la relación de volúmenes que exista entre ellos por esta razón se estableció un diseño experimental factorial de 3 niveles: la relación volumétrica entre los polímeros, la cantidad de  $\text{CaCl}_2$  y el tiempo de agitación de las mezclas. Las muestras obtenidas se realizaron por triplicado, en total se obtuvieron 36.

A partir de las pruebas de viscosidad dinámica, microscopía óptica, hinchamiento y economía atómica se definió la metodología de obtención de la muestra DAA 2, la cual cuenta con los siguientes parámetros de elaboración: igual proporción volumétrica de AS(2% p/v) - PVA (4% p/v), 8 horas de agitación de la solución y adición de 1 mL de la solución de cloruro de calcio (100 mM) por cada 2 mL de la solución de AS (2% p/v) como la más adecuada según los requerimientos establecidos en el diseño conceptual y propios del sistema biológico. También debido a que mostró un comportamiento isotrópico, con fibras de geometría cilíndrica y con una gran longitud, además de ser una propuesta eficiente por su capacidad de hinchamiento, la reducción en tiempos y reactivos obteniendo resultados favorables en las características físicas de topografía y rigidez.

## RECOMENDACIONES

- Durante la elaboración de los hidrogeles se observó que el método de adición del agente reticulante llegaba a influir directamente en la homogeneidad de la superficie del gel, además de la uniformidad en la reticulación debido a su interacción con la cantidad de alginato de sodio. Es por esto que se recomienda intentar diferentes métodos de adición del  $\text{CaCl}_2$  a la solución compuesta, para evitar una distribución incompleta y errores en las mediciones de viscosidad dinámica.
- Respecto al almacenamiento de los hidrogeles se sugiere mantenerlos en refrigeración a una temperatura de  $-5^\circ\text{C}$  para evitar cambios en las propiedades físicas del mismo, además del crecimiento de microorganismos no deseados.
- La agitación permite una mayor incorporación entre los biopolímeros utilizados, los tiempos establecidos deben ser manejados con rigor para obtener una estructura estable y que cuente con el beneficio de tener los dos componentes. Según los resultados obtenidos se recomienda usar máximo 8 horas de agitación, sin embargo podrían realizarse experimentos en tiempos menores para evaluar su efectividad y reducir el consumo energético.
- Los cambios abruptos de temperatura durante la congelación, pueden llegar a generar cristalización en los materiales, afectando así su estructura y rompimiento de las fibras presentes. Para evitar estos daños físicos se recomienda disminuir la temperatura gradualmente.
- La evaluación topográfica puede complementarse mediante un análisis de imagen en las topografías observadas, no solamente en las fibras. Así mismo se recomienda realizar una observación más detallada del material por medio de microscopía electrónica de barrido que permitirá evaluar características estructurales como la porosidad.
- Con el fin de verificar la funcionalidad en el sistema biológico se deberían realizar pruebas con las células OPC, en las cuales se pueda evidenciar el proceso de diferenciación a OL maduros. Estas pruebas podrían realizarse empleando el hidrogel tanto en su estado húmedo como liofilizado, sin embargo se sugiere usar el húmedo para simular el medio de su microentorno y conservar sus propiedades de viscosidad.

## REFERENCIAS

- Aggarwal S, Yurlova L, Simons M. 2011a. Central nervous system myelin: Structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol* 21: 585–593.
- Akbar, M., Yaqoob, A., Ahmad, A., Luque, R., Chapter 1 - Sodium alginate: an overview, Editor(s): Awais Ahmad, Ikram Ahmad, Tahseen Kamal, Abdullah M. Asiri, Sobia Tabassum, In *Micro and Nano Technologies, Sodium Alginate-Based Nanomaterials for Wastewater Treatment*, Elsevier, (2023). Pages 1-17, ISBN 9780128235515, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823551-5.00012-4>.
- Alves, M. H., Jensen, B. E., Smith, A. A., & Zelikin, A. N. (2011). Poly (vinyl alcohol) physical hydrogels: new vista on a long serving biomaterial. *Macromolecular bioscience*, 11(10), 1293-1313.
- Arulmoli, J., M. M. Pathak, L. P. McDonnell, J. L. Nourse, F. Tombola, J. C. Earthman, and L. A. Flanagan, “Static stretch affects neural stem cell differentiation in an extracellular matrix-dependent manner,” *Sci. Rep.* 5, 1–8 (2015).
- Barateiro, A. and Fernandes, A. (2014). Temporal oligodendrocyte lineage progression: *in vitro* models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1917-1929.
- Berthomieu C., Hienerwadel R., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, *Photosynthesis Research*, 101, 157-170 (2009).
- Calabresi, P. A. (2021). 383 - Esclerosis múltiple y enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central. *Goldman-Cecil. Tratado de Medicina Interna*, 2435. <https://doi.org/10.1016/B978-84-9113-765-8.00383-0>.
- Cárdenas Quiroga, E. A., Morales Martín, L. Y., & Ussa Caycedo, A. (2015). La estereoscopia, métodos y aplicaciones en diferentes áreas del conocimiento. *Revista Científica General José María Córdova*, 13(16), 201-219.
- Carvalho, E., Morais, M., Ferreira, H., Silva, M., Guimarães, S., Pego, A. *Biomateriales*, 2022-04-01, Vol umen 283 Elsevier Ltd
- Chaur, J. (2005). Diseño conceptual de productos asistidos por ordenador: Un estudio analítico sobre aplicaciones y definición de la estructura básica de un nuevo programa. Tesis doctoral, UPC, Departament de Projectes d'Enginyeria, 2005. ISBN 8468931527.
- Chen, C., Wang, L., Deng, L., Hu, R., & Dong, A. (2013). Performance optimization of injectable chitosan hydrogel by combining physical and chemical triple crosslinking structure. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 101 A(3), 684–693. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34364>
- Custodio Bartolomé Herrera, N., nce Lima, L., Custodio, N., Montesinos, R. & López-Góngora, M. Deterioro cognitivo en pacientes con esclerosis múltiple. *An. la Fac. Med.* (2018) 79:338–345.

- Doria, M. (2009). Química verde: un nuevo enfoque para el cuidado del medio ambiente. *Educación química*, 20(4), 412-420. Recuperado en 03 de mayo de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-893X200900040004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X200900040004&lng=es&tlng=es)
- Duffó, g., (2005). Biomateriales una mejor calidad de vida
- Espinosa, D. Hoyos (2018) Axones artificiales impresos en 3D diseñados por la ciencia Rep.
- Estela, C. D. M. (2002). Regeneración del nervio facial en conejos por la influencia in situ de neuroesteroides liberados desde una prótesis de quitosana.
- Franklin, R. J., Zhao, C. & Sim, F. J. (2002). Aging and CNS Remyelination. *Neuroreport*, 13(7), 923-928.
- Fernandez, s. (2010).diseño de experimentos: diseño factorial [trabajo de fin de máster universitario en ingeniería química]. Universitat politècnica de catalunya barcelonatech
- Fernandéz, V. (2010). Funciones de las proteínas asociadas a mielina durante el desarrollo del sistema nervioso central y en neurodegeneración [tesis doctoral] Universitat de barcelona.
- Franklin, R., Frisé, J., Lyons, D., Revisiting remyelination: Towards a consensus on the regeneration of CNS myelin, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volume 116, (2021)
- Foroughi, J., (2018) Hydrogels fibers 10.5772/intechopen.68817
- Gharagozloo, M., Bannon, R., Calabresi, P., Breaking the barriers to remyelination in multiple sclerosis, *Current Opinion in Pharmacology*, Volume 63, (2022)
- Gómez-Chabala, Luisa Fernanda, Londoño-López, Martha Elena, Echeverri-Cuartas, Claudia Elena. (2018). Caracterización de matrices de Polivinil alcohol-Alginato-Quitosano-Aloe vera. *Revista Ingeniería Biomédica*, 12(23), 25-30. <https://doi.org/10.24050/19099762.n23.2018.806>
- Hanrahan, G., Zhu, J., Gibani, S., & Patil, D. G. (2005). *CHEMOMETRICS AND STATISTICS | Experimental Design. Encyclopedia of Analytical Science*, 8–13. doi:10.1016/b0-12-369397-7/00079-0
- Hanrahan, G. y Lu, K. (2006). Aplicación de la metodología factorial y de superficie de respuesta en el diseño y optimización de experimentos modernos. *Revisiones críticas en química analítica* , 36 (3-4), 141-151.
- Hasnain, S., Jameel, E., Mohanta, E., Dhara, K., Alkahtani, S., Nayak, K., Chapter 1 - Alginates: sources, structure, and properties, *Alginates in Drug Delivery*, Academic Press,2020, Pages 1-17, ISBN 9780128176405, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817640-5.00001-7>.

- Herbert, A. L. & Monk, K. R. (2017). Advances in Myelinating Glial Cell Development. *Current Opinion in Neurobiology*, 42, 53-60.
- Hernandez, H., Patzig, J., Mayoral, S., Costa, K., Chan, J., and Casaccia, P. "Mechanostimulation promotes nuclear and epigenetic changes in oligodendrocytes," *J. Neurosci.* 36, 806–813 (2016).
- Hudecki, A., Kiryczyński, G., & Łos, M. J. (2019). Biomaterials, definition, overview. In *Stem cells and biomaterials for regenerative medicine* (pp. 85-98). Academic Press.
- Inkson, B. J. (2016). Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In *Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods* (pp. 17-43). Woodhead publishing.
- ISO/TC 229 Nanotechnologies. (2005). ISO. <https://www.iso.org/committee/381983.html>
- Jagielska A, Norman AL, Whyte G, Vliet KJ, Guck J, Franklin RJ. Mechanical environment modulates biological properties of oligodendrocyte progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2012 Nov 1;21(16):2905-14. doi: 10.1089/scd.2012.0189. Epub 2012 Jul 3. PMID: 22646081; PMCID: PMC5915215.
- Jaramillo, J. (2019). Terapia celular en enfermedades desmielinizantes [Tesis doctoral]. Universitat de valencia.
- Jaramillo Merchán, J. A. (2021). Terapia Celular en Enfermedades Desmielinizantes.
- Jobling Phillip, Nervous System: Neurons and Glial Cells, Editor(s): Ralph A. Bradshaw, Gerald W. Hart, Philip D. Stahl, Encyclopedia of Cell Biology (Second Edition), Academic Press, (2023) ISBN 9780128216248, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821618-7.00271-6>.
- Katime, I., Katime, O., Katime, D. (2005) Materiales inteligentes: hidrogeles macromoleculares algunas aplicaciones biomédicas
- Katiyar, K., Winter, C., Struzyna, L., Harris, J., and Cullen, D., "Mechanical elongation of astrocyte processes to create living scaffolds for nervous system regeneration," *J. Tissue Eng. Regener. Med.* 11, 2737–2751 (2017)
- Keane, TJ y Badylak, SF (junio de 2014). Biomateriales para aplicaciones de ingeniería de tejidos. En *Seminarios de cirugía pediátrica* (Vol. 23, No. 3, pp. 112-118). WB Saunders.
- Kippert, A., Fitzner, D., Helenius, J. y Simons, M. (2009). La contractilidad de la actomiosina controla el área de la superficie celular de los oligodendrocitos. *BMC Cell Biol.* 10:71. doi: 10.1186/1471-2121-10-71
- Lourenço, T., Grãos, M., (2016). Modulation of Oligodendrocyte Differentiation by Mechanotransduction. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10 (ISSN=1662-5102). Recuperado de <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2016.00277>
- Lu, Hao & Butler, Jonathan & Britten, Nicole & Venkatraman, Praburaj & Rahatekar, Sameer. (2021). Natural Antimicrobial Nano Composite Fibres Manufactured from a Combination of Alginate and Oregano Essential Oil. *Nanomaterials.* 11. 2062. 10.3390/nano11082062.

- Makhija, A. Jagielska, L. Zhu, A. C. Bost, W. Ong, S. Y. Chew, G. V. Shivashankar, and K. J. Van Vliet, "Mechanical strain alters cellular and nuclear dynamics at early stages of oligodendrocyte differentiation," *Front. Cell. Neurosci.* 12, 1–12 (2018)
- Makhija, E. P., Espinosa-Hoyos, D., Jagielska, A., & Van Vliet, K. J. (2020). Mechanical regulation of oligodendrocyte biology. *Neuroscience Letters*, 717, 134673.
- Marinval, N., & Chew, S. Y. (2021). Mechanotransduction assays for neural regeneration strategies: A focus on glial cells. *APL bioengineering*, 5(2), 021505.
- Martin, N., & Youssef, G. (2018). Dynamic properties of hydrogels and fiber-reinforced hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 85, 194-200.
- Ma, S., Cong, Z., Chen, H., Wen, H., Cao, L., Liu, C., ... & Liao, Y. (2021). Velvet antler polypeptide-loaded polyvinyl alcohol-sodium alginate hydrogels promote the differentiation of neural progenitor cells in 3D towards oligodendrocytes *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 167, 106003.
- Medina Rodríguez, E. M. (2015, mayo). *Fisiología de los precursores de oligodendrocitos murinos y humanos durante el desarrollo y en el sistema nervioso central adulto: implicación de la fosfodiesterasa-7*. Universidad de Castilla la Mancha.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2005). Decreto número 4725 de 2005.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2018). Decreto número 1036 de 2018.
- Mohamed, M., Jaafar, J., Ismail, A., Othman, M., Rahman, M., Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy (2017).
- Moreno, Begoña, Muñoz, Maximiliano, Cuellar, Javier, Domancic, Stefan, & Villanueva, Julio. (2018). Revisiones sistemáticas: definición y nociones básicas. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 11(3), 184-186. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-01072018000300184>
- Molino, J., Revete, A., Aparicio, A., & Reginensi, D. (2021). Desarrollo de hidrogeles en aplicaciones en biomedicina.
- Monsalve, A. (2010). Reología, la ciencia que estudia el movimiento de fluidos. *Santiago: sn*, 18.
- Mori, H., & Hara, M. (2016). Clusters of neural stem/progenitor cells cultured on a soft poly (vinyl alcohol) hydrogel crosslinked by gamma irradiation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 121(5), 584-590.
- Multiple Sclerosis International Federation. (2021, 25 oktober). *What is MS | Multiple Sclerosis*. MS International Federation. Geraadpleegd op 28 mei 2022, van <https://www.msif.org/about-ms/what-is-ms/>
- Ortega Muñoz, C. (2012). *Papel del receptor megalina en la biología de los precursores de oligodendrocitos durante el desarrollo y en patologías desmielinizantes*. Universidad Autónoma de Madrid.

- Prisca, S., Leferink, Vivi., Heine, M., The Healthy and Diseased Microenvironments Regulate Oligodendrocyte Properties: Implications for Regenerative Medicine, *The American Journal of Pathology*, Volume 188, Issue 1, (2018),
- Ramirez, A., Benítez, J. L., Rojas de Astudillo, L., & Rojas de Gásque, B. (2016). Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 36(2), 108-130.
- Revete, A., Aparicio, A., Molino, J., Reginensi, D. development of hydrogels in biomedicine applications. academic journal. gente clave, volumen 5 (numero 1 año 2021) recuperado de [http://repositorio2.udelas.ac.pa/bitstream/handle/123456789/531/andrea\\_revete\\_andrea\\_aparicio\\_jay\\_molino\\_y\\_diego\\_reginensi.pdf?sequence=1&isallowed=y](http://repositorio2.udelas.ac.pa/bitstream/handle/123456789/531/andrea_revete_andrea_aparicio_jay_molino_y_diego_reginensi.pdf?sequence=1&isallowed=y)
- Reyes, A., Bulavina L., Pivneva, T. (2014). La glía, el pegamento de las ideas. *I2 ciencia BULLET*
- RJ Franklin, ¿Por qué falla la remielinización en la esclerosis múltiple? *Nat Rev Neurosci* 3 , 705–714 (2002).
- Rosenberg, S. S., Kelland, E. E., Tokar, E., De la Torre, A. R., & Chan, J. R. (2008). The geometric and spatial constraints of the microenvironment induce oligodendrocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14662–14667. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805640105>
- Ruiz A (2009). Despliegue de la función de calidad (QFD). Universidad Pontificia ICAI.
- Saldin, L.T., M.C. Cramer, S.S. Velankar, L.J. White, and S.F. Badylak. 2017. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomater.* 49:1-15
- Shah, S., Yin, PT, Uehara, TM, Chueng, ST, Yang, L. y Lee, KB (2014). Guía de la diferenciación de células madre en oligodendrocitos utilizando andamios híbridos de grafeno y nanofibras. *Adv. Mate.* 26, 3673–3680. doi: 10.1002/adma.201400523
- Shimizu, T., Y. Osanai, K. F. Tanaka, M. Abe, R. Natsume, K. Sakimura, and K. Ikenaka, “YAP functions as a mechanotransducer in oligodendrocyte morphogenesis and maturation,” *Glia* 65, 360–374 (2017). 11L. Wang, J. Xia, J. Li, T. L. Hagemann, J. R. Jones, E. Fr
- Sim, L. Wrabetz, J. Svaren, and M. L. Feltri, “YAP and TAZ control peripheral myelination and the expression of laminin receptors in Schwann cells,” *Nat. Neurosci.* 19, 879–887 (2016)
- Siqi, Ma., Zhaoqing, Cong., Huan, Chen., Han, Wen., Li, Cao., Chunyu, Liu., Feifei, Yang., Yonghong, Liao., Velvet antler polypeptide-loaded polyvinyl alcohol-sodium alginate hydrogels promote the differentiation of neural progenitor cells in 3D towards oligodendrocytes *in vitro* (2021)

- Skaper, S. (2019). Oligodendrocyte precursor cells as a therapeutic target for demyelinating diseases. *Nanoneuroprotection and Nanoneurotoxicology*, 245. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2019.03.013>
- Thomas Philips, Andre Bento-Abreu, Annelies Nonneman, Wanda Haeck, Kim Staats, Veerle Geelen, Nicole Hersmus, Benno Küsters, Ludo Van Den Bosch, Philip Van Damme, William D. Richardson, Wim Robberecht, Oligodendrocyte dysfunction in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis, *Brain*, Volume 136, Issue 2, February 2013, Pages 471–482}
- Ulloa-Navas MJ, Pérez-Borredá P, Morales-Gallel R, Sauri-Tamarit A, García-Tárraga P, Gutiérrez-Martín AJ, Herranz-Pérez V and García-Verdugo JM (2021) Ultrastructural Characterization of Human Oligodendrocytes and Their Progenitor Cells by Pre-embedding Immunogold. *Front. Neuroanat.* 15:696376. doi: 10.3389/fnana.2021.696376
- Unal, D., Caliarì, S., Lampe, K., 3D Hyaluronic Acid Hydrogels for Modeling Oligodendrocyte Progenitor Cell Behavior as a Function of Matrix Stiffness (2022)
- Velasco, A., (2013). Mecánicas de hidrogeles de tipo elastina con la temperatura, el tiempo y la concentración. [Máster en física en los sistemas de diagnóstico, tratamiento y protección en ciencias de la salud].
- Vinchhi, P., Rawal, S., Patel, M., Chapter 19 - Biodegradable hydrogels, In *Developments in Biomedical Engineering and Bioelectronics, Drug Delivery Devices and Therapeutic Systems*, Academic Press, (2021) Pages 395-419, ISSN 25897527, ISBN 9780128198384, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819838-4.00012-2>.
- Wang, L., Yang, H., Zang, C., Dong, Y., Shang, J., Chen, J., Wang, Y., Liu, H., Zhang, Z., Xu, H., Bao, X., Zhang, D., CXCR2 antagonism promotes oligodendrocyte precursor cell differentiation and enhances remyelination in a mouse model of multiple sclerosis, *Neurobiology of Disease*, Volume 134, 2020, 104630, ISSN 0969-9961, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104630>.
- Webb, A., Clark, P., Skepper, J., Compston, A. y Wood, A. (1995). Orientación de oligodendrocitos y sus progenitores por topografía de sustrato. *J. ciencia celular*. 108, 2747–2760.
- Willems T, Vardhan S, Wu S, Sakiyama-Elbert S, The influence of microenvironment and extracellular matrix molecules in driving neural stem cell fate within biomaterials, *Brain Research Bulletin*, Volume 148, 2019, Pages 25-33, ISSN 0361-9230, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.03.004>.
- Y. Poitelon, C. Lopez-Anido, K. Catignas, C. Berti, M. Palmisano, C. Williamson, D. Ameroso, K. Abiko, Y. Hwang, A. Gregorieff, J. L. Wrana, M. Asmani, R. Zhao, F. J.
- Yang, B., Yin, S., Bian, X., Liu, C., Liu, X., Yan, Y., Zhang, Y., Zhang, H., Hou, Z., Preparation and properties of monomethoxyl polyethylene glycol grafted O-carboxymethyl chitosan for edible, fresh-keeping packaging materials, *Food*

Packaging and Shelf Life, Volume 33 (2022) 100874, ISSN 2214-2894,  
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100874>.

Zlomuzica, A., Plank, L., Kodzaga, I., Dere, E., A fatal alliance: Glial connexins, myelin pathology and mental disorders, *Journal of Psychiatric Research*, Volume 159, (2023). Pages 97-115, ISSN 0022-3956, <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2023.01.008>.

Ziabreva, I., Campbell, G., Rist, J., Zambonin, J., Rorbach, J., Wydro, M. M., Lassmann, H., Franklin, R. J. & Mahad, D. (2010). Injury and Differentiation Following Inhibition of Mitochondrial Respiratory Chain Complex IV in Rat Oligodendrocytes. *Glia*, 58(15), 1827- 1837.

## ANEXOS

*Anexo 1: Matriz QFD para priorización de requerimientos*

¿Qué?	Prioridad	¿Cómo?									
		El biomaterial debe cumplir con un rango de rigidez entre 1,5 y 7 kpa	Estructura del hidrogel aleatoria, sin patrones	Hidrogel isotrópico	Hidrogel con geometría cilíndrica similar a los axones	Hidrogel biocompatible	Hidrogel biodegradable	Hidrogel natural, sintético o híbrido	Evaluaciones reológicas	Evaluaciones Topográficas	Análisis de respuesta
REQUERIMIENTOS	Prioridad	El biomaterial debe cumplir con un rango de rigidez entre 1,5 y 7 kpa	Estructura del hidrogel aleatoria, sin patrones	Hidrogel isotrópico	Hidrogel con geometría cilíndrica similar a los axones	Hidrogel biocompatible	Hidrogel biodegradable	Hidrogel natural, sintético o híbrido	Evaluaciones reológicas	Evaluaciones Topográficas	Análisis de respuesta
Rigidez similar a la matriz extracelular de los oligodendrocitos	26	5	3	3	3	1	1	3	5	1	1
Topografía ideal para la diferenciación de OL	26	3	5	5	3	1	1	3	1	5	1
Geometría similar a la matriz extracelular, incluyendo axones	12	1	1	1	5	1	1	1	1	3	1
Material compatible con el ente biológico	13	1	1	1	1	5	5	5	1	1	3
Material degradable	5	1	1	1	1	3	5	3	1	1	3
Ningún análisis biológico	3	1	1	1	1	1	1	1	5	5	1

Difusión de nutrientes y subproductos	5	1	1	1	1	3	5	3	1	1	3
Presupuesto máximo para materiales y reactivos de 3,400,000	6	1	1	3	1	3	3	5	3	3	1
Tiempo máximo de obtención de muestras de biomaterial, 45 días	4	3	3	3	3	1	1	1	3	3	3
<b>Totalización</b>		<b>264</b>	<b>264</b>	<b>276</b>	<b>260</b>	<b>184</b>	<b>204</b>	<b>300</b>	<b>236</b>	<b>260</b>	<b>154</b>
Priorización	100	3	3	2	4	7	5	1	6	4	8

*Anexo 2: Matriz de decisión para selección de materiales*

Requerimientos	Prioridad	M1 Poliacrilamida	M2 Ácido hialurónico	M3 Alginato - PVA	M4 Colágeno	M5 PEG-MA	M6 Metacrilamida quitosano	M7 Alginato O-CMC
El biomaterial debe cumplir con un rango de rigidez entre 1,5 y 7 kPa, rangos similares a la rigidez de la matriz extracelular de los oligodendrocitos de acuerdo a los resultados satisfactorios obtenidos en estudios. (Makhija, 2020)	20	3	3	3	1	3	3	3
La estructura del hidrogel no debe tener patrones, para promover la diferenciación de los oligodendrocitos (Whilems, 2019).	10	3	1	1	3	3	3	3
El hidrogel debe tener una topografía isotrópica. ( Moe et al., 2012 tomado de Whilems, 2019).	5	1	0	1	3	1	1	1
La geometría del hidrogel debe ser cilíndrica, modelando la estructura de los axones (Makhija, et al, 2020).	5	3	1	3	3	0	0	1
El hidrogel debe ser biocompatible y biodegradable. Esto soportandose en revisión bibliográfica del material a implementar (Zue, et al., 2021).	10	3	3	3	3	3	3	3

La naturaleza del biomaterial puede ser sintética, natural o híbrida (Zaeri, et al., 2022).	5	3	3	3	3	3	3	3
Los oligodendrocitos presentan mejor diferenciación en superficies aleatorias, no alineadas.(Whilems, 2019)	5	3	1	3	3	3	3	3
El biomaterial debe permitir la difusión de nutrientes y la interacción de OL con otras células.	15	3	3	3	3	3	3	3
El tiempo empleado en la metodología de obtención de las muestras del hidrogel no debe superar los 45 días, teniendo en cuenta imprevistos.	10	0	1	3	3	3	3	3
Los materiales y reactivos no deben superar un aproximado de 3,400,000 según lo presupuestado.	15	3	0	3	3	3	3	3
TOTAL	100	260	180	270	260	275	275	280
%		86,7	60	90	86,7	91,7	91,7	93,3