Diseño de un biomaterial tipo hidrogel como soporte para la microglía con potencial aplicación en la regeneración del sistema nervioso central

Ana María Mosquera Umbacia

Universidad El Bosque

Facultad de Ingeniería

Bioingeniería

Bogotá

2022

Diseño de un biomaterial tipo hidrogel como soporte para microglía con potencial aplicación en la regeneración del sistema nervioso central

Ana María Mosquera Umbacia

Trabajo de grado para optar por el título de:

Bioingeniero

Director:

José Francisco Ibla Gordillo

Universidad El Bosque

Facultad de Ingeniería

Bioingeniería

Bogotá

2022

DEDICATORIA

A mi papá y a mi mamita.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerle al tutor de este trabajo de grado, Dr. Francisco Ibla, por su dedicación, paciencia y apoyo durante el desarrollo de este proyecto, por su conocimiento y sus sugerencias, así como el respeto a mi trabajo y mis ideas. Fue para mí un honor poder contar con su apoyo a lo largo de mi vida académica, así como sus consejos y motivación para seguir adelante.

De igual manera, quiero agradecer a los profesores Ronald Jiménez y Angélica Velandia, por su colaboración y apoyo con algunas de las pruebas y manejos de los equipos. Sus comentarios y aportes fueron sumamente importante para la realización de este trabajo. A mis jurados y evaluadores, la Dr. Sandra Perdomo y el Ingeniero Diego Vergara, por sus correcciones y sugerencias para finiquitar este proyecto de manera exitosa. Así mismo, gracias a Zandy Castellanos y Carolina Casanova por su apoyo en el laboratorio.

Este trabajo tampoco hubiese sido posible sin el apoyo de mi familia y amigos, en especial de mi mamá Rosalba, mi hermana Luisa, mi tía Mery. Gracias por ser mi primer círculo de apoyo y las mujeres más importantes de mi vida, por su paciencia, cariño y motivación para sacar este proyecto adelante.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA 3
AGRADECIMIENTOS 4
LISTA DE TABLAS 8
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE ECUACIONES 12
RESUMEN 13
ABSTRACT 14
INTRODUCCIÓN 15
CAPÍTULOS 16
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 16
2. OBJETIVOS 20
2.1. Objetivo general 20
2.2. Objetivos específicos 20
3. JUSTIFICACIÓN 21
4. MARCO REFERENCIAL 24
4.1. Antecedentes 24
4.1.1. Self-healing hydrogel for tissue repair in the central nervous system. 24
4.1.2. Collagen/chitosan-functionalized graphene oxide hydrogel provide a 3D matrix for neural stem/precursor cell survival, adhesion, infiltration, and migration 24
4.1.3. Injectable, antioxidative, and neurotrophic factor-deliverable hydrogel for peripheral nerve regeneration and neuropathic pain relief 25
4.2. Marco conceptual 25
4.2.1. Lesión de médula espinal 25
4.2.2. Terapia regenerativa 25
4.2.3. Microglía 26
4.2.4. Biomaterial 27
4.2.5. Hidrogel 27
4.2.6. Bioimpresión 3D 28
4.2.7. Biotinta 29
4.2.8. Colágeno 29

4.2.9. Quitosano 29
4.2.10. Óxidos de grafeno 30
4.2.11. Glutaraldehído 31
4.2.12. Análisis de superficie de respuesta 32
4.3. Marco legal 32
4.3.1. Artículo 4 de la Ley 150 de 2013 32
4.3.2. Resolución 2950 de 2019 33
5. REQUERIMIENTOS 34
6. METODOLOGÍA 35
6.1. Fase I: Establecer las condiciones de síntesis y obtención del biomaterial tipo hidrogel que cumpla con los requisitos físicos y de interacción de la microglía determinados en el diseño conceptual del biomaterial. 36
6.2. Fase II: Obtener el biomaterial tipo hidrogel bajo el diseño experimental establecido como criterio de diseño detallado. 37
6.3. Fase III: Evaluar el diseño detallado del hidrogel mediante pruebas físicas, morfológicas, topográficas, de hinchamiento y composición del hidrogel. 38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 44
7.1. Fase I 44
7.1.1. Requerimientos 44
7.1.2. Revisión sistemática 45
7.1.3. Selección de componentes y metodología de obtención del hidrogel 47
7.1.4. Pruebas preliminares 52
7.1.4.1. Extracción de colágeno 53
7.1.4.2. Funcionalización de quitosano con óxidos de grafeno y síntesis del hidrogel de colágeno y CSGO 56
7.2. Fase II 57
7.2.1. Establecimiento del diseño experimental factorial 58
7.2.2. Síntesis y obtención del biomaterial 59
7.3. Fase III 60
7.3.1. Caracterización morfológica 60
7.3.2. Caracterización de composición 74
7.3.3. Caracterización porcentajes de hinchamiento 78
7.3.4. Caracterización reológica del material 82

7.3.5. Análisis de superficie de respuesta 84
8. CONCLUSIONES..... 91
9. RECOMENDACIONES 92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 93

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Planteamiento de preguntas PICO 45
Tabla 2 Componentes inmersos en la pregunta PICO..... 45
Tabla 3 Estrategias de búsqueda establecidas a partir de la pregunta PICO..... 46
Tabla 4 Artículos obtenidos tras el tamizaje de información 46
Tabla 5 Criterio 1: Capacidad de gelificación..... 47
Tabla 6 Criterio 2: Biodegradabilidad..... 48
Tabla 7 Criterio 3: Funcionalización del biomaterial..... 48
Tabla 8 Criterio 4: Biocompatibilidad del biomaterial 49
Tabla 9 Criterio1: Etapas de obtención del biomaterial..... 49
Tabla 10 Criterio 2: Tiempo total de síntesis..... 50
Tabla 11 Criterio 3: Costo 50
Tabla 12 Criterio 4: Cumplimientos de los principios de química verde..... 50
Tabla 13 Matriz de selección alternativas de combinación de componentes..... 51
Tabla 14 Matriz de selección metodologías de obtención 51
Tabla 15 Diseño experimental funcionalización quitosano con óxidos de grafeno (CSGO) 58
Tabla 16 Variaciones de colágeno planteadas 59
Tabla 17 Código de las muestras establecidas..... 59
Tabla 18 Composición muestra M2Col1 61
Tabla 19 Composición muestra M3Col3 64
Tabla 20 Resultados análisis semicuantitativo elemental de la muestra M3Col3 67
Tabla 21 Composición muestra M4Col2 67
Tabla 22 Composición muestra M6Col3 68
Tabla 23 Resultados análisis semicuantitativo elemental de la muestra M6Col3 70
Tabla 24 Composición de la muestra M9Col2 71
Tabla 25 Composición de la muestra M9Col3 72
Tabla 26 Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles con el nivel 1 de colágeno (10,0 mg)..... 78
Tabla 27 Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles con el nivel 2 de colágeno (12,5 mg)..... 79
Tabla 28 Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles con el nivel 3 de colágeno (15,0 mg)..... 80
Tabla 29 Análisis de varianza % de hinchamiento 86
Tabla 30 Análisis de varianza para la superficie de respuesta de viscosidad 87
Tabla 31 Análisis de varianza tamaño del poro 89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Árbol del problema 19
Figura 2 Células de microglía 26
Figura 3 Estructura 2D CID 71853 (Quitosano) 30
Figura 4 Estructura 2D CID 124202900 (Óxido de grafeno) 31
Figura 5 Estructura 2D CID 3485 (Glutaraldehído) 31
Figura 6 Diagrama de flujo obtención de un hidrogel como soporte para microglía 36
Figura 7 Diagrama de flujo de la fase I del proyecto (Diseño conceptual del producto) 37
Figura 8 Diagrama de flujo fase II del proyecto (Diseño detallado del producto). 37
Figura 9 Diagrama de flujo fase III del proyecto (Evaluación del diseño) 38
Figura 10 Diagrama de flujo para la caracterización de morfología y topografía del hidrogel siguiendo la metodología descrita por (C. Chen et al., 2013). 39
Figura 11 Diagrama de flujo evaluación del porcentaje de hinchamiento de acuerdo con el método de la norma ASTM WK21927. 40
Figura 12 Diagrama metodología caracterización reológica de las muestras basado en la metodología descrita por (Zuidema et al., 2014) 41
Figura 13 Diagrama de flujo evaluación de composición por medio de EITF 42
Figura 14 Diagrama de flujo para el análisis de superficie de respuesta 43
Figura 15 Metodología preparación de CSGO descrita por (Rezaei et al., 2021) 52
Figura 16 Metodología preparación hidrogeles de colágeno y CSGO descrita por (Rezaei et al., 2021) 53
Figura 17 Metodología propuesta para la extracción de colágeno bovino tipo I a partir de cola de vaca 54
Figura 18 (A)Imagen estereoscopio X4,5 del colágeno extraído a partir de la metodología propuesta (Estereoscopio Olympus SZ61) y (B) su respectivo IFTR 55
Figura 19 Espectrofotometría infrarroja de Fourier para el colágeno reportado en bibliografía 56
Figura 20 Funcionalización preliminar del quitosano con óxidos de grafeno. 57
Figura 21 Hidrogeles de Col 1 y Col 2 con Muestra 3 60
Figura 22 Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M2Col1 magnificación 5,00 kx 62
Figura 23 Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M2Col1 magnificación 500 x 63
Figura 24 Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M2Col1 magnificación 500 x 64
Figura 25 Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M3Col3 magnificación 5,00 kx 65
Figura 26 Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M3Col3 magnificación 500x 66

Figura 27 Análisis químico semicuantitativo elemental de la muestra M3Col3 obtenido a través de la microscopía electrónica de barrido 66
Figura 28 Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M4Col2 magnificación 5,00 kx 68
Figura 29 Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M6Col3 magnificación 5,00 kx 69
Figura 30 Análisis químico semicuantitativo elemental de la muestra M6Col3 obtenido a través de la microscopía electrónica de barrido 70
Figura 31 Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M9Col2 magnificación 942 x 71
Figura 32 Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M9Col2 magnificación 20,0 kx 72
Figura 33 Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M9Col3 magnificación 5,00 kx 73
Figura 34 Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M9Col3 magnificación 5,00 kx 73
Figura 35 Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M9Col3 magnificación 20,0 kx 74
Figura 36 Estructura química del quitosano funcionalizado con óxidos de grafeno y colágeno 75
Figura 37 Espectro IR de las muestras M1Col1, M4Col1, M7Col 1 y M10Col1... 76
Figura 38 Espectro IR de las muestras M1Col2, M2Col2, M4Col2 y M9Col2 77
Figura 39 Espectro IR de las muestras M1Col3, M5Col3, M7Col3 y M8Col3 77
Figura 40 Porcentaje de hinchamiento de las muestras con el nivel 1 de colágeno (10,0 mg) 79
Figura 41 Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles con el nivel 2 de colágeno (12,5 mg) 80
Figura 42 Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles con el nivel 3 de colágeno (15,0 mg) 81
Figura 43 Resultados viscosidad muestras en función de la tasa de corte. 83
Figura 44 Resultados viscosidad muestras en función de la tasa de corte. 83
Figura 45 Referencia de un análisis de superficie de respuesta 84
Figura 46 Análisis de superficie de respuesta de la relación concentración de colágeno, concentración de quitosano, y concentración de GO sobre el porcentaje de hinchamiento 85
Figura 47 Análisis de superficie de respuesta de la relación concentración de colágeno, concentración de quitosano, y concentración de GO sobre la viscosidad 87
Figura 48 Análisis de superficie de respuesta de la relación concentración de GO y el porcentaje de hinchamiento sobre el tamaño del poro 88

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1 Ecuación porcentaje de hinchamiento base húmeda 40
Ecuación 2 Modelo de regresión de segundo orden 85

RESUMEN

El sistema nervioso central es una red compleja de conexiones sinápticas que cumplen diversas funciones motoras, cognitivas y sensoriales en un individuo. Las lesiones en este sistema son particularmente difíciles de tratar debido a la poca capacidad de regeneración intrínseca del tejido. La aplicación de principios de ingeniería de tejidos junto con el diseño de biomateriales con características físicas y químicas específicas para el sistema ha proveído efectos que permitan modular el microambiente reactivo de la lesión. Este proyecto propuso el desarrollo de un biomaterial tipo hidrogel, que, cumpliendo los requerimientos biológicos del sistema, pueda servir como soporte para la microglía durante los procesos de regeneración. Los componentes de este biomaterial se definieron a través de una revisión sistemática, que permitió establecer una combinación de óxidos de grafeno, colágeno y quitosano. A partir de esta selección, se procedió a realizar el planteamiento de 2 diseños experimentales que permitiera evaluar los diferentes tratamientos aplicados, y a través de una serie de caracterizaciones morfológicas y topográficas por medio de microscopía electrónica de barrido, físicas como lo son el porcentaje de hinchamiento y pruebas reológicas y evaluaciones de composición por medio de espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier. Estas caracterizaciones permitieron la construcción de un análisis de superficie de respuesta que permitió identificar a la muestra M3Col2 como el biomaterial con la composición con las mejores características para servir como soporte para la microglía en procesos de regeneración nerviosa.

Palabras clave: Quitosano, óxidos de grafeno, colágeno, regeneración, microglía, biomaterial, hidrogel.

ABSTRACT

The central nervous system is a complex network of synaptic connections that is responsible for individuals' motor, cognitive, and sensory functioning. Injuries caused to this system are particularly difficult to manage and treat due to its tissues' weak capacity to regenerate. The employment of tissue engineering principles in conjunction with the development of biomaterials with special physical and chemical properties for the system provided results that enabled the regulation of lesions' reactive microenvironment. This project aimed to develop a hydrogel-type biomaterial that could assist microglia during regeneration processes, considering the biological requirements of the system. The components of this biomaterial were selected through a systematic inspection, which helped determine the combination of graphene oxides, collagen, and chitosan. After this, we proceeded to devise the structure of two experimental designs that facilitated evaluating the application of different treatments. Through a series of morphological and topographic characterizations, which were realized through scanning electron microscopy, rheological evaluations, physical evaluations such as the swelling percentage of the material, and composition analysis through EDX and FTIR, a response surface analysis was constructed, that identified M3Col2 as the biomaterial with a composition that demonstrated the best characteristics to support the microglia in nerve regeneration processes.

Keywords: Chitosan, graphene oxide, collagen, regeneration, microglia, biomaterial, hydrogel.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, las lesiones de médula espinal se consideran un problema de salud pública debido a su alta mortalidad y morbilidad. Estas lesiones pueden llegar a causar daños temporales o permanentes en las funciones sensoriales y motoras del paciente, y se asocian de forma frecuente a traumas de orígenes intencionales o no (Giraldo et al., 2021).

El sistema nervioso central es una red compleja de células que se encarga de controlar y dirigir las funciones cognitivas, sensoriales y motoras de los individuos. La complejidad de este sistema, junto a su poca capacidad de regeneración hace que los diferentes desórdenes o lesiones presentadas se vean limitados en las posibilidades de tratamientos relacionados y dirigidos al manejo y cura de los mismos. La mayoría de estos desórdenes son irreversibles y causan muerte celular que, a largos plazos, pueden afectar las funciones del SNC(Assunção-Silva et al., 2015).

Hasta el momento se han desarrollado diferentes avances en nanotecnología e ingeniería de tejidos que pueden llegar a promover la regeneración neural y funcional de manera exitosa. El aplicar principios de la ingeniería de tejidos con materiales diseñados específicamente para promover la regeneración y la biocompatibilidad con el sistema al que será introducido, permite modular el microambiente al que será ingresado y de esta manera promover la reparación y el crecimiento celular (Hsu & Chen, 2018; Tsui et al., 2019). Para lograr este fin, diversos tipos de andamios, como los hidrogeles, polímeros sólidos porosos, materiales fibrosos y descelularizados se han usado en estos avances con fines terapéuticos en la ingeniería de tejido para el CNS. De estas formas de materiales previamente mencionadas, los hidrogeles presentan la capacidad de mimetizar las propiedades mecánicas del sistema nervioso y facilitar la transferencia efectiva de nutrientes y gases gracias a su porosidad y su naturaleza hidratada (A. R. Murphy et al., 2017).

Con el fin de proponer nuevas alternativas en el desarrollo de biomateriales que puedan superar las barreras físicas y biológicas que se han presentado hasta el momento en los diferentes acercamientos clínicos, este proyecto se basó en la obtención de un biomaterial tipo hidrogel que pueda servir como soporte de la línea celular microglía, precursora del SNC y encargada de la respuesta inmune del sistema nervioso, mediante una revisión sistemática que permitiera identificar los componentes del material, un diseño experimental y el posterior análisis de las características físicas, morfológicas y químicas del material propuesto.

CAPÍTULOS

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema nervioso (junto al sistema endocrino y al sistema inmunitario) es uno de los 3 sistemas encargados de coordinar las funciones del cuerpo humano. En específico, este sistema recibe información del mundo exterior y de los órganos internos, para así determinar las respuestas adecuadas a los cambios que se den es estos dos ámbitos. El sistema nervioso se divide en Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP) (Esteves et al., 2020).

El SNC -compuesto por el encéfalo, la médula espinal y la retina- presenta una capacidad limitada para su regeneración espontanea tras sufrir de una lesión, que junto con una variedad reducida de estrategias para promover el proceso regenerativo, hace que las opciones de tratamiento para pacientes con lesiones o enfermedades del SNC sean escasas (Tsui et al., 2019). Parte de estas limitaciones surgen por el gran número de mecanismos que están asociados a las lesiones del SNC, como la necrosis y apoptosis (de neuronas, oligodendrocitos y astrocitos), desmielinización, excitotoxicidad, isquemia, daños oxidativos, inflamación, entre otros (Weidner et al., 2017). Sumado a esto, hay una ausencia notable de factores promotores de crecimiento axonal y una presencia prolongada de moléculas inhibidoras de estos factores (asociados a la activación de la microglía y la formación de la cicatriz glial) (Sabelström et al., 2013).

Las lesiones del cerebro y médula espinal adquieren día a día importancia a nivel mundial, tanto económica como socialmente: se calcula que este tipo de lesiones tiene una incidencia mundial anual que oscila entre los 40 y 80 casos por cada millón de habitantes (National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2017). La mayoría de estos casos se encuentran asociados a accidentes automovilísticos, caídas y lesiones relacionadas a deportes o violencia (Ahuja et al., 2017).

En Colombia según los reportes de ciudades como Cali y Medellín, la epidemiología de traumatismo raquimedular (TRM) es un problema social que, a pesar de poder presentarse en individuos de cualquier edad, afecta en su mayoría a la población joven con un promedio de edad de 28 años, del cual entre el 80 y 90% son hombres, y sus principales causas son las lesiones derivadas por armas de fuego y accidentes de tránsito (Burbano-López & Sánchez, 2017). Hasta el momento, el TRM genera enormes costos médicos, psicosociales y económicos, y tiene un impacto directo sobre el individuo, la familia de este y la sociedad (Chiu et al., 2010). Según el estudio realizado en el Hospital Pablo Tobón Uribe de Medellín, entre las historias clínicas revisadas de los pacientes admitidos con traumas raquimedulares entre enero de 2005 y diciembre de 2010, se pudo establecer que el Hospital recibió 68 casos de TRM, con una frecuencia de 12 casos por cada 1000 pacientes admitidos

en UCI. Se pudo observar también que hubo una mortalidad hospitalaria del 21% (Carvajal et al., 2015).

Las lesiones medulares se definen como el daño que se ocasiona en la médula espinal que puede causar cambios temporales o permanentes sobre su función. Estas lesiones pueden dividirse en etiologías traumáticas y no traumáticas (Ahuja et al., 2017). Los daños causados asociados a este tipo de lesiones se caracterizan por: muerte celular, pérdida axonal, degradación de mielina, activación de las células del sistema inmune e interrupción de los suministros de sangre de la barrera hemática de la médula. Los primeros daños provocados por esas lesiones tienden a ser mecánicos, pero con el paso del tiempo, una cascada de eventos secundarios da pie a daños como: inflamación, hemorragias, edemas, producción de especies reactivas de oxígeno y excitotoxicidad (Kroner & Rosas Almanza, 2019).

La obtención de estrategias terapéuticas exitosas para el tratamiento de este tipo de lesiones y traumas se ve obstaculizado por factores biológicos y tecnológicos. A nivel biológico, todos los mecanismos de inflamación activados cuando sucede una lesión generan un ambiente hostil debido a la naturaleza tóxica de la misma, existe un desequilibrio de su microambiente en el que hay un aumento de factores de inhibición de la regeneración y una disminución de los factores promotores de crecimiento de tejidos, células y otras moléculas (Fan et al., 2018). (Fan et al., 2018)Esta respuesta se encuentra directamente ligada a la microglía, que es la línea celular encargada de la respuesta inmune del SNC y cuya activación se da por cambios bruscos o amenazas dentro del sistema (Gomes-Leal, 2012). La microglía posee roles vitales en el establecimiento y mantenimiento del funcionamiento del sistema nervioso y es capaz de determinar el curso de las neuronas tras una lesión (Tsui et al., 2019).

A nivel tecnológico, las terapias hasta ahora existentes presentan restricciones en sus diseños. Se han desarrollado múltiples terapias con biomateriales para promover la regeneración axonal, entre los acercamientos más exitosos se encuentran: modelos de nanopartículas e hidrogeles de colágeno, laminina y ácido poliglicólico (PLGA) para apoyar el crecimiento de las conexiones neurales preexistentes (Hlavac et al., 2020; Koss & Unsworth, 2016). Dentro de estos biomateriales, se ha considerado el desarrollo de hidrogeles, que se definen como una red de polímeros tridimensionales que contienen altos porcentajes de agua. Se caracterizan por tener una porosidad, tamaño de poro y geometría que puede ser modificada durante la síntesis del hidrogel, estas características de porosidad les permite albergar biomoléculas, fármacos e incluso células que pueden ser empleados para estrategias terapéuticas (Vijay Kumar Thakur, 2018).

Existe un gran interés en el desarrollo de hidrogeles para la regeneración del SNC, ya que este tipo de biomaterial es capaz de simular las propiedades químicas, físicas y mecánicas de la matriz extracelular (MEC) que permiten la adhesión, proliferación y diferenciación de las células (Tam et al., 2014). Sin embargo, el

diseño de estructuras capaces de simular estas características se ve afectado por las técnicas de biofabricación existentes y accesibles en el momento. Los métodos convencionales existentes para el cultivo de células para la generación de tejidos artificiales son realizados usualmente en ambientes 2D, y en consecuencia la estructura del tejido a formar se ve limitado dado que adopta una estructura planar que es diferente a las estructuras 3D complejas presentes en los tejidos de los seres vivos (Hsu & Chen, 2018). Las estructuras neurales poseen dinámicas complicadas dado que las células presentes en el SNC requieren geometrías específicas y presentan una alta sensibilidad al revestimiento de la superficie con la que interactúan (Sun & Gao, 2012; Wongsarnpigoon & Grill, 2012).

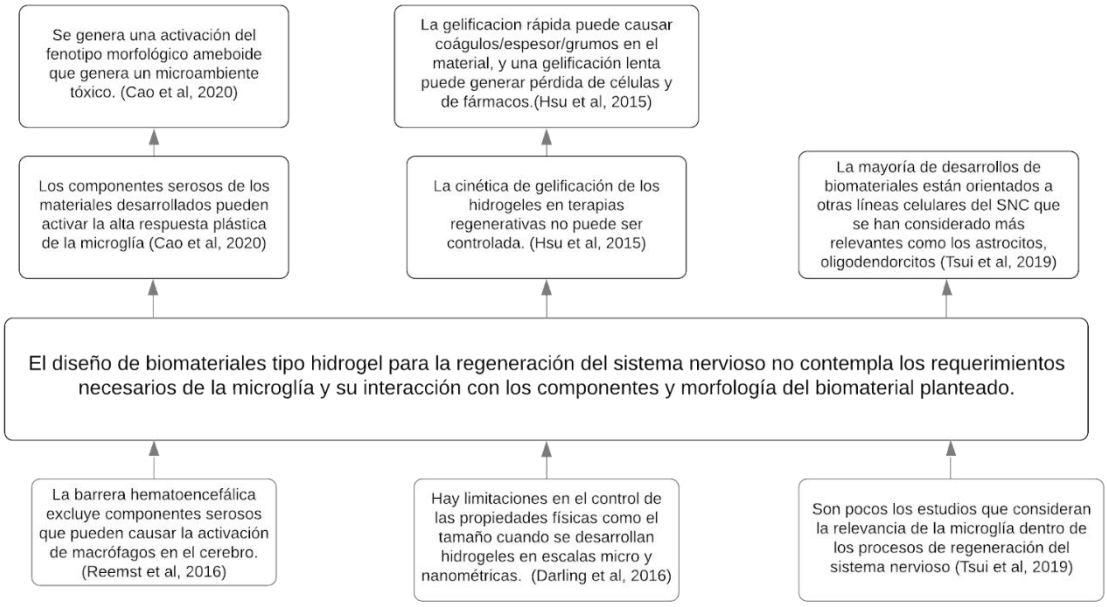
Dada la necesidad de crear técnicas que permitan obtener estructuras en 3D adaptables a las diferentes líneas celulares componentes del SNC, y los resultados favorables en estudios comparativos entre el crecimiento de cultivos celulares en ambientes 2D y 3D, se han empezado a explorar técnicas de bioimpresión 3D que hasta el momento han tenido resultados exitosos, mostrando crecimientos de dendritas superiores a los crecimientos observados en cultivos planos 2D. Para poder avanzar en estas técnicas, es necesario que la biotinta a imprimir tenga la capacidad de mantener las células vivas, activas y adheridas a la tinta, y que esta sea imprimible. Así mismo, esta tinta debe tener una resistencia mecánica que le permita mantener su forma luego de ser impresa (Hsu & Chen, 2018). Estos materiales también deben superar las barreras que hay en el control de sus propiedades físicas, como tamaño de los poros, cuando se desarrollan en escalas micro y nanométricas, que dificultan las cinéticas de gelificación del material (Darling et al., 2016; Hsieh et al., 2015).

Las traslaciones clínicas de estas terapias desarrolladas han demostrado limitaciones en términos de biocompatibilidad debido a la activación de la microglía como consecuencia del no reconocimiento de los materiales empleados en los procedimientos(Assunção-Silva et al., 2015; Aurand et al., 2012). Esto hace que la eficacia de las nuevas estrategias se vea comprometida por las limitaciones impuestas por el sistema inmune cuando no se toma en cuenta sus comportamientos en el microambiente en el que el material será introducido, así como los mismos requerimientos biológicos del sistema en términos de morfología, superficie y geometría (Hsu & Chen, 2018).

Los estudios existentes se han enfocado en otras líneas celulares que se han llegado a considerar más relevantes para la regeneración del sistema nervioso, como los astrocitos y oligodendrocitos(Tsui et al., 2019), sin tener en cuenta la multifuncionalidad de esta línea celular, que juega un rol importante en el establecimiento de la funcionalidad del SNC y su papel en la atenuación de la respuesta inflamatoria (Tsui et al., 2019). Es por ello por lo que se considera como situación problema que el diseño de los biomateriales tipo hidrogel para la regeneración del sistema nervioso no contemple los requerimientos necesarios de

la microglía y su interacción con los componentes y morfología del biomaterial planteado.

Figura 1
Árbol del problema



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Diseñar un biomaterial tipo hidrogel con potencial aplicación en el desarrollo de biotintas adaptadas a la microglía.

2.2. Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de síntesis y obtención del biomaterial tipo hidrogel que cumpla con los requisitos físicos y de interacción de la microglía determinados en el diseño conceptual del biomaterial.
- Obtener el biomaterial tipo hidrogel bajo el diseño experimental establecido como criterio de diseño detallado.
- Evaluar el diseño detallado del hidrogel mediante pruebas físicas, morfológicas, topográficas, de hinchamiento y composición del hidrogel.

3. JUSTIFICACIÓN

El propósito de este trabajo de grado en opción de producto es el diseño de un biomaterial con potencial aplicación en terapias de regeneración en SN considerando los requerimientos biológicos de la microglía, que, como indica en el título, pretende brindar un diseño que tenga aplicaciones en la impresión 3D y pueda aportar en las condiciones de síntesis, obtención y fabricación de estos materiales con fines regenerativos teniendo en cuenta las condiciones específicas de la línea celular de la microglía, responsable de la falla de previos acercamientos con este tipo de terapias en el momento de la traslación clínica.

Actualmente los biomateriales son componentes clave para las aplicaciones de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos, y su éxito depende de la capacidad que tenga el material diseñado para soportar y guiar el crecimiento de las células durante los procesos de sanación y remodelación del tejido (Rahmati et al., 2018). Estos biomateriales deben contar con características específicas que le permitan recrear los aspectos del tejido sano y que soporten los procesos de crecimiento y guía celular, por lo que el diseño de este debe tener en cuenta todos los procesos a los que el biomaterial será sometido y de esta manera evaluar las características físicas y mecánicas de este (Aurand et al., 2012).

Sin embargo, el obtener terapias exitosas se ha dificultado por la complejidad que presenta el Sistema Nervioso (Reemst et al., 2016). Una de las causas de estas fallas es la poca consideración que se tiene de la microglía dentro del proceso neuro inflamatorio, y su interacción con el biomaterial(Tsui et al., 2019). Dentro de los estudios propuestos por Leung et al., y Li et al., se demostró que el uso de hidrogeles activa la microglía, pero no produce apoptosis en el cuerpo estriado, lo que se considera beneficioso en términos de biocompatibilidad (Li et al., 2016). No obstante, estos biomateriales presentan limitaciones en sus aplicaciones *in vivo*, puesto que su composición y características topográficas no son pensadas en relación con el ambiente citotóxico en el que son introducidos y hace que sean reconocidos como cuerpos extraños, lo que aumenta la adhesión de la microglía y, por ende, la respuesta de incompatibilidad con el sistema (Hsieh et al., 2015).

El presente trabajo se encuentra enmarcado en el foco misional de tecnologías para la salud de entes biológicos del programa de Bioingeniería de la Universidad El Bosque. Este foco misional se centra en el desarrollo de tecnologías que permitan solucionar problemas de la salud humana o animal, integrando los conocimientos de las ciencias naturales y la ingeniería para aportar soluciones creativas que se ajusten a las necesidades de salud y de calidad de vida de individuos, comunidades y sistemas biológicos, que finalmente contribuye al objetivo de desarrollo sostenible 3, garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades.

El programa de Bioingeniería de la Universidad El Bosque cuenta con el Semillero de Biomateriales, especializado en el desarrollo y funcionalización de biomateriales para aplicaciones en terapias regenerativas, que antes ha realizado proyectos en regeneración ósea en cavidad oral, y que ahora evalúa posibles diseños de biotintas para ser empleadas en regeneración de sistema nervioso. El entendimiento del sistema biológico y las herramientas de diseño y tecnología que aporta la ingeniería se puede apreciar específicamente en el desarrollo de materiales biocompatibles para procesos de regeneración nerviosa, entre ellos, la regeneración de la médula espinal.

En Colombia no existen muchas fuentes bibliográficas que indiquen que tanta incidencia o prevalencia existe de la lesión medular, según datos del Ministerio de Salud y Protección Social, para el año 2017 el 25.33% de las personas con discapacidades en Colombia expresaron que la alteración que más les afecta se presenta en el sistema nervioso. De este grupo poblacional, el 47% son menores de edad entre los 0 y 18 años (Ministerio de Salud, 2018). Sin embargo, dentro de estas cifras no se presenta una estadística que indique específicamente que tipo de alteración o lesión presenta el sistema nervioso. Estas lesiones pueden llegar a causar complicaciones médicas como disminución de la función pulmonar, complicaciones respiratorias que requieren de intubación, irregularidad en latidos cardiacos y descenso de la presión arterial, coágulos sanguíneos, espasmos, disreflexia autónoma, dolor, entre otros (Esteves et al., 2020).

Dada la importancia de la respuesta inflamatoria, y la falta de desarrollos y diseños que tengan en cuenta la microglía y el microambiente citotóxico que genera, es necesario que el diseño de biomateriales para la regeneración del SNC contemple los requerimientos necesarios desde la microglía y su interacción con los componentes y la morfología del biomaterial planteado.

Este proyecto propone el diseño experimental de un hidrogel con funciones específicas para su aplicación como potencial biotinta en terapias de regeneración del sistema nervioso central, funcionalizado específicamente para la línea celular microglía, por lo que no será útil para tratar terapias que tengan otros enfoques. Las fases de diseño y obtención se basan en el desarrollo de un diseño experimental basado en bibliografía que permitirá obtener el bosquejo de composición del diseño preliminar propuesto en base a las características físicas y químicas de la microglía que se definieron como requerimientos para este producto. Una vez terminada esta fase, se procede a realizar una caracterización de los resultados obtenidos en términos de sus características físicas, morfológicas, capacidad de hinchamiento y composición del hidrogel obtenido ya que estas son las características que se consideran clave en el desarrollo de biomateriales enfocados en la microglía. Así mismo, se realizarán pruebas reológicas y de otras propiedades físicas del material obtenido que nos permita analizar su futuro comportamiento como material imprimible, dentro de estas evaluaciones se consideran la viscosidad y la densidad del material.

Todas las condiciones biológicas que se deben tener en cuenta para el desarrollo del biomaterial se contemplarán desde la revisión bibliográfica y considerarán durante el planteamiento del diseño detallado del material.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. Antecedentes

4.1.1. Self-healing hydrogel for tissue repair in the central nervous system.

Desarrollado por Fu-Yu Hsieh, Ting-Chen Tseng y Shan-hui Hsu en 2015, desarrollaron un hidrogel inyectable de autosanación para curar desórdenes en el SNC. Este hidrogel se hizo a base de quitosano, con un módulo de 1,5 kPa y un mecanismo de sanación de daño que promueve la supervivencia y el crecimiento de nuero esferas con capacidad progenitora. Para el ensayo preclínico escogieron peces cebra, ya que se conoce que son especies confiables, donde el proceso se dará de manera rápida y segura. Para comprobar si el hidrogel desarrollado podía curar los daños presentes en el SNC, se destruyó el SNC de los embriones de peces cebra usando etanol al 2%. Finalmente pudieron comprobar que los embriones tratados con el hidrogel que poseían las esferas tenían tasas de eclosión del 73%, a diferencia de los embriones tratados únicamente con el hidrogel, que tuvieron tasas de eclosión de un 13%. El uso de hidrogeles inyectables para liberación controlada de células en el SNC es uno de los actuales tratamientos terapéuticos para tratar lesiones o daños en el SNC (Hsieh et al., 2015).

4.1.2. Collagen/chitosan-functionalized graphene oxide hydrogel provide a 3D matrix for neural stem/precursor cell survival, adhesion, infiltration, and migration

Este estudio publicado en el 2021 por Anita Rezaei, Hadi Aligholi, Zahra Zeraatpisheh, Amad Gholami y Esmaeil Mirzaei en el Journal of Bioactive and compatible polymers brinda un acercamiento a una de las terapias más prometedoras desarrolladas hasta le momento enfocadas en células madre del sistema nervioso central. Para este desarrollo, los investigadores propusieron un hidrogel de colágeno y quitosano funcionalizado con óxido de grafeno y evaluaron sus características como un andamio para las células madre neurales/ células precursoras del sistema nervioso central.

Dentro de sus estudios y evaluaciones pudieron evidenciar que la funcionalización del quitosano con óxidos de grafeno resulta en hidrogeles con mayor porosidad y capacidad de adsorción de agua, al mismo tiempo que la degradación del material se vio disminuida. Adicionalmente, los estudios con células les permitió evidenciar una mayor viabilidad de las células precursoras del sistema nervioso en los

hidrogeles con la mezcla propuesta en lugar del hidrogel control (Rezaei et al., 2021).

4.1.3. Injectable, antioxidative, and neurotrophic factor-deliverable hydrogel for peripheral nerve regeneration and neuropathic pain relief

Este estudio tuvo como finalidad el desarrollo de un hidrogel multifuncional de ácido hialurónico- ácido fenil burónico- alcohol polivinílico- heparina (HA-PVA-Hep), con el fin de proponer un hidrogel biocompatible, estable, inyectable, antiinflamatorio y con la capacidad de liberar de forma sostenible factores neurotróficos. Se investigó el efecto terapéutico del hidrogel propuesto para reparar las lesiones en nervios periféricos haciendo uso de un modelo de aplastamiento de nervio en ratones. Esto les permitió a los investigadores evidenciar que el hidrogel podía aliviar el dolor inducido por la lesión en nervio periférico, y adicionalmente mejorar de manera efectiva la función sensoriomotora y previno significativamente la atrofia muscular, lo que les permitió evidenciar la regeneración del nervio, así como la remielinización del mismo tras 28 días de la lesión (Kong et al., 2021).

4.2. Marco conceptual

4.2.1. Lesión de médula espinal

Es una de las lesiones más devastadoras en le SNC, esta comprende un trauma que se puede dividir en procesos primarios y secundarios. En la lesión primaria existe un trauma mecánico que se da por la transmisión de energía al cordón espinal, la deformidad y la compresión que esta ejerce en el mismo. Por esta razón se produce una disrupción axonal, vascular y de membranas celulares que provocan la muerte celular, edemas e isquemias que desencadenan procesos de liberación de radicales libres, alteraciones hidroelectrolíticas con cito-toxicidad y apoptosis celular sostenida que provocan un deterioro sostenido de la destrucción celular (Plaza et al., 2012).

4.2.2. Terapia regenerativa

Se conoce como terapia regenerativa el proceso de reemplazar, ingeniar o regenerar células, tejidos y órganos de animales (humanos y no humanos) para restaurar la su función normal de los mismos (Mason & Dunnill, 2008). El objetivo de este campo es la ingeniería de tejidos y órganos dañados mediante la estimulación de los mecanismos intrínsecos de reparación del cuerpo para sanar y

recuperar las funciones originales del tejido u órganos que previamente eran irreparables (Mahla, 2016).

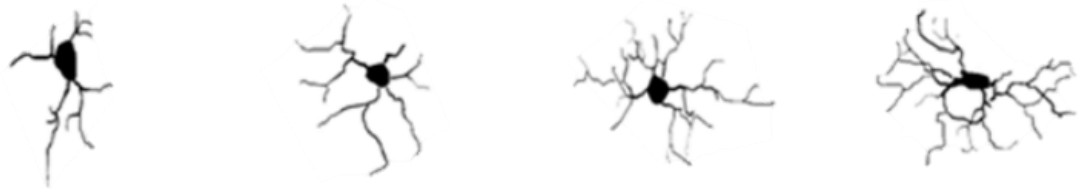
En estas terapias también se contemplan las posibilidades de la generación de órganos y tejidos *in vitro* que puedan ser implantadas *in vivo* cuando los mecanismos del cuerpo no pueden ser estimulados por el mismo organismo (Mahla, 2016).

4.2.3. Microglía

La microglía es una célula macrófaga perteneciente al sistema inmune de los seres humanos (Esteves et al., 2020). Poseen una característica particular que la diferencia de otras células gliales, tienen un origen mesodérmico, mientras que el resto de estas células se derivan de la dermis del tubo neural (Ransohoff & Perry, 2009).

La microglía posee 2 fenotipos característicos: su estado de vigilancia (M1) y su estado ameboide (M2). En un cerebro saludable con condiciones normales tiene un fenotipo distintivo (M1) que es inducido por las moléculas expresadas o segregadas por las neuronas o astrocitos adyacentes. Este fenotipo, como se observa en la figura 1, no se asemeja a un macrófago, sino que más bien luce como una neurona; dadas sus prolongaciones largas y delgadas, que le permite sensar y percibir el microambiente local (Ransohoff & Perry, 2009).

Figura 2
Células de microglía



Nota: Células de microglía de la corteza prefrontal. Adaptado de (Kongsui et al., 2014).

4.2.4. Biomaterial

Los biomateriales se definen como una sustancia que se ha diseñada para que sola o en conjunto con un sistema, pueda dirigir el curso de procedimientos terapéuticos o de diagnóstico mediante el control de interacciones de la sustancia con el sistema en el que se encuentra. Los biomateriales pueden ser implantes (dentales, cardíacos, lentes intraoculares, ligamentos, injertos vasculares, entre otros) o como dispositivos médicos (órganos artificiales, biosensores, marcapasos, etc.). Estos son usados para sustituir o mejorar las funciones de aquellos órganos o tejidos que has sufrido procesos de degeneración o que han sido dañados. Sus aplicaciones principales se encuentran en la medicina regenerativa y se valen de sus múltiples características físicas y químicas para apoyar los procesos regenerativos necesarios (Hudecki et al., 2018).

Los biomateriales pueden clasificarse en las siguientes categorías (Hudecki et al., 2018):

I. Materiales reabsorbibles: que son capaces de desintegrarse tras su implantación en el organismo y se reabsorbe en su entorno tisular.
II. Materiales no reabsorbibles: aquellos que no se desintegran ni se reabsorben en el organismo.

También pueden ser clasificados según el principio de los mismos, si son bioinertes (que provocan una respuesta tisular baja o nula), bioactivos (que favorecen la unión con el tejido circundante), biodegradables (que pueden liberar su masa en el tejido adyacente y logran disolverse gradualmente en un periodo determinado de tiempo (Hudecki et al., 2018).

En general, se puede decir que los metales son materiales inertes; los polímeros pueden llegar a ser inertes o reabsorbibles; y las cerámicas pueden ser inertes, reabsorbibles o activas. Para lograr estas características, el diseño y selección de los biomateriales debe tener en cuenta numerosas propiedades que se dividen en: mecánicas, físicas, químicas y biológicas, que, usualmente se encuentran entrelazadas (Bandyopadhyay & Bose, 2013). Estas propiedades responden al uso específico del biomaterial, por lo cual su diseño debe estar basado en un contexto biofuncional, donde sus características le permitan llevar a cabo su función como implante o como dispositivo médico (Hudecki et al., 2018).

4.2.5. Hidrogel

Los hidrogeles se definen como redes poliméricas capaces de captar y almacenar grandes cantidades de agua. Estos cuentan con grupos hidrófilos que al ser hidratados en un medio acuoso permite la formación de la estructura del hidrogel. Los hidrogeles se caracterizan por tener una estructura porosa, donde la geometría

y el tamaño del poro pueden ser controlados durante los procesos de síntesis del mismo, lo que es bastante útil para el almacenamiento de moléculas bioactivas. Estos hidrogeles poseen características reológicas que los asemejan al tejido vivo de los organismos, lo que lo convierte en una herramienta versátil para diferentes acercamientos a problemáticas de regeneración tisular, pues logran evitar ciertas problemáticas de biocompatibilidad y diferenciación celular (Vijay Kumar Thakur, 2018).

La formulación general de los hidrogeles biodegradables se compone de un monómero, un iniciador y un agente reticulante. Estos hidrogeles biodegradables se derivan de varias fuentes ya sean naturales, semisintéticas o sintéticas que son capaces de sustituir a los hidrogeles no biodegradables en las aplicaciones médicas, biomédicas y farmacológicas. Esta combinación de componentes ha permitido que los avances en hidrogeles hayan permitido superar obstáculos antes presentes en la formulación de los hidrogeles convencionales como son la biodegradabilidad, la bioadhesión, la biomimética y las limitaciones que presenta tener un hidrogel *in situ* (Vinchhi et al., 2021).

4.2.6. Bioimpresión 3D

La bioimpresión 3D se define como la impresión de estructuras utilizando células viables, biomateriales y moléculas biológicas. Una ventaja importante de la bioimpresión es que evita los problemas de homogeneidad que acompañan a la siembra de células después de la fabricación, ya que la colocación de las células se incluye durante el proceso de fabricación (Moroni et al., 2018; S. V. Murphy & Atala, 2014). La bioimpresión debe producir andamios con una microarquitectura adecuada que proporcione estabilidad mecánica y promueva el crecimiento celular, al tiempo que se tiene en cuenta el impacto de la fabricación en la viabilidad celular; por ejemplo, la citotoxicidad química causada por el uso de disolventes o el efecto apoptótico inducido por la presión producida durante la extrusión del material (Kačarević et al., 2018). La ventaja de los andamios cargados de células distribuidas homogéneamente ha quedado demostrada por una integración más rápida con el tejido del huésped, un menor riesgo de rechazo y, lo que es más importante, un crecimiento uniforme del tejido *in vivo* (Kačarević et al., 2018). Las técnicas convencionales de siembra de células son estáticas o dinámicas, y aunque esta última da lugar a una mayor eficacia de siembra y penetración celular en el andamio, se sabe que afecta a la morfología celular (Villalona et al., 2010).

4.2.7. Biotinta

Las biotintas se definen como un conjunto de materiales y células diseñados para ser sometidos a procesos automatizados mediante técnicas de biofabricación como lo son la estereolitografía (SLA), la transferencia inducida por láser (LIFT), escritura directa, entre otras. Estas biotintas pueden estas compuestas por un solo material o de múltiples materiales para desarrollar biotintas a la medida de la técnica a impresión a usar y sus aplicaciones. Los parámetros claves para la selección del material son: imprimibilidad, propiedades mecánicas, degradación funcionalidad, bioquímica, viabilidad celular y biocompatibilidad (Ozbolat, 2016).

4.2.8. Colágeno

El colágeno es considerado una de las proteínas más abundantes presentes en los mamíferos, llegando a componer aproximadamente un 30% de peso en las proteínas de tejido del cuerpo (Patino et al., 2002). Su prevalencia en el tejido humano hace que tenga propiedades biodegradables, biocompatibles, y que mejore la penetración celular y la reparación de lesiones. Estas características hacen que sea una de las opciones más viables como polímeros empleados en materiales biomédicos y matrices de ingeniería de tejidos (Abraham et al., 2008).

En la actualidad, se conocen cerca de 20 tipos de colágeno. El colágeno formador de fibrillas se conoce como colágeno tipo I, II, III, V y XI. Estos son capaces de formar fibras altamente organizadas y fibrillas que servirán como soporte para el cuerpo en el esqueleto, piel, vasos sanguíneos, nervios e intestinos. El colágeno tipo I es específico está compuesto de 3 cadenas: 2 cadenas α-1 (I) idénticas, y una cadena diferente conocida como α-2 (I). Este tipo de colágeno es particularmente abundante en huesos, tendones, piel, ligamentos, arterias, útero y córnea, comprendiendo un estimado del 80% y 99% de total de colágeno en su composición (Patino et al., 2002). Su tamaño se encuentra alrededor de los 300 nm de diámetro, agrupándose para formar fibras de mayores dimensiones. La molécula de colágeno está cerca de los 300 kDa, compuesta de aproximadamente 10% de prolina e hidroxiprolina, y tiene glicina presente en la posición de cada tercer aminoácido (Abraham et al., 2008).

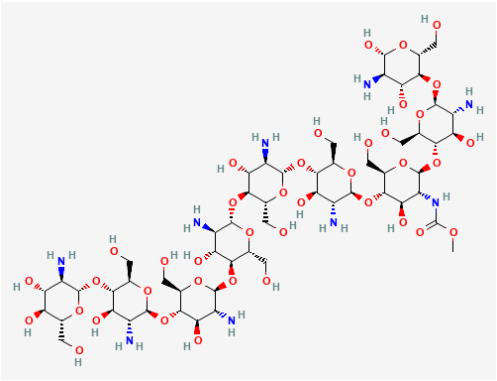
4.2.9. Quitosano

El quitosano es un polímero natural que se deriva de la desacetilación de la quitina, adicionalmente posee unas propiedades fisicoquímicas que lo hacen de gran interés para la industria (Blanquicet Macea et al., 2015). El quitosano es el único

polisacárido alcalino presente en la naturaleza, adicionalmente no es tóxico, es biocompatible y se degrada de manera natural a amino azúcares, los cuales son completamente adsorbidos por el cuerpo (Bakshi et al., 2020).

Las propiedades físicas y químicas del quitosano dependen de su peso molecular (MW), grado de desacetilación (DDA), grado de cristalinidad, exención de ionización/ grupo amino libre, entre otros (Bakshi et al., 2020).

Figura 3
Estructura 2D CID 71853 (Quitosano)

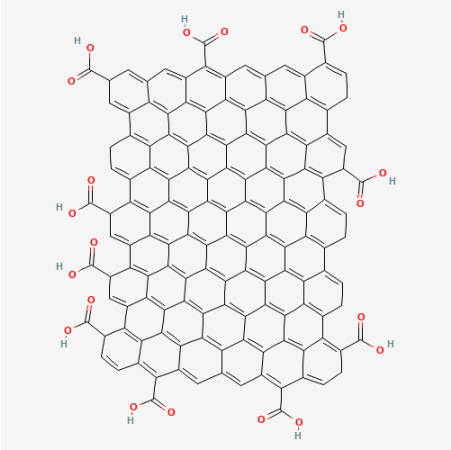


Nota: Estructura química del grafeno. Reproducida de Compound Summary for CDI 71853, de National Center for Biotechnology Information, 2022 (National Center for Biotechnology Information, 2022).

4.2.10. Óxidos de grafeno

El óxido de grafeno, anteriormente conocido como óxido de grafito o ácido grafítico, es un producto de la oxidación del grafito. A diferencia del grafeno, el óxido de grafeno posee una gran cantidad de grupos funcionales con oxígeno, lo que le permite estar en dispersiones acuosas. Adicionalmente, esta característica le permite ser altamente funcionalizable, lo que lo convierte en un material versátil e interesante desde la investigación en materiales (Raidongia et al., 2014).

Figura 4
Estructura 2D CID 124202900 (Óxido de grafeno)

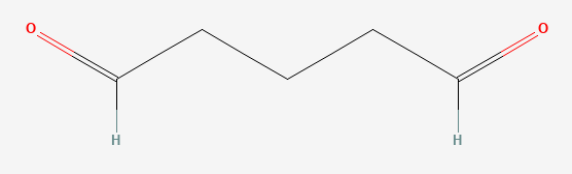


Nota: Estructura química del grafeno. Reproducida de Compound Summary for Graphene oxide powder, de National Center for Biotechnology Information, 2022 (National Center for Biotechnology Information, 2022).

4.2.11. Glutaraldehído

El glutaraldehído (ver figura 5), es un líquido de apariencia aceitosa, incoloro, y de un olor agudo y penetrante. Este compuesto no es estable en su forma pura, razón por la cual se encuentra en soluciones mezcladas con agua.(Agencia para sustancias Tóxicas y registro de enfermedades., 2015)**.**

Figura 5
Estructura 2D CID 3485 (Glutaraldehído)



Nota: Estructura química del glutaraldehído. Reproducida de Compound Summary for CID 3485, Glutaraldehyde, de National Center for Biotechnology Information, 2022 (National Center for Biotechnology Information, 2022).

4.2.12. Análisis de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta es una técnica estadística y matemática que es usada para desarrollar, mejorar y optimizar procesos, que también puede ser aplicado en el diseño, desarrollo y formulación de nuevos productos. En base al diseño experimental planteado, el análisis de superficie de respuesta permite estimar un modelo polinómico que permite optimizar las variables de respuesta de interés (Myers et al., 2016).

Para llevar esto a cabo es necesario definir el objetivo de la optimización que sería el planteamiento de la variable que se desea evaluar. Posteriormente se escogen los factores de interés y se elabora un diseño experimental que permitirá llevar a cabo los procedimientos y obtener los datos para plantear un modelo matemático (ya sea de primer o segundo orden) y permite evaluar los resultados obtenidos. Si uno de los modelos es adecuado, se hace la búsqueda del óptimo adecuado para la respuesta por medio de herramientas gráficas y finalmente se valida experimentalmente la respuesta haciendo uso de los factores obtenidos, y evaluando si lo predicho por el modelo es congruente con los resultados (Myers et al., 2016).

4.3. Marco legal

Este proyecto se ve enmarcado por los siguientes decretos y resoluciones. Se tiene en cuenta que no existe una normatividad específica para el uso de biomateriales en aplicaciones regenerativas, se considera al hidrogel como un elemento de apoyo en la liberación controlada de medicamentos y factores de crecimiento, por esta razón, este proyecto se acoge a la normatividad existente para el desarrollo de insumos y dispositivos médicos, así como la normatividad referente a la producción de medicamentos biológicos.

4.3.1. Artículo 4 de la Ley 150 de 2013

Este artículo indica que todos los medicamentos, insumos y dispositivos médicos que sean utilizados en procedimientos quirúrgicos e invasivos deberás contar con el registro sanitario expedido por el Instituto Nacional del Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima). Por lo tanto, todos los materiales a usar durante el diseño del hidrogel propuesto deben de contar con un registro sanitario que asegure que estos componentes cumplen con los estándares de seguridad, eficacia y desempeño requeridos por el mismo para un correcto funcionamiento.

4.3.2. Resolución 2950 de 2019

El cual establece la guía para la evaluación de la Comparabilidad de Medicamentos Biológicos en base a el Comité de Expertos de Estandarización Biológica de la Organización Mundial de la Salud (OMS), donde se revisarán los principios de garantía de calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos biológicos, sin generar barreras innecesarias a la competencia y a su disponibilidad. De esta manera, garantizar que los materiales a usar en el desarrollo de este hidrogel están avalados por estancias internacionales que aprueban el uso de estos materiales como vehículos de entrega de medicamentos y su seguridad como dispositivo médico.

Para las pruebas a desarrollar, se tendrá en cuenta la guía ASTM F2150-19 de la Sociedad Estadounidense para Pruebas y Materiales (ASTM International por sus siglas en inglés) las cuales describen los estándares para llevar a cabo pruebas de caracterización en biomateriales usados en la medicina de tejidos e ingeniería de tejidos, declarando los parámetros necesarios del material a utilizar dependiendo de su composición y clasificación así como las posibles pruebas a realizar para asegurar la seguridad y calidad del biomaterial (*ASTM F 2150-07 Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products*, 2019). Así mismo, esta guía establece que cada producto de andamio es único, por lo que todos los hidrogeles que se obtengan y que cumplan los requerimientos, deben de ser evaluados y caracterizados.

5. REQUERIMIENTOS

Los requerimientos del proyecto se dividieron en 3 secciones, que se explican a continuación:

- Funcionales

    - La superficie mínima del hidrogel debe ser de 15-30 μm^2, que corresponden a la superficie que ocupa una célula de microglía (Kettenmann & Verkhratsky, 2011).
    - El hidrogel debe poseer una capacidad de hinchamiento entre el 60-80% (Vijay Kumar Thakur, 2018).
    - El o los componentes/sustancias químicas del hidrogel deben ser biocompatibles y esta información debe estar soportada por bibliografía.
    - El biomaterial debe tener una viscosidad de 300-30.000 cP para cumplir con condiciones físico-químicas de las biotintas (Chopin-Doroteo et al., 2021).

- Calidad

    - Las sustancias químicas y componentes del hidrogel deben tener características de biodegradabilidad y biocompatibilidad para evitar el crecimiento de la cicatriz glial (C. T. Tsui et al., 2021).
    - El diseño experimental planteado debe cumplir con los criterios estadísticos definidos para garantizar la confiabilidad de los resultados con un límite del 95%.

- Restricción

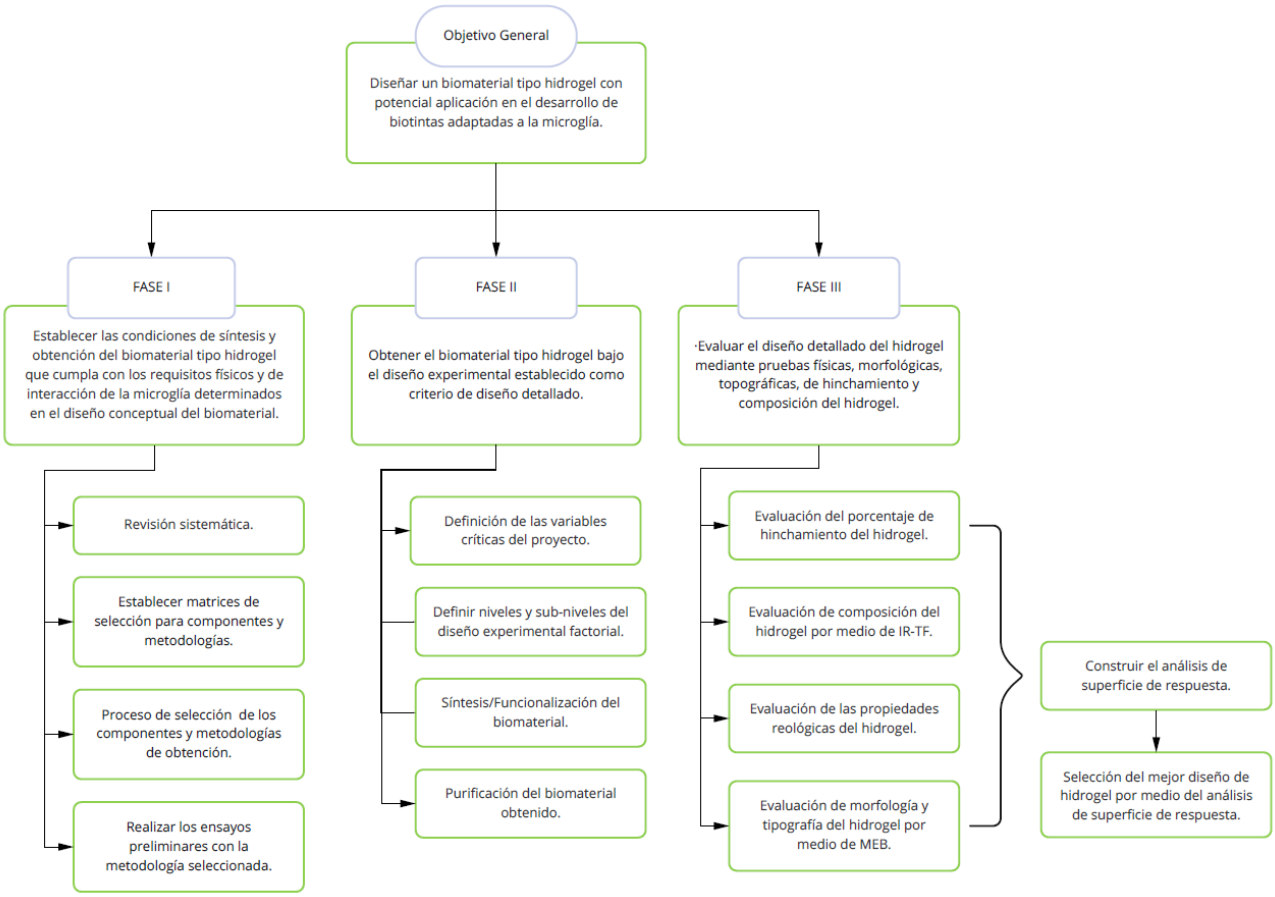
    - El biomaterial desarrollado se evaluará bajo las condiciones establecidas para la línea celular basadas en resultados experimentales encontrados en bibliografía.
    - Los hidrogeles con tamaños inferiores a 15 μm^2 no serán considerados para las etapas de caracterización física y química.
    - En las evaluaciones, no se considera el análisis *in vitro* del material con la línea celular.

6. METODOLOGÍA

Para el desarrollo del diseño del hidrogel como soporte para microglía, se propuso la metodología mostrada en la figura 5. Cada una de las fases propuestas en esta metodología, corresponde a los objetivos específicos planteados, con el fin de dar cumplimiento a cada uno de ellos. En primer lugar, se establece el diseño conceptual del hidrogel por medio de una revisión sistemática (RS), que proporcionó información respecto a los avances en composiciones que se han empleado en el desarrollo de materiales para regeneración en sistema nervioso. Esta revisión permitió identificar posibles componentes, así como metodologías de síntesis y obtención de hidrogeles que posteriormente fueron seleccionadas por medio de una matriz de decisión. Una vez se han seleccionado los componentes y metodologías a usar, se realizaron unas pruebas preliminares que dan lugar la segunda fase, el desarrollo del diseño detallado. En esta fase, se observaron los resultados obtenidos en las pruebas preliminares para establecer las variables críticas del proceso de obtención del biomaterial, que posteriormente da paso a la definición de los niveles y subniveles del diseño experimental factorial planteado. A partir del diseño experimental, se procede a realizar la obtención de los hidrogeles. Para finalizar, se proceden a realizar las respectivas caracterizaciones de los hidrogeles obtenidos en la segunda fase del proyecto. Se realizan las evaluaciones de porcentaje de hinchamiento, evaluaciones de topografía y morfología por medio de MEB, y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, que proporcionaron la información necesaria para construir un análisis de superficie de respuesta que permitió identificar el hidrogel con las mejores características para servir como soporte para la microglía en procesos de regeneración nerviosa.

Figura 6

Diagrama de flujo obtención de un hidrogel como soporte para microglía



6.1. Fase I: Establecer las condiciones de síntesis y obtención del biomaterial tipo hidrogel que cumpla con los requisitos físicos y de interacción de la microglía determinados en el diseño conceptual del biomaterial.

Para esta fase del proyecto se realizó una revisión sistemática siguiendo la metodología PICO, que establece el planteamiento de preguntas con la finalidad de realizar una búsqueda de información específica en bases de datos como Nature, ProQuest, Elsevier, IEEE, que facilite e incremente el alcance de la búsqueda de información (Martínez Díaz et al., 2016).

Con la información obtenida a través de la revisión sistemática, se procedió a llevar a cabo una serie de matrices de selección para establecer los componentes del hidrogel a desarrollar, así como las metodologías de síntesis y obtención de material. Una vez se ha finalizado la selección, de procedió a realizar las respectivas pruebas preliminares que permitirían establecer más adelante algunas características del diseño experimental.

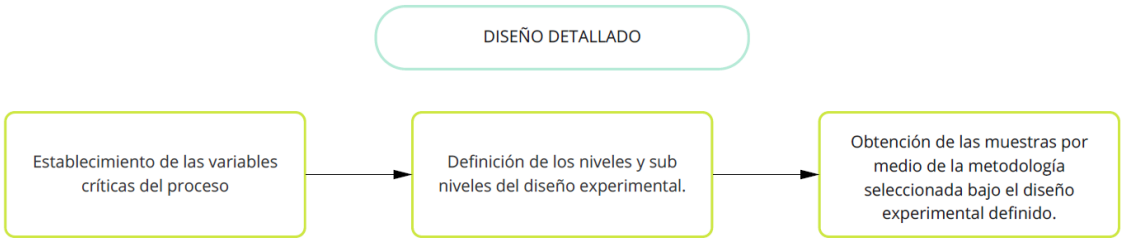
Figura 7
Diagrama de flujo de la fase I del proyecto (Diseño conceptual del producto)

6.2. Fase II: Obtener el biomaterial tipo hidrogel bajo el diseño experimental establecido como criterio de diseño detallado.

En esta fase del proyecto se realizó la obtención del biomaterial tipo hidrogel a partir del establecimiento de dos diseños experimentales factoriales, propuestos teniendo en cuenta características del proceso obtenidas en la fase anterior durante las pruebas preliminares y que permitieron establecer las variables críticas del proceso.

A partir de los diseños experimentales propuestos, se realizó la obtención de 27 muestras de material, cada uno considerando diferentes cantidades de quitosano, óxidos de grafeno y colágeno.

Figura 8
Diagrama de flujo fase II del proyecto (Diseño detallado del producto)

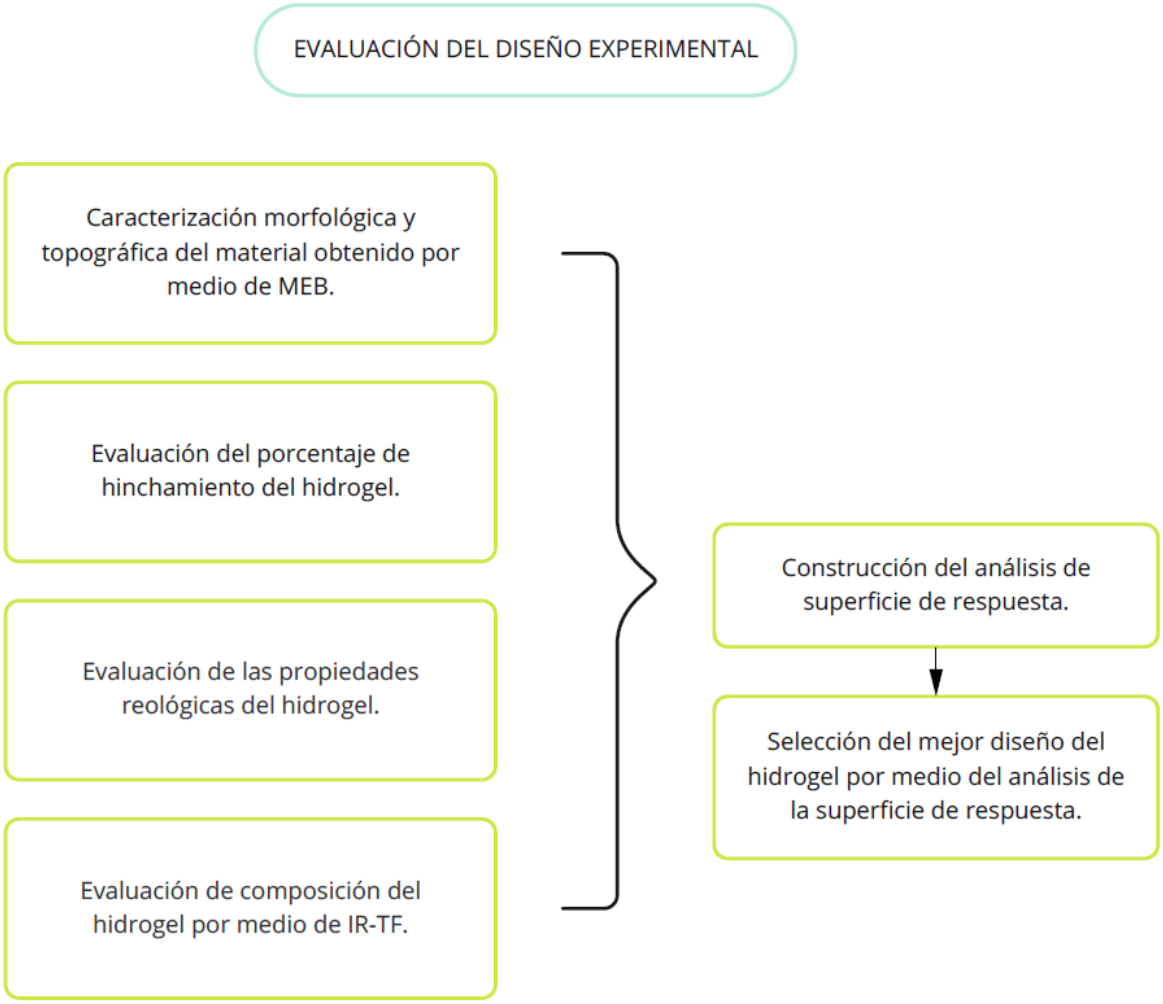


6.3. Fase III: Evaluar el diseño detallado del hidrogel mediante pruebas físicas, morfológicas, topográficas, de hinchamiento y composición del hidrogel.

Para evaluar las características del biomaterial desarrollado y su cumplimiento con los requerimientos técnicos y de calidad establecidos, se llevó a cabo una metodología que contempla a su vez, varias evaluaciones de las características que se desean evaluar en un material. Siendo así, se realizaron caracterizaciones morfológicas y topográficas del material, evaluaciones de porcentaje de hinchamiento, propiedades reológicas y de composición, cuyos resultados permitieron la construcción de un análisis de superficie de respuesta para establecer el mejor diseño de un biomaterial que sea soporte de la línea celular microglía en procesos de regeneración nerviosa.

Figura 9

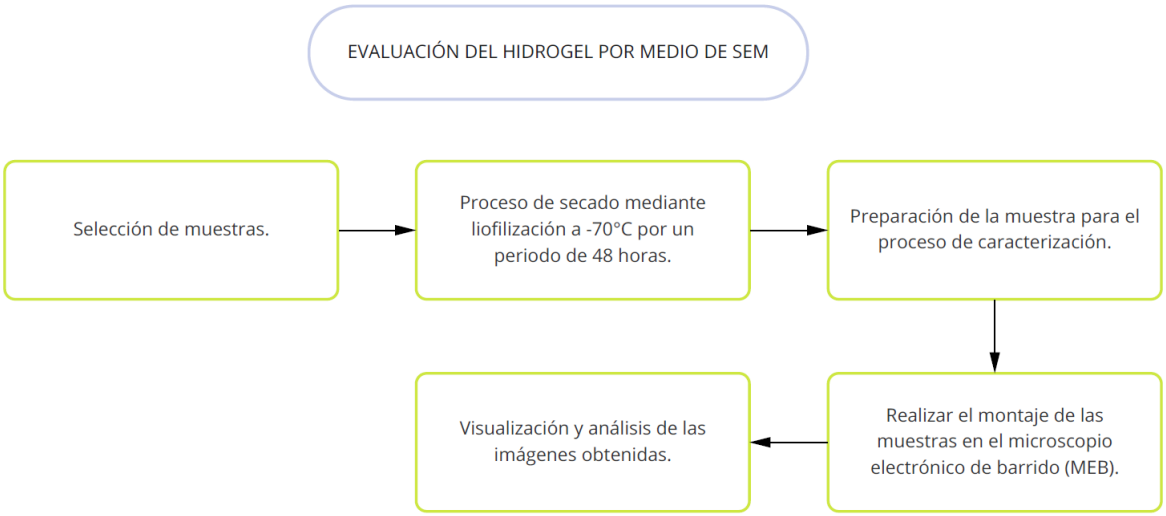
Diagrama de flujo fase III del proyecto (Evaluación del diseño)



Caracterización morfológica y topográfica del material obtenido por medio de MEB

Para observar la morfología de la superficie, después de la gelificación según la metodología descrita por Chen et al., en 2013, las muestras de hidrogeles se congelan rápidamente en el refrigerador o en nitrógeno líquido y se liofilizan con un sistema de liofilización al vacío de -50°C a -70°C durante al menos 48 horas hasta que se sublime todo el solvente. A continuación, la muestra se monta en un soporte metálico, normalmente de aluminio, con cinta conductora, y se recubre con metal para la conducción al vacío mediante un pulverizador. El oro se utiliza para recubrir la muestra liofilizada en general, pero también se utilizan el oro-paladio o el platino. Para observar la morfología interior, es decir, la vista transversal de los hidrogeles, los hidrogeles liofilizados se suelen fracturar y luego se recubren con metal mediante pulverización catódica.

Figura 10
Diagrama de flujo para la caracterización de morfología y topografía del hidrogel siguiendo la metodología descrita por (C. Chen et al., 2013).



Evaluación del porcentaje de hinchamiento del hidrogel

Para medir el hinchamiento de los hidrogeles se ha utilizado el método de la norma ASTM WK21927, la cual establece la guía para la caracterización de los hidrogeles empleados en medicina regenerativa. Esta prueba permitió identificar el porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles por método gravimétrico, el cual se explica en la figura 10. Para esta evaluación, se hizo uso de PBS a un pH de 7,2, el cual fue adicionado a las muestras secas por un tiempo total de 6 horas y cuyo peso fue

medido en intervalos de 5, 10, 20, y 30 minutos y posteriormente cada hora hasta completar las 6 horas. El hinchamiento se calcula a través de la siguiente ecuación:

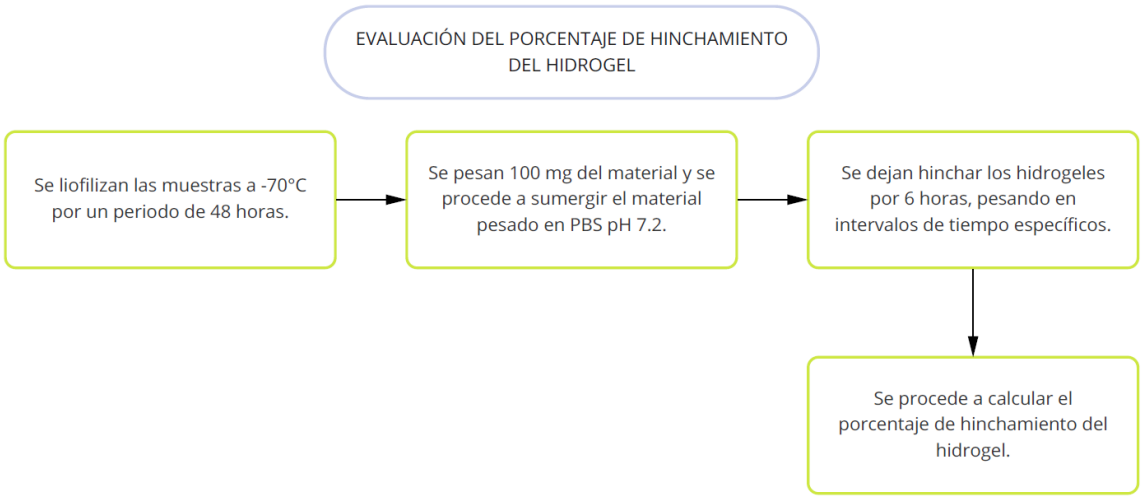
Ecuación 1
Ecuación porcentaje de hinchamiento base húmeda

$$\%\ Hinchamiento\ base\ húmeda: \frac{W_0 - W_t}{W_t} \times 100$$

Donde:

- W_0 es el peso inicial del hidrogel
- W_t es el peso en un tiempo t del hidrogel

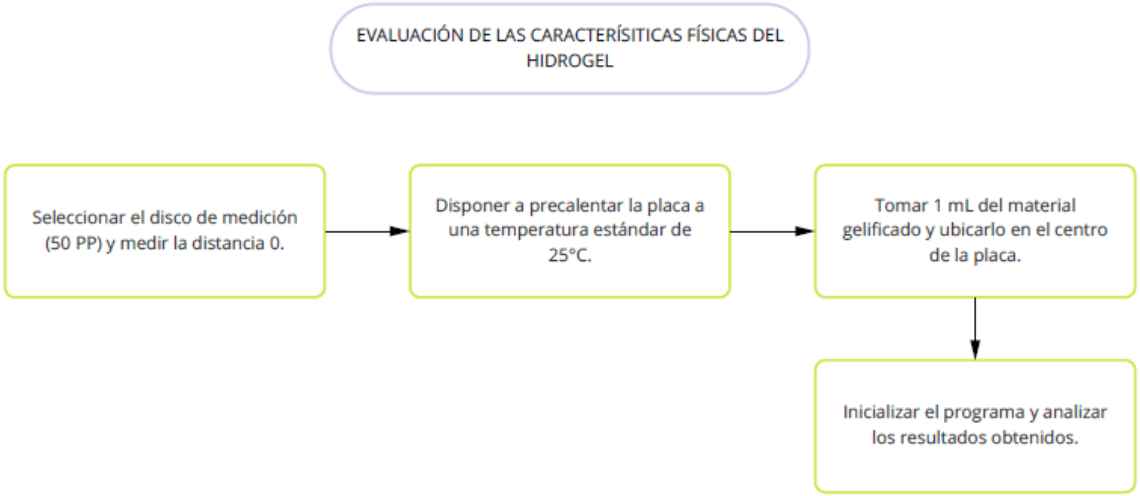
Figura 11
Diagrama de flujo evaluación del porcentaje de hinchamiento de acuerdo con el método de la norma ASTM WK21927.



Evaluación de las propiedades reológicas del hidrogel

Para evaluar las características físicas de viscosidad del hidrogel desarrollado se hizo uso del reómetro AntonPaar MCR 92 que se encuentra en los laboratorios de la universidad. Para este procedimiento se toma el disco de medición PP50 y se procede a realizar un precalentamiento de las placas a una temperatura de 25°C. Las muestras son montadas en su forma gelificada, aproximadamente 1 ml por muestra y se procede a ejecutar la prueba de viscosidad. Se registran los resultados y se procede a analizarlos (Zuidema et al., 2014).

Figura 12
Diagrama metodología caracterización reológica de las muestras basado en la metodología descrita por (Zuidema et al., 2014)

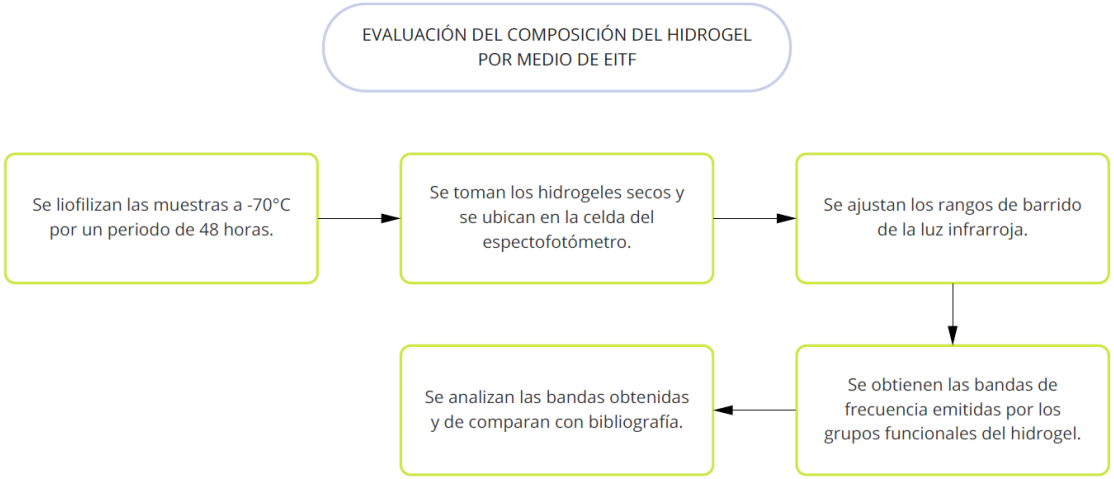


Evaluación de composición del hidrogel mediante IR-TF

Esta técnica es útil para identificar la estructura química de una sustancia, en este caso del hidrogel. Se basa en el principio de que los componentes básicos de una sustancia, es decir, los enlaces químicos, suelen poder excitarse y absorber la luz infrarroja a frecuencias típicas de los tipos de enlaces químicos. El espectro de absorción IR resultante representa una huella digital de la muestra medida. Esta técnica se utiliza ampliamente para investigar la disposición estructural en el hidrogel por comparación con los materiales de partida (Carvalho et al., 2021).

Los hidrogeles por evaluar se ponen en la celda infrarroja del espectrofotómetro y se expone la muestra a una fuente de luz infrarroja, haciendo un barrido de onda entre los 500 cm^{-1} hasta los 4000 cm^{-1}, cuyo resultado me permitirá determinar los grupos funcionales presentes en las muestras para realizar un análisis posterior (Bandyopadhyay & Bose, 2013).

Figura 13
Diagrama de flujo evaluación de composición por medio de EITF



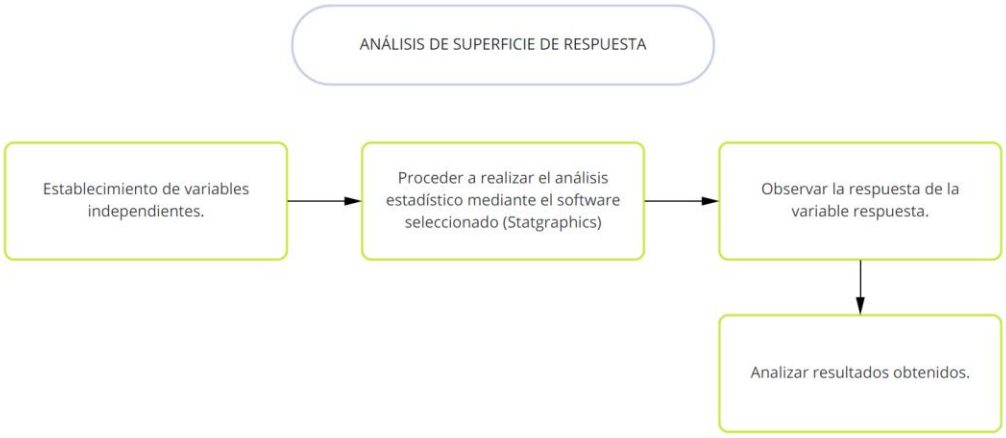
Análisis de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta es una técnica estadística y matemática que es usada para desarrollar, mejorar y optimizar procesos, que también puede ser aplicado en el diseño, desarrollo y formulación de nuevos productos. En base al diseño experimental planteado, el análisis de superficie de respuesta permite estimar un modelo polinómico que permite optimizar las variables de respuesta de interés (Myers et al., 2016).

Para realizar este análisis de superficie de respuesta, se hizo uso del software Statgraphics. Este análisis estadístico se realizó a partir de los hidrogeles con mejores características en las caracterizaciones anteriormente explicadas, que a partir de un análisis estadístico permitió el establecimiento de un polinomio (ecuación) que permitió la comparación de los valores óptimos del hidrogel y por ende, la selección del mejor tratamiento (Allouss et al., 2019).

Figura 14

Diagrama de flujo para el análisis de superficie de respuesta



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Fase I

Para el desarrollo de la Fase I del proyecto, se plantearon 5 actividades principales que corresponden al diseño conceptual de este proyecto y las pruebas preliminares de la metodología de obtención del material.

7.1.1. Requerimientos

Para iniciar la revisión sistemática, fue necesario remitirse a los requerimientos biológicos del sistema y los requerimientos con los que el diseño debe cumplir para proporcionar, de manera exitosa, un soporte para la microglía y de esta manera favorecer la regeneración del tejido nervioso.

A nivel celular y biológico, se conoce que la microglía es una célula macrófaga perteneciente al sistema inmune de los seres humanos, que, junto a los astrocitos, pericitos y la membrana basal se encargan de la regulación de la barrera hematoencefálica -un sincitio de células endoteliales altamente regulado con propiedades de transporte transcelular y paracelular bajas que les permite proteger el microambiente neuronal-. Aunque la microglía no juega un papel fundamental en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, su ablación puede influenciar de manera negativa la integridad de la barrera por medio de la liberación de especies reactivas de oxígeno y citoquinas (Haruwaka et al., 2019).

Teniendo esto en cuenta, el las sustancias químicas y componentes del hidrogel deben tener características de biodegradabilidad y biocompatibilidad para evitar la activación de la microglía y por ende, el crecimiento de la cicatriz glial (Tsui et al., 2019). Así mismo, estas características de biodegradabilidad y biocompatibilidad se deben encontrar soportadas por bibliografía.

En cuanto a las características físicas del hidrogel, este debe tener una capacidad de hinchamiento entre el 60-80% (Vijay Kumar Thakur, 2018) y su superficie mínima se debe encontrar entre los 15-30 µm2, tamaño que corresponde a la superficie que ocupa una célula de microglía (Kettenmann & Verkhratsky, 2011). De manera adicional, se contempla una característica de viscosidad que se debe encontrar entre los 300-30.000 cP para que el material propuesto cumpla con las condiciones físico-químicas de las biotintas (Chopin-Doroteo et al., 2021).

7.1.2. Revisión sistemática

Para llevar a cabo el diseño conceptual del hidrogel, se realizó una búsqueda sistemática de los materiales usados hasta el momento en terapias de regeneración en sistema nervioso que, a su vez, emplearan microglía. Esta revisión bibliográfica se ejecutó bajo la metodología PICO, la cual requiere plantear una pregunta de investigación y la creación de una estructura lógica que facilite e incremente el alcance de la búsqueda de información (Moreno et al., 2018).

Tabla 1
Planteamiento de preguntas PICO

Pregunta	¿Qué biomateriales se han usado para favorecer la proliferación celular de la microglía en lesiones de sistema nervioso central o en enfermedades de médula espinal?
Intervención	¿Cuáles son los materiales o sistemas químicos con componentes biocompatibles que favorecen la expresión de la microglía en procesos de regeneración celular?
Comparación	¿Cuáles son los resultados del uso de biomateriales en otras estructuras físicas de biomaterial (fibras, esferas, partículas)?
Outcome	¿Cuál es el biomaterial tipo hidrogel que puede favorecer la biocompatibilidad en el sistema nervioso con una ata tasa de efectividad en el tratamiento?

Teniendo lo anterior en cuenta, se plantearon las palabras claves pertinentes a cada una de las preguntas propuestas en la sección anterior. Esas serán útiles para la formación de las estrategias de búsqueda a emplear.

Tabla 2
Componentes inmersos en la pregunta PICO

Pregunta	Biomateriales, microglía, lesión de sistema nervioso central, enfermedades en médula espinal.
Intervención	Regeneración celular, materiales, expresión celular.
Comparación	Fibras, esferas, partículas, estructura física del biomaterial.
Outcome	Hidrogel, efectividad de tratamiento, biocompatibilidad.

El planteamiento de estas palabras permitió la elaboración de las siguientes estrategias de búsqueda en un segundo idioma (inglés), en las bases de datos Nature, SpringerLink, IEEE, Poquest, NCBI, Elsevier y PubMed.

Tabla 3
Estrategias de búsqueda establecidas a partir de la pregunta PICO

Estrategia	Palabras clave
1	Biomaterials AND microglia
2	“Spinal cord diseases” AND “spinal cord regeneration” AND materials
3	Hydrogels AND “nerve regeneration” AND microglia
4	“Spinal cord regeneration” AND hydrogel AND efficacy
5	“Nerve regeneration” AND microglia AND “treatment efficacy”
6	Hydrogel AND “nerve regeneration” AND biocompatible
7	Hydrogels AND microglia AND biocompatible

Estas estrategias planteadas permitieron obtener un total de **57 artículos y trabajos de investigación** que consideraban los criterios de búsqueda anteriormente expuestos. Sin embargo, fue necesario realizar un tamizaje la información recopilada para obtener un total de 5 artículos que consideraran procesos de regeneración en SNC con microglía u otras células gliales de origen embrionario por medio de biomateriales. Estos se tuvieron en cuenta posteriormente en el proceso de selección.

Tabla 4
Artículos obtenidos tras el tamizaje de información

Año de publicación	Título del artículo
2015	Biodegradable hydrogels composed of oxime crosslinked poly (ethylene glycol), hyaluronic acid, and collagen: a tunable platform for soft tissue engineering.
2018	PHBV/PLS/Col-based nanofibrous scaffolds promote recovery of locomotion function.
2019	Designing a bioactive scaffold from coassembled collagen-laminin short peptide hydrogels for controlling cell behavior.
2020	Carbohydrate functionalized collagen hydrogels modulate the glycoenvironment of a neuronal primary culture.
2021	Collagen/Chitosan functionalized graphene oxide hydrogel provides a 3D matrix for neural stem/precursor cell survival, adhesion, infiltration, and migration.

7.1.3. Selección de componentes y metodología de obtención del hidrogel

Considerando los artículos que se obtuvieron del tamizaje mencionado anteriormente, se procedió a realizar el planteamiento de unos criterios de selección específicos que se tendrían en cuenta para la selección tanto de componentes como metodología de obtención del biomaterial tipo hidrogel. Estos criterios de selección tienen en cuenta los requerimientos del sistema biológico que fueron definidos previamente, y otros criterios de diseño que se consideran relevantes en el proceso de diseño de un material.

A continuación, se presentan los criterios considerados para la selección de los componentes del biomaterial.

Tabla 5

Criterio 1: Capacidad de gelificación

Definición: Al hacerse el planteamiento de la obtención de un biomaterial tipo hidrogel, los componentes propuestos deben ser capaces de presentar cinéticas de gelificación cuyos tiempos de gelificación se encuentren dentro de los 30 minutos.	El tiempo de gelificación supera los 30 minutos.	El proceso de gelificación puede darse dentro de los 30 minutos.
Puntaje	1	5

Tabla 6
Criterio 2: Biodegradabilidad

Definición: La creación de polímeros reabsorbibles (en los que el hidrogel se descompone en sustancias más pequeñas para ser degradados o excretados por el cuerpo) presentan ventajas que permiten a las células remodelar su entorno, lo que lo hace maleable y, por ende, permite la formación de una matriz extracelular que resulte en un tejido más maduro (Spicer, 2020).	El polímero no es biodegradable.	El polímero es medianamente biodegradable.	El polímero es altamente biodegradable.
Puntaje	1	3	5

Tabla 7
Criterio 3: Funcionalización del biomaterial

Definición: La funcionalización de biomateriales puede ser explotado como un método para perfeccionar las características fisiológicas de los biomateriales mediante la confección de su superficie de acuerdo con las necesidades fisiológicas de las células vivas (Blanco-Elices et al., 2020).	El material no puede ser funcionalizado.	El material puede ser funcionalizado. .
Puntaje	1	5

Tabla 8
Criterio 4: Biocompatibilidad del biomaterial

Definición: El microambiente presente en las lesiones de médula espinal presentan sustancias tóxicas y sustancias inhibidoras. Dada la activación de la microglía en su fenotipo ameboide, el microambiente es particularmente sensible a la introducción de nuevas sustancias o materiales que no reconozca.	Ninguno uno de los componentes de la formulación propuesta es biocompatible.	Al menos uno de los componentes de la formulación propuesta es biocompatible.	Más de uno de los componentes de la formulación propuesta es biocompatible.
Puntaje	1	3	5

De igual manera, se plantean criterios de selección para las metodologías de síntesis y obtención de los materiales propuestos. Los criterios definidos se explican a continuación.

Tabla 9
Criterio1: Etapas de obtención del biomaterial

Definición: Las etapas de obtención del material proveen información respecto a los procesos que se deben llevar a cabo para la obtención del material.	La obtención del material comprende más de 5 etapas.	La obtención del material comprende entre 3 y 5 etapas.	La obtención del material comprende 3 etapas o menos.
Puntaje	1	3	5

Tabla 10
Criterio 2: Tiempo total de síntesis

Definición: Se considera los tiempos de síntesis deben estar de acuerdo con el tiempo con el que cuenta el proyecto para llevarse a cabo.	El tiempo de obtención del material supera las 6 horas.	El tiempo de obtención del material está rondando las 6 horas.
Puntaje	1	5

Tabla 11
Criterio 3: Costo

Definición: Para llevar a cabo el proyecto se contempla un presupuesto determinado para cubrir los gastos de los insumos asociados a la obtención y síntesis del biomaterial.	Los costos asociados a los insumos necesarios para la obtención del biomaterial supera el presupuesto.	Los costos asociados a la obtención del biomaterial están dentro del presupuesto planteado.
Puntaje	1	5

Tabla 12
Criterio 4: Cumplimientos de los principios de química verde

Definición: Se considera que los experimentos que se deban llevar a cabo tengan un impacto ambiental bajo. Esto se puede medir teniendo en cuenta el cumplimiento de los 12 principios de química verde.	Cumple entre 1-2 principios.	Entre 3- 5 de los 12 principios se cumplen.	Más de 5 principios se cumplen
Puntaje	1	3	5

Teniendo en cuenta las definiciones anteriormente descritas, fue posible establecer las siguientes matrices de selección.

Tabla 13
Matriz de selección alternativas de combinación de componentes

Criterios	Peso del criterio	Oxima, PEG, Col, AH.	PHBV/PLS/Col	Col-laminina	Col-carbohidrato	CSGO-Col
Biodegradabilidad	30%	1,5	0,9	1,35	1,5	1,5
Capacidad de gelificación	20%	0,6	0,6	1	1	0,9
Funcionalización del biomaterial	20%	1	1	0,8	0,6	1
Biocompatibilidad	30%	0,9	0,9	1,5	1,5	1,5
Puntaje		4	3,4	4,65	4	4,9

Tabla 14
Matriz de selección metodologías de obtención

Criterios	Peso del criterio	Oxima, PEG, Col, AH.	PHBV/PLS/Col	Col-laminina	Col-carbohidrato	CSGO-Col
Etapas de obtención del biomaterial	28%	0,28	0,9	0,84	1,4	1,5
Tiempo total de síntesis	27%	0,81	0,6	1,35	1,35	0,9
Costo	25%	1	1	0,25	0,75	1
Cumplimiento de los principios de química verde	20%	0,6	0,9	1	1	1,5
Puntaje		2,69	3,4	3,4	4,5	4,9

Debido a las características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad de gelificación, se logró establecer que la combinación de colágeno con óxidos de grafeno funcionalizado con quitosano son los componentes óptimos para un biomaterial como soporte para la microglía.

La interacción de los grupos funcionales del GO con proteínas y otras biomoléculas de la MEC propicia los procesos de adhesión y proliferación celular. Adicionalmente, el quitosano posee características estructurales similares a las propias de la MEC,

cuya interacción provee microambientes favorables para los procesos celulares (Rezaei et al., 2021).

Así mismo, la metodología planteada por Rezaei et al., en 2021 cumple con los criterios planteados, proporcionando incluso información biológica relevante en los procesos de implementación de biomateriales en células pluripotentes del sistema nervioso central.

7.1.4. Pruebas preliminares

La metodología seleccionada plantea una funcionalización de óxidos de grafeno con quitosano para obtener CSGO, que posteriormente será añadido a una solución de colágeno para dar paso a la formación del hidrogel.

El artículo Collagen/chitopsan-functionalized Graphene oxide hydrogel provide a 3D matrix for neural, stem/precursor cells survival, adhesion, infiltration and migration, se puede dividir en 2 grandes fases. La primera fase contempla la obtención de óxidos de grafeno y su subsecuente funcionalización con colágeno, y la segunda fase contempla la preparación de los hidrogeles de colágeno y CSGO.

La metodología planteada por los autores se puede observar en la figura 13 y 14 a continuación.

Figura 15
Metodología preparación de CSGO descrita por (Rezaei et al., 2021)

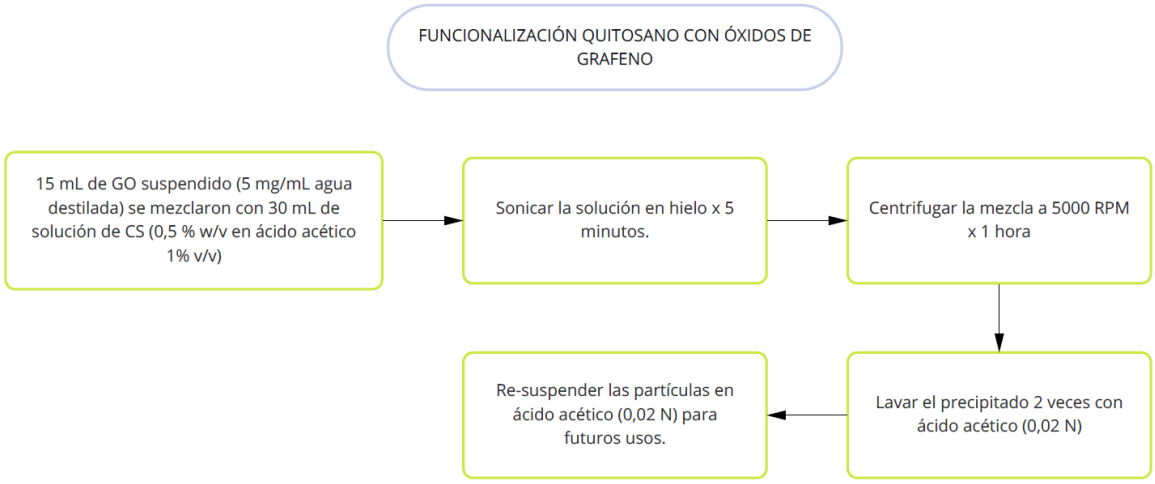
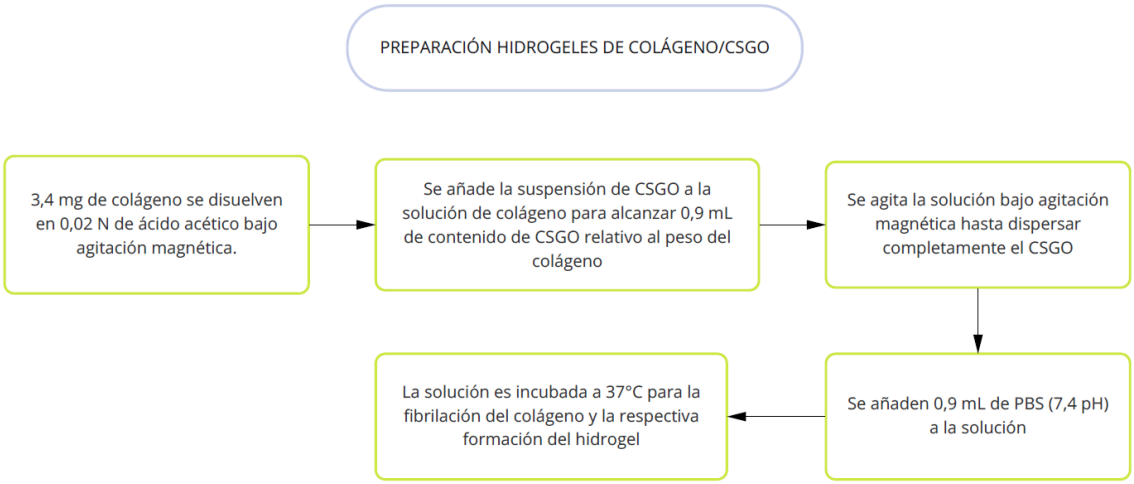


Figura 16
Metodología preparación hidrogeles de colágeno y CSGO descrita por (Rezaei et al., 2021)



Teniendo en cuenta el alcance de este proyecto y la disponibilidad de varios de los elementos requeridos para desarrollar este producto, se procedió a realizar una serie de modificaciones sobre la metodología seleccionada.

Entre las primeras modificaciones, se encuentra la extracción de colágeno con el fin de estandarizar el proceso de extracción y tener control sobre el tipo de colágeno obtenido. También se considera la variación de la concentración de colágeno en relación con la cantidad de CSGO, con el fin de evaluar su impacto sobre las características del hidrogel.

7.1.4.1. Extracción de colágeno

Con el fin de estandarizar el proceso de obtención del biomaterial y garantizar el tipo de colágeno obtenido, se propone la extracción del colágeno bovino tipo I.

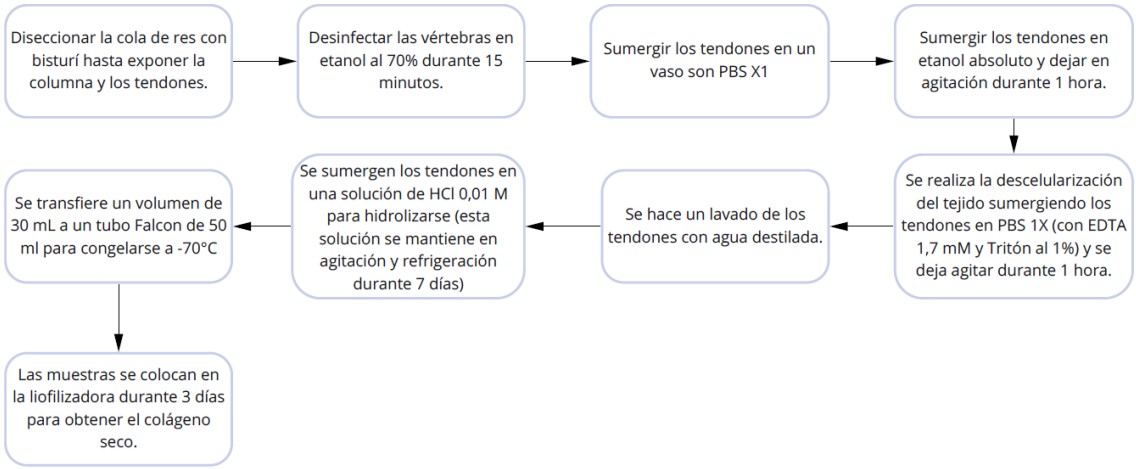
Para la extracción de colágeno bovino tipo I, se procedió a realizar una revisión bibliográfica que permitiera identificar la mejor metodología para obtener colágeno tipo I de manera fiable y con un alto rendimiento. Esta revisión permitió identificar la metodología descrita por (Negrete et al., 2018) que por medio de descelularización e hidrólisis ácida permite obtener un biopolímero comparable a un colágeno comercial. Para este proyecto se modificó la fuente animal del colágeno.

Se permite así establecer el proceso de extracción de colágeno bovino tipo I a partir de cola de vaca, donde las vértebras de la cola de res se diseccionaron utilizando un bisturí hasta exponer la columna y los tendones, retirando todo el músculo

posible. Estas vértebras y tendones expuestos fueron desinfectados en etanol al 70% durante un periodo de 15 minutos y posteriormente fueron sumergidos en PBS 1X. Acto seguido, se procedió a sumergir en etanol absoluto y se dejó en agitación durante una hora y media. Las vértebras y tendones proceden a ser lavados con agua destilada y sumergidos en PBS 1X (EDTA 1,7 mM y Tritón 100X al 1%) para ser dejados en agitación durante 3 horas para descelularizar. Una vez se cumple este tiempo, la muestra es nuevamente lavada con agua destilada y es sumergida en una solución de 0,01M para el proceso de hidrólisis, que se mantuvo en refrigeración y agitación durante un periodo de 7 días. Cumplido este tiempo, se procede a transferir un volumen de 30 ml a un tubo Falcon y se almacena a -80°C. Finalmente las muestras son liofilizadas por un periodo de 3 días para obtener colágeno seco.

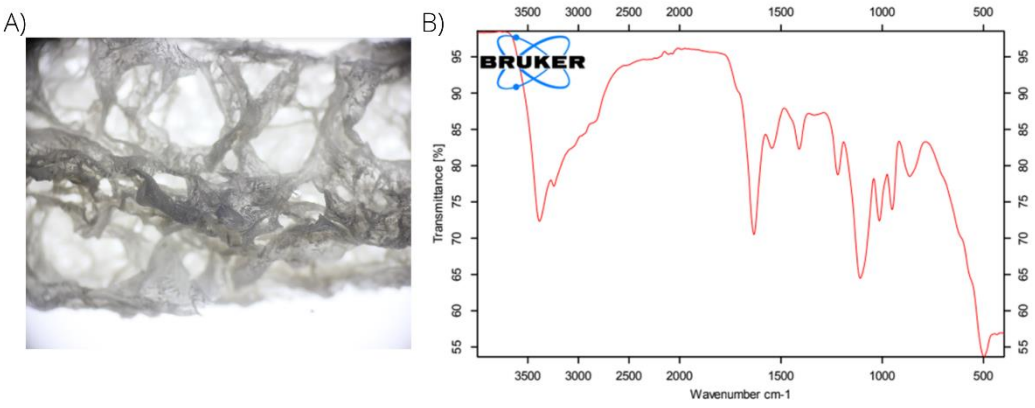
Figura 17

Metodología propuesta para la extracción de colágeno bovino tipo I a partir de cola de vaca



Esta metodología permitió la obtención de 5,82 mg de colágeno tipo I a partir de 151,72 gr de huesos de cola de vaca, el cual fue caracterizado por medio de estereoscopía, micrografía y análisis de su espectro infrarrojo. En la figura 16 es posible observar (A) imágenes con estereoscopio de las fibras de colágeno extraídas a partir de la metodología propuesta, así como (B) su espectro infrarrojo por transformada de Fourier, que fue obtenido por medio del equipo BRUKER Alpha Platinum-ATR.

Figura 18
(A)Imagen estereoscopio X4,5 del colágeno extraído a partir de la metodología propuesta (Estereoscopio Olympus SZ61) y (B) su respectivo IFTR

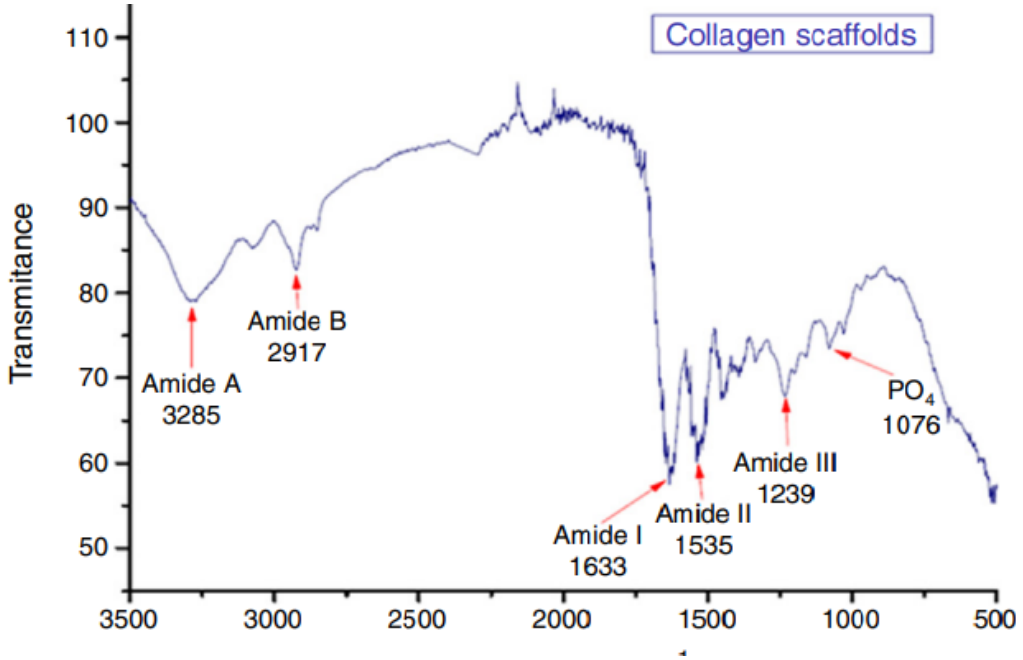


La caracterización por medio de estereoscopía permitió un primer acercamiento a la estructura y características del colágeno extraído a través de la metodología propuesta. Se puede evidenciar que posee una morfología tridimensional, en forma de red de color blanco, que puede ser comparable a otras estructuras de colágeno extraído y liofilizado de otras fuentes animales (Cheng et al., 2017; Preetha Mini Jose et al., 2014).

La imagen 16 también muestra la espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier del colágeno extraído, que permite evidenciar la presencia de la amida A entre los 3400 cm^{-1} a 3340 cm^{-1}, correspondiente a las vibraciones del estiramiento N-H (Cheng et al., 2017). Así mismo, es posible observar un nuevo pico a los 1633 cm^{-1} que corresponde al estiramiento del enlace C=O de la amida I, el pico en 1546 cm^{-1} está asociado al enlace N-H de la amida II y la banda que está relacionada con la amida III se encuentra a los 1220 cm^{-1}, comparables con los resultados reportados en bibliografía previamente por (Preetha Mini Jose et al., 2014; Saldin et al., 2017;Rezaei et al., 2021). En la imagen 17 es posible observar el reporte de la espectrofotometría infrarroja de Fourier del colágeno reportado por otros autores junto con la indicación de los grupos funcionales correspondientes a cada banda.

Figura 19

Espectrofotometría infrarroja de Fourier para el colágeno reportado en bibliografía



Nota: Espectro FT-IR de andamios de colágeno. Reproducida de Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering, 2015 (León-Mancilla et al., 2016).

7.1.4.2. Funcionalización de quitosano con óxidos de grafeno y síntesis del hidrogel de colágeno y CSGO.

Para la funcionalización del quitosano con óxidos de grafeno, se siguió la metodología planteada en la figura 13. Para efecto del desarrollo de la prueba preliminar, se propusieron 2 concentraciones de CSGO con diferentes formas de GO. La primera preparación consideró la forma laminada de los óxidos de grafeno, y para la segunda preparación se consideró la mitad de la primera preparación, pero de una forma pulverizada.

Este cambio permitió notar una diferencia inmediata en las coloraciones y consistencia de las muestras obtenidas. Como se observa en la figura 18, hay una diferencia evidente en color y consistencia del material funcionalizado.

Figura 20
Funcionalización preliminar del quitosano con óxidos de grafeno.

Los resultados de las pruebas preliminares permitieron establecer que la muestra con GO pulverizado presentaba características más favorables para la formación del hidrogel en términos de superficie y consistencia. Por este motivo, se empleó la concentración de esta muestra como la base para proponer las variaciones del diseño experimental. También se pudo observar que, de las muestras obtenidas, ninguna mostró tener una fase de gelificación. Esto permitió considerar el añadir una sustancia que permita la gelificación por entrecruzamiento, como lo es el glutaraldehído. La adición de este agente reticulante en una proporción de 5% (2000 µL) en relación con el volumen de la muestra (10 µL) mostró resultados rápidamente y permitió tener un proceso de gelificación en el material propuesto.

7.2. Fase II

La segunda fase del proyecto comprende el diseño detallado del biomaterial, por lo tanto, en esta sección se llevó a cabo el establecimiento del diseño experimental teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las pruebas preliminares y los requerimientos funcionales del sistema, y posteriormente, se tiene la síntesis, obtención y purificación del biomaterial obtenido bajo los criterios de diseño detallado.

7.2.1. Establecimiento del diseño experimental factorial

Un diseño experimental se define como una herramienta estadística que permite la manipulación intencional de una o varias variables independientes y de esta manera evaluar el impacto estadístico de la misma sobre la variable respuesta (Montgomery, 2008). De esta manera, se hizo necesario realizar un análisis de las respuestas del material a las diferentes variaciones a las que se sometió, permitiendo encontrar una metodología que tomara todas las posibles variables y diera como resultado el mejor hidrogel que sirva como soporte para la microglía.

Teniendo en cuenta las pruebas preliminares y la naturaleza de la metodología seleccionada que consiste de 2 momentos, el primero siendo la funcionalización del quitosano y los óxidos de grafeno, y el segundo la síntesis del hidrogel, se propusieron 2 diseños experimentales. Las variaciones propuestas se evidencian a continuación.

Tabla 15
Diseño experimental funcionalización quitosano con óxidos de grafeno (CSGO)

		Masa de óxidos de grafeno		
		28,2 mg	37,5 mg	46,8 mg
Masa de quitosano	0,56 gr	Muestra 5	Muestra 4	Muestra 6
	0,75 gr	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 3
	0,93 gr	Muestra 8	Muestra 7	Muestra 9

A partir de la funcionalización del quitosano con óxidos de grafeno, se procedió a establecer los subniveles del nivel de colágeno. Basándose en literatura, la cantidad de colágeno considerada como media para la realización de este ensayo fue de 12,5 mg, que se varió en ± 25%, obteniendo una masa de 10 mg como la cantidad más baja, y 15 mg como la cantidad más alta de colágeno. La definición de las cantidades de colágeno y sus respectivos códigos se encuentran a continuación en la tabla 16.

Tabla 16
Variaciones de colágeno planteadas

Código	Masa
Col 1	10,0 mg
Col 2	12,5 mg
Col 3	15,0 mg

Teniendo esto en cuenta, se procede a plantear un diseño experimental factorial de dos niveles, colágeno y óxidos de grafeno funcionalizado con quitosano, que permitirían la obtención de 27 muestras, que para garantizar su significancia estadística y grado de confiabilidad de las muestras en un 95%, se harán por triplicado, obteniendo un total de 81 muestras. Los códigos empleaos para la identificación de las muestras se observan a continuación en la tabla 17.

Tabla 17
Código de las muestras establecidas

Muestra	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9
Col 1	M1Col1	M2Col1	M3Col1	M4Col1	M5Col1	M6Col1	M7Col1	M8Col1	M9Col1
Col 2	M1Col2	M2Col2	M3Col2	M4Col2	M5Col2	M6Col2	M7Col2	M8Col2	M9Col2
Col 3	M1Col3	M2Col3	M3Col3	M4Col3	M5Col3	M6Col3	M7Col3	M8Col3	M9Col3

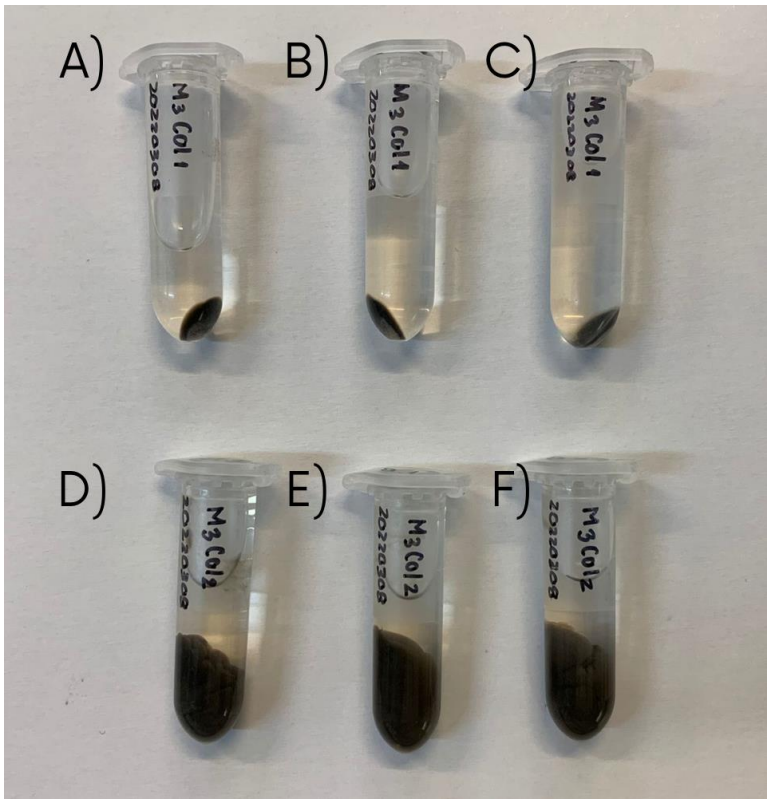
7.2.2. Síntesis y obtención del biomaterial

Para la síntesis del hidrogel de colágeno y CSGO se siguió nuevamente la metodología de (Rezaei et al., 2021) que por medio de 4 pasos permite obtener el material deseado; (1) 3,4 mg de colágeno se disuelven en ácido acético (0.02 N) bajo agitación magnética. (2) Se añade la solución de CSGO hasta alcanzar 0,9 ml y se deja en agitación magnética hasta alcanzar una solución homogénea. (3) Se añaden 0,9 ml de PBS (pH 7.2) a la solución y se neutraliza añadiendo NaOH 0,5. (4) La solución procede a ser encubada durante una hora a 37°C para permitir la fibrilación del colágeno y, por ende, la formación del hidrogel.

Teniendo esa metodología en cuenta, se procedió a realizar la obtención de las 81 muestras explicadas en el diseño experimental. Dentro de los primeros resultados observables a simple vista, la cantidad de colágeno muestra que tiene un efecto directo en la cantidad de material obtenido, pues teniendo la misma muestra de

CSGO, los hidrogeles con la concentración más baja de colágeno poseen una diferencia significativa en comparación a los hidrogeles con la cantidad media de colágeno, esto se puede observar en la figura 19.

Figura 21
Hidrogeles de Col 1 y Col 2 con Muestra 3



7.3. Fase III

Una vez se han obtenido de manera exitosa los hidrogeles de Col/CSGO, se procede a realizar las caracterizaciones correspondientes que permitirán el posterior análisis de la información cuantitativa y el análisis estadístico que dará lugar a escoger el tratamiento que se adecúa a los requerimientos que se plantearon en la primera fase del proyecto.

7.3.1. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de los hidrogeles se dio por medio de microscopía electrónica de barrido, como se observa a continuación en las figuras 22 a la figura 35. Las imágenes por medio de esta técnica permitieron la observación de la microestructura del material y una estimación de su superficie por medio del

programa ImageJ, para este ensayo, las muestras M2Col1, M3Col3, M4Col2, M6Col3, M9Col2 y M9Col3 fueron seleccionadas en base a la cantidad obtenida del material y su relevancia dentro del diseño experimental por sus resultados dentro de la evaluación del porcentaje de hinchamiento y viscosidad.

Reportes en bibliografía mencionan que el añadir componentes basados en carbono, se evidencia un incremento en el tamaño de los poros del material (Magaz et al., 2021; Roshanbinfar et al., 2019). Sin embargo, dicha observación no pudo ser realizada en este ensayo, pues la naturaleza de la muestra y su proceso de secado por liofilizadora hicieron del hidrogel un material en polvo que no muestra una topografía porosa propiamente dicha.

Microscopía electrónica de barrido de la muestra M2Col1.

La imagen de microscopía obtenida a partir de la muestra M2Col1, que tiene la composición mencionada en la tabla 18, puede observarse a continuación en la figura 20. Esta muestra tiene una característica particular, y es la diferenciación clara entre una zona porosa del material en la parte inferior de la imagen y una zona lisa en la parte superior. La topografía lisa puede estar asociada al tipo de molde y de secado que tuvo el material para la preparación de la prueba. Esta imagen se tomó con un haz de electrones de 7,0 kV, una magnificación 5,00 kx para obtener una escala de 20 µm.

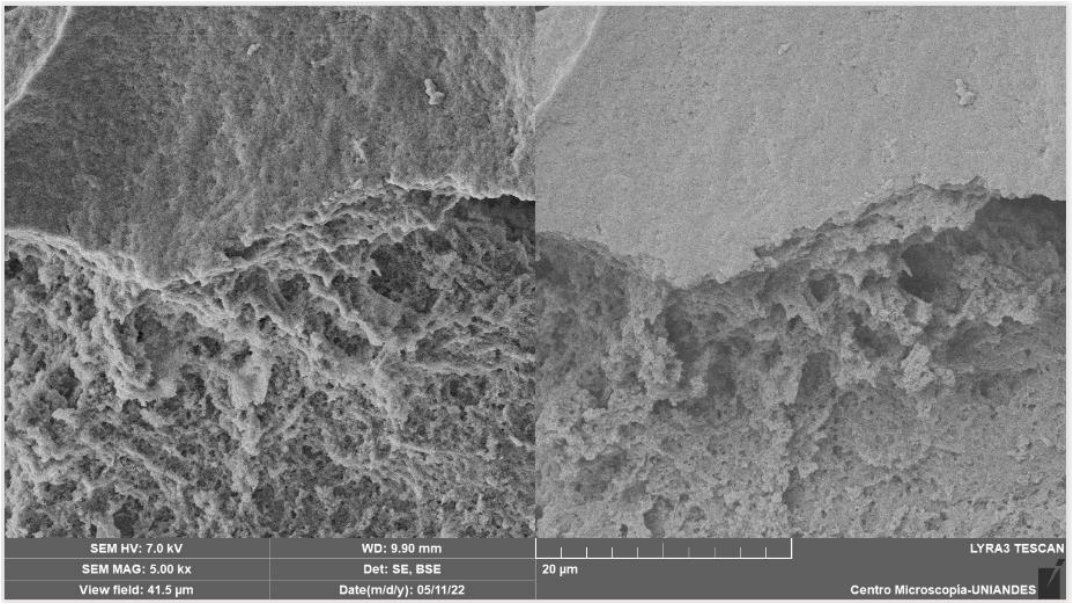
Tabla 18
Composición muestra M2Col1

Composición muestra M2Col1		
Quitosano	Óxidos de grafeno	Colágeno
0,75 gr	28,2 mg	10,0 mg

Las imágenes MEB permitieron observar una fractura bajo la zona particularmente lisa, donde es posible ver una organización de poros de manera aleatoria. Asís mismo, la figura 21 permite observar múltiples facturas sobre la superficie del material que muestra algunas láminas comparables a resultados obtenidos previamente por otros autores (Magaz et al., 2021; Roshanbinfar et al., 2019). Esta imagen se tomó con un haz de electrones de 7,0 kV, una magnificación 500 x para obtener una escala de 200 µm.

Figura 22

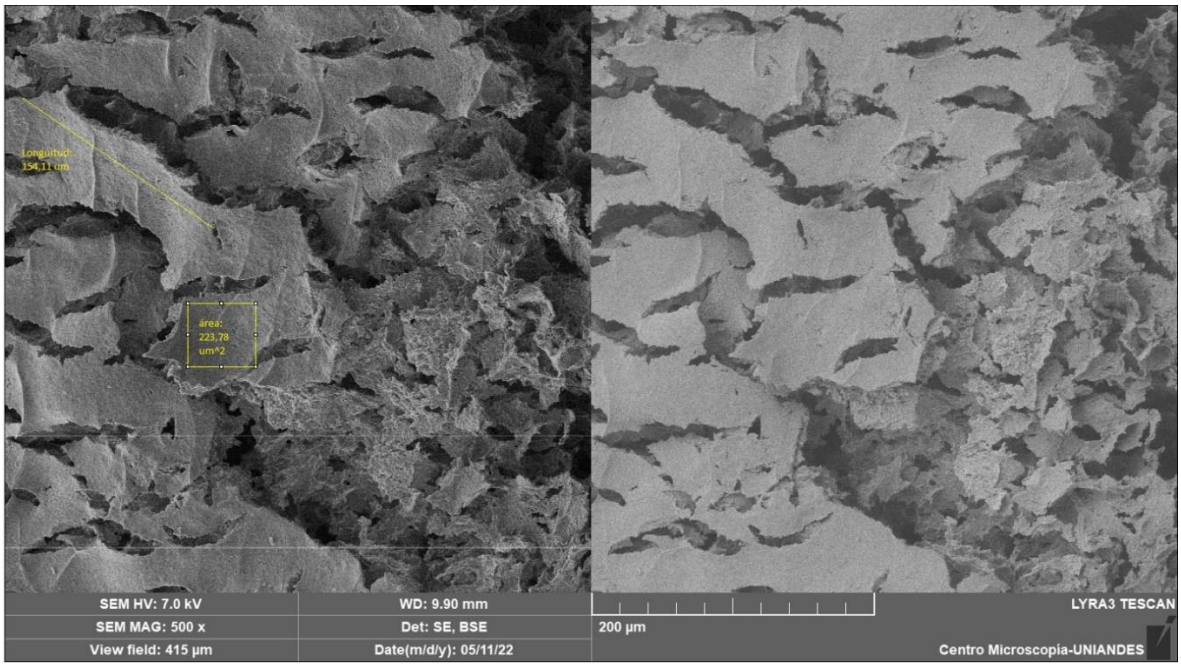
Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M2Col1 magnificación 5,00 kx



Estas imágenes permiten observar una serie de láminas fracturadas ubicadas uniformemente a lo largo de la superficie que en su interior presentas algunas porosidades entre ellas.

Figura 23

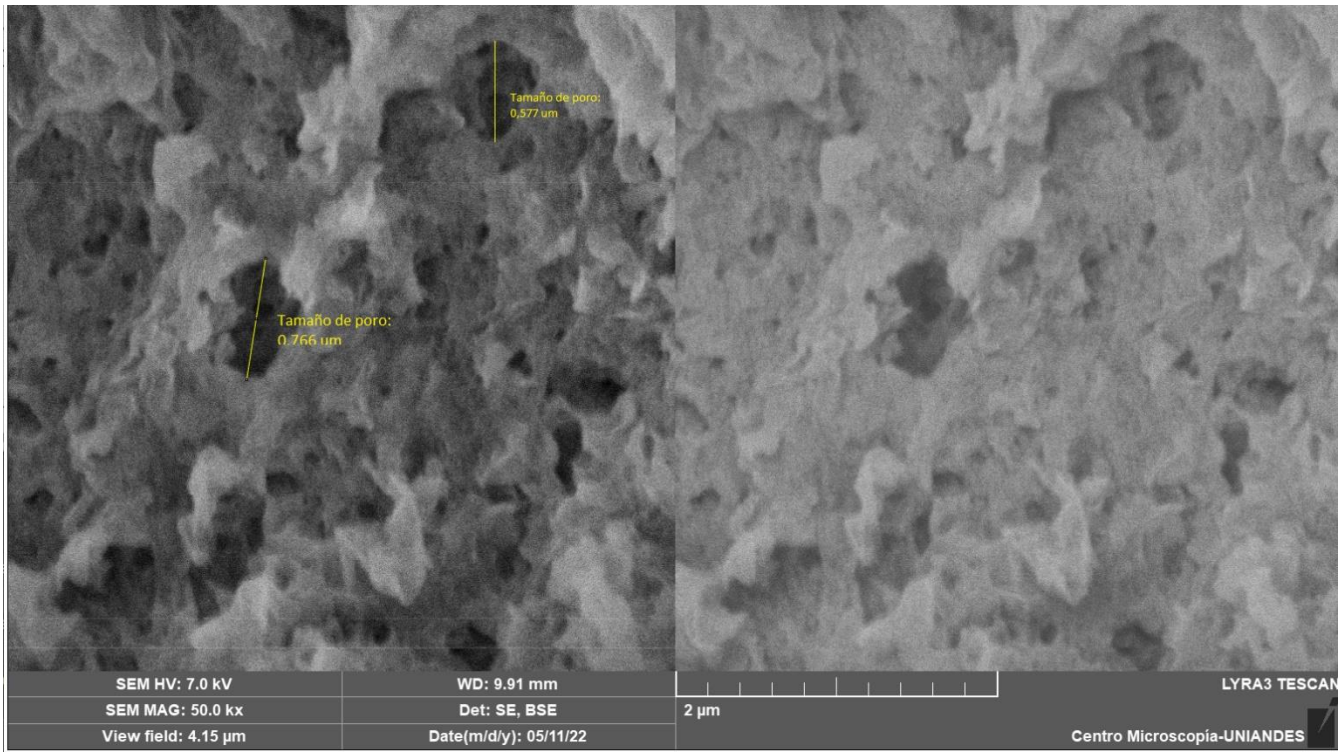
Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M2Col1 magnificación 500 x



La figura 23 permite observar las medidas tomadas por medio del software ImageJ, con el fin de determinar los tamaños y áreas de algunas partes del material. Como lo evidencia la imagen, la muestra 4 posee una longitud en sus fracturas de alrededor de 154,11 µm, y un área superficial de 2123,78 μm^2, dando cumplimiento al requerimiento que se había planteado respecto al tamaño del material (Kettenmann & Verkhratsky, 2011).

Así mismo, la figura 24 muestra una magnificación de 50,0 kx en la zona porosa del material, de que podemos observar que las longitudes de poro marcadas se encuentran entro los 0,577 µm y 0,766 µm.

Figura 24
Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M2Col1 magnificación 500 x



Microscopía electrónica de barrido de la muestra M3Col3

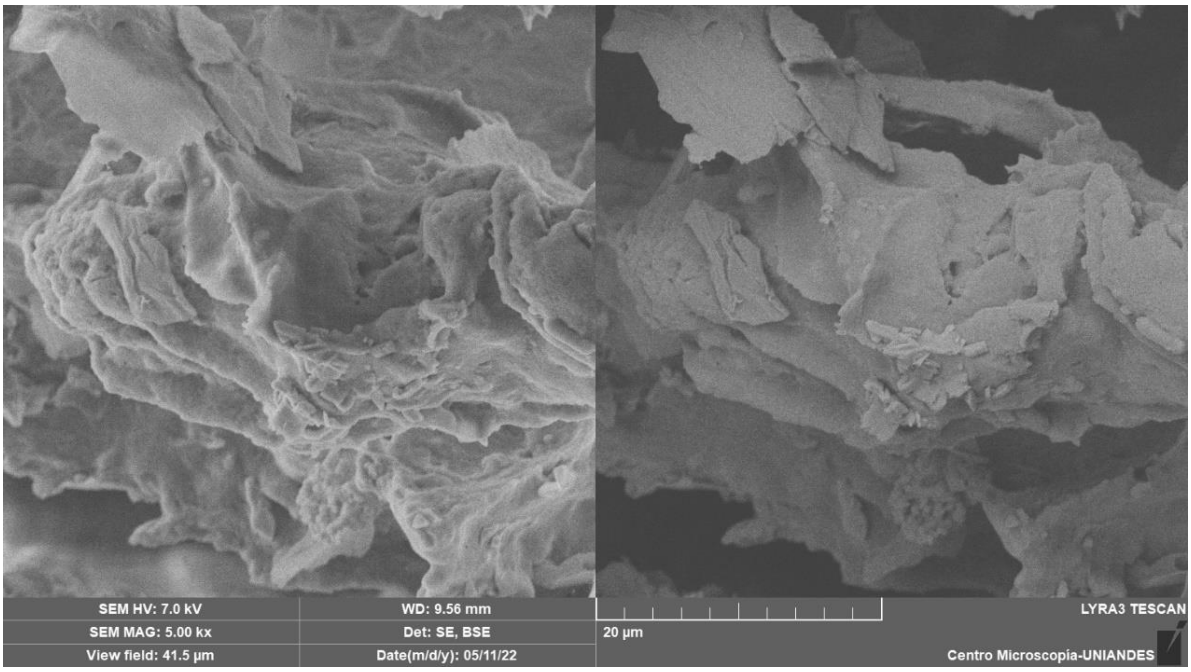
La imagen de microscopía obtenida a partir de la muestra M3Col3, que tiene la composición mencionada en la tabla 19, puede observarse a continuación en la figura 25. Esta muestra, a diferencia de la observada anteriormente en la figura 20, presenta una serie de láminas interconectadas con algunas aglomeraciones que pueden deberse a errores en el proceso de síntesis y purificación del material. Sin embargo, este tipo de formaciones laminares y aglomeradas son observables también en ensayos realizados por otros investigadores, que se demuestran típicos en materiales carbonosos(Sabzevari et al., 2018). Esta imagen se tomó con un haz de electrones de 7,0 kV, una magnificación 5,00 kx para obtener una escala de 20 µm.

Tabla 19
Composición muestra M3Col3

Composición muestra M3Col3		
Quitosano	Óxidos de grafeno	Colágeno
0,75 g	46,8 mg	15,0 mg

Figura 25

Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M3Col3 magnificación 5,00 kx



En la figura 26, es posible observar la muestra M3Col3 en una magnificación de 500x, que permite observar una estructura porosa de manera aleatoria. Por medio del software ImageJ, fue posible realizar las medidas de uno de los poros, así como de una de las escamas de la parte superior. Esto permitió encontrar un poro de longitud 33,493 µm, así como una longitud de escama de 96,502 µm.

Adicionalmente, se realizó un análisis semicuantitativo elemental para corroborar los componentes presentes en el hidrogel, así como su ubicación y abundancia a lo largo del material. De esta manera, se obtienen los resultados mostrados en la figura 27 y la tabla 20.

Figura 26

Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M3Col3 magnificación 500x

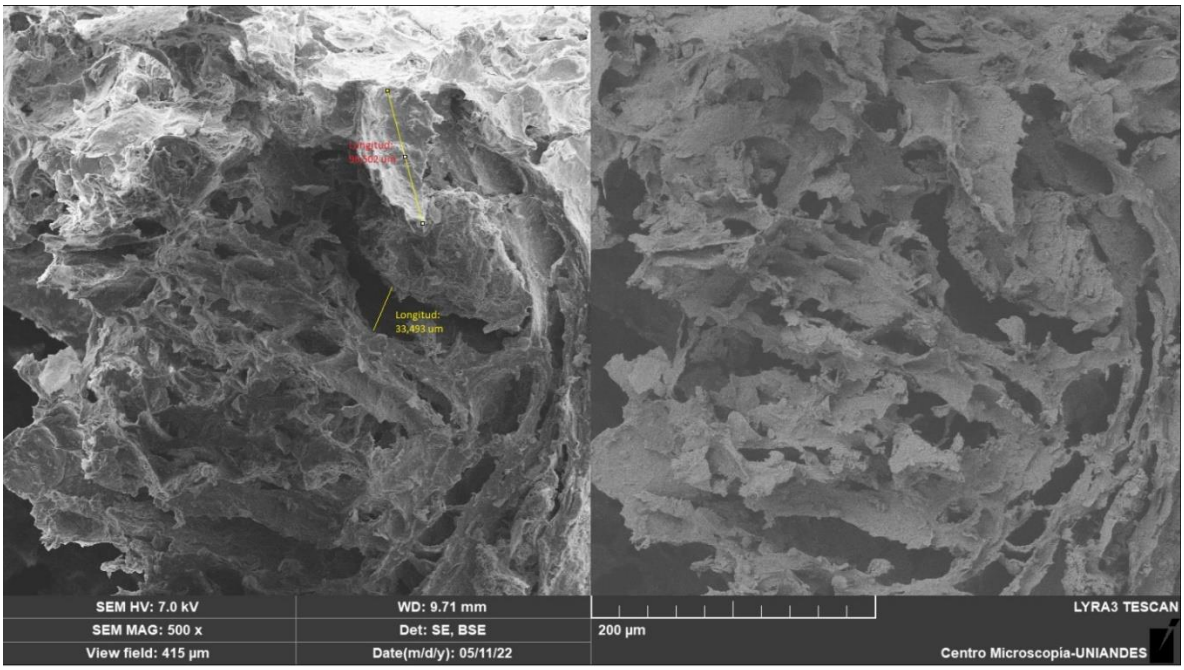


Figura 27

Análisis químico semicuantitativo elemental de la muestra M3Col3 obtenido a través de la microscopía electrónica de barrido

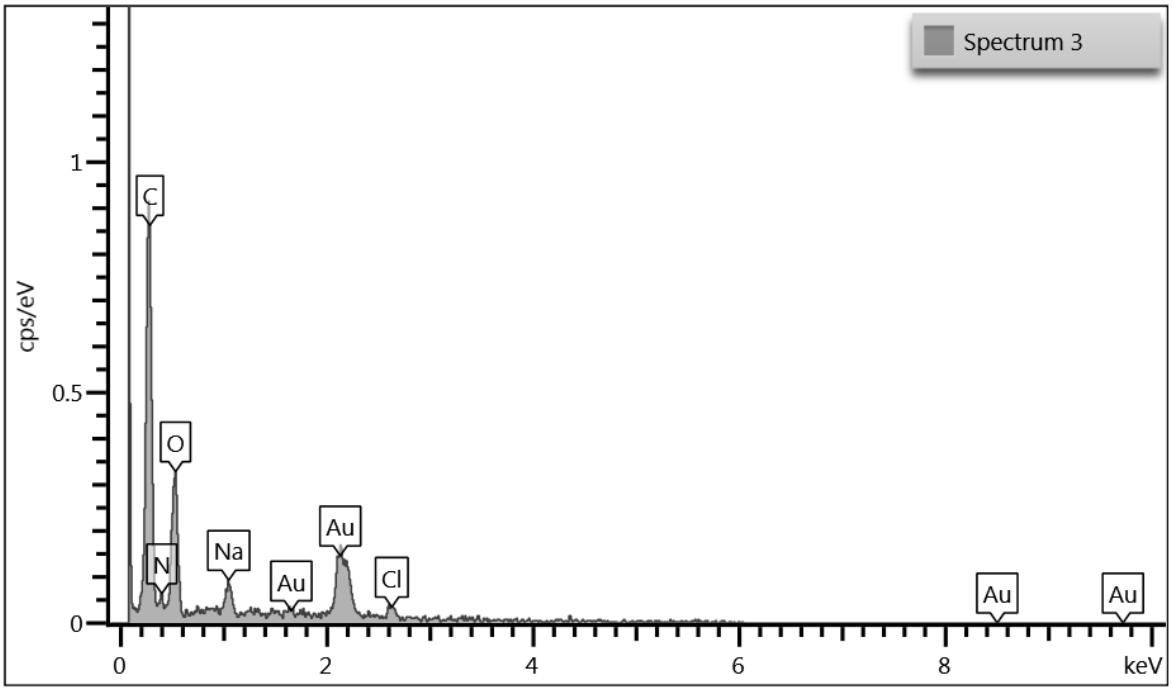


Tabla 20
Resultados análisis semicuantitativo elemental de la muestra M3Col3

Element	Line Type	Wt%	Wt% Sigma	Atomic %
C	K series	70.17	3.01	76.94
N	K series	3.01	3.68	2.83
O	K series	21.76	1.55	17.91
Na	K series	2.19	0.35	1.25
Cl	K series	2.87	0.61	1.07
Total:		100.00		100.00

La figura 27 y la tabla 20 muestran la composición del hidrogel M3Col3, que demuestra tener altos porcentajes de carbono y oxígeno, resultados de la funcionalización del quitosano con los óxidos de grafeno. Así mismo, la presencia de sodio y cloro son residuos de los procesos y reactivos utilizados en la síntesis y purificación del material. Estos particularmente pueden ser vistos como pequeñas cristalizaciones en la figura 25, que pueden ser asociados a la falta de lavados del proceso en la extracción de colágeno. Así mismo, la presencia del oro se adjudica al proceso de metalización de la muestra para ejecutar la caracterización por medio de microscopía electrónica de barrido.

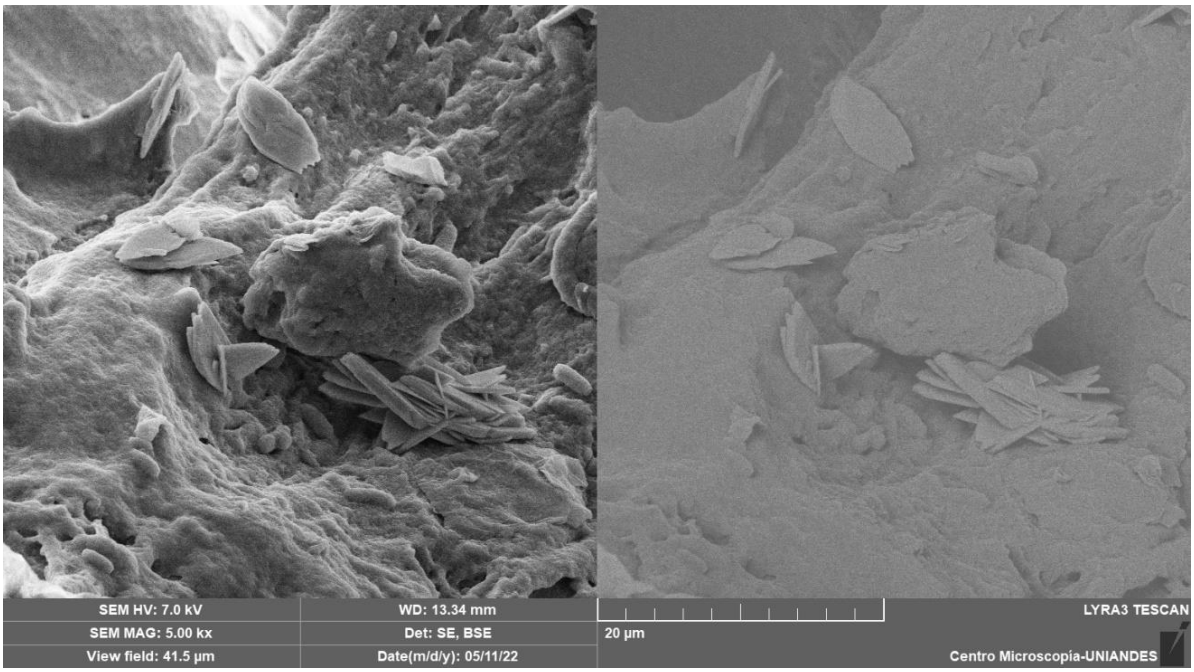
Microscopía electrónica de barrido de la muestra M4Col2

La imagen de microscopía obtenida a partir de la muestra M4Col2, que tiene la composición mencionada en la tabla 20, puede observarse a continuación en la figura 23. Esta muestra conserva una similitud con la micrografía obtenida en la figura 22, se puede apreciar una cavidad del material sonde encontramos una serie de láminas que pueden ser atribuidas a los óxidos de grafeno. Este material también muestra una aglomeración de material características de los componentes carbonosos presentes en la muestra (Sabzevari et al., 2018). Esta imagen se tomó con un haz de electrones de 7,0 kV, una magnificación 5,00 kx para obtener una escala de 20 µm.

Tabla 21
Composición muestra M4Col2

Composición muestra M4Col2		
Quitosano	Óxidos de grafeno	Colágeno
0,56 gr	37,5 mg	12,5 mg

Figura 28
Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M4Col2 magnificación 5,00 kx



Microscopía electrónica de barrido de la muestra M6Col3

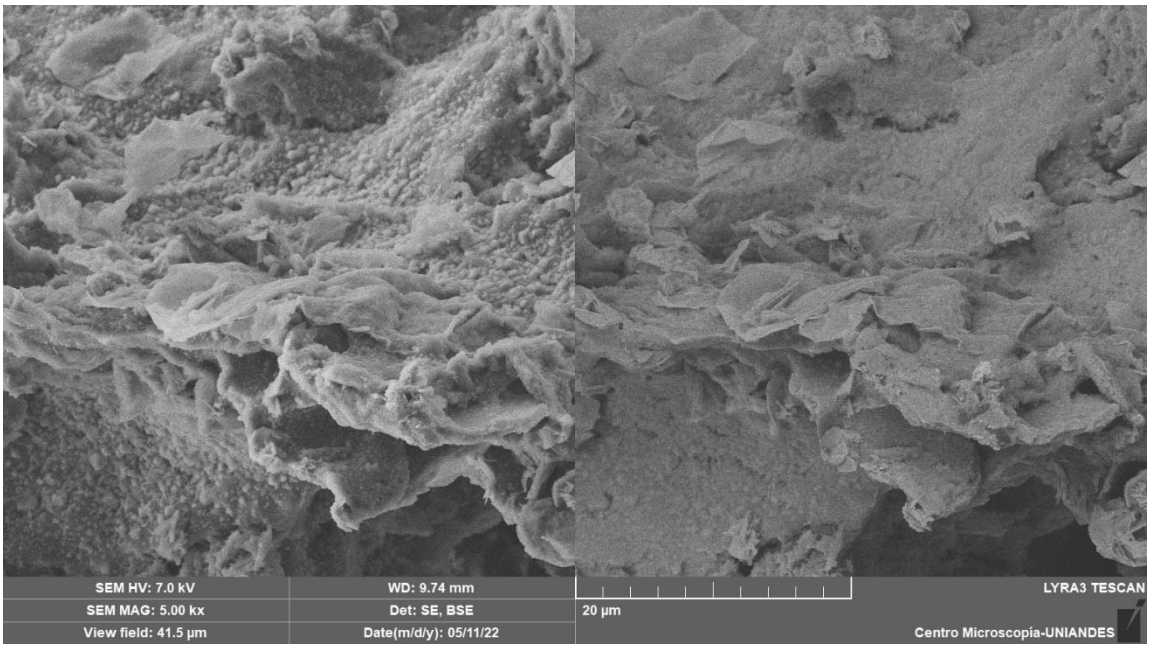
La imagen de microscopía obtenida a partir de la muestra M6Col3, que tiene la composición mencionada en la tabla 22, puede observarse a continuación en la figura 29. Esta muestra no posee indicaciones de porosidad en su superficie, sin embargo, se puede ver la presencia de algunas láminas, como se ha descrito en anteriores micrografías. Esta muestra, a diferencia de las anteriores, posee una rugosidad a través de su superficie que parece indicar la presencia de cristales, posiblemente provenientes del proceso de purificación del hidrogel. Esta imagen se tomó con un haz de electrones de 7,0 kV, una magnificación de 5,00 kx para obtener una escala de 20 µm.

Tabla 22
Composición muestra M6Col3

Composición muestra M6Col3		
Quitosano	Óxidos de grafeno	Colágeno
0,56 g	46,8 mg	15,0 mg

Figura 29

Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M6Col3 magnificación 5,00 kx



La figura 29 también muestra una superficie donde existen una hojillas o láminas que se encuentras dispersadas de manera aleatoria pero que tratan de organizarse de manera horizontal a lo largo de la superficie del material.

Figura 30
Análisis químico semicuantitativo elemental de la muestra M6Col3 obtenido a través de la microscopía electrónica de barrido

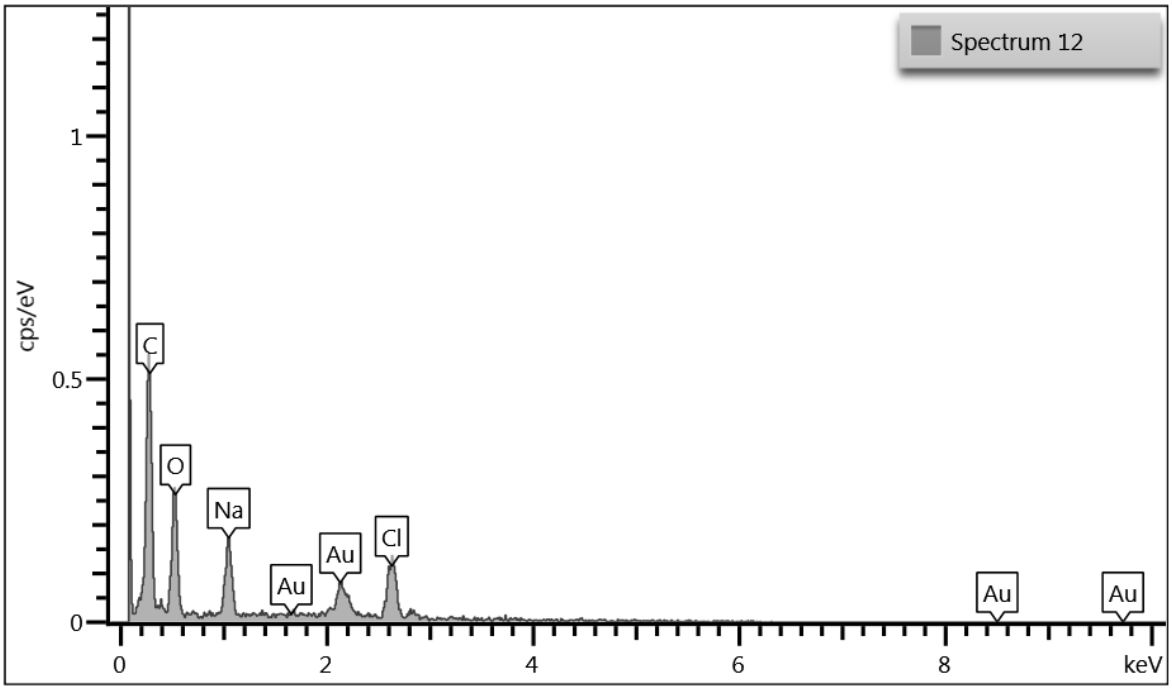


Tabla 23
Resultados análisis semicuantitativo elemental de la muestra M6Col3

Element	Line Type	Wt%	Wt% Sigma	Atomic %
C	K series	69.21	1.33	79.66
O	K series	15.76	0.89	13.62
Na	K series	4.06	0.29	2.44
Cl	K series	10.98	0.67	4.28
Total:		100.00		100.00

De esta muestra también se realizó un análisis semicuantitativo elemental, el cual demostró una alta presencia de carbono y oxígeno, y siendo consistente con su porcentaje, hay una mayor cantidad de oxígeno que se debe a la funcionalización del quitosano con el óxido de grafeno, esta vez, en una concentración más alta, comparada con la muestra M3Col3. Nuevamente los residuos presentes en la muestra, correspondiendo al sodio y cloro, están relacionados a los procesos de purificación y lavado del colágeno, visibles como cristales en la figura 29.

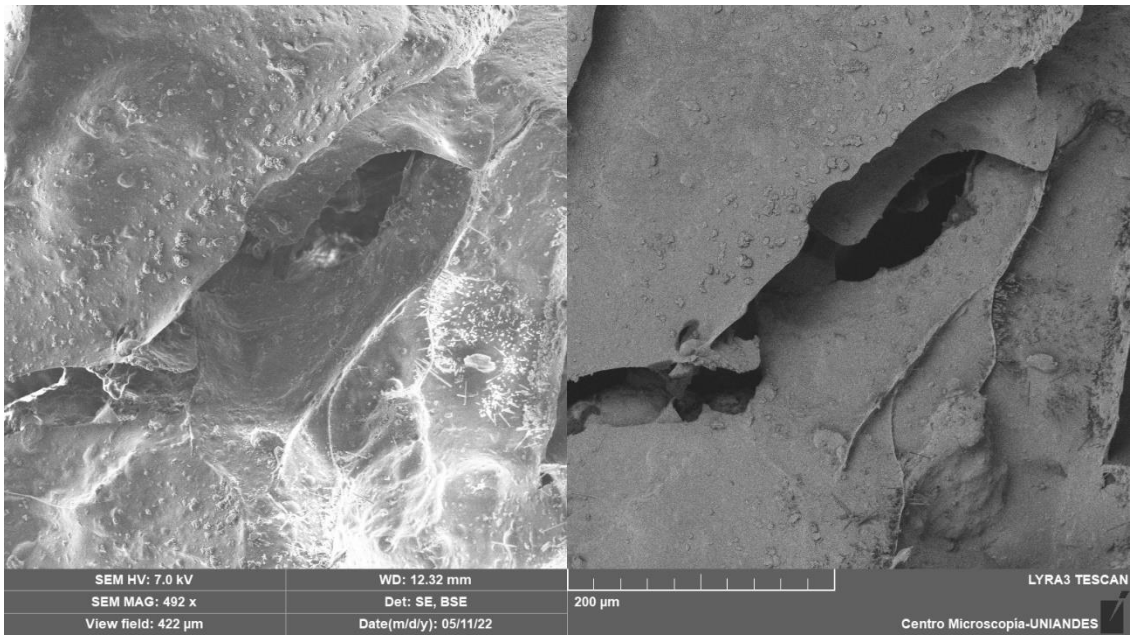
Microscopía electrónica de barrido de la muestra M9Col2

La imagen de microscopía obtenida a partir de la muestra M9Col2, que tiene la composición mencionada en la tabla 22, puede observarse a continuación en la figura 25. La micrografía obtenida muestra una serie de láminas intercaladas una sobre otra, que muestran algunos signos de fractura y múltiples cristales en su superficie. Los cristales pueden verse más a detalle en la figura 26. Esta imagen se tomó con un haz de electrones de 7,0 kV, una magnificación de 492 x para obtener una escala de 20 µm.

Tabla 24
Composición de la muestra M9Col2

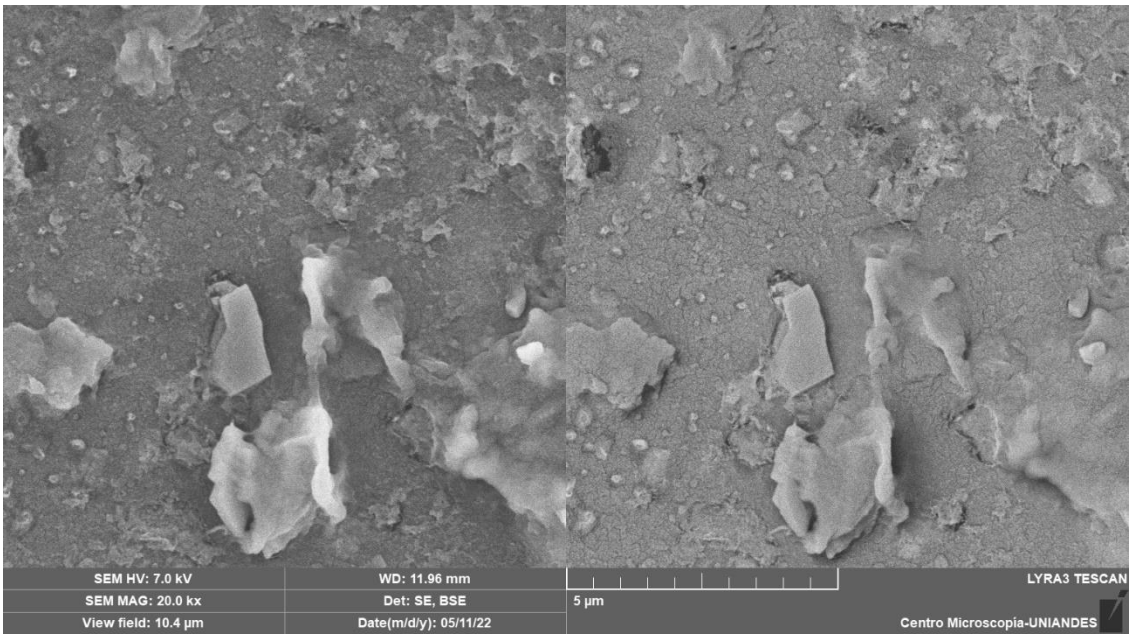
Composición muestra M9Col2		
Quitosano	Óxidos de grafeno	Colágeno
0,93 gr	46,8 mg	12,5 mg

Figura 31
Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M9Col2 magnificación 942 x



La figura 31 muestra una serie de láminas de apariencia compacta con fracturas que parecen indicar una organización por niveles de las muestras, las fracturas presentes permiten ver algunas porosidades en el material.

Figura 32
Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M9Col2 magnificación 20,0 kx



Microscopía electrónica de barrido de la muestra M9Col3

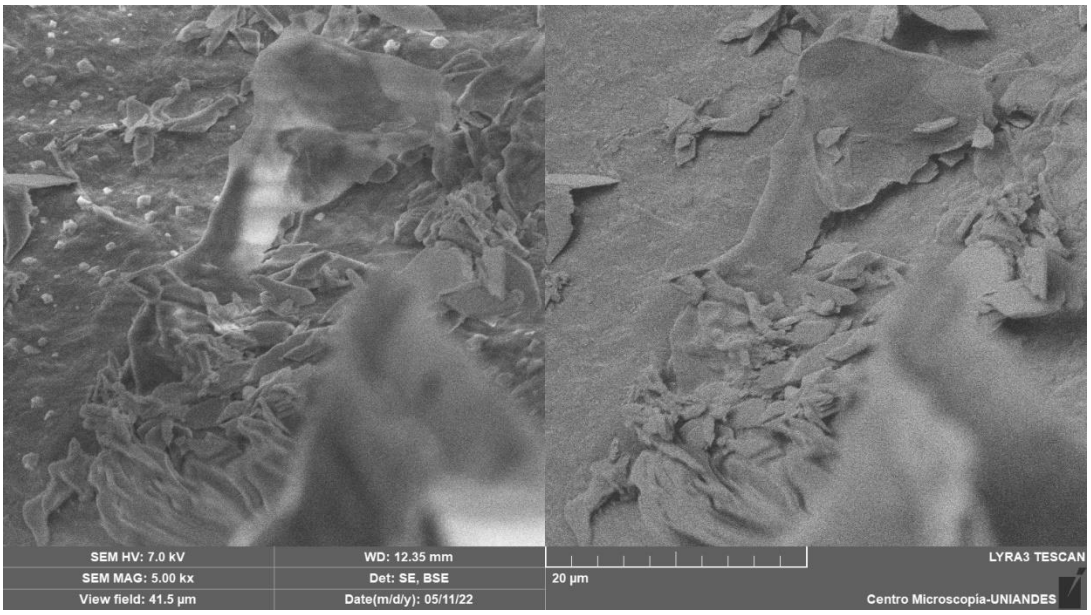
La imagen de microscopía obtenida a partir de la muestra M9Col3, que tiene la composición mencionada en la tabla 23, puede observarse a continuación en la figura 25. Al ser la muestra con mayor contenido de componentes carbonosos, es de esperar observar las aglomeraciones de material, así como la formación de laminillas en ciertas regiones de este. Esta imagen se tomó con un haz de electrones de 7,0 kV, una magnificación de 5,00 kx para obtener una escala de 20 µm.

Tabla 25
Composición de la muestra M9Col3

Composición muestra M9Col2		
Quitosano	Óxidos de grafeno	Colágeno
0,93 gr	46,8 mg	15,0 mg

Figura 33

Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M9Col3 magnificación 5,00 kx



La figura 33 muestra la superficie de material cubierta de una serie de hojillas que hacen referencia al material carbonoso presente en la composición, y se respectiva aglomeración a lo largo del material.

Figura 34

Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M9Col3 magnificación 5,00 kx

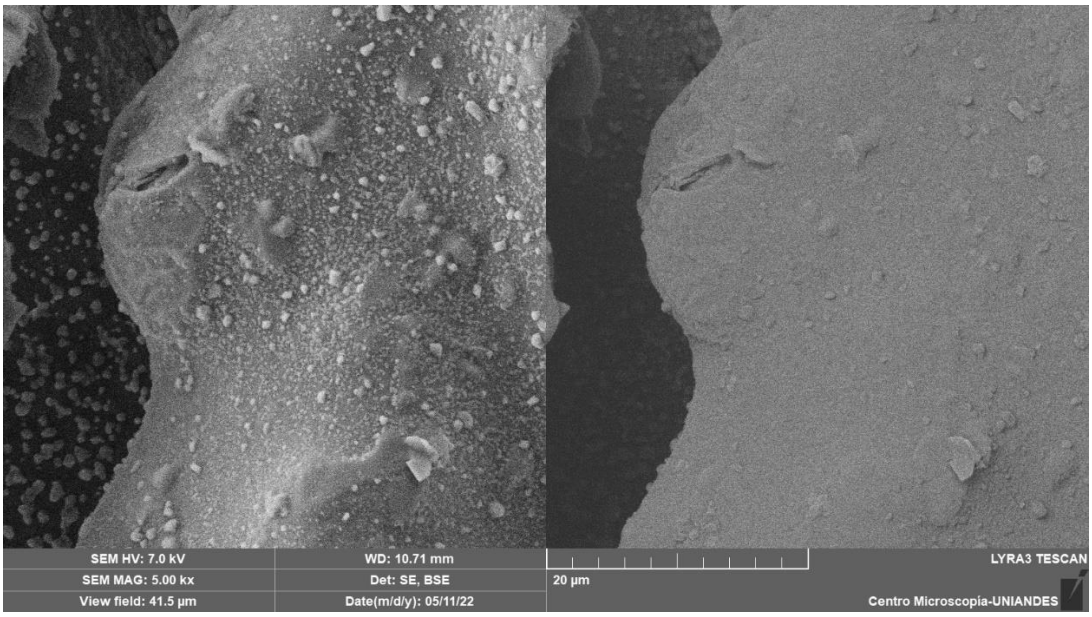
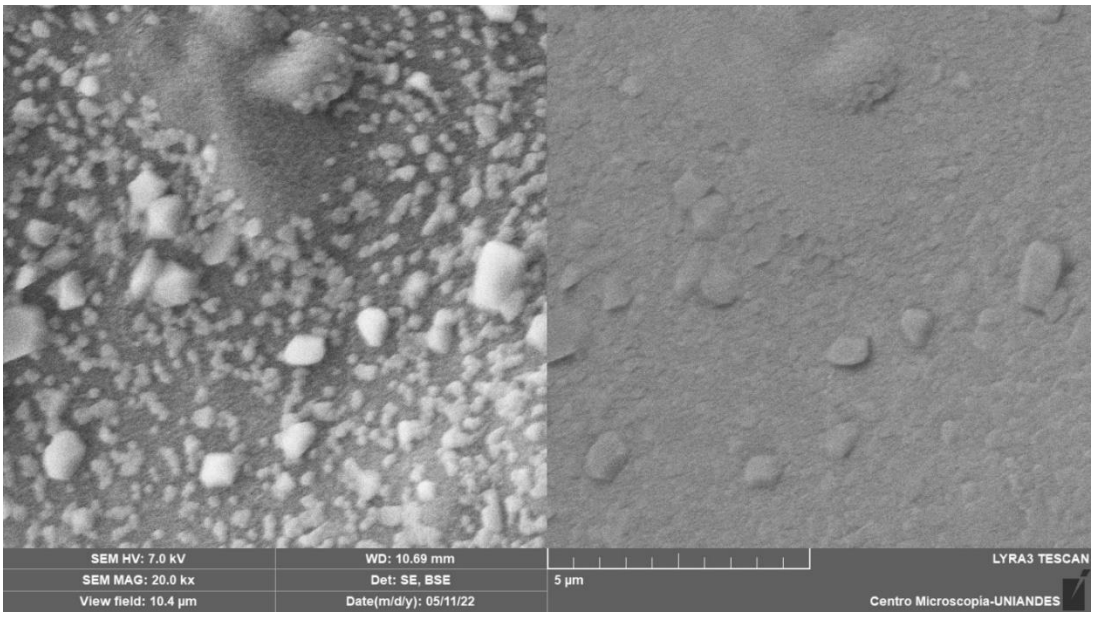


Figura 35
Micrografía obtenida a partir de la microscopía electrónica de barrido de la muestra M9Col3 magnificación 20,0 kx



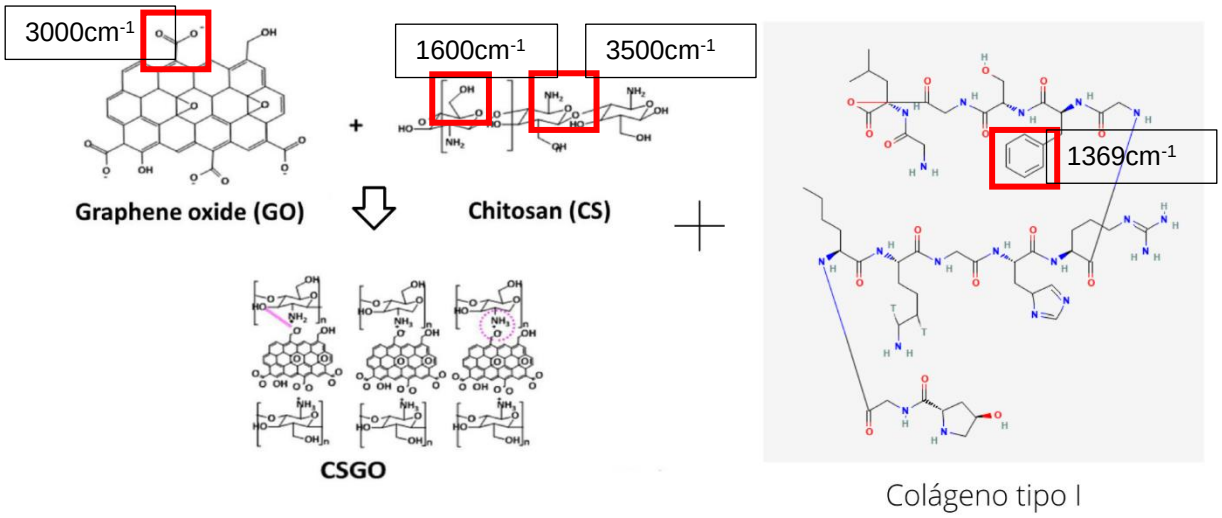
Las figuras 34 y 35 muestran un acercamiento a las zonas con mayor cantidad de formación de cristales. Es posible asumir que la formación de cristales está relacionada a falta de purificación del material. Teniendo en cuenta que este material contiene la mayor cantidad de colágeno contemplada en el diseño experimental, se puede plantear que la purificación de la extracción del colágeno fue incompleta, dejando algunas sales que pudieron ser observadas por medio de la microscopía electrónica de barrido.

7.3.2. Caracterización de composición

Se realizó una espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para identificar los grupos funcionales presentes en el hidrogel propuesto de colágeno y quitosano funcionalizado con óxidos de grafeno. A continuación, se realizaron las identificaciones estructurales y de composición de los hidrogeles.

Figura 36

Estructura química del quitosano funcionalizado con óxidos de grafeno y colágeno



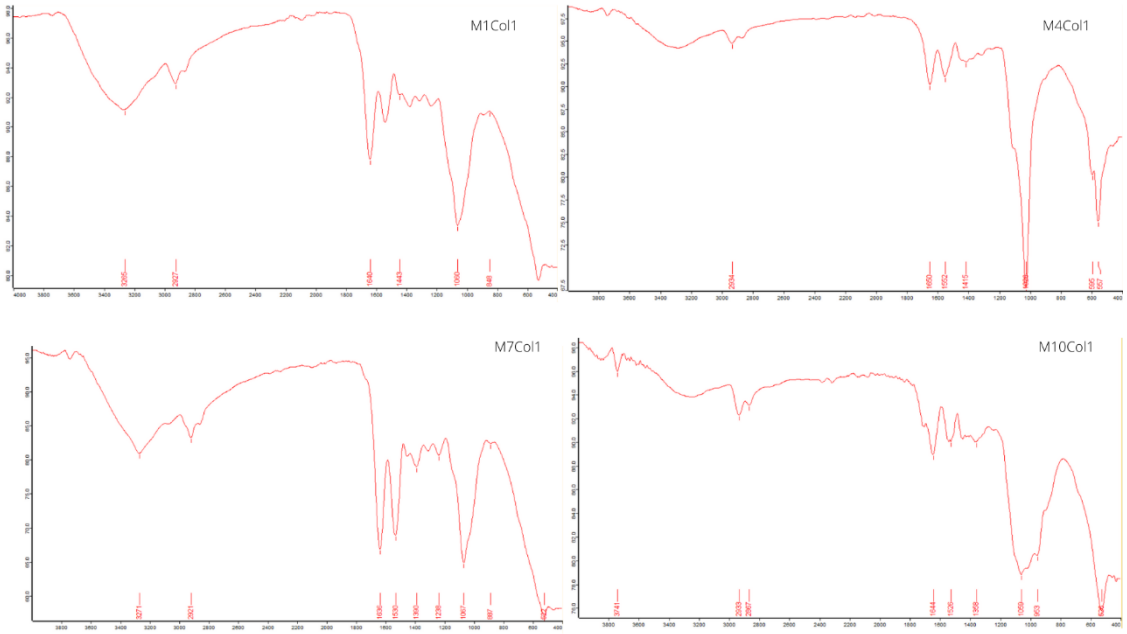
Nota: Estructuras químicas del óxido de grafeno, quitosano y colágeno. Reproducida de Collagen/chitosan-functionalized graphene oxide hydrogel provide a 3D matrix for neural stem/precursor cells survival, adhesion, infiltration and migration, 2021(Rezaei et al., 2021), PubChem Compound Summary for CID 6913668, Collagen I, alpha chain (98-110) (National Center for Biotechnology Information; 2022).

Para proceder con el análisis de los espectros IR de las muestras obtenidas, es importante denotas que, debido a su composición, cada una de las muestras debe contemplar las bandas denotadas en la figura 36, correspondientes a los espectros relacionados a los grupos funcionales característicos de las muestras.

La figura 21 muestra que los componentes del hidrogel están conformados por grupos carboxilo y oxigenados. Como se mostró anteriormente en la figura 17, los óxidos de grafeno poseen una serie de bandas características relacionadas a la vibración de la tensión de los enlaces C-O-C alrededor de los 1045 cm^{-1}, así mismo, también presentan una banda C-OH a los 1213 cm^{-1}, una banda C=O de un grupo carboxilo a los 1718 cm^{-1}, y un estiramiento OH a los 3395 cm^{-1} (Rezaei et al., 2021).

Figura 37

Espectro IR de las muestras M1Col1, M4Col1, M7Col 1 y M10Col1



La figura 37 muestra los espectros infrarrojos de 4 de las muestras que poseen el nivel 1 de colágeno (10 mg). Estas gráficas demuestran la aparición de las bandas del colágeno, que se habían mostrado previamente en la figura 11, pero cuya principal característica es tener un pico más alto, entre 1636 cm^{-1} y 1650 cm^{-1}. Esta banda correspondiente a la amida I y al estiramiento del enlace C=O de los óxidos de grafeno (Rezaei et al., 2021). Es posible también evidenciar que la profundidad de los picos se encuentra ligada a las concentraciones de los componentes presentes en el tratamiento a evaluar.

Este mismo análisis puede verse aplicada a las figuras 38 y 39 que esta vez muestran los espectros obtenidos de algunas de las muestras con los niveles medios y altos de colágeno. Es posible verificar que, como se menciona anteriormente, la banda de la amida I se ubica en todas las muestras en un rango un poco más alto de lo normal, haciendo referencia a la funcionalización exitosa con óxidos de grafeno.

Figura 38

Espectro IR de las muestras M1Col2, M2Col2, M4Col2 y M9Col2

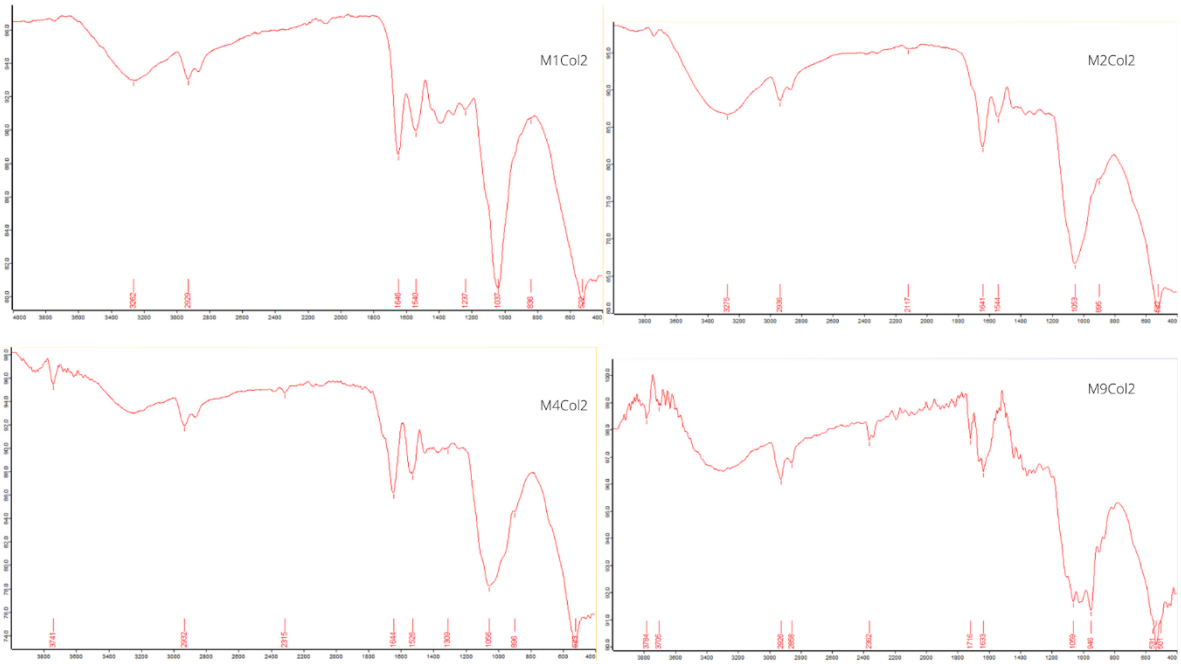
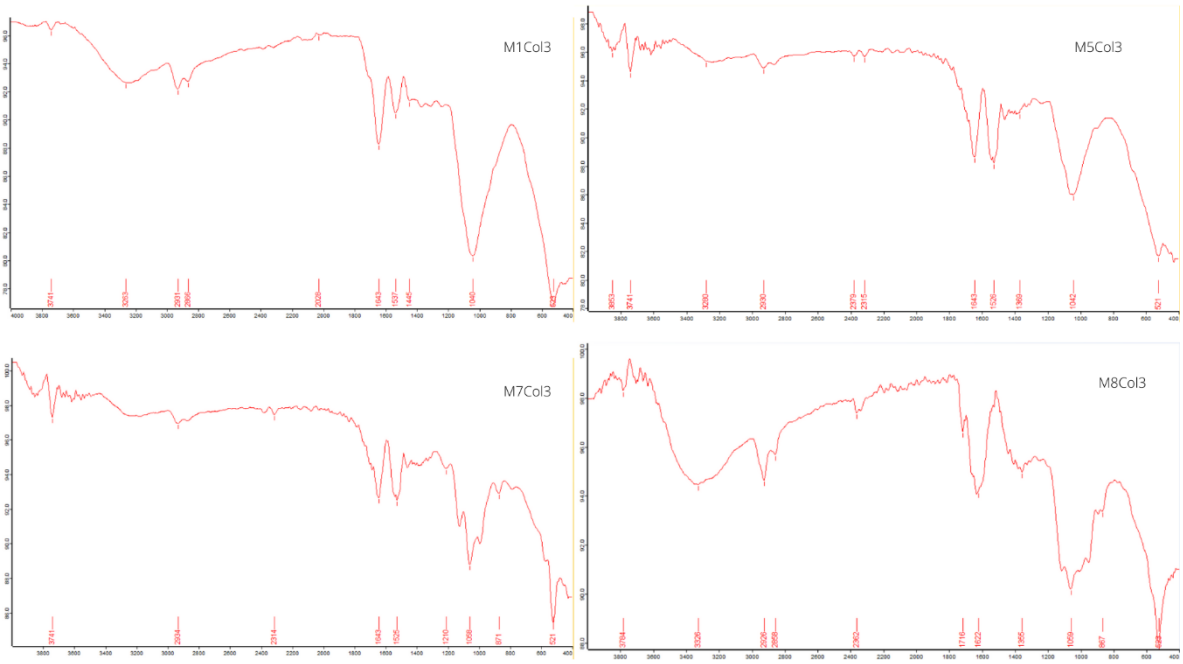


Figura 39

Espectro IR de las muestras M1Col3, M5Col3, M7Col3 y M8Col3



Los resultados obtenidos en las figuras 37, 38 y 39 fueron comparados a las caracterizaciones realizadas por (Rezaei et al., 2021) en su artículo Collagen/chitosan-functionalized graphene oxide hydrogel provide a 3D matrix for neural stem/precursor cells survival, adhesion, infiltration and migration, publicado en 2021, donde se realizó la fabricación de un hidrogel a base de una funcionalización de quitosano con óxidos de grafeno y colágeno. Haciendo esta comparación, es posible determinar que las bandas obtenidas en los espectros son comparables a las reportadas en bibliografía, y siguen los patrones estipulados en la profundidad de los picos a medida que la concentración de los componentes aumenta. Adicionalmente, por las variaciones en las bandas del estiramiento C=O, es posible decir que se dio la funcionalización del composito de CSGO. Adicionalmente, los resultados anteriores también indican que el pico que aparece alrededor de los 1200 cm^{-1} pueden estar relacionados a estiramiento de los grupos epoxy de la superficie del óxido de grafeno y el estiramiento de los grupos N-H y C-N de la estructura del colágeno.

7.3.3. Caracterización porcentajes de hinchamiento

Para el cálculo del porcentaje de hinchamiento se partió de una masa de 100 mg de cada una de las muestras (27 muestras) y se realizó este ensayo por triplicado. Como solvente se empleó PBS 1X con pH 7,4.

Tabla 26
Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles con el nivel 1 de colágeno (10,0 mg)

Tiempo	M1Col1	M2Col1	M3Col1	M4Col1	M5Col1	M6Col1	M7Col1	M8Col1	M9Col1
0,28	92±2	93±11	93±1	95±0,2	92±4	90±6	98,6±1	87±15	95±2
0,5	97±15	95±7	95±1	97±0,2	92±3	97±2	98±2	93±7	96,3±1
0,71	93±19	95±5	95±2	98,7±2	91,6±2	97,2±2	95±2	98,2±3	96±9
1	93±5	94±4	95±4	98,3±7	91±2	97±1	95,3±2	98±1	96±3
1,41	90±4	94,8±3	96±0,3	98±2	91±2	97,4±12	96±3	98±1	95,2±3
2	90±6	92±3	96,3±0,3	98±2	92,3±1	97,4±18	95,2±12	98±3	89,1±7
2,23	89±14	92±3	96±1	92±4	92±2	97,7±3	95±6	97,4±1	90±3
2,44	84±11	92±5	96±3	93±3	92±1	97,5±2	92,5±3	97,3±4	90±2

Figura 40
Porcentaje de hinchamiento de las muestras con el nivel 1 de colágeno (10,0 mg)

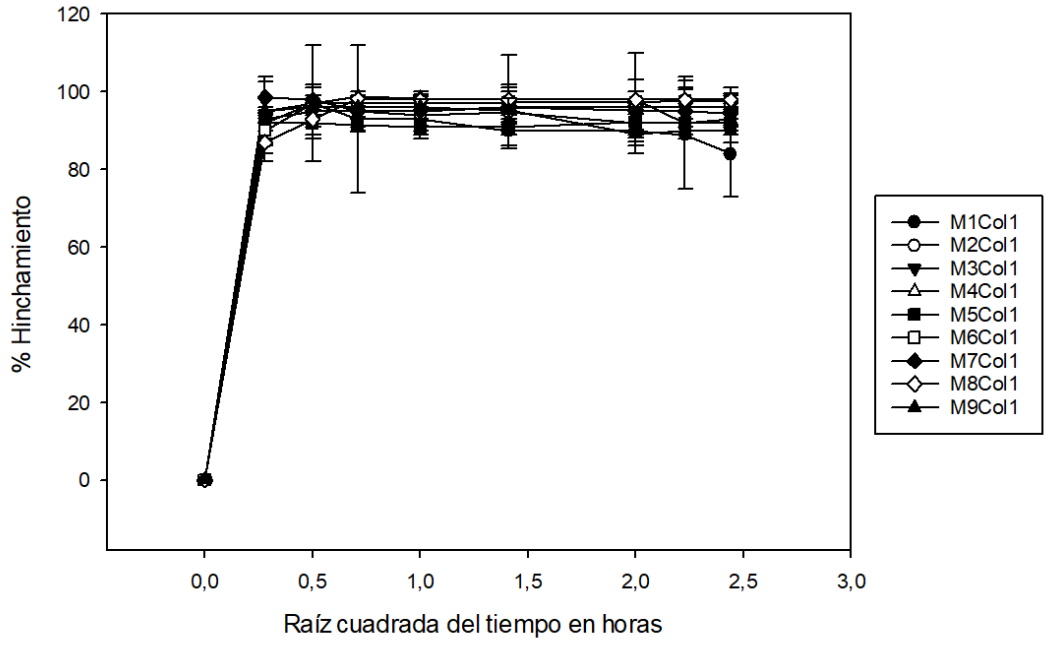


Tabla 27
Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles con el nivel 2 de colágeno (12,5 mg)

Tiempo	M1Col2	M2Col2	M3Col2	M4Col2	M5Col2	M6Col2	M7Col2	M8Col2	M9Col2
0,28	92±5	90±1	74±4	93±1	94±11	97±1	95±1	90±4	95±1
0,5	95±7	95±1	89±4	93±37	94±5	97±1	94±1	90,8±3	98,3±1
0,71	93±6	93±4	89±2	95±10	97±5	97±4	94±4	90±68	98±5
1	94±2	96±8	96,6±0,4	94±10	97,8±4	95,6±3	94,7±3	87,2±34	98±8
1,41	95±1	96±20	94±17	91±6	97±6	95±1	95±1	87±46	99,4±0,4
2	95±1	96±32	97±28	96±2	94±4	95±1	95±1	87±22	92±0,2
2,23	93±8	96±7	90±5	94±3	93,6±2	95,8±2	94±2	89±86	92±1
2,44	96±6	96±3	83±2	94±6	94±3	96,3±3	94,3±1	88,9±32	93±1

Figura 41

Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles con el nivel 2 de colágeno (12,5 mg)

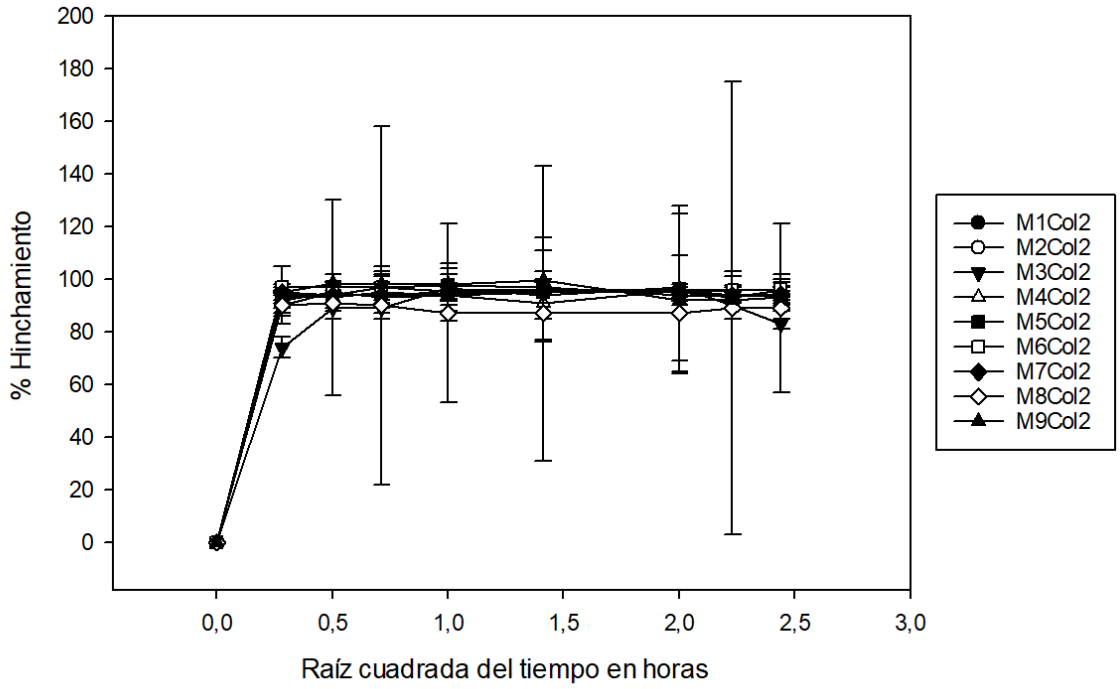


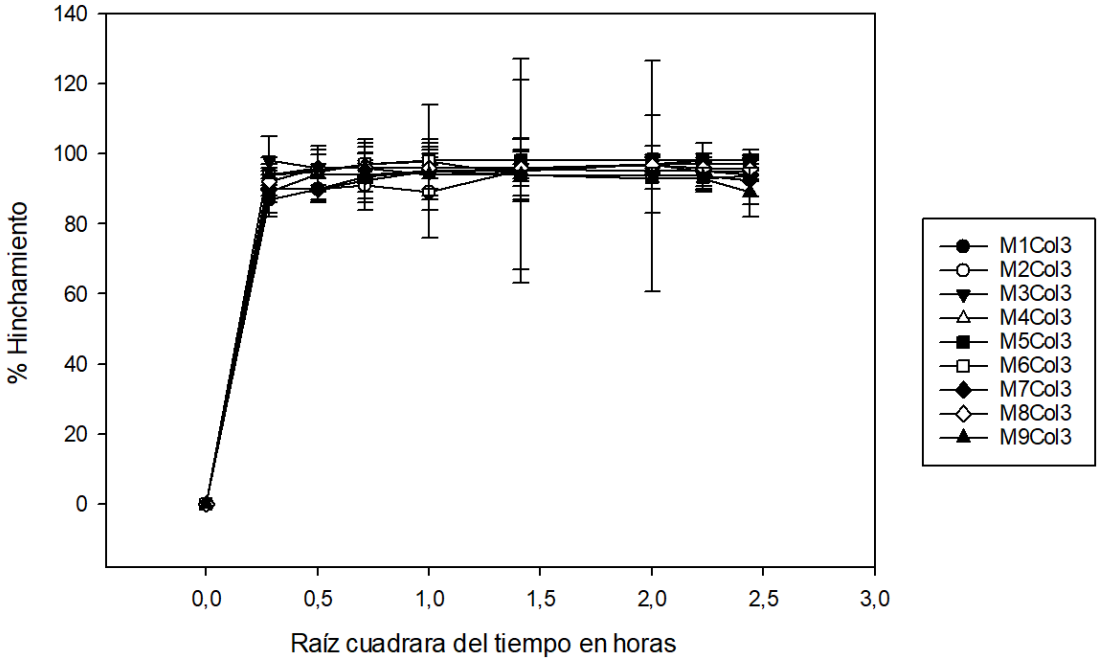
Tabla 28

Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles con el nivel 3 de colágeno (15,0 mg)

Tiempo	M1Col3	M2Col3	M3Col3	M4Col3	M5Col3	M6Col3	M7Col3	M8Col3	M9Col3
0,28	87±1	90±4	98±1	89±7	94±11	94±1	90±4	92±1	94±1
0,5	90±1	90±3	96±1	94,3±8	94,8±5	95±1	90±4	96±1	96±5
0,71	92,3±4	91±5	96±4	94±10	97±5	97±1	93,4±2	96,3±4	96±7
1	95±8	89±5	95,9±3	95±19	98±4	97,8±1	95±5	96±8	94±7
1,41	94±27	95,4±9	96±1	95±32	98±6	94±7	95,7±5	96,8±8	94±1
2	93,6±33	97±2	97,1±2	97±14	98,3±4	93±3	95±2	96±3	93±3
2,23	93,6±4	94,8±4	97±2	98±2	98±2	93±3	95±1	95,7±7	93±3
2,44	92,5±7	95±3	97±1	98±1	98±3	93,7±6	94±2	95,2±3	89±1

Figura 42

Porcentaje de hinchamiento de los hidrogeles con el nivel 3 de colágeno (15,0 mg)



Las tablas 26, 27 y 28 junto con las figuras 40, 41 y 42 muestran los porcentajes de hinchamiento de los hidrogeles de CSGO propuestos, separados en base a su cantidad de colágeno, que, a pesar de no mostrar grandes diferencias entre sus variaciones de colágeno, si permite identificar la importancia del quitosano para la capacidad de hinchamiento del hidrogel, y con su funcionalización con los niveles más altos de óxidos de grafeno, permite una mayor retención del PBS en el material, aumentando así su capacidad de hinchamiento y corroborando la información existente en bibliografía (Rezaei et al., 2021; Sabzevari et al., 2018).

Comparando los resultados obtenidos con los resultados base de la metodología seleccionada, se pueden observar algunas variaciones, pues en el artículo Collagen/chitopsan-functionalized Graphene oxide hydrogel provide a 3D matrix for neural, stem/precursor cells survival, adhesion, infiltration and migration de (Rezaei et al., 2021) se puede observar una tendencia lineal en los porcentajes de hinchamiento de las muestras. Aunque el comportamiento de las muestras dista de los resultados obtenidos por los autores, es posible deducir que las mayores cantidades de quitosano y óxidos de grafeno aportan un perfil importante en la característica de hinchamiento de los hidrogeles, aunque para este ensayo no fuera cierto en todos los casos.

7.3.4. Caracterización reológica del material

El comportamiento reológico de un material, en este caso, de un hidrogel para futuras aplicaciones clínicas, es de crucial importancia ya que provee información mecánica sobre el comportamiento del material. Las mediciones reológicas se realizaron empleando un reómetro (AntonPaar MCR 92) y utilizando la geometría de medición PP50. La placa se precalentó a una temperatura estándar de 25°C y las muestras fueron extraídas y puestas una por una sobre la placa.

A continuación, en las figuras 37 y 38 se puede apreciar que el hidrogel propuesto tiene un comportamiento no newtoniano, evidente por su adelgazamiento por cizallamiento, pues es posible notar como la viscosidad del material disminuye a medida que aumenta el esfuerzo cortante (M. H. Chen et al., 2017; Stojkov et al., 2021). Esta primera muestra gráfica, permite catalogar el material obtenido como un pseudoplástico, siendo consistente con lo esperado de un material basado en una solución de polímeros (Kocen et al., 2017).

La figura 43 compila los resultados de viscosidad de las muestras M5Col2 (azul oscuro), M4Col1 (rojo), M3Col1 (azul claro) y la muestra M3Col2 (verde aguamarina). Esta gráfica permite identificar la muestra M4Col1 con una viscosidad mayor, y sostenida en el tiempo a diferencia de las otras muestras evaluadas, seguida de la muestra M5Col2. A diferencia de la figura 43, las muestras de la figura 44 están compuestas por los tratamientos más bajos de CSGO.

La figura 44 muestra los resultados de viscosidad de las muestras M1Col1 (gris claro), M1Col2 (verde), M1Col3 (rosado), M2Col1 (azul opaco), M2Col2 (negro) y M2Col3 (gris opaco).

Figura 43

Resultados viscosidad muestras en función de la tasa de corte.

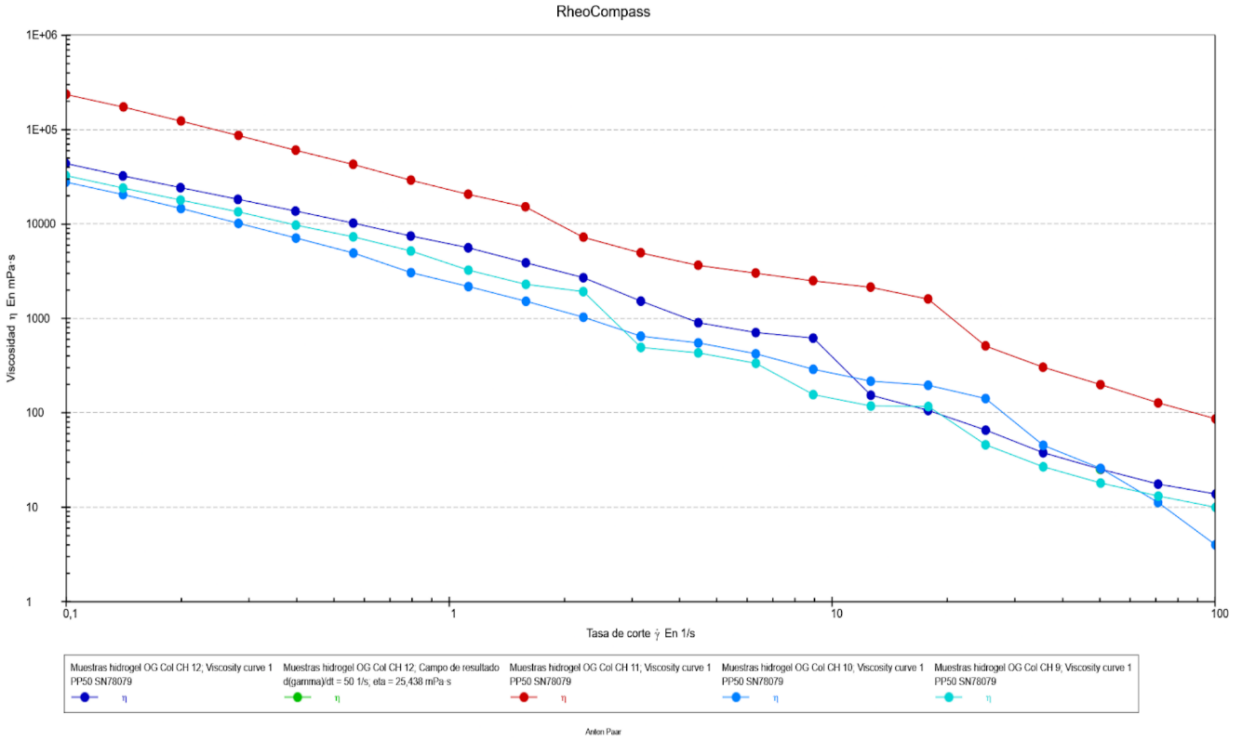
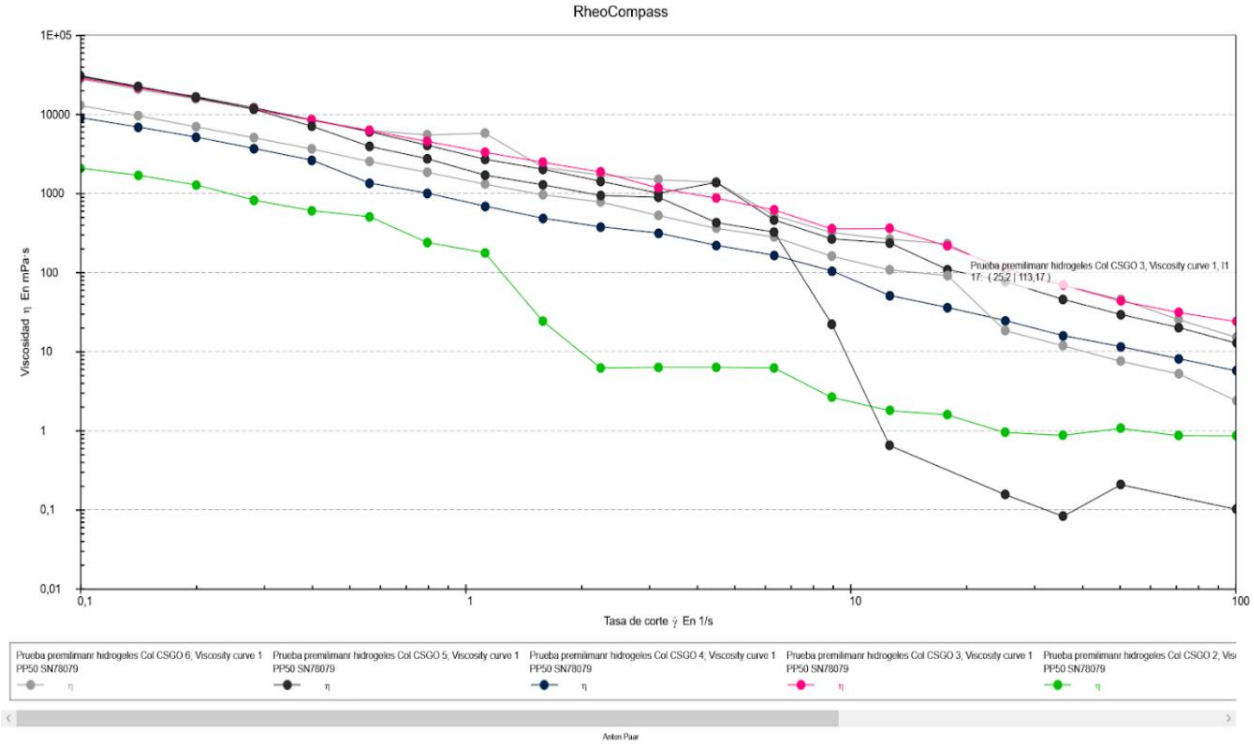


Figura 44

Resultados viscosidad muestras en función de la tasa de corte.



En análisis de estas gráficas permite identificar un patrón relacionado a la cantidad de quitosano con óxidos de grafeno, pues las muestras que poseían un tratamiento que considerara un nivel de CSGO alto, la viscosidad del material aumenta, por lo que son dos variables directamente proporcionales.

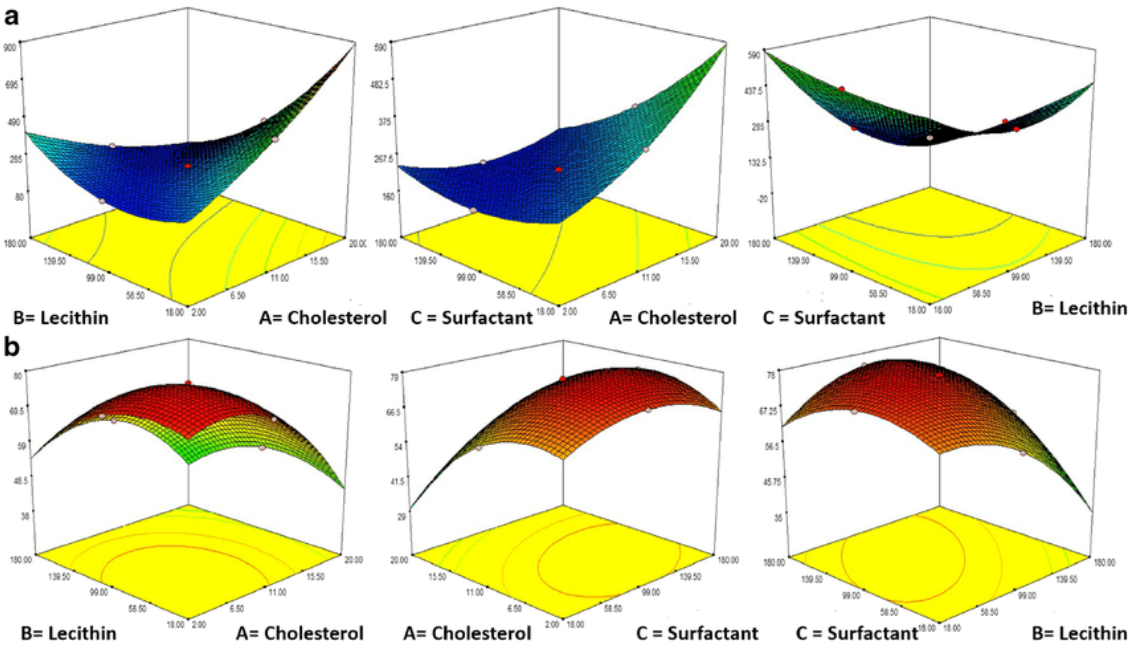
Estos resultados corroboran otros estudios sonde se evidencia que la adición de óxidos de grafeno, (en el caso de este trabajo, las concentraciones más altas), muestran un aumento en la viscosidad del material, esto se debe a la presencia de un alto número de grupos funcionales que contienen oxígeno interactuando con los grupos amino del quitosano (Kosowska et al., 2020).

7.3.5. Análisis de superficie de respuesta

El análisis de superficie de respuesta es un grupo de técnicas tanto matemáticas como estadísticas, cuyo principal objetivo es optimizar una respuesta de interés a través del estudio de la influencia de las variables. Este análisis produce como resultado una figura (véase figura 45) que permite visualizar de manera gráfica y tridimensional como varía la respuesta del material al realizar una variación sobre sus variables independientes (Myers et al., 2016).

Figura 45

Referencia de un análisis de superficie de respuesta



Nota: Metodología de superficie de respuesta para la optimización de una formulación. Reproducida de Development and Evaluation of Optimized Thiolated Chitosan Proniosomal Gel Containing Duloxetine for Intranasal Delivery (Khatoon et al., 2019).

De manera matemática, un análisis de superficie de respuesta de modela a partir de modelos de regresión de primer o segundo orden, de esta manera se brinda una mejor aproximación al modelo. Para el caso de dos variables independientes, se puede emplear el modelo expuesto en la ecuación 2. Esta ecuación representa a η como la variable respuesta y β_1, β_2, … β_k como las variables independientes o variables del proceso. También te tiene en cuenta ε como error estadístico (Myers et al., 2016).

Ecuación 2

Modelo de regresión de primer orden

$$\eta = \beta_0 + \beta_1\chi_1 + \beta_2\chi_2 + \varepsilon$$

A través del software Statgraphics, se procedió a hacer el diseño del modelo matemático con el fin de optimizar los efectos de las variables de CSGO y masa de colágeno sobre algunas de las evaluaciones realizadas. Los resultados se observan a continuación.

Figura 46

Análisis de superficie de respuesta de la relación concentración de colágeno, concentración de quitosano, y concentración de GO sobre el porcentaje de hinchamiento

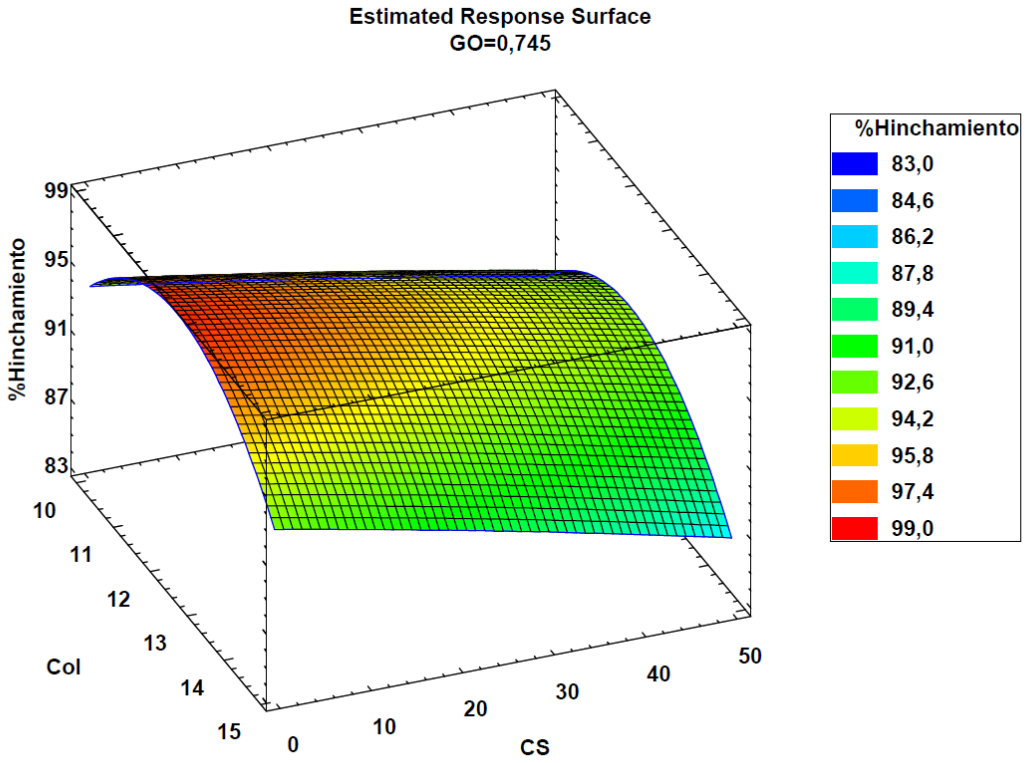


Tabla 29
Análisis de varianza % de hinchamiento

Fuente	*Suma de cuadrados*	*Df*	*Cuadrado medio*	*F-Ratio*	*P-Value*
A:Col	6,125	1	6,125	0,64	0,4596
B:CS	45,125	1	45,125	4,73	0,0818
C:GO	12,5	1	12,5	1,31	0,3044
AA	96,9808	1	96,9808	10,16	0,0244
AB	0,25	1	0,25	0,03	0,8778
AC	81,0	1	81,0	8,48	0,0333
BB	0,0576923	1	0,0576923	0,01	0,9411
BC	16,0	1	16,0	1,68	0,2521
CC	0,519231	1	0,519231	0,05	0,8249
Total error	47,75	5	9,55		
Total (corr.)	306,0	14			

La figura 46 presenta la superficie de respuesta de las condiciones óptimas de respuesta de la masa de colágeno, quitosano y óxidos de grafeno en relación con el porcentaje de hinchamiento del material. A través de este análisis, y su respectivo análisis de varianza, es posible establecer que, para maximizar el porcentaje de hinchamiento del material, con un valor óptimo de 99,35%, la masa de colágeno a emplear es de 12,5 mg (correspondientes a la muestra 2), y la combinación del diseño de CSGO que relaciona el nivel bajo de quitosano con el nivel intermedio de óxidos de grafeno (M2).

Así mismo, bajo la misma metodología, se procedió a realizar el análisis de la viscosidad de las muestras que dio como resultado la gráfica observada en la figura 47. Esta superficie de respuesta representa las condiciones de viscosidad óptimas para el hidrogel a partir de su porcentaje de hinchamiento y la composición del material en términos de colágeno y quitosano. De esta manera, y por medio de la función de optimización, es posible encontrar los rangos de composición, que, al relacionarse con el porcentaje de hinchamiento y la viscosidad del material, permite establecer la composición con las mejores características para este material.

Figura 47
Análisis de superficie de respuesta de la relación concentración de colágeno, concentración de quitosano, y concentración de GO sobre la viscosidad

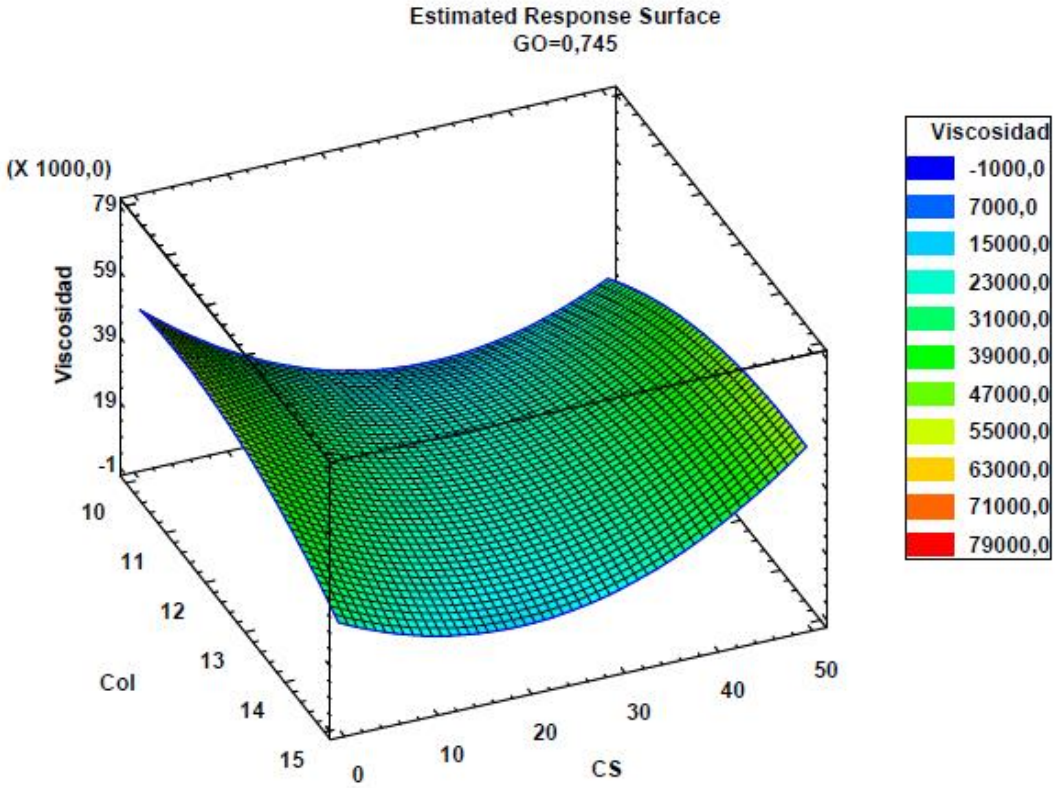


Tabla 30
Análisis de varianza para la superficie de respuesta de viscosidad

Fuente	*Suma de cuadrados*	*Df*	*Cuadrado medio*	*F-Ratio*	*P-Value*
A:Col	4,33401E6	1	4,33401E6	0,01	0,9284
B:CS	5,33441E7	1	5,33441E7	0,11	0,7538
C:GO	2,58034E8	1	2,58034E8	0,53	0,4988
AA	2,25339E8	1	2,25339E8	0,46	0,5261
AB	4,1984E8	1	4,1984E8	0,86	0,3952
AC	2,53706E8	1	2,53706E8	0,52	0,5022
BB	1,45829E9	1	1,45829E9	3,00	0,1437
BC	2,38424E8	1	2,38424E8	0,49	0,5148
CC	1,29271E7	1	1,29271E7	0,03	0,8768
Total error	2,42873E9	5	4,85745E8		
Total (corr.)	5,46666E9	14			

El análisis ANOVA para la variabilidad de la viscosidad muestra las relaciones de cada uno de los factores considerados. En este caso, 0 efectos tienen valores P

inferiores a 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero al nivel de confianza del 95,0%. En respuesta a este análisis, se establece que las concentraciones óptimas para el resultado de viscosidad del material corresponden al nivel medio del colágeno Col2, con lo niveles de quitosano medio y alto para el óxido de grafeno, con un valor óptimo de viscosidad de 52335,8 cP.

Para el establecimiento de la metodología con mejores resultados sobre el tamaño del poro del material, se realizó un análisis de superficie de respuesta teniendo como variables la cantidad de óxidos de grafeno y el porcentaje de hinchamiento de la muestra. La figura 47 muestra el resultado de este proceso.

Figura 48

Análisis de superficie de respuesta de la relación concentración de GO y el porcentaje de hinchamiento sobre el tamaño del poro

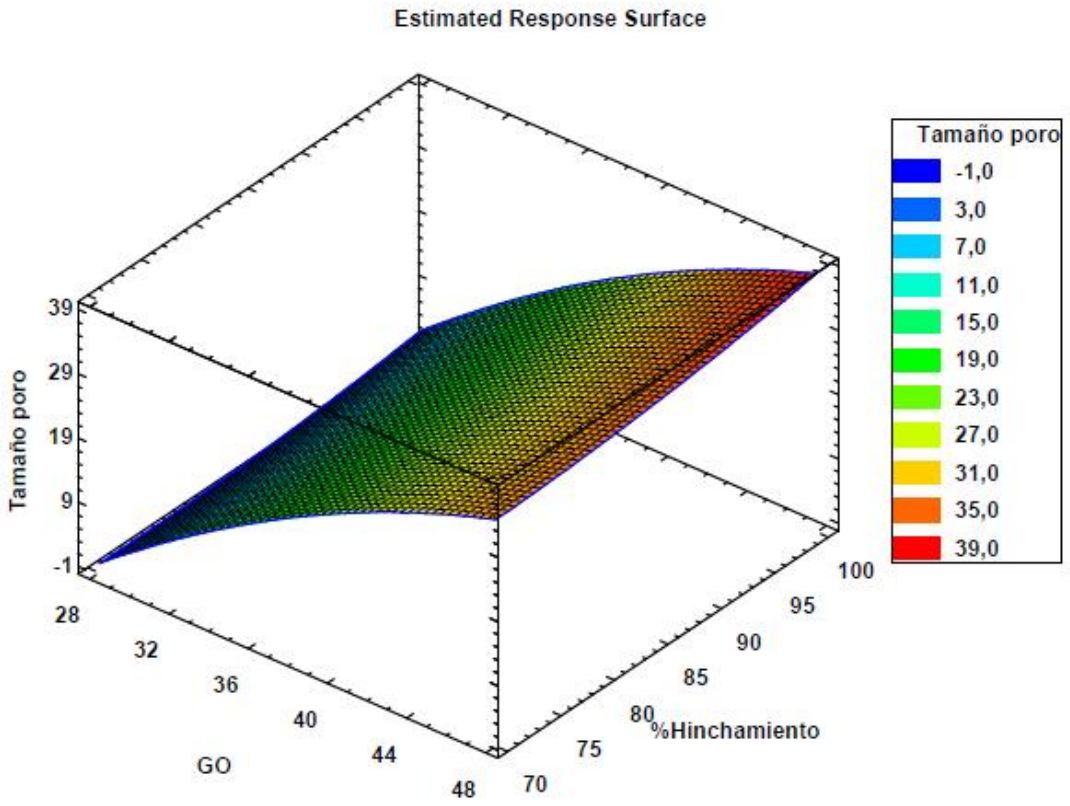


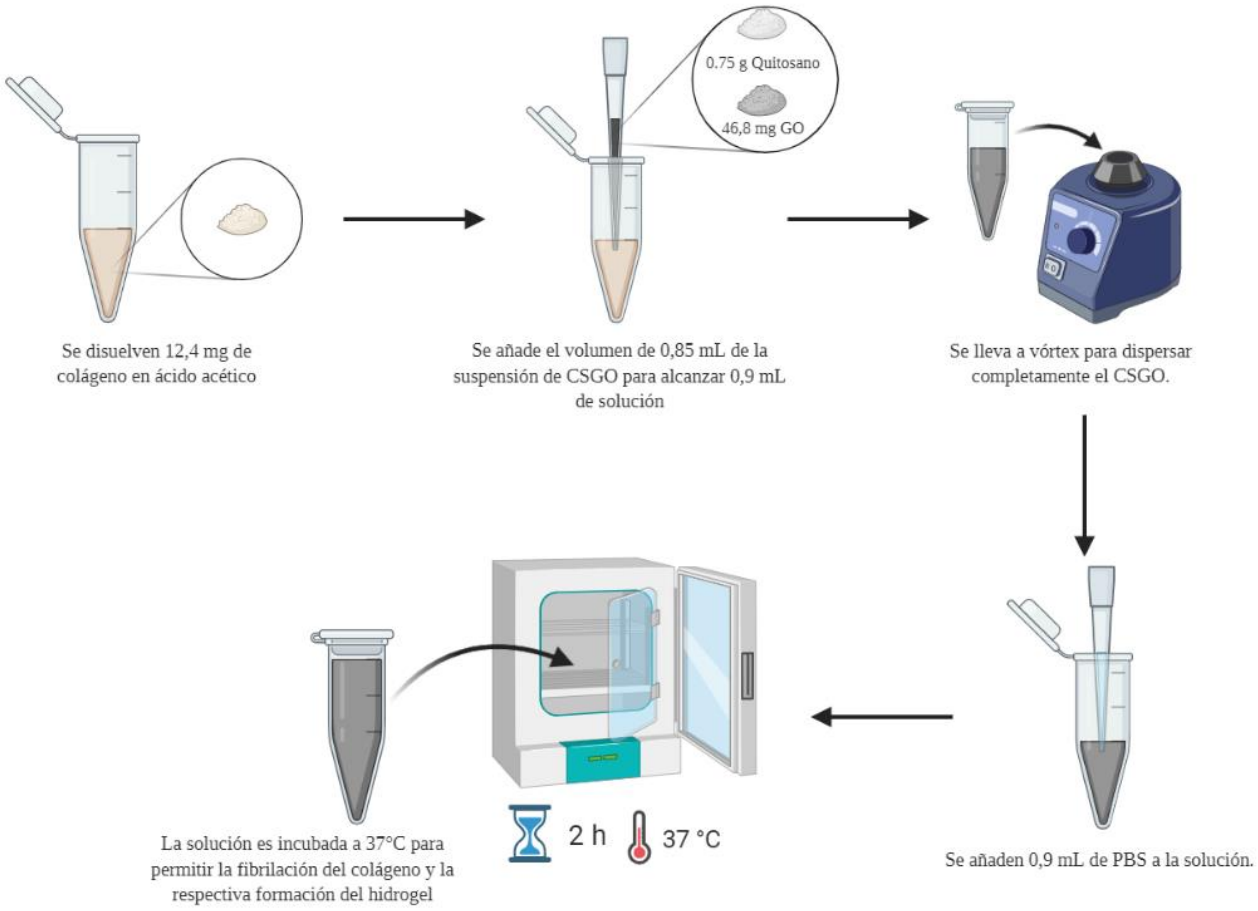
Tabla 31
Análisis de varianza tamaño del poro

Fuente	*Suma de cuadrados*	*Df*	*Mean Square*	*F-Ratio*	*P-Value*
A:GO	1642,92	1	1642,92	88,19	0,0002
B:%Hinchamiento	22,2684	1	22,2684	1,20	0,3241
AA	27,3847	1	27,3847	1,47	0,2795
AB	1,01909	1	1,01909	0,05	0,8243
BB	2,15441	1	2,15441	0,12	0,7476
Total error	93,1481	5	18,6296		
Total (corr.)	1786,74	10			

El análisis ANOVA para la variabilidad del tamaño del poro muestra las relaciones de cada uno de los factores considerados. En este caso, 1 de los efectos (la concentración de óxidos de grafeno) tienen valores P inferiores a 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero al nivel de confianza del 95,0%. En respuesta a este análisis, se establece que las concentraciones óptimas para el resultado de tamaño de poro del material corresponden al nivel más alto de óxidos de grafeno, 46,8 mg.

A partir de cada uno de los análisis de varianza realizados en la superficie de respuesta, se pudo determinar que algunas de las variables eran significativas estadísticamente para algunas características específicas. Cada una de las tablas obtenidas muestra en color rojo la relación y relevancia de la variable dentro del ensayo realizado. Esto da como resultado, que el diseño que considera las mejores características para el diseño de un biomaterial con potencial aplicación como soporte a la microglía en procesos de regeneración corresponde a la muestra M3Col2. Esta muestra presenta la combinación óptima establecida a través del análisis realizado de la superficie de respuesta en donde los valores que optimizan las características que se consideran relevantes en el diseño de un biomaterial, para este proyecto son las de tamaño de poro, porcentaje de hinchamiento y viscosidad. Se considera que la formulación del material debe de componerse del nivel más alto de óxidos de grafeno, y niveles medios de colágeno y quitosano. De esta manera se procedió a plantear la siguiente metodología para la obtención de un biomaterial tipo hidrogel que sirva como soporte para la línea celular microgía en los procesos de regeneración celular del sistema nervioso central (véase Figura 49).

Figura 49
Metodología de obtención propuesta



8. CONCLUSIONES

La metodología encontrada a partir de la revisión sistemática planteada permitió el establecimiento de las condiciones de síntesis y obtención de un biomaterial tipo hidrogel que tuviese en cuenta los requisitos físicos y de interacción de la microglía que se establecieron como criterios de diseño detallado.

Se pudo evidenciar que los componentes basados en carbono, como lo son los óxidos de grafeno, aportan un mayor porcentaje de hidratación a los hidrogeles, y es posible observar tal cambio en los hidrogeles con mayor composición de quitosano y óxidos de grafeno.

Se pudo comprobar que el proceso de secado por liofilizado no es la mejor opción para observar la naturaleza porosa del material obtenido, pues el material tiende a convertirse en polvo y no evidencia las características que se desean observar, así mismo, se evidencian residuos de cristales que pueden estar relacionados a la purificación del material y su secado.

El espectro FTIR de los hidrogeles demuestran una funcionalización exitosa del CSGO con el colágeno, pues su relación entre las bandas características de cada uno de los componentes se mantiene y es comparable a los reportes previos en bibliografía.

La liofilización de las muestras para la evaluación morfológica demostró que, por la naturaleza del material, este proceso hizo que las muestras no pudieran ser analizadas en su totalidad, pues por este proceso de secado, la muestra sufre algunos cambios y fracturas que impiden su correcto análisis. Para futuras pruebas, sería necesario hacer un congelamiento del gel y analizarlo mediante CrioMEB.

A partir del análisis de superficie de respuesta, fue posible determinar el diseño M3Col2 como diseño que contempla las mejores características para el soporte de la microglía, debido a su porcentaje de hinchamiento y su viscosidad.

Se pudo determinar que la composición de 12,5 mg de colágeno, 0,75g de quitosano y 46,8 mg de óxidos de grafeno posee los requerimientos de un biomaterial planteado para a microglía, pues cumple con la superficie establecida, así como los tamaños de poro e hinchamiento planteados en el diseño conceptual del material.

9. RECOMENDACIONES

Con la finalización de este proyecto, se evidencia que para futuros desarrollos similares es necesario tener en cuenta una evaluación biológica, de ser posible con una línea celular precursora del sistema nervioso central, esta información biológica resulta pertinentes para determinar otras características necesarias en el material y evaluar su capacidad de migración y perfusión.

Adicionalmente, se recomienda la consideración de un componente seroso dentro de la composición del hidrogel, ya que, como se ha mencionado anteriormente, la microglía es un tipo celular particularmente sensible a la composición serosa, por lo que tener en cuenta este factor puede brindar un acercamiento exitoso en las transiciones *in-vivo.*

Se sugiere también la comparación y consideración de dentro del diseño experimental de un hidrogel con colágeno comercial, de esta manera se tendrá un punto de comparación y un control que pueda brindar información sobre la composición. Dentro del diseño experimental, se considera también la adición de una cuarta variable relacionada a un agente reticulante, con el fin de obtener información respecto a la viscosidad y, por ende, imprimibilidad de la biotinta.

Para los futuros análisis de hidrogeles, se sugiere realizar el proceso de CrioSEM en lugar de MEB, de esta manera la estructura del hidrogel se conserva y se aprecia de mejor manera su topografía y morfología interna.

Para tener un mayor entendimiento del comportamiento mecánico del material, se sugieren realizar pruebas que evalúen su comportamiento tixotrópico, con el fin de entender como la estructura del hidrogel responde a las tasas de corte más altas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, L. C., Zuena, E., Perez-Ramirez, B., & Kaplan, D. L. (2008). Guide to collagen characterization for biomaterial studies. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *87*(1), 264–285. https://doi.org/10.1002/jbm.b.31078

Agencia para sustancias Tóxicas y registro de enfermedades. (2015). *RESUMEN DE SALUD PÚBLICA Glutaraldehído*. 6. https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs208.pdf

Ahuja, C. S., Wilson, J. R., Nori, S., Kotter, M. R. N., Druschel, C., Curt, A., & Fehlings, M. G. (2017). Traumatic spinal cord injury. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 3). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.18

Allouss, D., Essamlali, Y., Amadine, O., Chakir, A., & Zahouily, M. (2019). Response surface methodology for optimization of methylene blue adsorption onto carboxymethyl cellulose-based hydrogel beads: Adsorption kinetics, isotherm, thermodynamics and reusability studies. *RSC Advances*, *9*(65), 37858–37869. https://doi.org/10.1039/c9ra06450h

Assunção-Silva, R. C., Gomes, E. D., Sousa, N., Silva, N. A., & Salgado, A. J. (2015). Hydrogels and Cell Based Therapies in Spinal Cord Injury Regeneration. *Stem Cells International*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/948040

ASTM F 2150-07 Standard Guide for Characterization and Testing of Biomaterial Scaffolds Used in Tissue-Engineered Medical Products (Issue C, pp. 1–10). (2019). American Society for Testing and Materials. https://www.astm.org/Standards/F2150.htm

Aurand, E., Wagner, J., Lanning, C., & Bjugstad, K. (2012). Building Biocompatible Hydrogels for Tissue Engineering of the Brain and Spinal Cord. *Journal of Functional Biomaterials*, *3*(4), 839–863. https://doi.org/10.3390/jfb3040839

Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., & Kumar, N. S. (2020). Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *150*, 1072–1083. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113

Bandyopadhyay, A., & Bose, S. (2013). *Characterization of Biomaterials*. Elsevier. https://ezproxy.unbosque.edu.co/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=485995&lang=es&scope=site

Blanco-Elices, C., España-Guerrero, E., Mateu-Sanz, M., Sánchez-Porras, D., García-García, Ó. D., Sánchez-Quevedo, M. del C., Fernández-Valadés, R., Alaminos, M., Martín-Piedra, M. Á., & Garzón, I. (2020). In vitro generation of novel functionalized biomaterials for use in oral and dental regenerative medicine applications. Running title: Fibrin-agarose functionalized scaffolds. *Materials*, *13*(7), 1–16. https://doi.org/10.3390/ma13071692

Blanquicet Macea, R., De Hoyos, C. F., Montes, Y. G., Fuentes, E. M., Inés, J., & Ruiz, R. (2015). Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero Synthesis and film properties of chitosan and whey. *Polímeros*, *25*(1), 58–69. http://dx.doi.org/10.1590/0104-1428.1558

Burbano-López, C., & Sánchez, L. E. (2017). Traumatismo de la médula espinal e incertidumbre desde la teoría de Merle Mishel. *Enfermería Universitaria*, *14*(3), 176–183. https://doi.org/10.1016/j.reu.2017.06.004

Carvajal, C., Pachecho, C., Gómez-Rojo, C., Calderon, J., Cadavid, C., & Jaimes, F. (2015). Características clínicas y demográficas de pacientes con trauma raquimedular. Experiencia de seis años. *Acta Medica Colombiana*, *40*(1), 45–50.

Carvalho, I. C., Mansur, H. S., Leonel, A. G., Mansur, A. A. P., & Lobato, Z. I. P. (2021). Soft matter polysaccharide-based hydrogels as versatile bioengineered platforms for brain tissue repair and regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, *182*, 1091–1111. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.116

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

Chen, M. H., Wang, L. L., Chung, J. J., Kim, Y. H., Atluri, P., & Burdick, J. A. (2017). Methods to Assess Shear-Thinning Hydrogels for Application As Injectable Biomaterials. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, *3*(12), 3146–3160. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00734

Cheng, X., Shao, Z., Li, C., Yu, L., Raja, M. A., & Liu, C. (2017). Isolation, characterization and evaluation of collagen from jellyfish Rhopilema esculentum kishinouye for use in hemostatic applications. *PLoS ONE*, *12*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169731

Chiu, W. T., Lin, H. C., Lam, C., Chu, S. F., Chiang, Y. H., & Tsai, S. H. (2010). Epidemiology of traumatic spinal cord injury: Comparisons between developed and developing countries. *Asia-Pacific Journal of Public Health*, *22*(1), 9–18. https://doi.org/10.1177/1010539509355470

Chopin-Doroteo, M., Mandujano-Tinoco, E. A., & Krötzsch, E. (2021). Tailoring of the rheological properties of bioinks to improve bioprinting and bioassembly for tissue replacement. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1865*(2). https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129782

Darling, N. J., Hung, Y. S., Sharma, S., & Segura, T. (2016). Controlling the kinetics of thiol-maleimide Michael-type addition gelation kinetics for the generation of homogenous poly(ethylene glycol) hydrogels. *Biomaterials*, *101*, 199–206. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.053

Esteves, M., Almeida, A., & Leite-Almeida, H. (2020). Insights on nervous system

biology and anatomy. In *Handbook of Innovations in Central Nervous System Regenerative Medicine* (Issue 1664). INC. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818084-6.00001-5

Fan, B., Wei, Z., Yao, X., Shi, G., Cheng, X., Zhou, X., Zhou, H., Ning, G., Kong, X., & Feng, S. (2018). Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury. *Cell Transplantation*, *27*(6), 853–866. https://doi.org/10.1177/0963689718755778

Giraldo, Y. A., Castro, J. L., Tovar-Sánchez, M. A., Kumar, A. A., Pacichana-Quinayáz, S. G., & Bonilla-Escobar, F. J. (2021). Epidemiology of traumatic spinal cord injuries in Colombia. *Spinal Cord Series and Cases*, *7*(1), 1–8. https://doi.org/10.1038/s41394-021-00408-3

Gomes-Leal, W. (2012). Microglial physiopathology: How to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain and Behavior*, *2*(3), 345–356. https://doi.org/10.1002/brb3.51

Haruwaka, K., Ikegami, A., Tachibana, Y., Ohno, N., Konishi, H., Hashimoto, A., Matsumoto, M., Kato, D., Ono, R., Kiyama, H., Moorhouse, A. J., Nabekura, J., & Wake, H. (2019). Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nature Communications*, *10*(1), 1–17. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13812-z

Hlavac, N., Kasper, M., & Schmidt, C. E. (2020). Progress toward finding the perfect match: hydrogels for treatment of central nervous system injury. *Materials Today Advances*, *6*, 100039. https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2019.100039

Hsieh, F. Y., Tseng, T. C., & Hsu, S. H. (2015). Self-healing hydrogel for tissue repair in the central nervous system. *Neural Regeneration Research*, *10*(12), 1922–1923. https://doi.org/10.4103/1673-5374.169624

Hsu, S. H., & Chen, C. W. (2018a). 3D bioprinting nerve. In *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery: Techniques and Applications*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101103-4.00016-8

Hsu, S. H., & Chen, C. W. (2018b). 3D bioprinting nerve. In *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery: Techniques and Applications*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101103-4.00016-8

Hudecki, A., Kiryczyński, G., & Łos, M. J. (2018). Biomaterials, definition, overview. *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, *ii*, 85–98. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1

Kačarević, Ž. P., Rider, P. M., Alkildani, S., Retnasingh, S., Smeets, R., Jung, O., Ivanišević, Z., & Barbeck, M. (2018). An introduction to 3D bioprinting: Possibilities, challenges and future aspects. *Materials*, *11*(11). https://doi.org/10.3390/ma11112199

Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2011). Neuroglia, der lebende Nervenkitt. *Fortschritte Der Neurologie Psychiatrie*, *79*(10), 588–597. https://doi.org/10.1055/s-0031-1281704

khatoon, M., Sohail, M. F., Shahnaz, G., ur Rehman, F., Fakhar-ud-Din, ur Rehman, A., Ullah, N., Amin, U., Khan, G. M., & Shah, K. U. (2019). Development and Evaluation of Optimized Thiolated Chitosan Proniosomal Gel Containing Duloxetine for Intranasal Delivery. *AAPS PharmSciTech*, *20*(7). https://doi.org/10.1208/s12249-019-1484-y

Kocen, R., Gasik, M., Gantar, A., & Novak, S. (2017). Viscoelastic behaviour of hydrogel-based composites for tissue engineering under mechanical load. *Biomedical Materials (Bristol)*, *12*(2). https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa5b00

Kong, Y., Shi, W., Zhang, D., Jiang, X., Kuss, M., Liu, B., Li, Y., & Duan, B. (2021). Injectable, antioxidative, and neurotrophic factor-deliverable hydrogel for peripheral nerve regeneration and neuropathic pain relief. *Applied Materials Today*, *24*, 101090. https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101090

Kongsui, R., Beynon, S. B., Johnson, S. J., & Walker, F. R. (2014). Quantitative assessment of microglial morphology and density reveals remarkable consistency in the distribution and morphology of cells within the healthy prefrontal cortex of the rat. *Journal of Neuroinflammation*, *11*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s12974-014-0182-7

Kosowska, K., Domalik-Pyzik, P., Krok-Borkowicz, M., & Chłopek, J. (2020). Polylactide/hydroxyapatite nonwovens incorporated into chitosan/graphene materials hydrogels to form novel hierarchical scaffolds. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7). https://doi.org/10.3390/ijms21072330

Koss, K. M., & Unsworth, L. D. (2016). Neural tissue engineering: Bioresponsive nanoscaffolds using engineered self-assembling peptides. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 44, pp. 2–15). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.026

Kroner, A., & Rosas Almanza, J. (2019). Role of microglia in spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, *709*(January), 134370. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134370

León-Mancilla, B. H., Araiza-Téllez, M. A., Flores-Flores, J. O., & Piña-Barba, M. C. (2016). Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. *Journal of Applied Research and Technology*, *14*(1), 77–85. https://doi.org/10.1016/j.jart.2016.01.001

Li, J., Darabi, M., Gu, J., Shi, J., Xue, J., Huang, L., Liu, Y., Zhang, L., Liu, N., Zhong, W., Zhang, L., Xing, M., & Zhang, L. (2016). A drug delivery hydrogel system based on activin B for Parkinson's disease. *Biomaterials*, *102*, 72–86. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.016

Magaz, A., Li, X., Gough, J. E., & Blaker, J. J. (2021). Graphene oxide and electroactive reduced graphene oxide-based composite fibrous scaffolds for engineering excitable nerve tissue. *Materials Science and Engineering C*, *119*. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111632

Mahla, R. S. (2016). Stem cells applications in regenerative medicine and disease

therapeutics. *International Journal of Cell Biology*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/6940283

Martínez Díaz, J. D., Ortega Chacón, V., & Muñoz Ronda, F. J. (2016). Design of clinical questions in evidence-based practice. Formulation models. *Enfermeria Global*, *15*(3), 431–438. https://doi.org/10.6018/eglobal.15.3.239221

Mason, C., & Dunnill, P. (2008). A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative Medicine*, *3*(1), 1–5. https://doi.org/10.2217/17460751.3.1.1

Ministerio de Salud. (2018). *Sala situacional de las Personas con Discapacidad (PCD) Ministerio de Salud y Protección Social Oficina de Promoción Social*. 34. https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/PS/sala-situacional-discapacidad-junio-2018.pdf

Moreno, B., Muñoz, M., Cuellar, J., Domancic, S., & Villanueva, J. (2018). Revisiones Sistemáticas: definición y nociones básicas. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, *11*(3), 184–186. https://doi.org/10.4067/s0719-01072018000300184

Moroni, L., Boland, T., Burdick, J. A., De Maria, C., Derby, B., Forgacs, G., Groll, J., Li, Q., Malda, J., Mironov, V. A., Mota, C., Nakamura, M., Shu, W., Takeuchi, S., Woodfield, T. B. F., Xu, T., Yoo, J. J., & Vozzi, G. (2018). Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends in Biotechnology*, *36*(4), 384–402. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.015

Murphy, A. R., Laslett, A., O'Brien, C. M., & Cameron, N. R. (2017). Scaffolds for 3D in vitro culture of neural lineage cells. *Acta Biomaterialia*, *54*(February), 1–20. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.02.046

Murphy, S. V., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, *32*(8), 773–785. https://doi.org/10.1038/nbt.2958

Myers, R., Montgomery, D., & Anderson-Cook, C. (2016). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments* (Fourth Edi). John Wiley & Sons, Ltd.

National Center for Biotechnology Information. (2022a). *PubChem Compound Summary for CID 124202900*. PubChem Compund Summary. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124202900

National Center for Biotechnology Information. (2022b). *PubChem Compound Summary for CID 3485, Glutaraldehyde*. PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutaraldehyde

National Center for Biotechnology Information. (2022c). *PubChem Compound Summary for CID 71853, Chitosan.* https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71853

National Spinal Cord Injury Statistical Center. (2017). Spinal cord injury facts and figures at a glance. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, *36*(1), 1–2. https://doi.org/10.1179/1079026813Z.000000000136

Negrete, J., Ortega, I., & Lopez, E. (2018). Extracción y purificación de colágeno tipo i para aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Jovenes En La Ciencia*, *1*(1), 2887–2892.

Ozbolat, I. T. (2016). 3D Bioprinting: Fundamentals, Principles and Applications. In *3D Bioprinting: Fundamentals, Principles and Applications*.

Patino, M. G., Neiders, M. E., Andreana, S., Noble, B., & Cohen, R. E. (2002). Collagen: An Overview. *Implant Dentistry*, *11*(3), 280–285. https://doi.org/10.1097/00008505-200207000-00014

Plaza, V. B., Pacheco, B. M., Aguilar, C. M., Valenzuela, J. F., & Pérez, J. J. Z. (2012). Lesión de la médula espinal. Actualización bibliográfica: Fisiopatología y tratamiento inicial. *Coluna/ Columna*, *11*(1), 73–76. https://doi.org/10.1590/S1808-18512012000100014

Preetha Mini Jose, H. M., Murugesan, P., Arumugam, M., & Mahesh Kumar, K. (2014). Isolation and characterization of acid and pepsin - Solubilised collagen from the muscle of mantis shrimp (Oratosquilla Nepa). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *6*(1), 654–657.

Rahmati, M., Pennisi, C. P., Budd, E., Mobasheri, A., & Mozafari, M. (2018). Biomaterials for regenerative medicine: Historical perspectives and current trends. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1119*(November), 1–19. https://doi.org/10.1007/5584_2018_278

Raidongia, K., Tan, A. T. L., & Huang, J. (2014). Graphene Oxide: Some New Insights into an Old Material. In *Carbon Nanotubes and Graphene: Edition 2* (Second Edi). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-098232-8.00014-0

Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: Unique stimuli, specialized responses. *Annual Review of Immunology*, *27*, 119–145. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528

Reemst, K., Noctor, S. C., Lucassen, P. J., & Hol, E. M. (2016). The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. *Frontiers in Human Neuroscience*, *10*(NOV2016), 1–28. https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566

Rezaei, A., Aligholi, H., Zeraatpisheh, Z., Gholami, A., & Mirzaei, E. (2021). Collagen/chitosan-functionalized graphene oxide hydrogel provide a 3D matrix for neural stem/precursor cells survival, adhesion, infiltration and migration. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, *36*(4), 296–313. https://doi.org/10.1177/08839115211022453

Roshanbinfar, K., Mohammadi, Z., Sheikh-Mahdi Mesgar, A., Dehghan, M. M., Oommen, O. P., Hilborn, J., & Engel, F. B. (2019). Carbon nanotube doped pericardial matrix derived electroconductive biohybrid hydrogel for cardiac tissue engineering. *Biomaterials Science*, *7*(9), 3906–3917. https://doi.org/10.1039/c9bm00434c

Sabelström, H., Stenudd, M., Réu, P., Dias, D. O., Elfineh, M., Zdunek, S., Damberg, P., Göritz, C., & Frisén, J. (2013). Resident Neural Stem Cells Restrict Tissue Damage and Neuronal Loss After Spinal Cord Injury in Mice. *Science*, *342*(6158), 637–640.

Sabzevari, M., Cree, D. E., & Wilson, L. D. (2018). Graphene Oxide-Chitosan Composite Material for Treatment of a Model Dye Effluent. *ACS Omega*, *3*(10), 13045–13054. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.8B01871

Saldin, L. T., Cramer, M. C., Velankar, S. S., White, L. J., & Badylak, S. F. (2017). Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, *49*, 1–15. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.068

Spicer, C. D. (2020). Hydrogel scaffolds for tissue engineering: The importance of polymer choice. *Polymer Chemistry*, *11*(2), 184–219. https://doi.org/10.1039/c9py01021a

Stojkov, G., Niyazov, Z., Picchioni, F., & Bose, R. K. (2021). Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications. In *Gels* (Vol. 7, Issue 4). https://doi.org/10.3390/gels7040255

Sun, Y. G., & Gao, Q. Z. (2012). Stability and stabilization of networked control system with forward and backward random time delays. *Mathematical Problems in Engineering*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/834643

Tam, R. Y., Fuehrmann, T., Mitrousis, N., & Shoichet, M. S. (2014). *Regenerative Therapies for Central Nervous System Diseases : a Biomaterials Approach*. 169–188. https://doi.org/10.1038/npp.2013.237

Tsui, C., Koss, K., Churchward, M. A., & Todd, K. G. (2019a). Biomaterials and glia: Progress on designs to modulate neuroinflammation. *Acta Biomaterialia*, *83*, 13–28. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.008

Tsui, C., Koss, K., Churchward, M. A., & Todd, K. G. (2019b). Biomaterials and glia: Progress on designs to modulate neuroinflammation. In *Acta Biomaterialia* (Vol. 83, pp. 13–28). Acta Materialia Inc. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.008

Tsui, C. T., MacGillivray, S. R., Weber, S. M., McAllister, L., Churchward, M. A., Dennison, C. R., & Todd, K. G. (2021). Applying a novel 3D hydrogel cell culture to investigate activation of microglia due to rotational kinematics associated with mild traumatic brain injury. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *114*(August 2020), 104176. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104176

Vijay Kumar Thakur, M. K. T. (2018). Hydrogels: Recent Advancess. In *Springer Singapore*.

Villalona, G. A., Udelsman, B., Duncan, D. R., McGillicuddy, E., Sawh-Martinez, R. F., Hibino, N., Painter, C., Mirensky, T., Erickson, B., Shinoka, T., & Breuer, C. K. (2010). Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. *Tissue*

Engineering - Part B: Reviews, *16*(3), 341–350. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0527

Vinchhi, P., Rawal, S. U., & Patel, M. M. (2021). Biodegradable hydrogels. In *Drug Delivery Devices and Therapeutic Systems*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819838-4.00012-2

Weidner, N., Rupp, R., & Tansey, K. E. (2017). Neurological aspects of spinal cord injury. In *Neurological Aspects of Spinal Cord Injury*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46293-6

Wongsarnpigoon, A., & Grill, W. M. (2012). Computer-based model of epidural motor cortex stimulation: Effects of electrode position and geometry on activation of cortical neurons. *Clinical Neurophysiology*, *123*(1), 160–172. https://doi.org/10.1016/j.clinph.2011.06.005

Zuidema, J. M., Rivet, C. J., Gilbert, R. J., & Morrison, F. A. (2014). A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, *102*(5), 1063–1073. https://doi.org/10.1002/jbm.b.33088