



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA**

**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA**

**CON TERMINAL EN REHABILITACIÓN ORAL**

**“MEMBRANA DE POLICAPROLACTONA, COLÁGENO DE PESCADO Y ÓXIDO DE  
GRAFENO PARA REGENERACIÓN ÓSEA: ESTUDIO EN DEFECTOS CRÍTICOS DE  
RATA ZUCKER”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA CON TERMINAL EN REHABILITACIÓN ORAL**

**PRESENTA**

**JESSICA GERARDO GUILLÉN (221450016)**

**DIRECTORA DE TESIS**

**JULIA FLORES TOCHIHUITL (ID 100228022)**

**DIRECTOR DISCIPLINARIO**

**GUILLERMO FRANCO ROMERO (ID 100294988)**

**DIRECTORA METODOLÓGICA**

**CAROLINA SÁMANO VALENCIA (ID 100526470)**

**LECTOR**

**MIGUEL ÁNGEL CASILLAS SANTANA (ID 100526485)**

**Puebla, Puebla 22 de junio 2023**





**BUAP**

Oficio No. FESIEP/CIFE/063/2023

**C. Jessica Gerardo Guillen**  
**Alumna de la Maestría en Estomatología**  
**con opción en Terminal en Rehabilitación Oral**  
**Matrícula No.: 221450016**  
**Facultad de Estomatología**  
**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**  
**PRESENTE**

*Sino este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, el que suscribe MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; por este medio me permito informar a Usted, que, está Secretaría de Posgrado aprueba la impresión de la Tesis titulada:*

**"Membrana de policaprolactona, colágeno de pescado y óxido de grafeno para regeneración ósea: Estudio en defectos críticos de rata Zucker".**

*derivada del Proyecto de Investigación Titulado:*

**"Membranas de colágeno de Pez/Grafeno para regeneración ósea guiada en un defecto óseo simple de la sínfisis mandibular de la rata diabética Zucker".**

*misma que presentará para realizar su examen profesional y obtener el grado de Maestra en Estomatología con opción en Terminal en Rehabilitación Oral; para su conocimiento y atención correspondiente.*

*Sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.*

**Atentamente**

**"Pensar bien, para vivir mejor"**

**H. Puebla de Z., 06 de junio de 2023**

**MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez**  
**Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado**  
**Facultad de Estomatología**



*\*Se anexa: Formato de Impresión de Tesis (Original) - p.s.c.y.a.*

*\*C.c.p. Archivo*

*\*NTRO. FJMA/DR.FADV.yaneth*

Facultad  
de Estomatología

31 Poniente 1304, Col. Volcanes,  
Puebla, Pue. C. P. 72410  
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
**FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA**  
**SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL**

Para obtener el Grado de: **Maestra en Estomatología con opción terminal en Rehabilitación Oral.**

**Registro CIFE:** 2019100      **Fecha:** miércoles 07 de junio de 2023.

**Título de la Tesis:** "Membrana de policaprolactona, colágeno de pescado y óxido de grafeno para regeneración ósea: Estudio en defectos críticos de rata zucker"

**Nombre del alumno:** Jessica Gerardo Guillén

**Matrícula:** 221450016

**Domicilio:** 35 poniente #507, Chula Vista, Puebla, Pue.

**Tel:** 68\*63 57 29 01

**Fecha de ingreso a la Facultad:** lunes 04 de enero del 2021

**Firma:** \_\_\_\_\_  


**Director de Tesis:** DC. Julia Flores Tochihiutl

**Grado académico:** Doctora en Ciencias Químico-Biológicas

**Adscripción:** Facultad de Estomatología

**ID:** 100228022

**Tel:** 22\*25 46 67 11

**Firma:** \_\_\_\_\_  


**Director Disciplinario:** MEI. Guillermo Franco Romero

**Grado académico:** Maestría En Estomatología Integral

**Adscripción:** Facultad de Estomatología

**ID:** 100294988

**Tel:** 22\*22 12 06 57

**Firma:** \_\_\_\_\_  


**Director Metodológico:** DC. Carolina Sámano Valencia

**Grado académico:** Doctorado en Biomateriales

**Adscripción:** Facultad de Estomatología

**ID:** 100526470

**Tel:** 44\*48 19 18 22

**Firma:** \_\_\_\_\_  


**Lector:** DC. Miguel Ángel Casillas Santana

**Grado académico:** Doctor en Ciencias Odontológicas

**Adscripción:** Facultad de Estomatología

**ID:** 100526485

**Tel:** 44\*48 46 76 45

**Firma:** \_\_\_\_\_  


**Nombre y firma de aprobación del Responsable de la Maestría en Estomatología con Opción terminal en Rehabilitación Oral.**

**MEI. Guillermo Franco Romero**

**Firma:** \_\_\_\_\_  


**La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología, autoriza la impresión de la Tesis.**

**MO. Farid Alfonso Diop Velázquez**



**Fecha:** miércoles 07 de junio de 2023



## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Mi agradecimiento a la Dra. Julia Flores Tochiuitl, quien me ha orientado y apoyado a lo largo de la realización de mi tesis, por compartirme sus conocimientos, su tiempo y su amistad. Por mover cielo, mar y tierra para conseguir todos los materiales necesarios, el equipo necesario y las personas necesarias para terminar este proyecto a tiempo y de manera correcta. Siempre estaré agradecida de haber tenido una asesora de tesis tan amable, simpática y capaz.

Al Dr. Guillermo Franco Romero, quien además de ser mi director disciplinario y apoyarme con lo necesario para realizar este proyecto, es mi coordinador de posgrado y un gran amigo de vida. Por siempre cuidarme y orientarme como si fuera parte de su familia, por darse cuenta cuando necesitaba un empujón extra y darme las palabras de ánimo adecuadas para no desistir en el camino. Por no dejar de corregirme e incitarme a ser mejor profesionista y persona. Por todo esto y más, le estaré agradecida eternamente.

A la Dra. Carolina Sámano Valencia, por siempre estar en disposición para atender mis dudas y corregirme si es necesario. Por ayudarme con el análisis estadístico de mi tesis y su redacción. Por su actitud positiva y amabilidad.

Agradecimiento a la maestra Gabriela Esquina Arenas y al Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez del Laboratorio de Pruebas Analíticas no destructivas, de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

Agradecimiento a la Dra. Samantha Rivera Macías y a la Químico Farmacobiólogo Hilda García Sánchez, del laboratorio de Histopatología de la Facultad de Estomatología de la BUAP.

A mis docentes de formación académica que también me apoyaron en la clínica de Rehabilitación Oral, por entregarme sus conocimientos sin reticencia y siempre con el fin de que fuera mejor profesionista, por motivarme a siempre investigar y formar un criterio propio. A mis compañeros de generación: Adriana, Gabriela y Martin, con los cuales he formado una familia que durara para toda la vida, los admiro y quiero. A mis

demás compañeros de posgrado: Mariana, Dulce, Claudia, Rodrigo, Lucas, Juan Carlos, Mónica, Estefanía y principalmente a Bryan, por brindarme su apoyo incondicional en los momentos buenos y malos momentos.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por brindarme un espacio en su universidad, y ofrecerme una educación de calidad y ética. Me llena de orgullo poder ser parte de los “Lobos BUAP”.

A CONACyT por apoyarme con una beca con número de becario: 1101887, para poder concluir mis estudios de maestría y terminar exitosamente mi proyecto de tesis.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Mi agradecimiento va principalmente dedicado a mis padres, quienes han sido mi mayor fuente de aprendizaje, inspiración y motivación y sin ellos nunca estaría en este lugar.

A mi madre, que siempre me ha apoyado con palabras de ánimo y amor, que me ha demostrado que nunca es demasiado tarde ni demasiado difícil para cumplir tus sueños. Por darme el ejemplo de que una mujer es capaz de ser madre y ser profesionalista, por tener la paciencia de atenderme, escucharme y ser mi mejor amiga. Por sus consejos de vida que son siempre sabios y por los valores que me ha inculcado. Doy gracias a la vida por tenerte a mi lado en todo momento, en las buenas y en las malas, que estás ahí para atraparme cuando siento que caigo. Por todo esto y mucho más, gracias, mamá.

A mi padre, que me ha enseñado la responsabilidad, la dedicación, la organización y la paciencia. Gracias por enseñarme que no importa las circunstancias de la vida, si uno se propone algo, lo puede lograr, con perseverancia y motivación. Por ser un excelente profesionalista con toda la extensión de la palabra, eres mi ejemplo a seguir desde que soy pequeña, gracias a ti me enamore del área de la salud, por tu atención a los pacientes y tu atención a los detalles. Por darme tu cariño siempre y apoyar cada sueño que tengo. Gracias siempre papá.

A mi abuelita, quien me ha enseñado lo que es la bondad, la humildad y el amor al prójimo lo cual también me ha motivado a dedicarme al área de la salud y atender a pacientes. Por ser mi segunda madre y cuidarme desde pequeña, por preocuparte por mi salud física y mental, por amarme incondicionalmente y hablarme del amor de Dios.

A mi hermano por ser mi compañero de vida, por ser fuerte junto conmigo en los momentos difíciles. Te quiero David.

Este proyecto pudo realizarse gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y  
Tecnología (CONACYT).  
No. CVU  
Número de beca: 1101887.

## ABREVIATURAS

Ácido poliglicólico	PGA
Ácido poliláctico	PLA
Bio-Gide®	BG
Colágeno	COL
Colágeno de pescado	COLp
Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	DMT2
Óxido de grafeno	OG
Policaprolactona	PCL
Peso/volumen	p/v
Regeneración ósea guiada	ROG
Ratas Zucker Diabéticas obesas	ZDF

# ÍNDICE

1. RESUMEN.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	14
3. PALABRAS CLAVE.....	16
4. ANTECEDENTES.....	17
4.1. Generales.....	17
4.1.1. Biocompuesto.....	17
4.1.2. Regeneración ósea guiada.....	18
4.1.3. Membrana para regeneración ósea guiada.....	18
4.1.4. Óxido de grafeno.....	19
4.1.5. Colágeno.....	20
4.1.6. Colágeno de pescado.....	20
4.1.7. Policaprolactona.....	21
4.1.8. Defecto óseo cítrico.....	21
4.1.9. Rata Zucker.....	21
4.2. Específicos.....	23
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	27
6. JUSTIFICACIÓN.....	28
7. HIPÓTESIS.....	29
8. OBJETIVOS.....	30
8.1. Objetivo general.....	30
8.2. Objetivos particulares o específicos.....	30
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
9.1. Diseño del estudio.....	31
9.2. Población y muestra.....	31
9.3. Criterios de selección.....	32
9.3.1. Inclusión.....	32
9.3.2. Exclusión.....	32
9.3.3. Eliminación (en su caso).....	32
9.4. Variables (definición conceptual, definición operacional, escala y categoría).....	33

9.5. Concordancia y fiabilidad.....	34
9.6. Ubicación espaciotemporal.....	34
9.7. Procedimientos, técnicas y fuentes de recolección.....	34
9.8. Diagrama de trabajo.....	39
9.9. Análisis Estadístico.....	40
9.10. Logística.....	40
9.10.1. Recursos humanos.....	40
9.10.2. Recursos materiales.....	40
10. BIOÉTICA.....	41
11. RESULTADOS.....	42
11.1. Análisis tomográfico.....	43
11.2. Análisis histológico.....	45
12. DISCUSIÓN.....	48
12.1. Análisis tomográfico.....	49
12.2. Análisis histológico.....	50
13. CONCLUSIÓN.....	54
14. BIBLIOGRAFÍA .....	55
15. ANEXOS.....	60

# 1. RESUMEN

La deficiencia de hueso alveolar es un problema clínico que puede afectar la calidad de vida de las personas que lo padecen. La regeneración ósea guiada (ROG), es una técnica quirúrgica utilizada para dirigir la formación de hueso en la que se utiliza una membrana de barrera para favorecer la formación y preservación de un coágulo al excluir la migración de tejido epitelial o conectivo.

El colágeno (COL) es una de las principales proteínas de la matriz extracelular y es normalmente obtenido de animales mamíferos, sin embargo, esta fuente tiene un riesgo potencial de transmitir enfermedades hacia el humano receptor, causar una reacción inmunológica cruzada y no ser aceptado por aspectos religiosos. Como alternativa, la utilización de COL de fuente marina en la ingeniería biomédica ha ido en aumento y principalmente se obtiene de pescado tilapia (COLp). Esta fuente puede reducir la autoinmunidad y además es más económico. Sin embargo, es necesario combinarse con otros biomateriales para tener suficiente fuerza mecánica.

El óxido de grafeno (OG) presenta un alto módulo de elasticidad, propiedades eléctricas incomparables y ofrece una gran superficie que puede ser químicamente funcionalizada. Además, es un excelente conductor y es biocompatible.

La policaprolactona (PCL) es un polímero que es biodegradable, biocompatible y exhibe una degradación lenta.

Se realizó la evaluación *in vivo* de una membrana experimental de PCL/OG/COLp y de una membrana del mercado, Bio-Gide® (BG), en un defecto óseo crítico en la calota de ratas Zucker, con y sin autoinjerto óseo para evaluar la regeneración ósea guiada. Posteriormente se llevó a cabo el análisis tomográfico e histológico.

A la observación macroscópica hubo ausencia de inflamación e infección en todos los grupos. En el análisis tomográfico se encontró una mayor formación ósea en los

grupos que tuvieron la membrana BG que los que tuvieron la membrana experimental habiendo una diferencia significativa entre ellos. En el análisis histológico se cumplió un patrón similar. Es importante continuar esta investigación con más grupos de estudio y en un futuro, con ratas Zucker diabéticas obesas, además, de realizar pruebas de biocompatibilidad y viabilidad celular.

## 2. INTRODUCCIÓN

La deficiencia de hueso alveolar representa un problema clínico y afecta la calidad de vida de las personas que lo padecen. Debido a esto, la ingeniería tisular se ha encargado de buscar sustitutos tisulares. La regeneración ósea guiada (ROG), es una técnica quirúrgica utilizada para dirigir la formación de hueso en la que se utiliza una membrana de barrera para favorecer la formación y preservación de un coágulo que ocupe el espacio del defecto a tratar, y mantenga el espacio para el hueso recién formado al excluir la migración de tejido epitelial o conectivo.

Con el advenimiento de los biomateriales y técnicas de elaboración de biocompuestos (biocompósitos) como las membranas, la restauración de la arquitectura y función del hueso es altamente favorable. El colágeno (COL) es una de las principales proteínas de la matriz extracelular, es el componente principal del tejido conectivo, tiene gran biocompatibilidad y biodegradabilidad por lo que es ampliamente utilizado como biomaterial. En este sentido, se ha buscado un material que presente compatibilidad con el tejido, que tenga buena osteoconductividad, facilidad de fabricación, biodegradación y que no sea frágil.

El COL tipo I, es normalmente se obtiene normalmente de animales mamíferos, sin embargo, esta fuente tiene un riesgo potencial de transmitir enfermedades hacia el humano receptor, causar una reacción inmunológica cruzada y no ser aceptado por aspectos religiosos. Como alternativa, la utilización de COL de fuente marina en la ingeniería biomédica ha ido en aumento. Esta fuente puede reducir la autoinmunidad debido a la diferencia de secuencia de aminoácidos que presenta comparada con la de los humanos, ya que cuando se introducen péptidos externos similares a los péptidos del huésped, la respuesta inmune se puede dirigir al huésped. A esto se le conoce como mimetismo molecular. Además, existe menos riesgo de transmisión de infecciones. Este COL se puede obtener principalmente de piel y escamas de pescados, por lo que es fácil de adquirir.

El óxido de grafeno (OG) es un biomaterial prometedor en el área de la ingeniería tisular debido a que presenta una alta fuerza mecánica y un alto módulo de elasticidad. También presenta propiedades eléctricas incomparables y ofrecen una gran superficie que puede ser químicamente funcionalizada. Además, es un excelente conductor y es biocompatible.

La policaprolactona (PCL) es un polímero que ha recibido mucha atención dentro de la investigación en regeneración ósea debido a que es biodegradable y biocompatible. Las membranas realizadas con una matriz de PCL asociadas a otras sustancias han demostrado que pueden proporcionar un soporte para el desarrollo celular, permitiendo la regeneración de diversos tejidos. Sus propiedades mecánicas influyen en el crecimiento celular, y su morfología influye en la adhesión celular, además, es posible incorporar proteínas lo que mejora sus propiedades.

Por la evidencia científica revisada creemos que la combinación de estos biomateriales puede favorecer la regeneración de defectos óseos que por sí mismos no podrían regenerarse. Es debido a esto, que necesitamos probar membranas con esta composición en defectos críticos en modelos animales para analizar si realmente ofrecen una ventaja sobre una membrana que se encuentra actualmente en el mercado.

### **3. PALABRAS CLAVE**

Membrana, policaprolactona, colágeno de pescado, óxido de grafeno, regeneración ósea, rata Zucker.

## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1. ANTECEDENTES GENERALES**

#### **4.1.1. Biocompuestos**

La combinación de dos o más materiales con diferentes composiciones, morfologías y propiedades, pueden resultar en compuestos con características físicas y químicas adaptadas, además, presentan propiedades mecánicas o bioactividad mejorada. A esos compuestos, de presentar biocompatibilidad, se le llama biocompuestos (1).

Además de la biocompatibilidad, los biocompuestos que son degradables deben presentar una tasa de degradación que se asemeje a la tasa de renovación de los tejidos que se van a reemplazar. En el caso de los andamios sintéticos de hueso, no solo deben tener alta resistencia, si no también deben presentar gran porosidad, que permitan la incorporación de células relacionadas al hueso como lo son las células madre mesenquimales (2).

Antes de diseñar cualquier compuesto, se deben considerar tres factores interdependientes: 1. Selección de la matriz y materiales dispersos más adecuados, 2. Elección de la fabricación y métodos de procesamiento, 3. Diseño del dispositivo tanto interno como externo (3).

A continuación, se muestra una clasificación avanzada de los biocompuestos. Mohanty et al., 2005 (4):

1. Polímeros termoplásticos reforzados con fibras
2. Polímeros bio estable con micropartículas cerámicas
3. Polímeros biodegradables con micropartículas cerámicas
4. Nanocompuestos
5. Resinas reforzadas con fibras

#### **4.1.2 Regeneración ósea guiada**

El hueso tiene una capacidad notable de auto renovación y remodelación, además, ha evolucionado para cumplir funciones mecánicas, endocrinas y homeostáticas. Sin embargo, existen factores que limitan esta reparación y la osteogénesis, como por ejemplo el grado de daño del tejido blando, factores del huésped como edad, diabetes, uso de antiinflamatorios no esteroideos y osteoporosis. Estos factores conllevan a secuelas clínicas como el aumento del riesgo de infección e incapacidad de mantener la calidad de vida (5).

Existen diferentes estrategias para reconstruir el tejido alveolar como las técnicas de injerto óseo, distracción alveolar osteogénica, y regeneración ósea guiada (ROG). Esta última técnica, es considerada uno de los métodos más comúnmente aplicados por su tasa de éxito (6).

La frase “regeneración ósea guiada” se acuñó a mediados de los 80s y se describe como un procedimiento quirúrgico en el que el coágulo sanguíneo o injerto óseo dentro de una lesión ósea, es cubierto por una membrana y se realiza para favorecer su recuperación. Esta técnica consiste en prevenir la migración de células no óseas al área que se intenta reconstruir a través de la adaptación de una membrana que funciona como barrera (7).

#### **4.1.3 Membrana para regeneración ósea guiada**

Las membranas para la regeneración ósea guiada funcionan aislando los tejidos blandos del defecto óseo para proveer un ambiente relativamente cerrado para el crecimiento tisular. De esta manera las células con habilidad regenerativa del defecto óseo proliferan y se diferencian en mayor medida para asegurar la osteogénesis y promover la formación de hueso nuevo (8).

Las membranas biocompatibles deben reunir requisitos como ser biodegradables, que sus productos de degradación no sean tóxicos para evitar una segunda cirugía para

la eliminación, tener una alta interconexión, porosidad en el rango de nanómetros, tener estructura de nanofibras, adecuada resistencia mecánica, tener capacidad oclusiva para aislar el defecto óseo, proveer de espacio adecuado para que ocurra la regeneración ósea, ser capaces de biointegrarse o unirse a los tejidos circundantes y ser clínicamente manejables. La conservación del espacio es muy importante, por lo que es prioridad la elección del tipo y composición de la membrana. De esta manera realizarán una separación física, previniendo la invasión de tejido fibroso durante el período de regeneración (6).

#### **4.1.4 Óxido de grafeno**

El grafeno está conformado por una hoja atómica única de carbonos  $sp^2$  conjugados, organizados en un patrón de panal de abeja con una fuerza mecánica y módulo de elasticidad extremadamente alto. También presenta propiedades electrónicas incomparables y ofrecen una gran superficie que puede ser químicamente funcionalizada. Presenta también excelente conductividad y buena biocompatibilidad (9).

Esta estructura plana ofrece una excelente capacidad de inmovilizar un gran número de sustancias, incluidos metales, drogas, biomoléculas, sondas fluorescentes y células. Gracias a estas propiedades, el grafeno y sus derivados se han convertido en uno de los materiales más versátiles y se utilizan en varias industrias (9,10).

El OG se genera a partir de la oxidación y exfoliación del grafeno. La oxidación introduce grupos funcionales de oxígeno que mejoran la hidrofiliidad y procesabilidad (10). Además, el OG se ha utilizado en células madre osteogénicas para estudiar la condrogénesis, adipogénesis, génesis epitelial, miogénesis, cardiomiogénesis y neurogénesis y demuestra una actividad antibacteriana mayor (11).

El OG tiene el potencial de mejorar ciertos materiales para la producción de biocompuestos como, por ejemplo, en los metales, ayuda disminuyendo la corrosión y aumenta la diferenciación celular, en las cerámicas aumenta la resistencia a la fractura

y aumenta la deposición mineral y por último en los polímeros, ayuda aumentando las propiedades mecánicas y aumenta la bioactividad y la liberación de medicamentos (1).

#### **4.1.5 Colágeno**

El COL es un polímero natural encontrado en la piel, huesos, tendones y ligamentos, una fuente amplia de hidrocoloides naturales. Es el componente principal de la matriz extracelular (MEC) de la mayoría de los tipos de tejidos y juega un rol crucial en la adhesión y proliferación celular (12).

Las fibrillas naturales de COL presentan una secuencia peptídica específica que puede ser reconocida por los receptores de superficie de las células, esto permite la adhesión celular. El COL promueve la regeneración epitelial, maduración dérmica, formación de tejido de granulación y angiogénesis lo que aumenta la reparación de una lesión (13,14).

#### **4.1.6 Colágeno de pescado**

El colágeno de piel de pescado (COLp) se ha utilizado para elaborar nanofibras, membranas por electrohilado, bioandamios fibrosos y porosos además de biocompuestos. El COLp extraído de pez Tilapia es uno de los menos costosos, y es usualmente extraído de la piel, hueso y escamas, también ha demostrado una excelente biocompatibilidad, con bajos efectos citotóxicos, baja inmunogenicidad, cierta biodegradabilidad y no hay riesgo de una enfermedad de transmisión bovina (12).

Los métodos de reticulación química pueden mejorar las propiedades mecánicas de este mediante la incorporación de otro material, y de esa manera reducir su tasa de degradación para que coincida con la velocidad de regeneración de los tejidos circundantes. En este sentido, se ha buscado un material que presente compatibilidad con el tejido, que tenga buena osteoconductividad, facilidad de fabricación, biodegradación y que no sea frágil. Tanto los materiales cerámicos como los hechos a

base de polímeros carecen de algunas de estas características por lo que el COLp asociado a estos materiales mejora sus propiedades y crea un biocompuesto más completo (15).

#### **4.1.7 Policaprolactona**

La PCL es un poliéster sintético alifático ampliamente usado en la rama de la medicina debido a su biocompatibilidad y degradabilidad. No tiene efectos citotóxicos y no se ha observado acumulación en el cuerpo humano. Asociado a diferentes sustancias puede proveer un soporte eficiente para el crecimiento celular, permitiendo la regeneración de cartílago, vasos sanguíneos, tejido cardíaco, tejido dérmico, tejido ocular y neurológico entre otros. Además, es usado en la ingeniería tisular ósea como andamio para la regeneración ósea guiada ya que ha exhibido propiedades osteopromotoras (16).

La PCL puede ser hidrofóbica y exhibe una degradación lenta comparado con otros polímeros como lo son el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA) que presentan una degradación rápida que puede generar un ambiente ácido que puede causar reacciones inflamatorias adversas (17).

La PCL es un material muy prometedor para aplicaciones biomédicas ya que se ha utilizado como andamio en la ingeniería de tejidos blandos y duros. Este material ha exhibido propiedades osteopromotoras ya que da soporte para la proliferación y diferenciación celular de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, de la pulpa dental y mesenquimales derivadas del tejido adiposo (18).

#### **4.1.8 Defecto óseo crítico**

Existen diversos factores etiológicos involucrados en la pérdida ósea incluyendo la atrofia ósea relacionada a diferentes síndromes, heridas traumáticas, tumores malignos o benignos, enfermedad periodontal y la pérdida dental que priva a los

maxilares del estímulo de las fuerzas oclusales, causando resorción de los procesos alveolares (19).

Los defectos óseos intraorales poseen una capacidad alta de auto regeneración, pero la cicatrización puede estar limitada por varios factores como el tamaño del defecto, la presencia o no de paredes óseas, ambiente de cicatrización cerrado, provisión de espacio, estabilidad mecánica de la herida, edad del paciente y comorbilidades (20).

No existe una definición establecida de lo que constituye un defecto de tamaño crítico. En general un defecto “de tamaño crítico” se refiere a uno que no puede regenerarse espontáneamente a pesar de la estabilización quirúrgica y requiere una intervención quirúrgica posterior, como por ejemplo un autoinjerto óseo (21).

Según la revisión sistemática realizada por Vajgel et al en 2013., (22) se considera como defecto óseo crítico en la calvaria de ratas a los defectos que miden 5 mm o más de diámetro. En la actualidad sigue siendo un reto clínico la regeneración de estos defectos y más si el paciente presenta alguna enfermedad crónica. El autoinjerto óseo ha sido considerado como la técnica “Gold standard” en estos defectos debido a su capacidad osteoinductora, osteoconductora y osteogénica, sin embargo, presenta desventajas. Esta técnica está asociada a un aumento de la morbilidad debido a que se necesitan dos sitios quirúrgicos en el paciente, provocando un aumento en el tiempo de recuperación, riesgo de infección y resorción ósea impredecible. Además, un defecto amplio requiere de un mayor volumen óseo que puede no estar presente en el paciente (23,24).

Para el estudio de la ROG se han utilizado modelos animales principalmente ratas, ya que nos permiten hacer pruebas preclínicas de terapias regenerativas para entender los procesos biológicos vía métodos que pueden ser considerados muy invasivos para la aplicación humana. El “Defecto de tamaño crítico en calota” es un modelo experimental ampliamente utilizado para probar biomateriales óseos en animales pequeños y grandes (23).

Este tipo de defecto en calota de rata sirve como modelo para la osificación intramembranosa, es altamente reproducible, no requiere fijación o estabilización y es rápido de realizar (25). El modelo ha sido ampliamente utilizado por diversos autores, algunos de ellos han sido Kretlow et al., Bassi et al., Maciel et al., Trejo-Iriarte et al., Hermenean et al. y Cavassini et al (16, 19, 24, 26–28).

#### **4.1.9 Rata Zucker**

La resistencia a la insulina y la hiperglucemia asociada a la diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) afectan a la matriz ósea, a las células y a la vasculatura a un nivel molecular y celular. Consecuentemente, se comprometen tanto la angiogénesis como la osteogénesis, ambas piezas fundamentales en la reparación y regeneración ósea (29).

Para el estudio de esta enfermedad existen varios modelos animales entre los que se encuentra la cepa de ratas Zucker Diabéticas Obesas (ZDF), las cuales están caracterizadas por tener el receptor de la leptina mutado y esto induce hiperfagia, lo que hace que se vuelvan obesas a las 4 semanas de edad. Además, son hiperinsulinémicas, hiperlipidémicas, hipertensas y muestran intolerancia a la glucosa. Dentro de esta misma cepa existen ratas delgadas (Lean) que se utilizan como control sano de las ZDF (30). En esta investigación se utilizaron ratas Zucker delgadas normoglucémicas.

## **4.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

Liu et al., en 2019 (31), estudiaron la integración de OG en aerogel de COL tipo I para mejorar sus propiedades mecánicas y utilizarse para la regeneración ósea. Compararon un aerogel de COL, con uno de COL-OG, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se realizaron tres muestras con diferentes concentraciones de OG, uno de 0.05 % en peso, otro de 0.1 % en peso y otro de 0.2 % en peso. La combinación de estos materiales resultó en un andamio con una microestructura altamente interconectada, con una porosidad de más

del 90%, ya que el OG proporciona irregularidades que proveen una mayor área de contacto para las células. Asimismo, se mejoró el módulo de elasticidad del aerogel conforme aumentó la concentración de OG. Para la prueba ósea *in vivo* se realizó un defecto crítico en la calota de ratas macho Sprague Dawley, las cuales se dividieron en 4 grupos de 4 ratas cada uno. Se realizaron 2 defectos de 5 mm por rata y al primer grupo se le colocó un aerogel de solo COL, al segundo grupo uno de 0.05% OG-COL, al tercer grupo uno de 0.1% COL-OG y al grupo 3 una de 0.2% de COL-OG. Se realizó un análisis tomográfico a las 4 semanas y a las 12 semanas, en esta última medición se encontró mayor cantidad de formación ósea en los grupos de COL-OG con concentración de 0.1% y 0.2% en peso.

Vlasceanu et al., en 2020 (32), realizaron un estudio *in vitro* e *in vivo* de un nuevo biocompósito que contenía quitosano y gelatina de pescado entrecruzado con genipín cargado con varias concentraciones de OG (0.5, 1, 2, 3 % en peso) enfocado en la regeneración ósea. *In vitro*, el biocompuesto con concentración de OG de 0.5 %, fue el que demostró una interacción beneficiosa con los pre-osteoblastos. *In vivo*, el material se implantó subcutáneamente en ratas CD1 de 6 semanas, se evaluó la biocompatibilidad y actividad inflamatoria con tinción inmunohistoquímica, que reveló una infiltración celular máxima y una reacción inflamatoria mínima para el andamio de gelatina de pez/genipín con OG al 0.5 %, confirmándose los resultados obtenidos en la prueba *in vitro* y también el efecto beneficioso de añadir OG a un andamio (24).

Dantas et al., en 2021 (33), sintetizaron y caracterizaron un nanohíbrido de OG funcionalizado con hialuronato de sodio (OG-HY), evaluaron su efecto *in vitro* y su potencial osteogénico *in vivo*. Realizaron defectos óseos en las tibias de ratas Wistar y se colocó el nanohíbrido con concentraciones de OG de 50,100 y 200 µg/mL y se comparó con el grupo control a los cuales solo se les dejó el coágulo de sangre. Las diferentes concentraciones de OG no alteraron la viabilidad de las células MC3T3-E1 en el estudio *in vitro*. El análisis histomorfométrico demostró que el nanohíbrido con la concentración de 100 µg/ml aceleró significativamente la reparación ósea de la tibia de las ratas comparada con los controles.

En 2021 Nguyen et al.,(12) sintetizaron un andamio tridimensional compuesto por PCL, COLp y proteína osteogénica de abulón. Realizaron pruebas *in vitro* e *in vivo*. Para la prueba *in vitro* hicieron un cultivo de células madre mesenquimales en el andamio para evaluar la actividad de la fosfatasa alcalina y la presencia de depósitos de calcio. Comparado con el grupo control el cual consistió en un andamio únicamente de PCL, demostró una mayor actividad de la fosfatasa alcalina y mayor depósito de calcio. En la prueba *in vivo* se colocaron ambos andamios en un defecto en la tibia de un conejo, se tomaron imágenes tomográficas y se realizó un análisis histológico. Los resultados de ambos análisis demostraron una mayor presencia de neoformación ósea en el andamio de PCL/COLp y proteína osteogénica de abulón.

En 2021, Bassi et al., (16) probaron la actividad biológica de una membrana de PCL durante el proceso de cicatrización ósea en defectos críticos de 8 mm en la calota de rata para evaluar su influencia en la calidad del hueso nuevo formado. Se utilizó un grupo control negativo el cual fue solo la utilización de coágulo sanguíneo sin ninguna membrana, otro grupo que fue el control positivo en el cual se colocaron membranas Bio-Guide® (BG), y por último el grupo experimental en el cual se colocaron membranas de PCL enriquecidas con 5% de hidroxiapatita. Se realizaron análisis histológicos e histomorfométricos a los 7, 15, 30 y 60 días postoperatorios. A los 30 y 60 días postoperatorios los grupos de PCL y BG exhibieron una cicatrización ósea similar incluyendo algunos especímenes que tuvieron cierre completo del defecto crítico. La membrana de PCL fue biocompatible y tuvo el potencial de ayudar en el procedimiento de ROG.

El grupo de Zhou et al., en 2018 (34) sintetizaron un andamio de COL con diferentes concentraciones de OG (0%, 0.05%, 0.1% y 0.2% peso/volumen (p/v) y se sumergieron en fluido corporal simulado para formar apatita similar a la ósea (Ap). Realizaron procedimientos de caracterización, evaluación celular *in vitro* y finalmente, una evaluación *in vivo* en un defecto crítico en calota de rata. 24 ratas macho se dividieron aleatoriamente en 4 grupos: 1) COL-Ap; 2) 0.05% OG-COL-Ap; 3) 0.1% OG-COL-Ap; y

4) 0.2% OG-COL-Ap (n= 6 ratas por grupo). Se les realizaron dos defectos críticos de 5 mm y se colocaron las membranas correspondientes. Realizaron evaluación microtomográfica e histológica. En la prueba *in vivo* encontraron el doble de formación ósea en el grupo de la membrana de 0.1% OG-COL-Ap que en el grupo COL-Ap.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El hueso tiene funciones importantes como lo son: dar soporte mecánico al cuerpo, movimiento, protección de órganos internos, alojamiento de la médula ósea, almacén de calcio y fosfato, y da soporte a los dientes para la masticación y el habla. Es debido a esto que tiene una alta capacidad de auto regeneración, sin embargo, esta capacidad puede verse limitada en diferentes situaciones como lo son: trauma, infección, inflamación persistente, comorbilidades y medicación. Por consecuencia, existe la necesidad de buscar nuevas opciones de membranas para la regeneración ósea guiada. Si bien es cierto que ya existen membranas comerciales con eficacia comprobada, la mayoría son caras, por lo que es necesario que existan alternativas más económicas en el mercado.

Es debido a esto, que es necesario evaluar la posible acción reparadora de membranas de COL de origen marino adicionadas con un componente que mejore sus propiedades físico-mecánicas y osteoinductoras, como lo es el OG, las cuales podrían ser una opción para la regeneración ósea guiada en defectos críticos.

Con lo anteriormente citado proponemos la siguiente **pregunta de investigación:**

¿Puede una membrana de PCL/OG/COLp favorecer la regeneración ósea en un defecto crítico en la calota de rata Zucker?

## 6. JUSTIFICACIÓN

La fabricación de membranas reabsorbibles de polímeros naturales como el COL de origen animal se ha utilizado durante mucho tiempo, gracias a su biocompatibilidad con el cuerpo humano y alta porosidad. Sin embargo, el COL de mamíferos por sí mismo no posee las capacidades mecánicas para soportar una regeneración ósea de gran extensión y duración, en este sentido también se desconocen muchas de las características que el COLp les confiere a membranas de este tipo, o como el OG pudiera contribuir a mejorar sus propiedades o brindar ventajas adicionales. Además, con la adición de PCL a la membrana, se pretende mejorar las propiedades de degradabilidad, ya que es un material hidrófobo, lo cual produce una degradación más lenta, lo que probablemente permitiría una mejor regeneración ósea.

La síntesis de una membrana con estos componentes significa tener un producto de menor costo, ya que el COLp se obtiene de las escamas y partes del pescado que normalmente se deshecha lo cual lo hace un producto económico, además de que se disminuye el riesgo de reacción inmunológica y problemáticas de origen religioso. Se espera que el OG y la PCL le confieran propiedades mecánicas mejoradas al COLp, haciendo una membrana más resistente y de mayor duración. Por lo que en la presente investigación se propone probar la membrana de PCL un material con buena degradabilidad adicionada de OG y recubierta con COLp en defectos óseos de ratas macho de la cepa Zucker delgadas.

La propuesta es novedosa ya que existen múltiples enfermedades locales o sistémicas, que generan pérdida ósea intraoral en la población y que ponen en riesgo su calidad de vida. Es debido a esto, que es importante que existan opciones de membranas que sean de fácil acceso a la población y así, puedan recibir un tratamiento de regeneración óseo oportuno.

## **7. HIPÓTESIS**

### **Hipótesis científica (Hi)**

La membrana de PCL/OG/COLp colocada en un defecto óseo de la calota de rata favorece la regeneración ósea.

### **Hipótesis nula (Ho)**

La membrana de PCL/OG/COLp colocada en un defecto óseo de la calota de rata no favorece la regeneración ósea.

## **8. OBJETIVOS**

### **8.1. Objetivo general**

Analizar si la membrana de PCL/OG/COLp al 30%, 2% y 4% respectivamente, favorece la regeneración ósea de defectos óseos críticos en la calota de ratas macho de la cepa Zucker.

### **8.2 Objetivos específicos**

- Evaluar tomográficamente la ganancia ósea de defectos críticos en la calota de las ratas macho de la cepa Zucker de los diferentes grupos, después de 3 meses de evolución.
- Evaluar histológicamente la cantidad de ganancia ósea de defectos críticos en la calota de ratas de los diferentes grupos de estudio después de 3 meses de evolución.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Diseño: experimental

De acuerdo con la evolución del fenómeno: Longitudinal

De acuerdo con la medición del fenómeno en el tiempo: Prospectivo

Diseño de estudio de acuerdo con el número de variables: Analítico

### 9.2 POBLACION Y MUESTRA

#### 9.2.1 Definición de la población de estudio para el modelo animal

Ratas (*Rattus norvegicus*) delgadas (lean) de la cepa Zucker de 15-16 semanas de edad con un peso entre 300 – 400 gramos obtenidas del Bioterio Claude Bernard. Se realizó muestreo no probabilístico por conveniencia que cumplió con los criterios de inclusión. El cálculo de la “n” se realizó con base en la fórmula propuesta por Rojo en 2014 (35), además de considerar el apartado de la NOM-062-ZOO-1999 en la cual se sugiere reducir al máximo el número de animales en investigación. También nos basamos en el principio que formularon a inicios de la década de los 60 dos biólogos ingleses, Russel y Burch, en su libro “*The Principle of Humane Experimental Technique*”; donde sugieren utilizar las tres erres que hacen referencia a reemplazar, reducir y refinar. La fórmula dio un resultado de 5.5 ratas por grupo, por lo que al redondear aporta el dato de 6 ratas por grupo (36).

Para el presente proyecto se utilizaron 24 ratas macho de la cepa Zucker de 4 meses de edad, obtenidas del Bioterio Claude Bernard de la BUAP. Se dividieron en 4 grupos (6 ratas por grupo) (Tabla 1).

**Tabla 1. Grupos de estudio con sus abreviaturas correspondientes**

<b>Grupo</b>	<b>Descripción</b>
1	Grupo con membrana Bio-Gide® (BG) + coágulo
2	Grupo con membrana BG + autoinjerto
3	Grupo con membrana experimental de PCL/OG/COL de pescado + coágulo
4	Grupo con membrana experimental de PCL/OG/ COL de pescado + autoinjerto

Se mantuvieron en el bioterio conforme a las consideraciones éticas de las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio según la NOM 062-ZOO-1999, realizando control de peso semanal, hasta el día de la eutanasia.

### **9.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

#### **9.3.1 Inclusión**

Ratas macho de 3-4 meses de edad de la cepa Zucker con un peso entre 300 y 400 gramos.

#### **9.3.2 Exclusión**

Ratas con alguna anomalía ósea o lesión en la calota que afecte al estudio

#### **9.3.3 Eliminación**

Ratas en las que el peso corporal haya disminuido más del 30% durante el estudio o que se hayan infectado en la cirugía.

## 9.4 VARIABLES

<b>Tabla2. Variables</b>					
<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Categoría de variable</b>	<b>Unidad de escala</b>
<b>Membrana PCL/OG/COLp</b>	Barrera flexible y permeable.	Membrana con composición de policaprolactona, óxido de grafeno y colágeno de pescado.	Independiente	Cualitativa	Sin unidad.
<b>Defecto óseo crítico</b>	Carencia de un segmento óseo	Defecto en el hueso de la calota realizado con una trefina de 5 mm.	Independiente	Cuantitativa	mm <sup>2</sup>
<b>Autoinjerto óseo</b>	Injerto transferido del mismo individuo. Se considera el "Gold standard" de los injertos óseos.	Hueso que se extrajo de la calota, se trituró y se colocó dentro del defecto.	Independiente	Cualitativa	Sin unidad
<b>Coágulo</b>	Masa de sangre que se forma cuando las plaquetas de la sangre, las proteínas y las células se pegan entre sí.	Coágulo que se forma en el defecto crítico de la calota.	Independiente	Cualitativa	Sin unidad
<b>Evaluación tomográfica</b>	Formación de hueso nuevo que, tras un proceso de remodelado, es idéntico al preexistente.	Hueso nuevo unido al hueso preexistente.	Dependiente	Cuantitativa	Relación de Área ósea entre el área tisular total (AO/AT).
<b>Evaluación histológica</b>	Sistema de puntuación que mide la calidad ósea	Cantidad de tejido inflamatorio, fibroso u óseo presente en la lesión.	Dependiente	Cuantitativa	Sin unidad

## **9.5 CONCORDANCIA Y FIABILIDAD**

Para el manejo y cuidado de los animales de laboratorio la tesista tomó capacitación en el manejo de animales en el Bioterio Claude Bernard. Se entrenó en la técnica para generar los defectos óseos, se realizó una prueba piloto para la estandarización de la técnica utilizando ratas de prueba a las que se tomaron varias mediciones del diámetro del defecto. Se utilizó la prueba estadística CCI (coeficiente de correlación intraclase o coeficiente  $r^2$  de Pearson), que determinó la confiabilidad, reproductibilidad y concordancia entre los defectos (nivel de significancia  $5\% = 0.05$ ).

El Gold standard fueron las medidas que registró el experto quien tiene la mayor experiencia, destreza y habilidad, por tanto, al replicarse y existir un nivel aceptable de acuerdo con el índice de las medidas del tesista con las del experto, se continuo con las pruebas.

## **9.6 UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL**

Laboratorio multidisciplinario, Facultad de Estomatología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Laboratorio de Histopatología, Facultad de Estomatología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Bioterio Claude Bernard, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Centro Avanzado de Pruebas Analíticas No Destructivas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

## **9.7 PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN**

La investigación se dividió en fases, en este caso se realizó la fase 1, utilizando ratas Zucker Lean sanas que en una fase 2, se hará la comparación con ratas ZDF la cual es

una cepa comúnmente utilizada como modelo para DMT2 como se describió anteriormente.

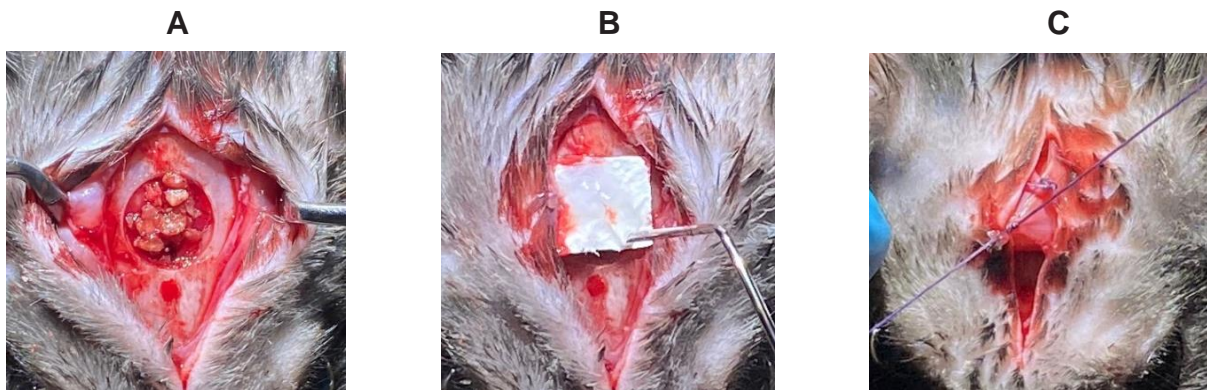
### 9.7.1 Técnica para generar los defectos óseos.

Se mantuvieron en ayuno de 8 horas previo al procedimiento quirúrgico a todos los grupos de estudio, posteriormente se anestesiaron con ketamina/xilacina (intraperitoneal) (40-90mg/kg Ketamina + 5-15mg/kg xilacina). El área quirúrgica se rasuró y desinfectó con antiséptico (Microdacyn®, Invekra, México) para asegurar condiciones quirúrgicas antisépticas. Posteriormente se realizó una incisión de 2 cm sobre la piel y periostio del cráneo, y se generó un defecto óseo con una trefina de 5 mm en todos los grupos (Figura 1).



**Figura 1.** A) Defecto óseo de 5 mm. B) Obtención de la fracción de la calota removida para molerse y para utilizarse como autoinjerto en los grupos 2 y 4. *Fuente propia.*

A los grupos con autoinjerto se les colocó su mismo hueso extraído triturado, dentro del defecto (Figura 2A). Se colocaron membranas de 6x6 mm previamente esterilizadas con lámpara de emisión de rayos ultravioleta (200-280 nm) durante 2 horas. Se colocó la membrana correspondiente a cada grupo (Figura 2B). Finalmente, se suturó el periostio y la piel con hilo reabsorbible de 4 ceros (Figura 2C).



**Figura 2.** A) Colocación de autoinjerto en el defecto. B) Colocación de la membrana de PCL/OG/COLp de 6x6 mm. C) Sutura de periostio y piel con hilo Vicryl® 4-0. *Fuente propia.*

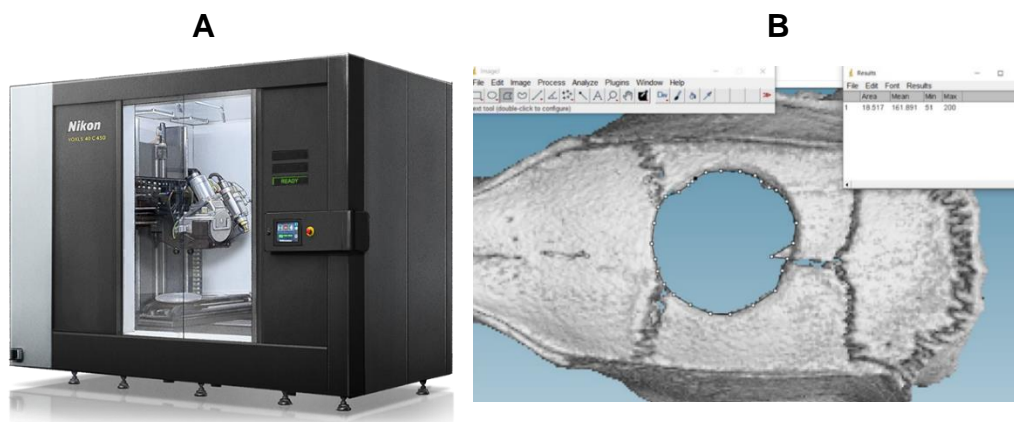
Se tomó una tomografía inicial de control y una vez recuperadas de la anestesia se les dio analgésico ketoprofeno (0.10 ml/100 gr) y antibiótico enrofloxacino (0.10 ml/100 gr), ambos por vía subcutánea durante los 3 días posteriores al procedimiento quirúrgico. Se observaron durante un período postoperatorio de 3 días para evaluar su comportamiento y la eficacia analgésica y antimicrobiana de los fármacos citados. Los grupos de estudio se regresaron al bioterio para su alojamiento hasta el día de la eutanasia (22).

La eutanasia de las ratas se realizó a las 16 semanas postcirugía, las cuales se encontraban en un estado saludable y sin ninguna reacción inflamatoria o presencia de infección en la zona donde se colocó la membrana. Se anestesiaron nuevamente con Ketamina/xilacina intraperitoneal (40-90mg/kg Ketamina + 5-15mg/kg xilacina), se realizó perfusión intracardiaca con solución salina de NaCl al 0.9% y se extrajeron las calotas para el estudio histopatológico.

### 9.7.2 Análisis tomográfico.

La tomografía es una herramienta invaluable para la medicina regenerativa ósea ya que nos da la oportunidad de explorar el sistema esquelético tanto *in vivo* como *ex vivo* (37).

Se utilizó el equipo M1 450K CT System de Nikon (Figura 3A) y posteriormente las imágenes se pasaron al software Avonix Imaging para para la reconstrucción tridimensional de la tomografía. Los parámetros con los que se tomaron las imágenes fueron: una energía del rayos-X de 110 Kv, la corriente de 103 mA, la potencia fue de 11.3 W, el tamaño de voxel fue de 0.0472 a 0.0783 y el tiempo de exposición fue de 20 minutos. Se realizó una toma al momento de la colocación de la membrana y 12 semanas después, se realizó otra toma del defecto. Se realizó un análisis cuantitativo utilizando la relación área ósea /área total (AO/AT) sobre cada imagen bidimensional (Figura 3B). Finalmente, con estas mediciones se obtuvo el porcentaje de la ganancia ósea (25)



**Figura 3.** A) Tomógrafo M1 450K CT System de Nikon. *industry.nikon.com* B) Se realizó la medición en mm<sup>2</sup> del área total del defecto de la tomografía inicial de cada grupo con el programa Image J. Fuente propia.

### 9.7.3 Análisis histológico

Después de la eutanasia se removió el tejido de interés se almacenó en formol tamponado al 10% con ácido nítrico al 1% (vol/vol) para el proceso de desmineralización durante 2 semanas. Posteriormente se deshidrató gradualmente en etanol (EtOH), se infiltró y embebió en parafina (Figura 4) y se realizaron cortes coronales de 2 micras a lo largo de la muestra. Finalmente, las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina y tricrómica de Masson (38,39).

Las secciones teñidas se analizaron y se registraron con un microscopio de luz estándar con cámara digital marca Leica DM 2000. Se observó cada sección a un aumento de 4x, 10x y 20x. Se evaluó cada muestra de acuerdo a una sección del sistema de puntuación creado por Patel et al en 2009 (40), el cual se modificó para adaptarse a nuestro estudio (ver tabla 3).



**Figura 4.** Cortes de la calota embebidos en parafina. *Fuente propia.*

<b>Tabla 3. Respuesta del tejido duro con respecto a la membrana. Patel et al 2009</b>	
<i>Tejido cerca de la membrana es mayoritariamente hueso</i>	4
<i>Tejido consiste en cierta cantidad de hueso, dentro de tejido denso fibroso maduro, y/o pocos elementos de respuesta inflamatoria</i>	3
<i>Tejido es mayormente tejido fibroso inmaduro (con o sin hueso) con vasos sanguíneos y fibroblastos jóvenes invadiendo el espacio con pocos macrófagos presentes</i>	2
<i>Tejido consiste mayormente en células inflamatorias y componentes de tejido conectivo (con o sin hueso) O el defecto se encuentra vacío o lleno de fluido</i>	1
<i>Tejido es denso y exclusivamente del tipo inflamatorio (no hay hueso presente)</i>	0

## 9.8 DIAGRAMA DE TRABAJO

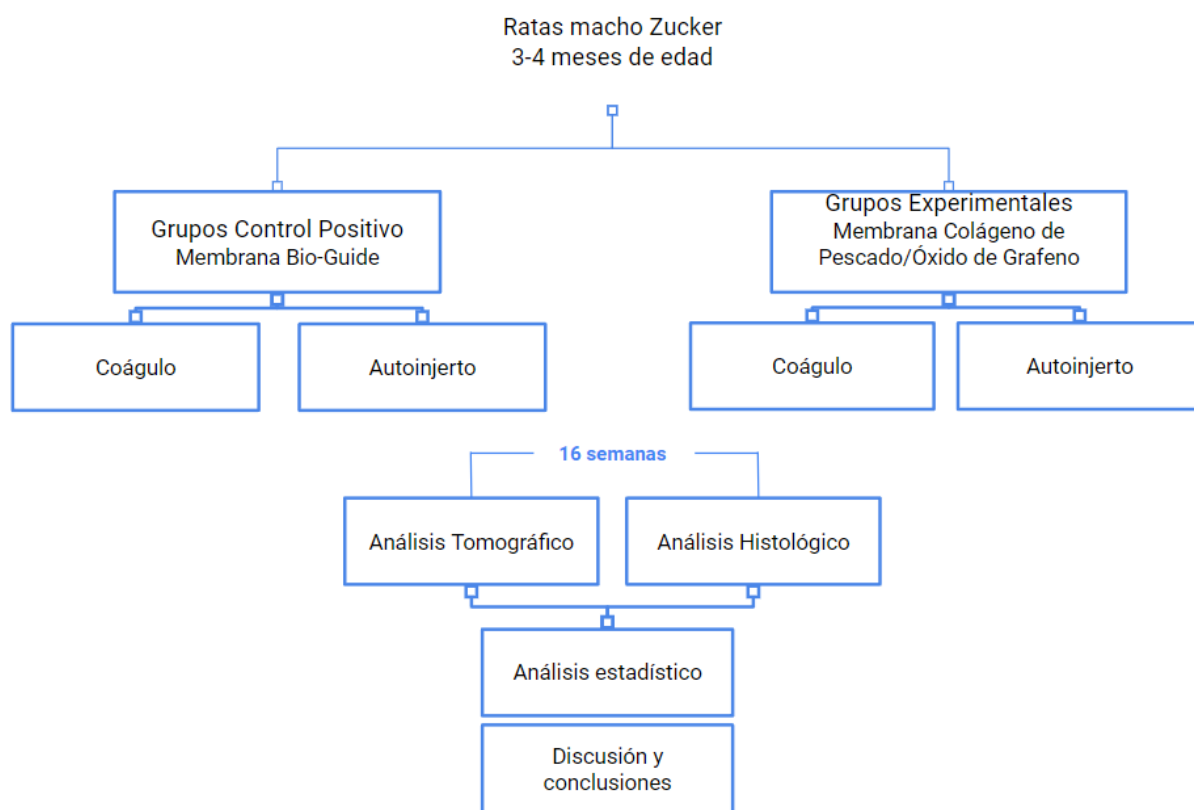


Figura 5. Diagrama de trabajo

## 9.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron vaciados en el programa Excel 2016 y llevados después al programa GraphPad Prism 7. Todos los datos en este estudio son expresados como la media  $\pm$  error estándar (SE).

Para variables numéricas se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión. Las medias entre 2 grupos se compararon usando la prueba t student, y la media de grupos múltiples se compararon utilizando la prueba de ANOVA de 1 vía, finalmente se realizó la prueba Newman-Keuls para contrastes post hoc. Se consideró  $p \leq 0.05$  como una diferencia estadísticamente significativa.

## 9.10 LOGÍSTICA

### 9.10.1 RECURSOS HUMANOS

Tesista de maestría en Estomatología, con opción en Rehabilitación Oral, director de tesis, director disciplinario y director metodológico.

### 9.10.2 RECURSOS MATERIALES

Los materiales utilizados fueron:

- Membranas elaboradas previamente en el laboratorio multidisciplinario compuesta de. PCL 30 %, COLp 4 % y OG 2 %.
- Membrana comercial Bio-Gide® de Geistlich.
- Moledor de hueso.
- Trefina Medessy 5 mm.
- Estuche de disección oftálmico.
- Reactivos para la inclusión en parafina de las muestras.
- Reactivos para tinción de hematoxilina y eosina.
- Reactivos para tinción tricrómica de Masson.
- 2 memorias externas de 1 terabyte.
- Microscopio Leica DM 2000.
- Tomógrafo M1 450K CT System de Nikon.
- Computadora portátil.
- Mezcla anestésica.
- Analgésico.
- Antimicrobiano.
- Alimento para ratas marca: LabDiet® 5001.

## 10. BIOÉTICA

Esta investigación se realizó conforme a las consideraciones éticas mantenidas bajo todas las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio según la NOM 062-ZOO-1999

*Los fármacos/sustancias que se utilizaron no representan riesgo para el personal.*

*El manejo de RPBI del proyecto se realizó conforme a la norma NOM-087-ECOL-SSA1-200*

Dictamen y aprobación por parte del comité de investigación de la Facultad de Estomatología (CIFE) y del CICUAL de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

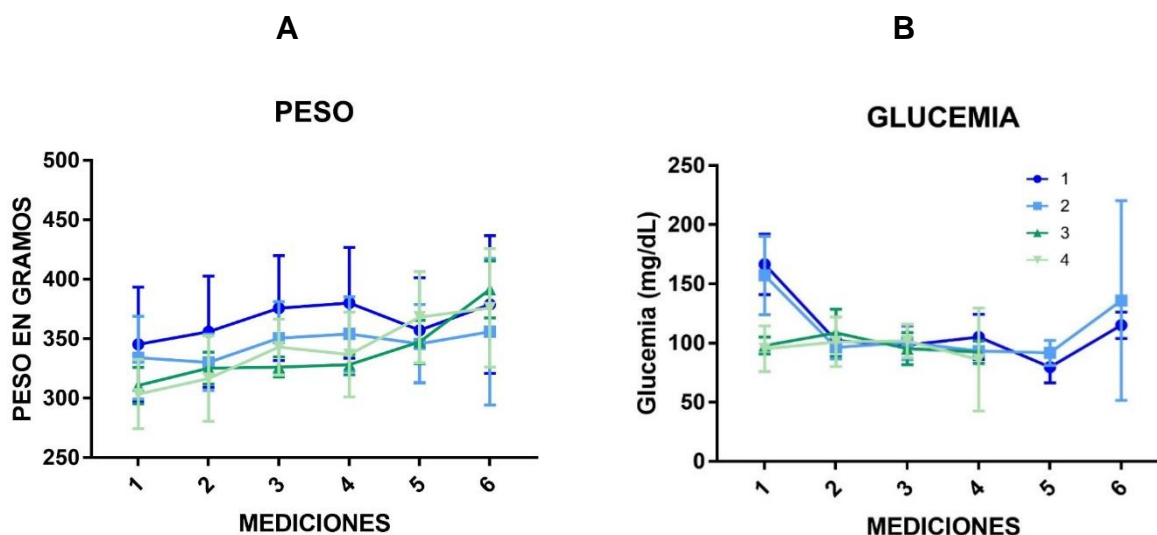
El manejo de los animales de laboratorio de este proyecto fue supervisado por el médico veterinario: Dr. Francisco Ramos Collazo responsable del Bioterio Claude Bernard de nuestra institución. Cédula profesional 6519572.

## 11. RESULTADOS

En la presente investigación se realizó el análisis tomográfico e histológico de un defecto óseo crítico en la calota de ratas macho Zucker Lean a las cuales se les colocó una membrana experimental de PCL/OG/COLp con y sin autoinjerto, las cuales se compararon con los grupos a los que se les colocó una membrana comercial de colágeno de origen porcino (Bio-Gide®) con y sin autoinjerto, para observar si la primera confería una ventaja en la reparación ósea.

Se utilizaron 6 ratas por grupo, de las cuales 1 rata del grupo 4 falleció durante el estudio. Se realizó control de peso y glucemia para asegurar que los grupos estuvieran sanos y no presentaran hiperglucemia. El peso de los grupos se mantuvo estable, hubo una ligera pérdida de peso posterior a la cirugía, pero se recuperaron semanas después y finalmente todos los grupos cumplieron este criterio de inclusión (Figura 6A).

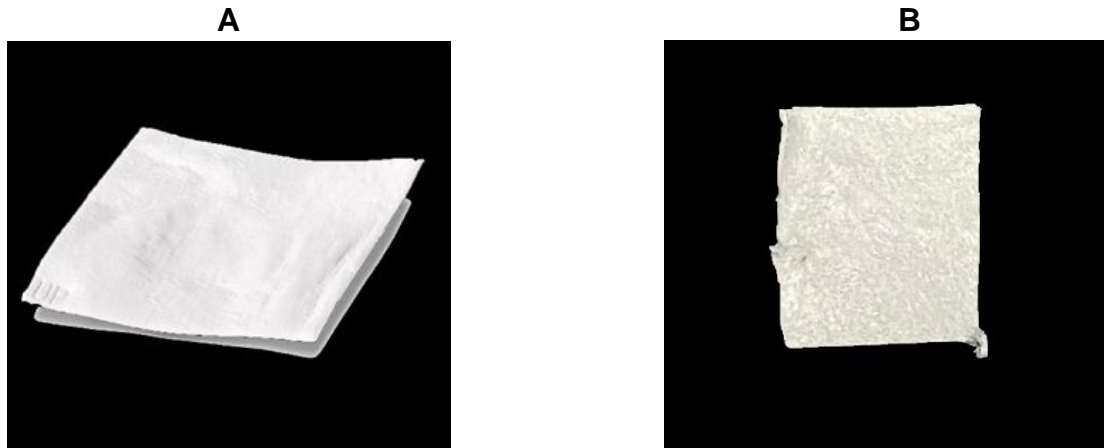
Con respecto a los niveles de glucemia llama la atención que aumentan en la medición 1 y 6, sin embargo, en promedio los niveles de glucosa fueron normales por debajo de 118 mg/dL en las mediciones 2, 3, 4 y 5 (Figura 6B) (41).



**Figura 6.** A) Todos los grupos tuvieron un buen incremento de peso de acuerdo a su edad. B) Niveles de glucemia medidos cada 15 días a todos los grupos de estudio.

### 11.1. Análisis tomográfico

Se utilizaron 12 membranas Bio-Gide® para los grupos 1 y 2, y 12 membranas de PCL/COLp/OG para los grupos 2 y 4 (Figura 7A y B).

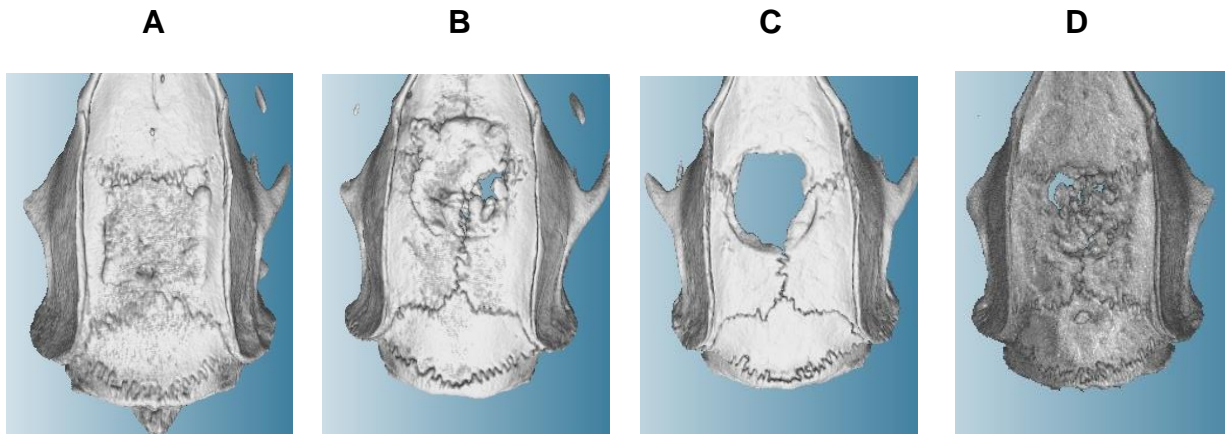


**Figura 7.** A) Membrana Bio-Gide®. *Imagen tomada de [geistlich.us/bio-gide](http://geistlich.us/bio-gide).* B) Membrana de PCL/OG/COLp. *Fuente propia.*

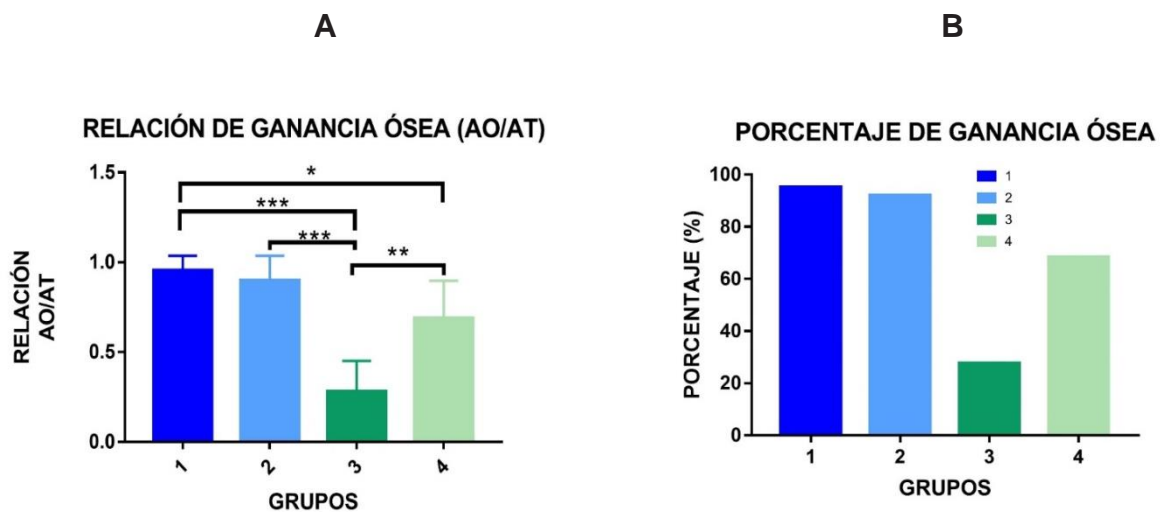
A los 3 meses postoperatorios, la relación área ósea/ área total, que indica la cantidad de tejido mineralizado que se ganó, fue significativamente mayor en los grupos 1 y 2 comparado con los grupos experimentales 3 y 4 (Figura 8 y 9A). En el grupo 1 esta relación fue de 0.9525 con un SE de  $\pm 0.03391$ , en el grupo 2 fue de  $0.8983 \pm 0.05596$ , en el grupo 3 de  $0.2793 \pm 0.07011$  y finalmente en el grupo 4 fue de  $0.6868 \pm 0.09417$ .

Se utilizó la prueba de T student para hacer la comparación entre grupos. Entre los grupos 1 y 2 no se encontró diferencia estadísticamente significativa, pero si entre los grupos 1 vs. 3 de  $p = <0.0001$ , 1 vs. 4  $p = 0.0188$ , 2 vs. 3  $p = <0.001$  y 3 vs. 4 de  $p = 0.0063$  (Figura 9A).

En porcentaje de ganancia ósea los grupos 1 y 2 presentaron una ganancia del 95% y 92% respectivamente, mientras que el grupo 3 tuvo una ganancia del 27.5% y el grupo 4 de 68.4% (Figura 9B).



**Figura 8.** Reconstrucción tridimensional de las tomografías. Los grupos 1 (BG+Coágulo) y 2 (BG+ autoinjerto) tuvieron un mayor cierre del defecto por tejido óseo (A y B), mientras que el grupo 3 (membrana experimental+coágulo) (C), el cierre fue menor. En el caso del grupo 4 (membrana experimental + autoinjerto) (D), el cierre del defecto también fue bueno. *Fuente propia.*



**Figura 9.** Análisis tomográfico. A) relación AO/AT. A los 3 meses postoperatorios se observa diferencia significativa entre los grupos 1-3 (T student,  $p < 0.0001$ ), 1-4 (T student,  $p = 0.0188$ ), 2-3 (T student,  $p < 0.001$ ), y 3-4 (T student,  $p = 0.0063$ ). B) Porcentaje de ganancia ósea. Hubo mayor ganancia ósea en los grupos 1 y 2 a los que se les colocó una membrana Bio-Gide®. El grupo 4 que además de la membrana de PCL/OG/COLp se le colocó autoinjerto óseo, tuvo una ganancia mayor que el grupo 3.

## 11.2 Análisis histológico

A la observación macroscópica, la membrana experimental aún se encontraba completa en la zona del defecto sin reabsorberse, lo que nos indica que la membrana tiene una buena degradabilidad con una duración de más de 12 semanas. La tinción de H&E y tricrómica de Masson demostraron que no hubo presencia de necrosis o inflamación severa en ninguno de los grupos (Figura 10).

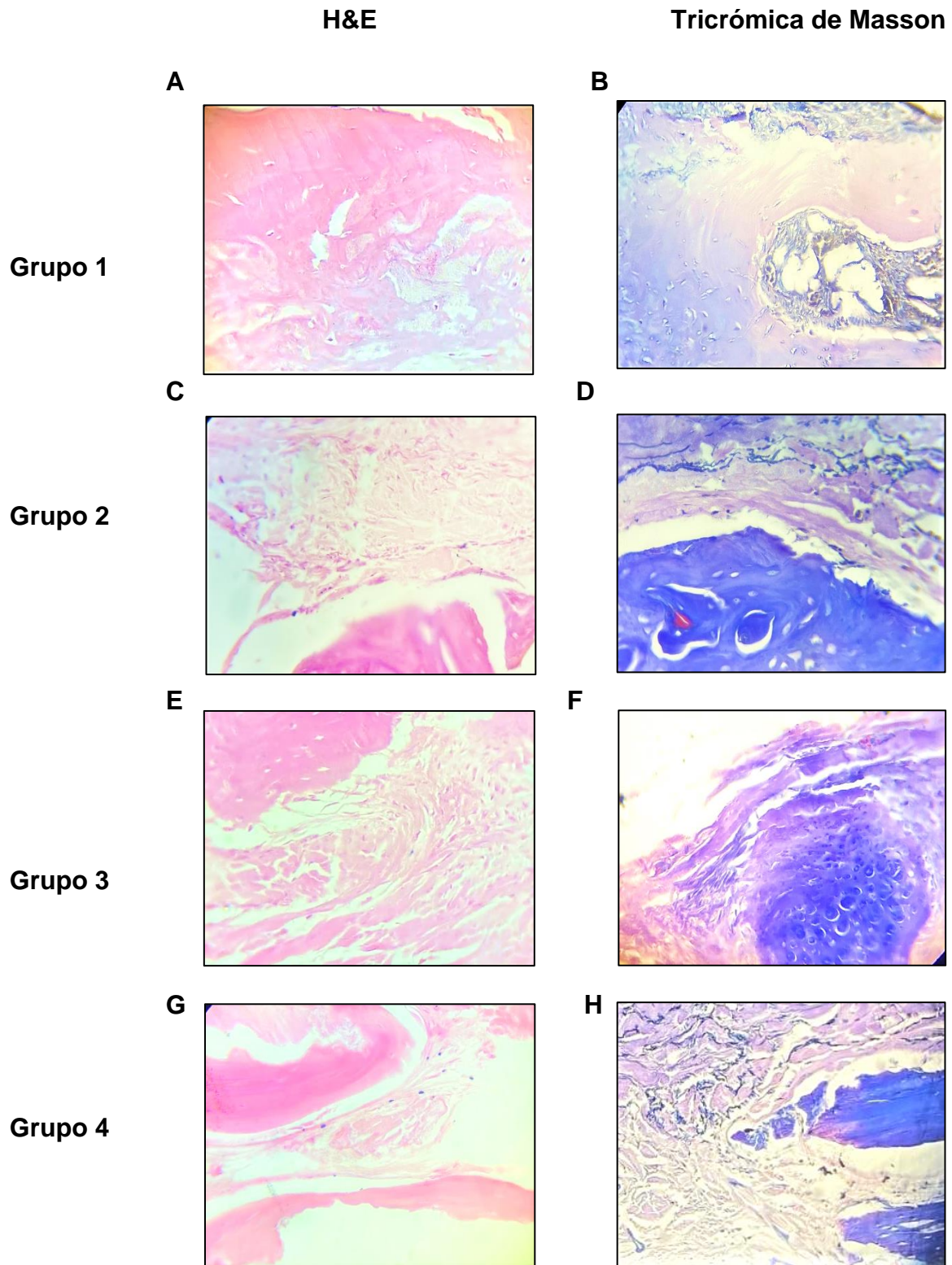
En el grupo 1: en la figura 10A se observa en la parte superior tejido óseo más organizado, laminar, maduro, osteonas y osteocitos inmersos en el tejido, y en la zona inferior se observa hueso inmaduro. En la figura 10B se observan zonas morado oscuro las cuales representan tejido óseo inmaduro con mayor cantidad de fibras de colágeno y las zonas morado claro representa hueso maduro laminar.

En el grupo 2: En la figura 10C en la parte superior se observa tejido fibroso, y en la zona inferior se identifica una zona de hueso laminar envuelto por el tejido fibroso (partícula de autoinjerto). Se observa una zona más irregular en la parte superior correspondiente a tejido óseo inmaduro y en la zona inferior un tejido más organizado con vasos sanguíneos correspondiendo a tejido óseo maduro (figura 10D).

Grupo 3: Se observa tejido óseo maduro con zonas de tejido óseo inmaduro en la parte inferior (figura 10E). Se observa material osteoide, o sea hueso inmaduro en la zona inferior con osteoblastos activos y en la zona superior se observa tejido mineralizado con osteocitos incluidos en el hueso (figura 10F).

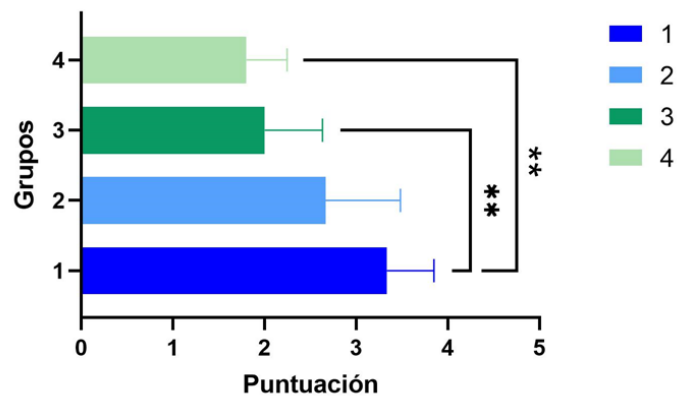
Grupo 4: Al observar estos cortes se encontraron varias zonas de tejido óseo laminar que correspondiente al autoinjerto, ya que se encuentran rodeadas por tejido óseo inmaduro (figura 10G). Se observa tejido óseo inmaduro y tejido fibroso rodeando partículas de tejido óseo maduro (figura 10H).

El análisis histológico se realizó a las 12 semanas, y se realizó por medio de un análisis semicuantitativo, modificado de Patel et al. en 2009 (40). Los cortes histológicos se analizaron y se puntuaron para evaluar la respuesta del tejido a la membrana y la cantidad de hueso que se ganó. En la Figura 11 se observan los resultados del puntaje de cada grupo



**Figura 10.** Cortes histológicos vistos a 40x, teñidos con H&E (A, C, E y G) y tricrómica de Masson (tiñe tejido conectivo, principalmente fibras de colágeno) (B, D, F y H).

### Análisis Cuantitativo Histológico



**Figura 11.** Se observa el promedio de puntuación de todos los grupos. Los grupos 1 y 2 tuvieron mayor puntaje y hubo diferencia significativa entre los grupos 1-3 (T student,  $p= 0.0025$ ) y 1-4 (T student,  $p= 0.0006$ ).

## 12. DISCUSIÓN

El hueso es un tejido conectivo especializado mineralizado que tiene muchas funciones vitales y es debido a esto que tiene una alta capacidad de auto reparación (20). El hueso es capaz de curarse con tejido de regeneración de una alta organización estructural igual a la del tejido original sin dejar cicatriz fibrosa, se le considera una recapitulación de la osteogénesis embrionaria y de crecimiento. En este proceso existen tejidos intermediarios incluyendo un callo fibroso, cartílago ligeramente mineralizado y hueso osteoide. Estos tejidos intermediarios proveen de una estabilidad mecánica inicial y eventualmente se reemplazan por hueso laminar (42).

Sin embargo, la capacidad espontánea de regeneración tiene sus limitaciones cuando existe un defecto crítico que se encuentra más allá de la envoltura esquelética. Es en estos casos que se necesita una adecuada intervención terapéutica como técnicas de ROG (20).

El COL tipo 1 es uno de los COL más prevalentes en la matriz extracelular de hueso y tendón. Sin embargo, utilizar COL por sí solo como andamio, no presenta la fuerza mecánica y osteoconductividad suficiente para ofrecer resultados de regeneración satisfactorios. Es aquí donde entra la acción del OG, el cual, es posible que le confiera una fuerza mecánica y propiedades biológicas superiores para obtener un material de regeneración prometedor, además la presencia de epóxidos, carbonilos e hidroxilos en su superficie, lo hacen fácil de funcionalizar y unirse a polímeros o nanopartículas (34).

En este sentido, el tamaño del defecto generado es importante para detectar la capacidad regeneradora de las membranas que se colocaron, ya que, de haber creado un defecto no crítico, la regeneración se hubiera generado espontáneamente por el mismo organismo y no por la membrana.

Los grupos 1 (Bio-Gide® (BG) + coágulo) y 3 (membrana PCL/OG/COLp + coágulo) son los que arrojaron más información sobre las propiedades regeneradoras de las membranas ya que no fueron ayudadas por un injerto o sustituto óseo, ya que el concepto de ROG consiste en la utilización de una membrana independientemente si se coloca o no, un injerto óseo sobre el defecto antes del cierre primario. Diversos autores han utilizado el modelo de defecto óseo crítico en calota de rata probando solo membranas sobre el defecto sin colocar nada dentro del mismo (16,43,44).

## **12.1 Análisis tomográfico**

A la observación macroscópica los grupos no presentaron evidencia de infección o inflamación antes y después de la colocación de la membrana, sin embargo, es necesario llevar a cabo pruebas de biocompatibilidad.

Al observar la reconstrucción tridimensional obtenida de las tomografías a las 12-16 semanas encontramos que hubo una mayor ganancia ósea en los grupos 1 (con coágulo) y 2 (con autoinjerto) a los que se les colocó una membrana de origen porcino comercial BG. El porcentaje de hueso ganado del grupo 1 fue de 95%, y del grupo 2 fue de 92%, lo cual comparado el grupo 3 en el cual la ganancia fue de 27.5%, fue bastante mayor. Sin embargo, en el grupo 4, que además de tener la membrana experimental tuvo autoinjerto, presentó una ganancia ósea de más del doble que el grupo 3. Esto nos confirma que la presencia de un andamio, a manera de un autoinjerto, confiere osteogeneración (24).

Nuestros resultados fueron diferentes a lo descrito por Bassi et al., en 2021 (16), en donde al analizar la imagen tomográfica, concluyen que los grupos con membranas de PCL tuvieron resultados similares en ganancia ósea a los grupos con membrana BG a los 30 y 60 días postoperatorios en defectos críticos de 8 mm. Nuestros resultados pudieron haber sido influenciados de manera negativa por la presencia de OG y el COLp en las membranas ya que entre más reactivos hayan en una membrana, hay más factores que controlar para que los resultados sean favorables.

Zhou et al., (34) también realizaron andamios de COL-OG, pero en forma de injerto y además agregaron apatita. Llevaron a cabo un análisis tomográfico para observar en la reconstrucción 3D, el volumen óseo que se generó en los distintos andamios de COL-Ap y OG a diferentes concentraciones. Finalmente encontraron mayor calcificación en los andamios de COL-Ap con OG al 0.1% y 0.2% p/v, teniendo un cierre completo del defecto a las 12 semanas. La diferencia que encontramos con nuestro estudio fue que nosotros realizamos un andamio en forma de membrana, la cual generalmente necesita de la colocación de injerto óseo dentro del defecto para llevar a cabo su función. El grupo de estudio 3 que consistió en la membrana experimental sobre un coágulo no obtuvo tan buenos resultados como los que se obtuvieron en el grupo 4 en el que además de tener la membrana experimental se le colocó un autoinjerto óseo, lo cual favoreció a la regeneración y cierre completo en casi todas las ratas. Aun con estos resultados, los grupos que tenían la membrana BG (grupo 1 y 2), tuvieron mejor rendimiento incluso sin la presencia de un autoinjerto ya que tuvieron una regeneración del 95%-92% del total del defecto. Es necesario evaluar la caracterización de nuestra membrana para asegurar de que las propiedades fisicoquímicas sean adecuadas para la ROG, como por ejemplo la porosidad y la hidrofobicidad de la misma.

## **12.2 Análisis histológico**

La evaluación histológica se realizó utilizando H&E y tricrómica de Masson. Los resultados histológicos fueron consistentes con el análisis tomográfico ya que el grupo 1 y 2 presento mayor cantidad de hueso maduro y hueso inmaduro que el grupo 3 y 4. En los grupos con autoinjerto (2 y 4), se observaron partículas del autoinjerto aun presentes. El autoinjerto se diferencia del hueso regenerado en que se ve como zonas de hueso maduro laminar inmerso en tejido fibroso u óseo inmaduro.

En los grupos 2 y 3 a pesar de que no se generó gran cantidad de tejido óseo maduro, se encontró gran cantidad de tejido óseo inmaduro o en proceso de mineralización, tejido fibroso y deposición de colágeno y nula presencia de tejido inflamatorio. Nuestros resultados difieren del estudio realizado por Zhou C et al., en 2018 (34), en el que obtuvieron mejores resultados en el andamio que presentaba COL-Ap y

OG al 0.1 % peso/volumen (p/v), que el andamio que solo presentaba COL-Ap. Estos andamios se colocaron en defectos críticos de 5 mm en calotas de ratas, y doble formación ósea en este grupo en comparación con el grupo que solo presentaba COL-Ap.

Con resultados similares, Vlascenau et al., (45) generaron un andamio de quitosano, gelatina de pescado y genipín y lo colocaron subcutáneamente para observar la reacción del tejido al andamio. Colocaron andamios con distintas concentraciones de OG siendo la de 0.5 % p/v la que generó mayor deposición de COL que el andamio de solo gelatina de pescado con genipín o con otra concentración de OG, probando que la colocación de OG si mejoró los resultados, pero posiblemente debe estar en menores concentraciones para generar una mejor respuesta celular.

Además, Liu et al.,(31), crearon un aerogel híbrido de COL con diferentes concentraciones de OG: 0%, 0.05%, 0.1% y 0.2% p/v. Obtuvieron mejor resultado histológico en los grupos que contenían OG principalmente con la concentración de 0.1%, que el grupo de únicamente COL, lo cual también difiere de nuestro estudio, en el cual el grupo 1 y 2 con COL de origen porcino presentó mejor desempeño, sin embargo, habrá que hacer la comparación de nuestra membrana experimental con un grupo que únicamente presente la membrana con COLp para observar si realmente este COL de origen marino es comparable con el COL de mamíferos de las membranas que ya existen en el mercado.

Dantas et al. (33) sintetizaron un nanohíbrido también para regeneración ósea de OG funcionalizado con hialuronato (HY). Probaron diferentes concentraciones de OG (0.05%, 0.1% y 0.2% p/v) las cuales colocaron en un defecto en la tibia de rata y también probaron un nanohíbrido con la combinación mencionada anteriormente. Realizaron análisis histológico al 7mo día y al 14vo día, en donde en esta última revisión encontraron un mejor patrón de regeneración en el grupo que presentaba OG al 0.1% y el nanohíbrido con OG al 0.1% que en los demás grupos con distintas concentraciones de OG y que en el grupo que presentaba solo un coágulo en el defecto.

En nuestro caso se utilizó una concentración de OG al 2%, que se encuentra dentro del rango de las concentraciones que se han utilizado en la literatura, que van desde 0.5%- 3%(31,33,34,45,46). Es necesario seguir probando con otras concentraciones para observar si se obtienen mejores resultados en cuanto a su posible participación en la regeneración ósea.

Con respecto a la PCL, Bassi et al.(16), como se mencionó anteriormente, trabajaron sobre un defecto óseo crítico de 8 mm en calota de rata para hacer la comparación de una membrana BG con una membrana de PCL enriquecida con 5% de hidroxiapatita. Encontraron que, a los 60 días, los defectos con BG y con PCL se habían cerrado por completo, y había partículas de PCL rodeadas por tejido osteoide, debido a esto no hubo diferencia estadísticamente significativa entre grupos, lo que difiere de nuestro estudio ya que, en el caso de nuestra membrana experimental sobre el coágulo, el tejido óseo fue menor, (27.5% vs 95%) con una diferencia estadísticamente significativa de  $p = 0.0025$ .

Tian Zhou et al. (47) sintetizaron una membrana de COLp/vidrio bioactivo/quitosano, y realizaron prueba in vivo en defecto óseo de furca tipo II en mandíbula de perro para evaluar si ayudaba a la ROG o regeneración tisular guiada. Los defectos a los que se le colocó esta membrana tuvieron mayor formación ósea a los 60 días que los defectos que solo presentaban un coágulo, siendo de 69.31% y de 44.63% la ganancia ósea respectivamente. En este caso la membrana favoreció bastante la regeneración ósea comparado con un grupo control negativo, no se realizó comparación con alguna membrana comercial ya probada como en nuestro caso, por lo que sería conveniente comparar también nuestra membrana con un grupo control negativo para observar si hay diferencia.

Es importante que esta investigación sea complementada con un segundo estudio en el que se agregue un grupo control negativo, en el cual el defecto solo presente coágulo sin colocar membrana, para observar si realmente nuestra membrana confiere una ventaja sobre no colocar nada en la lesión. Otro grupo que también es necesarios agregar

es, uno al que se le coloque una membrana de únicamente PCL, y otra de COLp, para evaluar qué componente es el que favorece mayormente a la regeneración ósea. En nuestro caso la limitante fue el tiempo que se necesita para la reproducción de las ratas y el tiempo que se tuvo para realizar la presente investigación, ya que no se consiguió el número total de ratas de la cepa Zucker para completar los grupos de estudio. En este sentido también es necesario complementar este estudio con todos los grupos descritos, utilizando ratas ZDF ya que estas presentan mayor predisposición a presentar hiperfagia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia, y así evaluar el efecto regenerador de estas membranas en modelos de DMT2. Es importante asegurar la hiperglucemia en estos grupos de estudio llevando a cabo un control semanal de la glucemia hasta que los niveles sean mayores de 118 mg/dL y se puedan mantener así.

También, se puede complementar este estudio con un análisis histomorfométrico más profundo, es decir, por ejemplo, evaluar con más detalle la celularidad del hueso, realizar pruebas de cuantificación de la enzima fosfatasa alcalina en sangre para evaluar si existe una precipitación cálcica en hueso y observar la cantidad de mineralización que ocurre en cada grupo.

### **13. CONCLUSIÓN**

Los componentes de nuestra membrana experimental han sido ampliamente estudiados y descritos en la literatura, y se conoce que son materiales prometedores en el área de la ingeniería tisular ósea.

Se logró comparar la capacidad regeneradora de la membrana de PCL/OG/COLp con una membrana comercial de COL de origen porcino Bio-Gide®. Macroscópicamente se observó que la membrana experimental se mantuvo durante un periodo de 12-16 semanas sin reabsorberse totalmente y además sin provocar necrosis o inflamación de los tejidos circundantes, lo cual es benéfico para la regeneración ósea.

Se observaron diferencias significativas en el análisis tomográfico e histológico entre la membrana comercial (con la cual se logró una mayor ganancia de tejido y ganancia ósea) y la membrana sintetizada en nuestro laboratorio.

Es necesario continuar con la investigación de estas membranas como lo es el realizar pruebas complementarias de biocompatibilidad y viabilidad celular.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

1. Xie H, Cao T, Rodríguez-Lozano FJ, Luong-Van EK, Rosa V. Graphene for the development of the next-generation of biocomposites for dental and medical applications. Vol. 33, *Dental Materials*. Elsevier Inc.; 2017. p. 765–74.
2. Valente KP, Brolo A, Suleman A. From dermal patch to implants—applications of biocomposites in living tissues. Vol. 25, *Molecules*. MDPI AG; 2020.
3. Nejatian T, Khurshid Z, Zafar MS, Najeeb S, Zohaib S, Mazafari M, et al. Dental biocomposites. In: *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*. Elsevier Inc.; 2017. p. 65–84.
4. Mohanty AK, Misra M, Drzal LT, editors. *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*. CRC Press; 2005.
5. Ball AN, Donahue SW, Wojda SJ, McIlwraith CW, Kawcak CE, Ehrhart N, et al. The challenges of promoting osteogenesis in segmental bone defects and osteoporosis. Vol. 36, *Journal of Orthopaedic Research*. John Wiley and Sons Inc.; 2018. p. 1559–72.
6. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. Vol. 125, *European Journal of Oral Sciences*. Blackwell Munksgaard; 2017. p. 315–37.
7. Urban IA, Monje A. Guided Bone Regeneration in Alveolar Bone Reconstruction. Vol. 31, *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2019. p. 331–8.
8. Yang Z, Wu C, Shi H, Luo X, Sun H, Wang Q, et al. Advances in Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration Techniques. Vol. 10, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
9. Mousavi SM, Hashemi SA, Ghasemi Y, Amani AM, Babapoor A, Arjmand O. Applications of graphene oxide in case of nanomedicines and nanocarriers for biomolecules: review study. Vol. 51, *Drug Metabolism Reviews*. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 12–41.
10. Seyedsalehi A, Daneshmandi L, Barajaa M, Riordan J, Laurencin CT. Fabrication and characterization of mechanically competent 3D printed polycaprolactone-reduced graphene oxide scaffolds. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
11. Priyadarsini S, Mohanty S, Mukherjee S, Basu S, Mishra M. Graphene and graphene oxide as nanomaterials for medicine and biology application. *J Nanostructure Chem*. 2018 Jun;8(2):123–37.

12. Oh GW, Nguyen VT, Heo SY, Ko SC, Kim CS, Park WS, et al. 3D PCL/fish collagen composite scaffolds incorporating osteogenic abalone protein hydrolysates for bone regeneration application: in vitro and in vivo studies. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2021;32(3):355–71.
13. Nguyen BNB, Moriarty RA, Kamalidinov T, Etheridge JM, Fisher JP. Collagen hydrogel scaffold promotes mesenchymal stem cell and endothelial cell coculture for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2017 Apr 1;105(4):1123–31.
14. Babu RJ, Sagayam S, Asirvatham C. Collagen aids in expediting the healing framework of diabetic ulcers. *Wound Medicine.* 2018 Dec 1;23:38–46.
15. Jin S, Sun F, Zou Q, Huang J, Zuo Y, Li Y, et al. Fish Collagen and Hydroxyapatite Reinforced Poly(lactide- co-glycolide) Fibrous Membrane for Guided Bone Regeneration. *Biomacromolecules.* 2019 May 13;20(5):2058–67.
16. Bassi APF, Bizelli VF, Francatti TM, de Moares Ferreira ACR, Pereira JC, Al-Sharani HM, et al. Bone regeneration assessment of polycaprolactone membrane on critical-size defects in rat calvaria. *Membranes (Basel).* 2021 Feb 1;11(2):1–12.
17. Dikici BA, Dikici S, Reilly GC, MacNeil S, Claeysens F. A novel bilayer polycaprolactone membrane for guided bone regeneration: Combining electrospinning and emulsion templating. *Materials.* 2019 Aug 1;12(16).
18. Kusirisin T, Suwanprateeb J, Buranawat B. Polycaprolactone versus collagen membrane and 1-year clinical outcomes: A randomized controlled trial. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2022 Apr 1;
19. Trejo-Iriarte CG, Serrano-Bello J, Gutiérrez-Escalona R, Mercado-Marques C, García-Honduvilla N, Buján-Varela J, et al. Evaluation of bone regeneration in a critical size cortical bone defect in rat mandible using microCT and histological analysis. *Arch Oral Biol.* 2019 May 1;101:165–71.
20. Sculean A, Stavropoulos A, Bosshardt DD. Self-regenerative capacity of intra-oral bone defects. *J Clin Periodontol.* 2019 Jun 1;46(S21):70–81.
21. Nauth A, Schemitsch E, Norris B, Nollin Z, Watson JT. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? *J Orthop Trauma.* 2018 Mar 1;32:S7–11.
22. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(8):879–93.
23. Shanbhag S, Pandis N, Mustafa K, Nyengaard JR, Stavropoulos A. Alveolar bone tissue engineering in critical-size defects of experimental animal

- models: a systematic review and meta-analysis. Vol. 11, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. John Wiley and Sons Ltd; 2017. p. 2935–49.
24. Maclel J, Momesso GAC, Ramalho-Ferreira G, Consolaro RB, de Carvalho PSP, Faverani LP, et al. Bone Healing Evaluation in Critical-Size Defects Treated with Xenogenous Bone Plus Porcine Collagen. *Implant Dent*. 2017 Apr 1;26(2):296–302.
  25. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012 Sep 6;7(10):1918–29.
  26. Kretlow JD, Spicer PP, Jansen JA, Vacanti CA, Kasper FK, Mikos AG. Uncultured marrow mononuclear cells delivered within fibrin glue hydrogels to porous scaffolds enhance bone regeneration within critical-sized rat cranial defects. *Tissue Eng Part A*. 2010 Dec 1;16(12):3555–68.
  27. Hermenean A, Dinescu S, Ionita M, Costache M. The Impact of Graphene Oxide on Bone Regeneration Therapies. In: *Advanced Techniques in Bone Regeneration*. InTech; 2016.
  28. Cavassini Torquato L, Antonio Chelin Suárez E, Viscensotto Bernardo D, Luzcybel Ribeiro Pinto I, Oliveira Mantovani L, Igor Lemes Silva T, et al. Bone repair assessment of critical size defects in rats treated with mineralized bovine bone (Bio-Oss®) and photobiomodulation therapy: a histomorphometric and immunohistochemical study. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03234-5>
  29. Caliaperoumal G, Souyet M, Bensidhoum M, Petite H, Anagnostou F. Type 2 diabetes impairs angiogenesis and osteogenesis in calvarial defects: MicroCT study in ZDF rats. *Bone*. 2018 Jul 1;112:161–72.
  30. Al-Awar A, Kupai K, Veszeka M, Szucs G, Attieh Z, Murlasits Z, et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. Vol. 2016, *Journal of Diabetes Research*. Hindawi Limited; 2016.
  31. Liu S, Zhou C, Mou S, Li J, Zhou M, Zeng Y, et al. Biocompatible graphene oxide–collagen composite aerogel for enhanced stiffness and in situ bone regeneration. *Materials Science and Engineering C*. 2019 Dec 1;105.
  32. Vlasceanu GM, Şelaru A, Dinescu S, Balta C, Herman H, Gharbia S, et al. Comprehensive appraisal of graphene–oxide ratio in porous biopolymer hybrids targeting bone-tissue regeneration. *Nanomaterials*. 2020 Aug 1;10(8):1–19.
  33. Dantas PC de L, Martins-Júnior PA, Coutinho DCO, Andrade VB, Valverde TM, Ávila E de S, et al. Nanohybrid composed of graphene oxide

functionalized with sodium hyaluronate accelerates bone healing in the tibia of rats. *Materials Science and Engineering C*. 2021 Apr 1;123.

34. Zhou C, Liu S, Li J, Guo K, Yuan Q, Zhong A, et al. Collagen Functionalized with Graphene Oxide Enhanced Biomimetic Mineralization and in Situ Bone Defect Repair. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018 Dec 19;10(50):44080–91.
35. Rojo AA. Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales. Valoración de las incidencias. *ANIMALES DE LABORATORIO*. 2014;(62).
36. Russel WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Vol. 1. London; 1959.
37. Kallai I, Mizrahi O, Tawackoli W, Gazit Z, Pelled G, Gazit D. Microcomputed tomography-based structural analysis of various bone tissue regeneration models. *Nat Protoc*. 2011 Jan;6(1):105–10.
38. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. Humana Press; 2003.
39. Prophet Edna B., Mills Bob, Arrington Jacquelyn B. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Amer Registry of Pathology (1 marzo 1992); 1992.
40. Young S, Patel ZS, Kretlow JD, Murphy MB, Mountziaris PM, Scott Baggett L, et al. Dose Effect of Dual Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein-2 on Bone Regeneration in a Rat Critical-Size Defect Model.
41. Consuelo Figueroa MG, Pérez H IH, Mejía RZ. Characterization of a type 2 diabetes model in female Wistar rats.
42. Shah FA, Jolic M, Micheletti C, Omar O, Norlindh B, Emanuelsson L, et al. Bone without borders – Monetite-based calcium phosphate guides bone formation beyond the skeletal envelope. *Bioact Mater*. 2023 Jan 1;19:103–14.
43. Di Pillo MK, Montagner PG, Teixeira LN, Martinez EF. In vivo evaluation of a collagen membrane in bone neoformation: A morphological and histomorphometric study. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2023 Feb 1;124(1).
44. Bizelli VF, Ramos EU, Veras ASC, Teixeira GR, Faverani LP, Bassi APF. Calvaria Critical Size Defects Regeneration Using Collagen Membranes to Assess the Osteopromotive Principle: An Animal Study. *Membranes (Basel)*. 2022 May 1;12(5).
45. Vlasceanu GM, Şelaru A, Dinescu S, Balta C, Herman H, Gharbia S, et al. Comprehensive appraisal of graphene–oxide ratio in porous biopolymer

hybrids targeting bone-tissue regeneration. *Nanomaterials*. 2020 Aug 1;10(8):1–19.

46. Fang H, Luo C, Liu S, Zhou M, Zeng Y, Hou J, et al. A biocompatible vascularized graphene oxide (GO)-collagen chamber with osteoinductive and anti-fibrosis effects promotes bone regeneration in vivo. *Theranostics*. 2020;10(6):2759–72.
47. Zhou T, Sui B, Mo X, Sun J. Multifunctional and biomimetic fish collagen/bioactive glass nanofibers: Fabrication, antibacterial activity and inducing skin regeneration in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine*. 2017 May 2;12:3495–507.

## 16. ANEXOS

<i>Análisis Tomográfico</i>	<b>GRUPO 1</b>				<b>GRUPO 2</b>				<b>GRUPO 3</b>				<b>GRUPO 4</b>			
<b>CLAVE</b>																
<b>AREA TOTAL (mm2)</b>																
<b>AREA DE HUESO (mm2)</b>																
<b>BV/TV</b>																
<b>PORCENTAJE</b>																
<i>Análisis Histológico</i>	<b>GRUPO 1</b>				<b>GRUPO 2</b>				<b>GRUPO 3</b>				<b>GRUPO 4</b>			
<b>CLAVE</b>																
<b>PUNTUACIÓN</b>																
<i>Medición de Glucosa</i>	<b>GRUPO 1</b>				<b>GRUPO 2</b>				<b>GRUPO 3</b>				<b>GRUPO 4</b>			
<b>CLAVE</b>																
<b>Glucemia en mg/dL (Fecha)</b>																
<i>Medición de Peso</i>	<b>GRUPO 1</b>				<b>GRUPO 2</b>				<b>GRUPO 3</b>				<b>GRUPO 4</b>			
<b>CLAVE</b>																
<b>PESO gr (Fecha)</b>																