



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA
CON OPCIÓN TERMINAL EN REHABILITACIÓN ORAL**

“EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE MEMBRANAS DE COLÁGENO DE PESCADO - ÓXIDO DE GRAFENO *VERSUS* MEMBRANA COMERCIAL”

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN ESTOMATOLOGÍA CON OPCIÓN TERMINAL EN REHABILITACIÓN
ORAL**

PRESENTA

MARIANA BERENICE HUERTA SOLANO (222250016)

DIRECTORA DE TESIS

D. C. JULIA FLORES TOCHIHUITL (ID 100228022)

DIRECTOR DISCIPLINARIO

M. E. I. GUILLERMO FRANCO ROMERO (ID 100294988)

DIRECTORA METODOLÓGICO

D.C CAROLINA SÁMANO VALENCIA (ID 100526470)

ASESORA INTERNA

MTRA. SAMANTHA RIVERA MACIAS (ID 100518803)

LECTOR

D.C. MIGUEL ÁNGEL CASILLAS SANTANA (ID 100526485)

Junio 2024



BUAP

Oficio No. FESIEP/CIFE/061/2024

C. Mariana Berenice Huerta Solano
Estudiante de la Maestría en Estomatología
Con opción en Terminal en Rehabilitación Oral
Matrícula No.: 222450016
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, la que suscribe MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana en mi calidad de Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; para comunicarle una noticia importante en relación con su proceso académico.

Con agrado, le informo que la Secretaría de Posgrado ha otorgado la aprobación para la impresión de su Tesis Titulada:

“Evaluación In Vivo de la Biocompatibilidad de Membranas de Colágeno de Pescado-Óxido de Grafeno versus Membrana Comercial”

Esta tesis está inscrita en el libro de registros No. 08, página 01, con el No. de asignación 2023199 en la Secretaría de Investigación de esta Unidad Académica. Usted presentará esta tesis para realizar su examen profesional y así obtener el grado de Maestra en Estomatología.

La aprobación de la impresión de su tesis represente un hito significativo en su trayectoria académica y profesional. Es el reflejo de su arduo trabajo, dedicación y la profundidad de su investigación en el campo de la Estomatología.

Le insto a que proceda con los pasos necesarios para la impresión y presentación de Tesis, cumpliendo con todas las normativas y plazos establecidos por la Facultad. Esto incluye la revisión final de su documento, asegurándose de que desempeñe todos los requisitos académicos y formatos establecidos, así como la coordinación con la Secretaría para la programación de su examen profesional.

Para cualquier consulta, aclaración o información adicional, le invito a contactar directamente a este Posgrado, estamos aquí para asistirle en cada paso restante de su proceso académico.

Sin otro particular, le reitero mi más atenta y distinguida consideración y le deseo éxito en la etapa final de esta carrera académica.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., a viernes 14 de junio del 2024

MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*Nota: Se anexa Formato de Impresión de Tesis - C. Mariana Berenice Huerta Solano - Maestría en Estomatología con opción en Terminal en Rehabilitación Oral - S.I.E.P. - Facultad de Estomatología - B.U.A.P. (original) - p.s.c.y.a.

*C.c.p. Archivo

*MCO. FJMA/MEP. GNRCC/yaneth

Secretaría de Investigación y
Estudios de Posgrado
Facultad de
Estomatología

31 poniente 1304, Col. Volcanes
Puebla, Pue.
C.P. 72410
Tel. Of. 22*22 29 55 00
Ext. 5526

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

Para obtener el Grado de: **Maestro(a) en Estomatología con opción terminal en Rehabilitación Oral**

No. Registro CIFE: 2023199 **Fecha de Registro ante CIFE:** miércoles 8 de marzo del 2023.

Título de la Tesis: "Evaluación in vivo de la biocompatibilidad de membranas de colágeno de pescado – óxido de grafeno versus membrana comercial"

Nombre del alumno: Mariana Berenice Huerta Solano

Matrícula: 222450016

Domicilio: Fracc. Sendero del Fresno, carrada sur del sauce N. 7. Rancho colorado.

Tel: 22*28 28 74 28

Fecha de ingreso a la Facultad: lunes 03 de enero del 2022.

Firma: _____

Director de Tesis: DC. Julia Flores Tochiuhitl

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: Maestro en Estomatología Integral

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100294988.

Tel: 22*22 12 06 57.

Firma: _____

Director Metodológico: DC Carolina Sámano Valencia **Grado académico:** Doctora en Ingeniería y Ciencia de Materiales.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100526470.

Tel: 44*48191822

Firma: _____

Lector: DC. Miguel Ángel Casillas Santana

Grado académico: Doctor en Ciencias.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100526485

Tel: 44*48 46 76 45.

Firma: _____

Nombre y firma de aprobación del presidente de la academia/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.

MEP. Gisela Natály Rubín de Celis Quintana



Fecha actual: viernes 14 de junio del 2024.

Sello _____



BUAP

Constancia No. FESIEP/CIFE/021/2023

A quien corresponda
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, la *Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*; hace constar, que, el proyecto de Investigación (Colectivo):

“Evaluación In Vivo de la Biocompatibilidad de Membranas de Colágeno de Pescado-Óxido de Grafeno versus Membrana Comercial”.

Presentado por:

No.	Cargos	Nombres	ID - Matrículas
1	Responsable del proyecto:	DC. Julia Flores Tochihuitl	100228022
2	Director Metodológico:	DC. Carolina Sámano Valencia	100526470
3	Director Disciplinario:	MEI. Guillermo Franco Romero	100294988
4	Asesor interno:	Mtra. Samantha Rivera Macias	100518803
5	Alumna: - Maestría en Estomatología – Terminal: <u>Rehabilitación Oral</u>	C. Mariana Berenice Huerta Solano	222450016

ha sido **ACEPTADO**, y quedara registrado en esta Secretaría de Posgrado, en el libro de registros 07 en la hoja 01 con No. de registro 2023199.

Por lo anterior, se estableció en la Minuta No. 02/2023, que, “El responsable del Proyecto de Investigación se compromete a entregar los informes parciales y finales en los meses correspondientes de julio y diciembre de año en curso, de acuerdo con lo solicitado por el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología (C.I.F.E.).

Para los fines legales que los interesados convengan, y sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., 08 de marzo de 2023


Mtro. Furid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*C.p. Archivo
*MTRO. FJMA/DR.FADV/Yaneth

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

ORIGINALITY REPORT

15%

SIMILARITY INDEX

13%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

7%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES



Anáhuac
Mayab

Se otorga el presente
RECONOCIMIENTO
a

Mariana Huerta Solano

Por haber obtenido el tercer lugar en el concurso de carteles de
investigación en la:

XVI REUNIÓN NACIONAL DE POSGRADOS DE PROSTODONCIA

Realizada los días 24, 25 y 26 de abril del 2024 en la Universidad Anáhuac Mayab
en la ciudad de Mérida Yucatán.

"VINCE IN BONO MALUM"

C.D.E.P. **Rolando Peniche Marcín**
Director de la Facultad de Odontología de la
Universidad Anáhuac Mérida

C.D.E.O.R. **Rafael A. Domínguez Cervera**
Coordinador del Posgrado de Rehabilitación Bucal
de la Universidad Anáhuac Mayab

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

¿Cómo no llegar tan lejos si tenemos una excelente mentora? Dra. Julia Flores Tochiuitl, no tengo palabras para expresar mi agradecimiento y admiración hacia usted. Gracias por todo el tiempo dedicado a este proyecto y su entrega total en cada paso, gracias por su paciencia y su apoyo en los momentos complicados, pero, sobre todo, gracias por ser el ser humano tan valioso que es, por abrirme las puertas de su laboratorio y de su familia, gracias por su amistad. Me tocó la mejor asesora de tesis.

Dr. Guillermo Franco Romero, tengo mucho que agradecerle, comenzando por su apoyo y asesoría en este proyecto, pero principalmente, gracias por confiar en mí desde el día uno, primero como su estudiante de licenciatura, su asistente y después como alumna de posgrado, gracia por permitirme cumplir mis sueños durante mi crecimiento profesional, gracias por sus consejos que me ayudaron a mejorar como persona y profesionista. Se que en usted tengo no solo su apoyo académico sino, su amistad. Siempre estaré agradecida.

Dra. Carolina Sámano Valencia, gracias por su compromiso como docente y como asesora, por su apoyo con mi proyecto de tesis y siempre mostrar interés y disposición.

Gracias a la Dra. Samantha Rivera Macias por su apoyo con mi proyecto, por enseñarme con paciencia y regalarme tiempo como docente y como amiga.

Químico Farmacobiólogo Hilda Garcia Sánchez, te convertiste en una pieza clave, gracias por tu ayuda, por explicarme y enseñarme con paciencia y pasión. Gracias por tu tiempo y disposición.

A mis docentes, por transmitir su conocimiento sin límite, por su empeño y dedicación, por ayudarme tener confianza en mí y mejorar como profesionista. Gracias a mis compañeros de generación: Brenda, Dulce, Lucas, Bryan y Rodrigo que estuvieron en cada éxito y fracaso, gracias por compartirme su tiempo, sus consejos, sus sueños y por todas las aventuras vividas, los quiero.

Gracias a mi alma mater la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, que ha sido mi hogar desde los 15 años, gracias por brindarme una educación de excelencia.
Siempre Lobo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Este logro se lo dedico a mi familia, han sido mi soporte en cada etapa de mi vida y tienen todo mi agradecimiento y mi amor.

Mami, nunca tendré la forma de agradecerte los que haces por mí, siempre apoyándome, alentándome a ser mejor, motivándome en cada decisión que he tomado y siguiéndome detrás como cuando era pequeña, porque en los momentos de flaqueza tu estabas ahí sosteniéndome sin dejarme caer. Gracias por convertirte en la madre de mi hijo este tiempo, por enseñarle los colores y a leer mientras yo no estaba. Eres la mejor madre y abuela. Te amo

Papito chulo, gracias por tu apoyo, hay mil cosas que tengo que agradecerte, como ser un papá fenomenal, amoroso e incondicional. Pero hoy quiero agradecerte en específico por enseñarme a disfrutar la vida, enseñarme a ser bueno, justo, amable, amoroso, responsable y trabajar siempre en beneficio de la salud de mis pacientes. Eres un gran ejemplo.

Hermanos, no lo habría logrado sin ustedes. Lau gracias por ser mi ejemplo y mi colega, gracias por todos los consejos y los ánimos que me dabas, gracias por todo tu apoyo y amor. Nacho, gracias por confiar en mí y alentarme a hacer mi posgrado, gracias por ser mi cómplice y también ser mi guía. Pao, hermanita gracias por ayudarme con mi hijo, por ser la mejor tía en mi ausencia, por darle el amor y la atención que yo no podía. Gracias por siempre mostrarte orgullosa de mi como yo lo estoy de ti.

Nico, mi amor. En este momento eres más consciente de tu alrededor y quiero darte las gracias por todas las noches que dormías solo mientras yo estudiaba, gracias por subir mi desayuno cuando tomaba clases en línea, gracias por esperarme todas las noches para hacer tarea o jugar un ratito, gracias por que a pesar de no estar todo el día contigo para ti siempre he sido la mejor mamá del mundo. Quiero que sepas que eres mi motor, por ti estoy aquí, mejorando, aprendiendo y cumpliendo mis sueños y de la misma forma en la que tú me ayudaste en este tiempo, yo estaré siempre contigo para ayudarte a cumplir tus propios sueños. Te amo mi amor, no esperan grandes aventuras.

Por último, quiero agradecer a mis amigos, se han convertido en mi segunda familia, gracias por siempre apoyarme.

Diana, Mayra y Julieta el sueño que tuvimos en una sala de juntas tomando café se hizo realidad, las quiero. Brenda, Yare, Fer Ibáñez, Ale, Pao, Rayo, Fer Spota, Lucas, Bryan y Raúl Bastida, ustedes fueron de gran apoyo en este periodo, se alegraron por mis triunfos y me apoyaron en los tropiezos, siempre me extendieron su mano y me animaron cuando ya no podía más, creyeron en mí. Los quiero amigos.

Este proyecto pudo realizarse gracias al apoyo del Consejo Nacional de Humanidades,
Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)

CVU 821597

Número de Beca: 816993

ABREVIATURAS

Bio-Gide	BG
Centímetros cuadrados	cm ²
Colágeno	COL
Colágeno de pescado	COLp
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Kilogramo	kg
Miligramo	mg
Óxido de grafeno	OG
Policaprolactona	PCL
Regeneración ósea Guiada	ROG
Regeneración tisular guiada	RTG

ÍNDICE

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	15
2. INTRODUCCIÓN	17
3. ANTECEDENTES	19
3.1 ANTECEDENTES GENERALES	19
3.1.1 Biocompuestos	19
3.1.2 Membranas para la Regeneración Tisular Guiada.....	20
3.1.3 Biocompatibilidad de las membranas para la ingeniería de tejidos.....	22
3.1.4 Membrana Bio-Gide.....	23
3.1.5 Colágeno	23
3.1.6 COL de piel de pescado	24
3.1.7 Óxido de grafeno	25
3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	28
5. JUSTIFICACIÓN	29
6. HIPÓTESIS	30
7. OBJETIVOS	31
7.1 Objetivo general.....	31
7.2 Objetivos específicos	31
8. MATERIALES Y MÉTODOS	32
8.1 Diseño del estudio.....	32
8.2 Población muestra	32
8.2.1 Definición de la población de estudio para el modelo animal	32
8.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN	33
8.3.1 Inclusión.....	33
8.3.2 Exclusión	33
8.3.3 Eliminación	33
8.4 VARIABLES	33
8.5 CONCORDANCIA Y FIABILIDAD.....	34
8.6 UBICACIÓN ESPACIO-TIEMPO	35
8.7 PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN	35
8.7.1 Anestesia y procedimiento quirúrgico	35

8.7.2. Recolección de la muestra.....	37
8.7.3 Análisis histológico.....	37
8.7.4 Análisis Descriptivo Microscópico	37
8.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
8.9 LOGÍSTICA.....	39
8.9.1 Recursos humanos	39
8.9.2 Recursos materiales	39
9. BIOÉTICA.....	40
10. RESULTADOS	41
10.1 Respuesta tisular / hallazgos macroscópicos	41
10.2 Respuesta tisular / hallazgos microscópicos.....	41
11. DISCUSIÓN	48
12. CONCLUSIÓN	51
13. EXPECTATIVAS:	52
13. BIBLIOGRAFÍA	53

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La regeneración de tejidos es un proceso natural en los seres humanos, sin embargo, existen situaciones que llevan a la pérdida de gran cantidad de tejido óseo con menor índice de regeneración. En este sentido, se emplean biocompuestos que sirven como andamios en combinación con células, materiales bioactivos y otros factores con el fin de reparar o regenerar tejidos perdidos.

En la actualidad uno de estos biocompuestos que se utilizan en la ingeniería de tejidos son las membranas, que sirven como barrera para permitir la formación de tejido epitelial y tejido óseo respectivamente. Están compuestas principalmente por colágeno (COL) de mamífero que cumple con características de biodegradabilidad, regeneración tisular y biocompatibilidad, sin embargo, presentan ciertas limitantes, lo que ha llevado a la exploración de nuevas fuentes de obtención de COL, como el COL de pescado (COLp), aunado a esto, los materiales que son reforzados con óxido de grafeno (OG) han proporcionado resultados favorables en la ingeniería de tejidos tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar histológicamente la biocompatibilidad de membranas compuesta de policaprolactona (PCL), óxido de grafeno (OG) y COLp, y compararlas con membranas de colágeno porcino marca Bio-Gide® (BG). A dieciocho ratas macho Wistar de 3 a 4 meses de edad, con un peso promedio de 300 g, se les implantaron en el tejido subcutáneo 4 membranas: (PCL), (PCL/OG), (PCL/OG/COLp), BioGide (BG) y control (C-) (que se obtuvo de la acción quirúrgica sin colocación de membrana). Se realizó la evaluación a los 7, 21 y 63 días a través del procesamiento histológico de las muestras y el análisis microscópico.

A los 63 días de evaluación la disminución de la respuesta celular inflamatoria del grupo PCL/OG/COLp es similar al grupo BG y el grupo C-; también, se identifica respuesta reparativa con presencia de fibroblastos y fibras colágenas lo que sugiere que esta membrana es biocompatible en el modelo murino.

PALABRAS CLAVE

Biocompatibilidad, membrana, colágeno de pescado, óxido de grafeno, regeneración tisular, rata Wistar.

2. INTRODUCCIÓN

La regeneración de tejidos es un proceso natural en los seres humanos, sin embargo, defectos óseos, fracturas, pérdidas prematuras de órganos dentarios, tumores o procesos infecciosos ocasionan la pérdida de gran cantidad de tejido óseo con menor índice de regeneración. La ingeniería de tejidos es una combinación de células, materiales bioactivos, factores bioactivos naturales y sintéticos con el objetivo de reparar o regenerar hueso nativo en las áreas defectuosas, por lo tanto, la selección de materiales es importante para el éxito de la ingeniería de tejidos.

Los materiales bioactivos, mezcla de hidroxiapatita y COL con alguna matriz como PCL, que es un polímero biodegradable, se asemejan estructural y composicionalmente al hueso natural, al mismo tiempo, destacan sus características de biocompatibilidad, biodegradación, baja antigenicidad y flexibilidad. La unión de polímeros en la biomedicina tiene como objetivo mejorar las limitaciones que tienen los biomateriales, se han encontrado resultados favorables en la unión de esta proteína con otros polímeros como el quitosano y OG en estos estudios el uso del COL porcino ha sido limitado por transmisión de enfermedades como la fiebre aftosa, por este motivo se exploran nuevas fuentes de COL.

Es una de las principales proteínas en la estructura de la matriz celular y el tejido conectivo, el COL tipo I es el más destacado en los vertebrados, presente en piel, hueso, dientes y tendones, este tiene sus aplicaciones en la industria cosmética, biomédica y farmacéutica. En la ingeniería de tejidos el COL se puede modificar fácilmente mediante la reacción de sus grupos funcionales para crear diferentes materiales con propiedades mecánicas o biológicas adaptadas en diferentes aplicaciones como suturas, agentes hemostáticos, membranas, composites dentales, matrices biodegradables entre otras. Las membranas de COL se utilizan en el proceso de regeneración tisular guiada (RTG) por su biocompatibilidad y cicatrización en heridas.

Las sustancias de origen marino con alto contenido proteico no presentan la capacidad de transmitir enfermedades, presentan propiedades biológicas como actividad

antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena. El COLp suele contener COL fibrilar tipo I localizado en los desechos, principalmente en escamas y la piel.

Los materiales que son reforzados con OG han proporcionado resultados favorables en la ingeniería de tejidos tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. El OG se asocia a proteínas por medio de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, presenta propiedades antimicrobianas y mecánicas como elasticidad y flexibilidad, por lo que al unirlo con otros materiales, es posible que brinde estas propiedades para potencializar su éxito.

Es necesario realizar pruebas de biocompatibilidad para comprobar que estos materiales no presentarán reacciones adversas al estar en contacto o ser introducidos al organismo. Por lo que el propósito de esta investigación fue evaluar la biocompatibilidad *in vivo* por medio de estudios histológicos de membrana de PCL/OG/COLp y compararla contra una membrana comercial.

3. ANTECEDENTES

3.1 ANTECEDENTES GENERALES

3.1.1 Biocompuestos

Los compuestos son mezclas de materiales en las que se espera conservar las mejores propiedades y disminuir sus desventajas. Cuando se utilizan en el cuerpo humano, se denominan biocompuestos. Los biocompuestos para la ingeniería de tejidos orales y dentales se han desarrollado principalmente mediante el uso de mezclas de materiales en donde se aprovecha su naturaleza compatible (1). En la actualidad, muchos de estos se utilizan para la reparación, reconstrucción y sustitución de tejidos afectados, por tal motivo, deben ser biocompatibles, biodegradables y con ciertas propiedades mecánicas (1,2).

Estructuralmente, los biocompuestos están hechos de biomateriales con un elemento de relleno en la matriz. Estos se clasifican en distintas categorías como biopolímeros naturales y sintéticos (Tabla 1), dependiendo de sus características se aplican en el área médica como implantes, en la administración de fármacos, materiales antimicrobianos, suturas, etc. (3).

Los biocompuestos sintéticos desempeñan un papel importante en la ingeniería de tejidos gracias a los avances tecnológicos y conocimiento de las reacciones biológicas que estos pueden tener. Estos pueden estar formados de dos o más materiales de andamiaje diferentes, como polímeros sintéticos y materiales inorgánicos para lograr que el producto de ingeniería tisular aproveche las ventajas de cada material individual y minimizar sus desventajas (3,4).

Una de las aplicaciones de biocompuestos en Odontología, está enfocada en la ingeniería de tejidos donde se combinan células, biomateriales, factores químicos y biológicos para reparar, mejorar o sustituir tejidos (4). En la cavidad oral existen diferentes situaciones que pueden llevar a la pérdida de hueso alveolar como lo pueden ser las

enfermedades periodontales, procesos infecciosos o traumatismos. En consecuencia, se han empleado diversos biocompuestos como membranas para promover la regeneración de los tejidos orales dañados (5).

Tabla 1. Lista de biopolímeros

Tipo de biopolímero		Ejemplo
Biopolímero natural	Carbohidrato vegetal y animal	Almidón, celulosa, nanocelulosa, agar, quitosano, etc.
	Proteína de origen vegetal	Proteína de soja, zeína de maíz, gluten de trigo, gelatina, colágeno, proteína de suero, caseína.
Polímero sintético biodegradable		Poli (L-lactida), ácido poliglicólico, policaprolactona, succinato de polibutileno, alcohol polivinílico, etc.
Biopolímeros producidos por fermentación microbiana		Polihidroxicanoatos que incluyen poli- β -hidroxibutirato, poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato, etc.

Tomado de Ilyas et al; (3) 2022

3.1.2 Membranas para la Regeneración Tisular Guiada

Las membranas en la regeneración ósea guiada (ROG) se utilizan para actuar como barrera para excluir tejido, como el epitelio gingival y el tejido conectivo que proliferan rápidamente, promoviendo así el crecimiento individual de células capaces de formar hueso. Existen membranas biológicas y sintéticas, según su estructura se pueden clasificar en macroscópicas: laminadas, tubulares, fibrosas; y en microscópicas: según su porosidad que pueden ser densas o porosas y según su configuración pueden ser simétricas y asimétricas (6).

En la actualidad, las membranas son utilizadas en defectos óseos para brindar soporte estructural al sitio del defecto y potencializar la regeneración de tejidos (7). Las membranas deben cumplir características como formar una barrera para evitar que células del epitelio migren a la zona que requiere regeneración ósea, integración tisular, permeabilidad selectiva, resistencia a la compresión de tejidos blandos, plasticidad para

adaptarse a la forma del defecto (8,9), biocompatibilidad, propiedades mecánicas y físicas adecuadas (6,10). La porosidad de la membrana juega un papel importante en la respuesta biológica, el tamaño del poro de la membrana influye en el grado de regeneración ósea porque facilitan la difusión de fluidos, oxígeno, nutrientes y sustancias bioactivas para el crecimiento celular (11), sin embargo, los poros de gran tamaño pueden afectar la regeneración permitiendo que células de los tejidos blandos migren a través de la membrana y puede facilitar la contaminación bacteriana y la unión firme del tejido blando (8), otra característica de las membranas que puede jugar un papel importante en la regeneración de tejidos es el grosor de esta, la colocación de una membrana más gruesa permite un menor crecimiento de tejidos blandos y promueve una mejor formación de hueso (12).

Se pueden identificar dos tipos de membranas: membranas reabsorbibles y no reabsorbibles. Para las membranas no reabsorbibles se requiere de una segunda intervención quirúrgica para la extracción de dicha membrana, mientras que la membrana reabsorbible permanecerá en la zona quirúrgica hasta su degradación (13).

Idealmente, la tasa de biodegradación de las membranas debe coincidir con la tasa de formación de tejido nuevo sin que queden materiales residuales (13). La formación del nuevo tejido involucra tres etapas: de inflamación, fibroblástica y de remodelación. El proceso de inflamación incluye la dilatación de arteriolas y capilares que aumenta el flujo sanguíneo, incremento de la permeabilidad vascular, acumulación de leucocitos en el sitio inflamado y migración celular hacia el tejido intersticial; la etapa fibroblástica, consiste en el incremento y aumento de nuevas células (14), los fibroblastos comienzan con el depósito de grandes cantidades de fibrina y tropocolágeno, esto da lugar a la fase de remodelación que se da con el desarrollo de un tejido estable, similar al tejido previo a la lesión llamado cicatriz, esta etapa tiene una duración aproximada de 2 a 3 semanas. Estos procesos son mediados por diferentes factores inflamatorios y contribuyen a la respuesta inflamatoria del cuerpo (15).

3.1.3 Biocompatibilidad de las membranas para la ingeniería de tejidos

La biocompatibilidad, según la Real Academia española, es la ausencia de reacciones alérgicas, inmunitarias, etc., en el contacto entre los tejidos del organismo y algunos materiales. Se refiere a la capacidad de un biomaterial para desempeñar la función deseada con respecto a una terapia médica, sin provocar ningún efecto local o sistémico indeseable en el receptor o beneficiario de dicha terapia, sino generar la respuesta celular o tisular beneficiosa más adecuada en una situación específica, y optimizar el rendimiento clínicamente relevante de dicha terapia (16).

La norma ISO 10993-1:2018 para la Evaluación Biológica de Productos Sanitarios define la biocompatibilidad como la capacidad de un producto sanitario o de un material para funcionar con una respuesta adecuada del huésped en una aplicación específica. Esta norma fue creada para determinar la respuesta biológica de productos sanitarios y para la protección de las personas frente a los riesgos biológicos derivados de su uso. La función principal de esta norma es servir de marco para planificar la selección y aplicación de pruebas para realizar una evaluación biológica completa de cada producto sanitario (17).

Los materiales dentales utilizados en odontología, según su aplicación, estarán en contacto con tejido óseo, gingival, muscular, mucoso, pulpar, además de fluidos como sangre y saliva, por este motivo deben ser sometidos a diferentes pruebas para determinar su biocompatibilidad (18). La biocompatibilidad de un material va a depender del sitio de colocación, tipo de material y la función que se espera de este (19).

En la regeneración ósea se estudian diferentes compuestos con uno o más biomateriales, tanto naturales como sintéticos de acuerdo con las funciones deseadas. Los principales polímeros naturales en la fabricación de biocompuestos para la regeneración ósea son: quitosano, COL, andamios de seda y alginato (13).

3.1.4 Membrana Bio-Gide®

La membrana Bio-Gide® está compuesta de COL de origen porcino, es reabsorbible, con características de elasticidad, biocompatibilidad e hidrofílica. Esta membrana presenta una estructura de bicapa que cumple la función de barrera para evitar la invasión de tejido blando en el sitio de la regeneración. Presenta un tiempo de reabsorción de 8 a 10 semanas y presenta beneficios como la posibilidad de suturarse a otros tejidos, ofrece irrigación completa al injerto gracias a la vascularización temprana, según los estudios es usada para RTG, ROG, regeneración de tejidos periodontales, periimplantaria, aumento de reborde y regeneración post extracción (20,21). Es una membrana que cumple con todas las características necesarias para el éxito de la regeneración (20).

3.1.5 Colágeno

En las últimas décadas, la investigación se ha centrado en el desarrollo de membranas de barrera y polímeros, el COL y los poliésteres alifáticos son los más investigados (22). El COL es una proteína natural que abunda en la piel, los tendones, el cartílago y los huesos de los animales, es responsable de la integridad estructural de muchos tejidos (23) y principalmente se clasifican en 4 tipos (22,23) (Tabla 2).

Tabla 2. Principales tipos de colágeno

Colágeno tipo I	90 % del colágeno total, que se encuentra principalmente en todos los tejidos conectivos principales, como la piel, los tendones, los ligamentos, los huesos, la córnea y el tejido conectivo periodontal
Colágeno tipo II	Se encuentra en cartílagos, discos intervertebrales y cuerpo vítreo
Colágeno tipo III	Se encuentra principalmente en el sistema cardiovascular y el tejido de granulación
Colágeno tipo IV	En la membrana basal

Tomado de Sylvie et al. (23) 2011

El COL forma la fase orgánica principal de hueso natural y juega un papel vital al servir como plantilla y también al proporcionar sitios de nucleación para el crecimiento óseo *in vivo* (24). Posee muchas características estructurales como inmunogenicidad,

capacidad hemostática, acción química sobre células regenerativas como fibroblastos y osteoblastos y buena estabilidad dimensional (25).

El COL tipo I se ha usado como componente principal en diversas membranas para la RTG que se basa en la capacidad de la membrana para excluir las células del epitelio con el fin de aumentar la capacidad de regeneración del tejido óseo dañado (23,26).

Las membranas de COL presentan propiedades buenas a la tracción y al desgarro, al igual que buena adaptación a los contornos de la superficie, para su preparación, el COL pasa por un proceso de limpieza de varias etapas que elimina las proteínas no colágenas y componentes antígenos, para obtener la neutralización y desantigenización y al final se aplica liofilización y esterilización (27). Se ha mostrado que las membranas de COL porcino tipo I y III, son biocompatibles e inertes, sin provocar inflamación o daño al cuerpo al promover el proceso de regeneración ósea (27,28).

El suministro de COL extraído de mamíferos se ha limitado y se obtiene principalmente de tendones y pieles de bovinos y porcinos. Esto ha llevado a problemas que incluyen enfermedades infecciosas, preocupaciones ambientales, aumento de alergias y también ha sido problemático por razones religiosas, por tal motivo se ha empezado a extraer de fuentes marinas, principalmente de los subproductos de los peces como la piel, las escamas y huesos (29). El COL de piel de peces marinos de agua fría es más soluble en ácido y tiene un bajo contenido de aminoácidos y un alto nivel de interacción con el calcio en comparación con el procedente de mamíferos, esto ha hecho que el COLp se encuentre en estudio para la biomedicina (30).

3.1.6 COL de piel de pescado

La piel de pescado es una alternativa para la obtención de COL, con aplicaciones dentro de la cosmética, ingeniería de tejidos, y usos farmacéuticos. Este COL muestra ventajas como la rápida absorción en el cuerpo debido a su menor peso molecular, así mismo, está más disponible en comparación del obtenido por otros animales (24,30).

Existen estudios que demuestran efectos positivos de las membranas y andamios de COLp que se utilizan para curar el tejido de la piel, así mismo, estos se han estudiado en conjunto con otros biomateriales y se han demostrado propiedades antibacterianas, biocompatibles y capacidad para acelerar el proceso de curación en la zona lesionada (30,31).

3.1.7 Óxido de grafeno

El grafeno es una estructura de carbono bidimensional con flexibilidad al formar enlaces químicos con propiedades favorables en medicina. Sin embargo, algunas de sus propiedades están limitadas (32), por lo contrario, el grafeno oxidado (óxido de grafeno) es altamente dispersable en sustancias biológicas debido a sus grupos hidroxilo, carboxilo y carbonilo, que agregan propiedades como la actividad antibacteriana, liberación de fármacos, alta conductividad térmica, capacidad para interactuar con biomoléculas y presenta efectividad en la regeneración de tejidos, es un material prometedor en el desarrollo de nuevas terapias médicas. (33).

La citotoxicidad del grafeno y sus derivados esta influenciada por factores como la concentración, forma, tamaño, dispersabilidad y funcionalización de la superficie. Diferentes estudios *in vitro* han demostrado que su citotoxicidad es expresada por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) con daño a la membrana celular de bacterias (34,35).

A pesar de esta citotoxicidad reportada, el impacto del OG en el desarrollo osteogénico es positivo siempre que la concentración de OG no sea alta y cuando sus propiedades son sumadas a las de otros biopolímeros (36,37).

3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Neto et al. evaluaron la biocompatibilidad y biodegradabilidad de una membrana de COL bovino y la compararon con una membrana de COL porcino Bio-Gide implantada

en el tejido subcutáneo de 30 ratones Balb-C tanto machos como hembras de 50 días de edad. Se dividieron aleatoriamente en tres grupos y se subdividieron según los periodos experimentales. Concluyeron que ambas membranas se consideraron biocompatibles ya que sus reacciones tisulares fueron compatibles con el proceso inflamatorio fisiológico, además, la membrana Bio-Gide favoreció el proceso de regeneración ósea guiada (38).

Raghavankutty et al. estudiaron las características del COL de piel de pescado y quitosano. Ellos caracterizaron y sintetizaron los polímeros, evaluaron la biocompatibilidad con estudios de hemocompatibilidad y citocompatibilidad. Los resultados confirman la capacidad de ambos polímeros para favorecer el crecimiento y la proliferación celular (39).

Pinho et al. prepararon películas poliméricas de soluciones de COL y quitosano extraídas de descartes pesqueros e investigaron la citotoxicidad y actividad inmunomodulador en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). Las células mononucleares se aislaron y se trataron con soluciones de quitosano, COL y quitosano-COL, para medir los cambios en la viabilidad celular, potencial de membrana mitocondrial, niveles de ROS, activación de linfocitos T y producción de citocinas. Los resultados mostraron que la interacción de COL y quitosano no tiene efectos citotóxicos. Ellos concluyen que los biomateriales a base de quitosano/COL producen efectos inmunoestimuladores en células mononucleares con potencial para enfoques biomédicos (40).

En defectos calvariales de ratas, Sang Lau et al. evaluaron el rendimiento *in vivo* de membranas de COL de tilapia. Trataron la piel de tilapia por medios químicos y enzimáticos, lo caracterizaron y lo evaluaron *in vitro* e *in vivo* para determinar su compatibilidad biológica. Los resultados demostraron que los andamios promovían la actividad metabólica celular, la diferenciación y la mineralización de la célula preosteogénica de rata (41).

Mihail et al. en su estudio, evaluaron la biocompatibilidad de un nuevo biocompuesto de quitosano y gelatina de pescado reticulado con genipina y cargado con

diferentes concentraciones de OG. Los compuestos al presentar porosidad mimetizan la estructura ósea. Este material lo implantaron en ratones CD1 de 6 semanas de edad para evaluar la actividad inflamatoria y la biocompatibilidad. Sus ensayos de biocompatibilidad *in vitro* demostraron una interacción beneficiosa general entre los preosteoblastos y, estos compuestos en particular mejoraron con una composición reforzada de OG al 0,5%. Concluyen que el uso de OG permite a las células adherirse y crecer de forma significativa (42).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Actualmente la pérdida prematura de los órganos dentarios, las necesidades protésicas para futuras restauraciones, traumatismos y patologías en la cavidad oral pueden dejar defectos óseos críticos con la necesidad de regeneración ósea. Existen biocompuestos que favorecen la cicatrización y formación de hueso en el defecto. La gran demanda de estos, llevan a la necesidad de crear biocompuestos como membranas que cumplan con características específicas como la biocompatibilidad, promoción de la cicatrización, la regeneración ósea y que sean de bajo costo, estas membranas deben ser caracterizadas y evaluadas.

El suministro de COL extraído de mamíferos se ha limitado y se obtiene principalmente de tendones y pieles de bovinos y porcinos. Esto ha llevado a problemas que incluyen enfermedades infecciosas, preocupaciones ambientales, aumento de alergias y también ha sido problemático por razones religiosas, por tal motivo, esta proteína se ha extraído de otras fuentes, principalmente de los subproductos de los peces como la piel, las escamas y huesos. Así mismo, al unir el COL con OG, muestra potencial en áreas de la medicina. Sus propiedades antibacterianas lo hacen útil en recubrimientos para prevenir infecciones. Además, su capacidad para interactuar favorablemente con otros polímeros. lo convierte en una herramienta versátil en diagnóstico y tratamiento. Su uso en sensores biomédicos promete avances en detección temprana de enfermedades y monitoreo de biomarcadores.

Lo anterior lleva a plantear la siguiente **pregunta de investigación:**

¿Es biocompatible la membrana de PCL/OG/COLp en un modelo murino?

5. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación está anidada a un proyecto general en el que se investigan las propiedades del COLp y OG para la regeneración ósea. Se investiga al COLp como una alternativa sustentable, económica y accesible para todo tipo de pacientes mientras que el OG es un material prometedor al que se le atribuyen propiedades como resistencia y dureza, buen conductor térmico y eléctrico, bactericida, biocompatible, reacciona con otras sustancias con gran potencial de desarrollo. En este caso, el estudio se basa en realizar las pruebas de biocompatibilidad que van a aportar información acerca de la viabilidad de las membranas de COLp y OG, de tal manera, que se pueda evidenciar su posible uso en humanos sin provocar una respuesta adversa, aunado a esto, la forma de obtención del COLp hace que dichas membranas tengan un costo accesible, lo que lleva a que un mayor número de personas que requieren de regeneración ósea guiada debido a traumas, pérdida de dientes o patologías con secuelas de defectos óseos, puedan acceder a éstas con facilidad y garantía de funcionalidad.

6. HIPÓTESIS

Hipótesis científica (Hi)

La membrana de PCL/OG/COLp es biocompatible en un modelo murino.

Hipótesis nula (Ho)

La membrana de PCL/OG/COLp no es biocompatible en un modelo murino.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Analizar la biocompatibilidad de las membranas de PCL (30%) - OG (2%) - COLp (4%) en un modelo murino y comparar contra una membrana comercial.

7.2 Objetivos específicos

- Examinar histológicamente la respuesta de biocompatibilidad de las membranas de PCL/OG/COLp, PCL y PCL/OG en el modelo murino: ratas macho de la cepa Wistar.
- Comparar la biocompatibilidad de membranas de PCL/OG/COLp contra membrana comercial, membrana de PCL/OG y membrana de PCL a los 7, 21 y 63 días.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Diseño del estudio

- De acuerdo con la intervención del investigador: Cuasiexperimental
- De acuerdo con la evolución del fenómeno en el tiempo: Prospectivo
- De acuerdo con el número de mediciones: Longitudinal
- De acuerdo con el número de variables: Analítico

8.2 Población muestra

8.2.1 Definición de la población de estudio para el modelo animal

Dieciocho ratas macho de la sepa Wistar con 4 meses de edad y peso promedio de 300 – 400 gramos suministradas del Bioterios Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). El cálculo de la “n” se realizó basándose en la propuesta por Rojo en 2014 y en la NOM-062-ZOO-1999 que menciona la importancia de reducir al menor número de animales para cada investigación. Además, se empleó el principio propuesto en los años 60 por dos biólogos británicos, Russel y Burch, en su obra "*The Principles of Humane Experimental Technique*", que aboga por la aplicación de las tres erres: reemplazar, reducir y refinar. Según esta fórmula, se obtuvo un resultado de 5.5 ratas por grupo, lo que, al aproximarlos, equivale a 6 ratas por grupo (Tabla 3) (43, 44, 45).

Tabla 3. Grupos de estudio con sus abreviaturas correspondientes

Grupo	Descripción
7 días	Grupo con la aplicación de las 4 membranas PCL, PCL/OG, PCL/OG/COLp y BG + un grupo control. Evaluación a los 7 días posteriores a la implantación.
21 días	Grupo con la aplicación de las 4 membranas PCL, PCL/OG, PCL/OG/COLp y BG + un grupo control. Evaluación a los 21 días posteriores a la implantación.

63 días	Grupo con la aplicación de las 4 membranas PCL, PCL/OG, PCL/OG/COLp Y BG + un grupo control. Evaluación a los 63 días posteriores a la implantación.
---------	--

Durante toda la fase experimental las ratas se mantuvieron en el bioterio con las condiciones estipuladas en la Norma 062-1999 donde habla del cuidado y uso de los animales de laboratorio (44). Durante este periodo se realizó un control de peso en cada rata.

8.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

8.3.1 Inclusión

Ratas macho que cumplieron con la edad y peso específico.

8.3.2 Exclusión

Animales con alguna enfermedad o lesión preexistente en la piel.

8.3.3 Eliminación

Infección de la zona quirúrgica, animales que enfermaron durante el estudio, o que hayan perdido más del 30% de su peso corporal.

8.4 VARIABLES

Tabla 4. Variables

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Categoría	Escala
----------	------------------	-----------------------	------------------------	-----------	--------

Membrana	Independiente	Capa de poco espesor que adquiere fácil movilidad y es observada mayormente para crear secciones de separación o adhesión.	Membrana compuesta de los biomateriales en estudio: COL, OG, COL-OG y Bio-Gide.	Cualitativa, nominal policotómica.	Dicotómica
Tiempo de exposición la membrana	Independiente	Período durante el que se desarrolla una acción o proceso.	El periodo al que estuvo expuesta la rata a la membrana; 7, 21 y 63 días.	Cuantitativa, razón, discreta.	Dicotómica
Biocompatibilidad	Dependiente	Ausencia de reacciones alérgicas, inmunitarias, etc., en el contacto entre los tejidos del organismo y algún material.	Conteo celular de la respuesta inmune del modelo animal ante la membrana en estudio.	Cuantitativa, razón y discreta.	Continua

8.5 CONCORDANCIA Y FIABILIDAD

La tesista tomó una capacitación para el manejo y cuidado de animales de laboratorio y fue supervisada por la responsable del proyecto. Se estandarizó la técnica para la escisión quirúrgica en el dorso de la rata donde se colocaron las membranas, este procedimiento fue supervisado por el responsable del bioterio Claude Bernard, el Dr. Francisco J. Collazo. Se utilizó la prueba estadística CCI (coeficiente de correlación intraclass o coeficiente de Pearson), esto determina la confiabilidad, reproducibilidad y concordancia entre las mediciones (nivel de significancia 5% =0.05). El gold estándar fueron las medidas que registró el experto, quien tiene mayor experiencia, destreza y habilidad, por tanto, al replicarse o al existir un nivel aceptable entre el índice de las medidas del tesista con las del experto, se procedió a colocar las membranas en las ratas seleccionados para el estudio. El mismo procedimiento de concordancia y fiabilidad se realizó para el estudio histopatológico.

8.6 UBICACIÓN ESPACIO-TIEMPO

- 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

8.7 PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN

8.7.1 Anestesia y procedimiento quirúrgico

Se evaluaron en diferentes periodos, a los 7 días, 21 días y 63 días las cuatro membranas repartidas de la siguiente manera; grupo uno: membrana de PCL, grupo dos: PCL/OG, grupo tres: PCL/OG/COLp, grupo cuatro: BG y el grupo cinco fue el grupo control donde se realizó el procedimiento quirúrgico sin colocación de membrana.

Las ratas se mantuvieron con un ayuno de 8 horas previas al tratamiento quirúrgico, después fueron sometidas a anestesia por vía intraperitoneal, se utilizó una aguja calibre 21G para inyectar 0,2 ml de la solución anestésica ketamina/xilacina (Ketamina®, Aranda, México) (Xilazina®, Cheminova, México), (40-90 mg/kg Ketamina + 5-15mg/kg xilacina), ya que la rata no presentó reflejos, se realizó una tricotomía y desinfección con antiséptico (Microdacyn®, Invekra, México) posteriormente se aisló el área quirúrgica (39).

Se realizaron 5 incisiones rectilíneas de 1 cm de longitud en el dorso de la rata con una distancia de 1.5 cm entre cada una de ellas, se utilizó una hoja de bisturí del número 15. Posteriormente, se realizó la separación entre la piel y la fascia muscular con tijeras romas hasta exponer el tejido subcutáneo para después colocar la membrana de un tamaño de 1cm² (38) (Figura 1).

Las membranas fueron sumergidas en solución fisiológica de cloruro de sodio al 0,9% para facilitar la colocación. Las incisiones se suturaron con hilo nylon 5.0 y posterior antisepsia con gasa con solución alcohólica de clorhexidina al 2% para reducir contaminación secundaria (Figura 2).

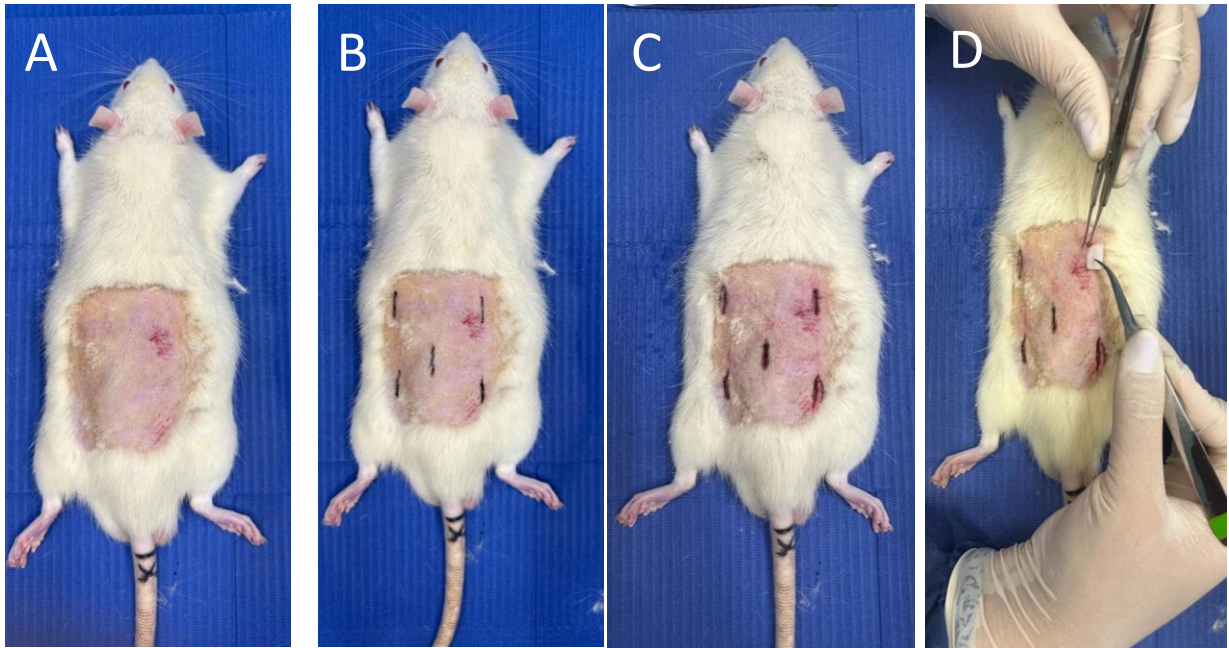


Figura 1. Procedimiento para la implantación de las membranas. (A) Tricotomía y limpieza de la zona, (B) distribución de la zona quirúrgica, (C) incisiones rectilíneas de 1 cm, (D) implantación de la membrana respectivamente. Fuente propia.

Los animales se mantuvieron en aislamiento durante el postoperatorio y fueron diariamente evaluados para registrar cualquier complicación postoperatoria.

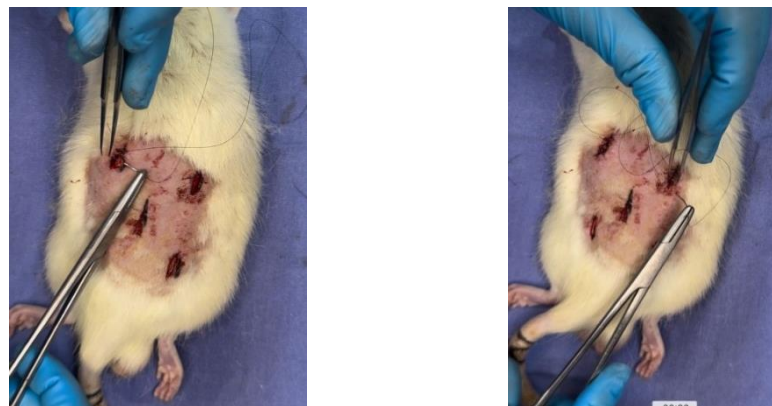


Figura 2. Sutura de cada incisión con hilo Nylon 5.0. Fuente propia.

8.7.2. Recolección de la muestra

Según el grupo experimental de 7, 21 y 63 días, las seis ratas de cada grupo recibieron una dosis letal de 150mg/kg de pentobarbital y lidocaína para la eutanasia. Posteriormente se tomaron las muestras de los sitios de implantación de las membranas y de tejido circundante. La muestra fue extraída con una hoja de bisturí del umero 15 y tijeras con extremo romo con 5mm de margen de seguridad (figura 3).

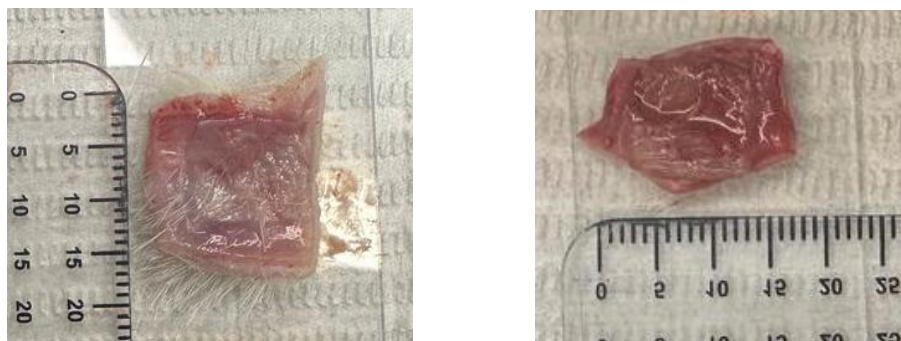


Figura 3. Obtención de la muestra con 5 mm de margen de seguridad posterior a 7 días de la implantación. Fuente propia.

8.7.3 Análisis histológico

Todas las muestras se fijaron en formol al 10% durante 24 horas. Después de haber fijado y eliminado el fijador de deshidrató la muestra a través de una aplicación gradual de soluciones acuosas con agentes deshidratantes con un equipo de procesador automático (Histokinett). Posterior a esto, las muestras fueron colocadas en parafina y cortadas en secciones de 5 micras de espesor, una vez obteniendo este resultado se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) para evaluación con microscopía óptica (46) (Figura 4).

8.7.4 Análisis Descriptivo Microscópico

Las imágenes analizadas fueron obtenidas mediante el uso de una cámara conectada al microscopio óptico, se emplearon aumentos de 40x y 100x para una observación general del área de interés, y de 200x para una visualización detallada de

las estructuras celulares y tisulares. Se examinó cada portaobjetos para determinar la presencia, cantidad y tipo de infiltrado inflamatorio en la interfaz membrana-tejido (Figura 5).

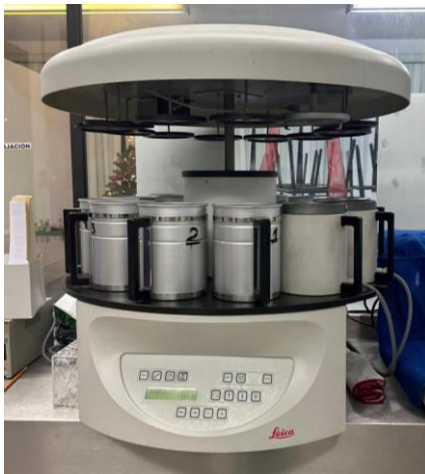


Figura 4. Procesamiento histológico con Histokinett y tinción de hematoxilina y eosina (HE). Fuente propia.

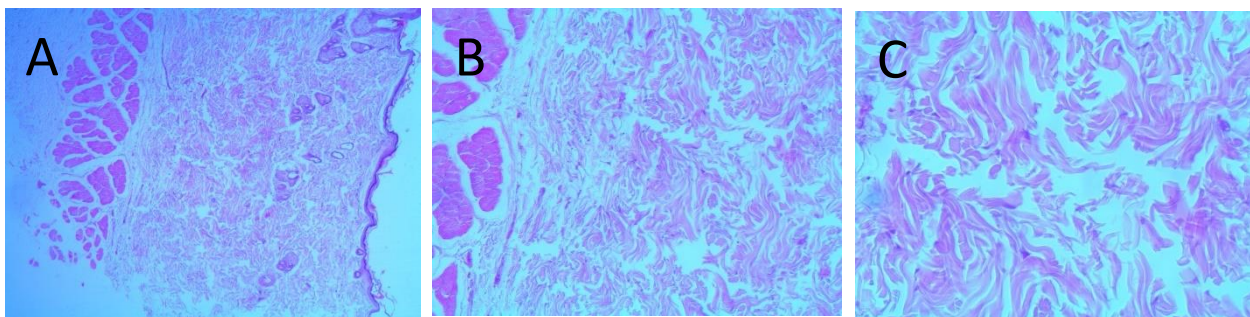


Figura 5. Microfotografías representativas de lesión subcutánea después de 63 días a un aumento de (A) 40x, (B) 100x y (C) 200x. Fuente propia.

8.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron vaciados en Excel 2016 y después se llevaron al programa Graph Prisma 5. Para evaluar la diferencia entre los grupos, después de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (interacción y tiempo de observación) con post-test de Bonferroni, con diferencia significativa de $p < 0.05$.

8.9 LOGÍSTICA

8.9.1 Recursos humanos

Director de tesis, director metodológico, director disciplinario y estudiante de maestría.

8.9.2 Recursos materiales

- Materiales utilizados:
- Membranas de PCL, PCL/OG y PCL/OG/COLp previamente elaboradas.
- Membrana Bio-Gide
- Anestesia
- Estuche de disección
- Analgésicos
- Antimicrobiano
- Histokinett
- Reactivos para inclusión en parafina
- Reactivos para tinción de Hematoxilina y eosina
- Microscopio estereoscópico
- Cámara canon con lente macro
- Computadora portátil
- Memoria externa
- Alimento para ratas

9. BIOÉTICA

Los sujetos de estudio fueron manipulados y cuidados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (44).

Los efectos locales se evaluaron mediante la comparación de la respuesta del tejido causada por una muestra de ensayo y la causada por los materiales de control utilizados en los productos sanitarios cuyas características de aceptabilidad clínica y biocompatibilidad han sido establecidas (39).

El manejo de los animales de laboratorio de este proyecto fue supervisado por el médico veterinario responsable del Bioterio Francisco Collazo responsable del Bioterio Claude Bernard de la BUAP, con cédula profesional: 6519572.

10. RESULTADOS

10.1 Respuesta tisular / hallazgos macroscópicos

Los grupos experimentales respondieron favorablemente al procedimiento pre y postquirúrgico, no se observaron complicaciones que pudieran comprometer los resultados de este estudio. Sin embargo, se observaron respuestas inmediatas de inflamación local en zonas específicas. En el 25% de las ratas se observó inflamación inmediata en la zona de la implantación de la membrana de PCL en comparación con el resto de las zonas de implantación (Figura 6). Esta respuesta se mantuvo 24 horas posteriores a la cirugía, después de este tiempo las 5 zonas quirúrgicas presentaron las mismas características macroscópicas comparadas con la zona donde se realizó el acto quirúrgico sin colocación de membrana (C-).



Figura 6. Respuesta inflamatoria inmediata en la zona de la implantación de membrana PCL. Fuente propia.

Al recolectar las muestras, se observó que a los 7 y 21 días las membranas eran visibles a diferencia de las muestras correspondientes a la membrana PCL/OG/COLp y la membrana BG que no eran tan visibles clínicamente. Al recolectar las muestras de los 63 días, la membrana PCL/OG/COLp aún presentaba fragmentos en comparación de la membrana BG que era clínicamente imperceptible.

10.2 Respuesta tisular / hallazgos microscópicos

La evaluación de las muestras a los 7 días posteriores a la implantación mostró que las membranas eran visibles dentro del lecho de implantación. Al analizar los resultados se observó que el grupo PCL/OG/COLp presentó un mayor número de linfocitos en comparación del grupo C-, PCL, PCL/OG, y BG siendo GB y C- el grupo con menor número de linfocitos, la presencia de macrófagos fue similar en los 5 grupos donde PCL/OG/COLp presentó mayor similitud en comparación con C- y BG. En el caso de los eritrocitos y vasos sanguíneos, la respuesta en cada grupo fue diferente, el grupo PCL/OG/COLp presentó mayor número de eritrocitos en comparación con C-, PCL, PCL/OG y BG lo que determinó mayor diferencia entre PCL/OG/COLp contra BG (Figura 7).

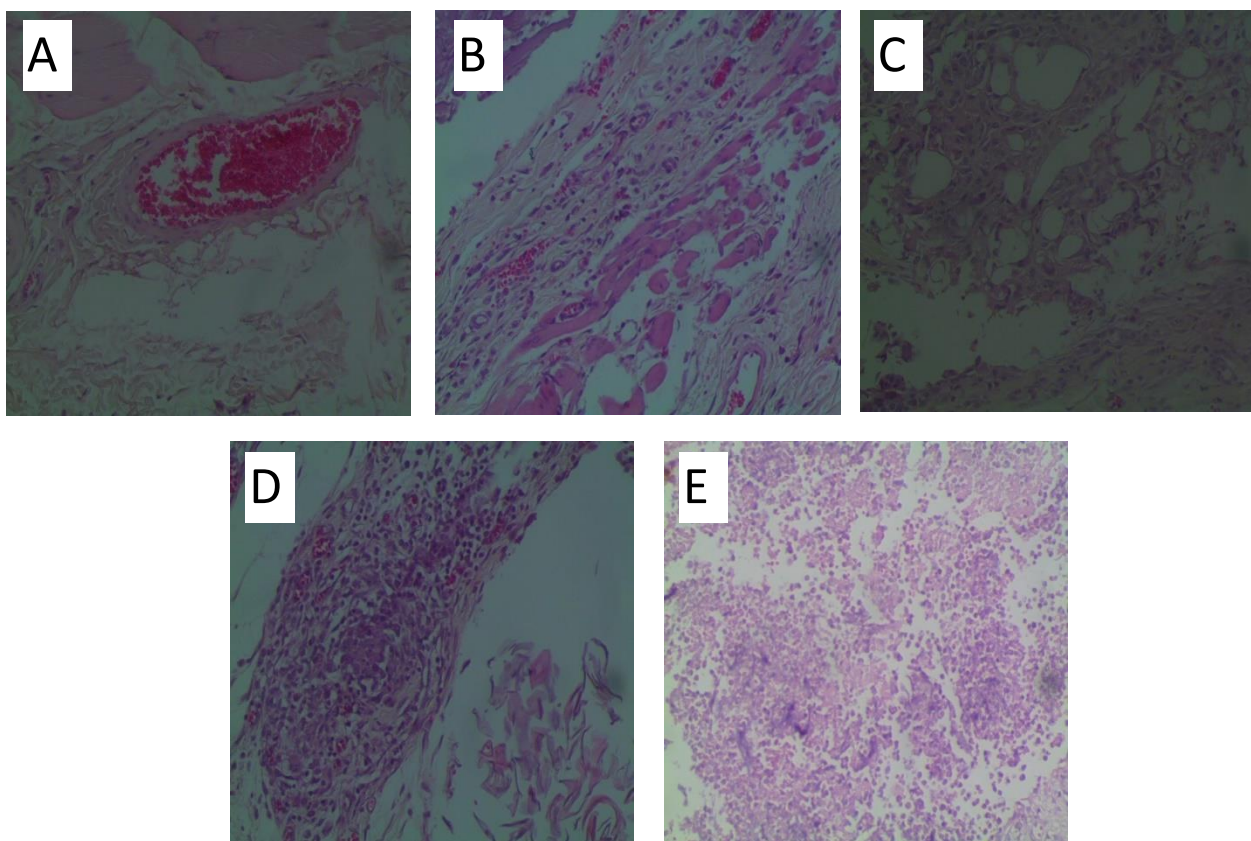


Figura 7. Microfotografías representativas de la lesión subcutánea después de 7 días. Sección histológica teñida con hematoxilina/eosina de la región de la incisión en los grupos: (A) C-, (B) PCL, (C)PCL/OG, (D) PCL/OG/COLp y (E) BG. Fuente propia.

La evaluación histopatológica mostró que a los 21 días después de la implantación aun eran detectables las membranas y no había presencia de una respuesta inflamatoria exagerada. Cada grupo contenía una cantidad similar de linfocitos, macrófagos eritrocitos

y vasos sanguíneos. Sin embargo, al comparar entre grupos, PCL/OG/COLp presentó un menor número de linfocitos que PCL y PCL/OG mientras que la cantidad de linfocitos en comparación con el grupo control era similar y esta misma situación ocurrió con la presencia de macrófagos. Los eritrocitos y vasos sanguíneos presentes en las muestras se encontraban aumentados significativamente en el grupo PCL mientras que PCL/OG-COLp, y BG tenían la misma cantidad de eritrocitos. Un hallazgo importante es que PCL/OG/COLp mostró presencia de pocas fibras colágenas, que es similar a lo que se observó en las muestras del grupo C- y BG (Figura 8).

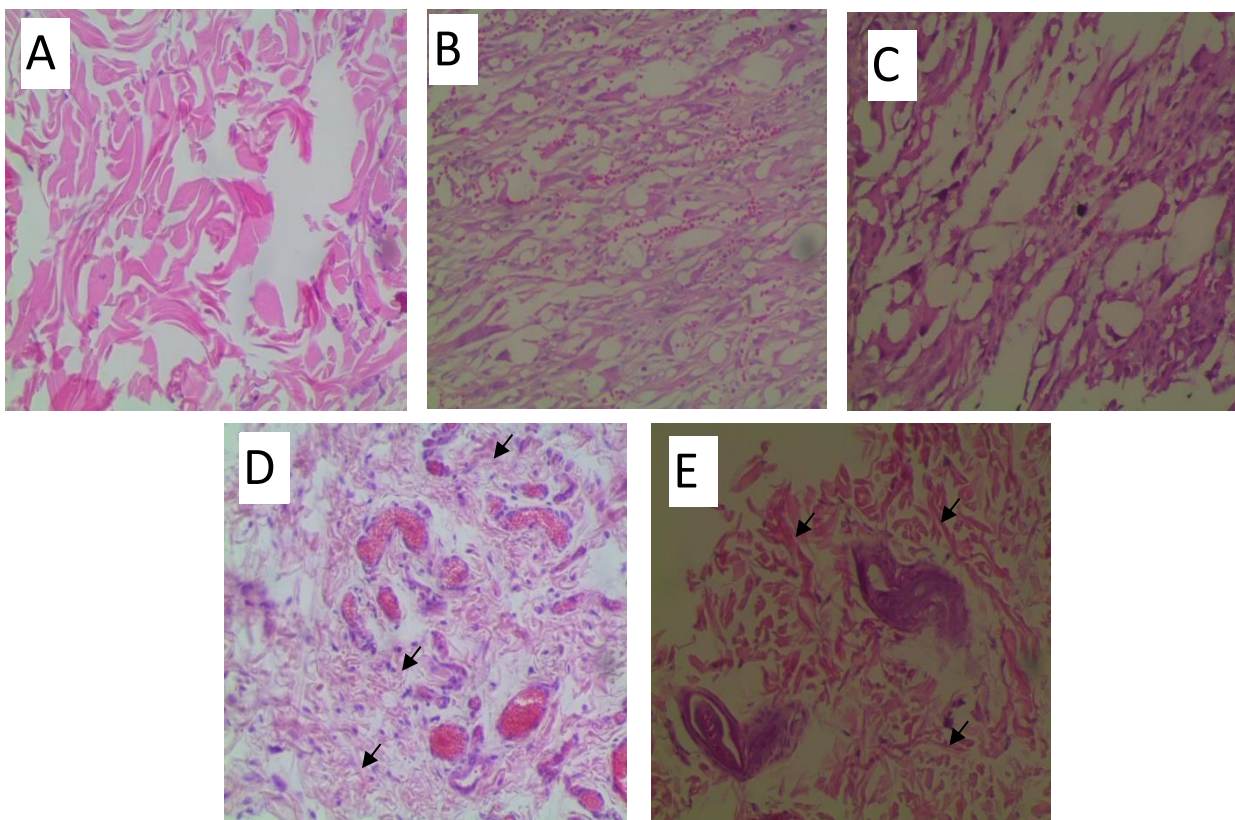


Figura 8. Microfotografías representativas de la lesión subcutánea después de 21 días. Sección histológica teñida con hematoxilina/eosina de la región de la incisión en los grupos: (A) C-, (B) PCL, (C)PCL/OG, (D) PCL/OG/COLp y (E) BG. Las flechas marcan la presencia de fibras colágenas en los grupos correspondientes. Fuente propia.

La evaluación histopatológica a los 63 días mostró que disminuyó la presencia de linfocitos en todos los grupos. El número de macrófagos y vasos sanguíneos aumentó en el grupo PCL y PCL/OG lo que sugiere una respuesta inflamatoria crónica y mayor angiogénesis, las membranas BG Y PCL/OG/COLp eran casi indetectables en

comparación con las membranas PCL y PCL/OG. Para el lapso de este periodo el grupo control tenía mínima presencia de linfocitos, macrófagos, eritrocitos y vasos sanguíneos, su característica principal era la presencia de fibras colágenas y fibroblastos, situación similar al grupo PCL/OG/COLp y BG (Figura 9).

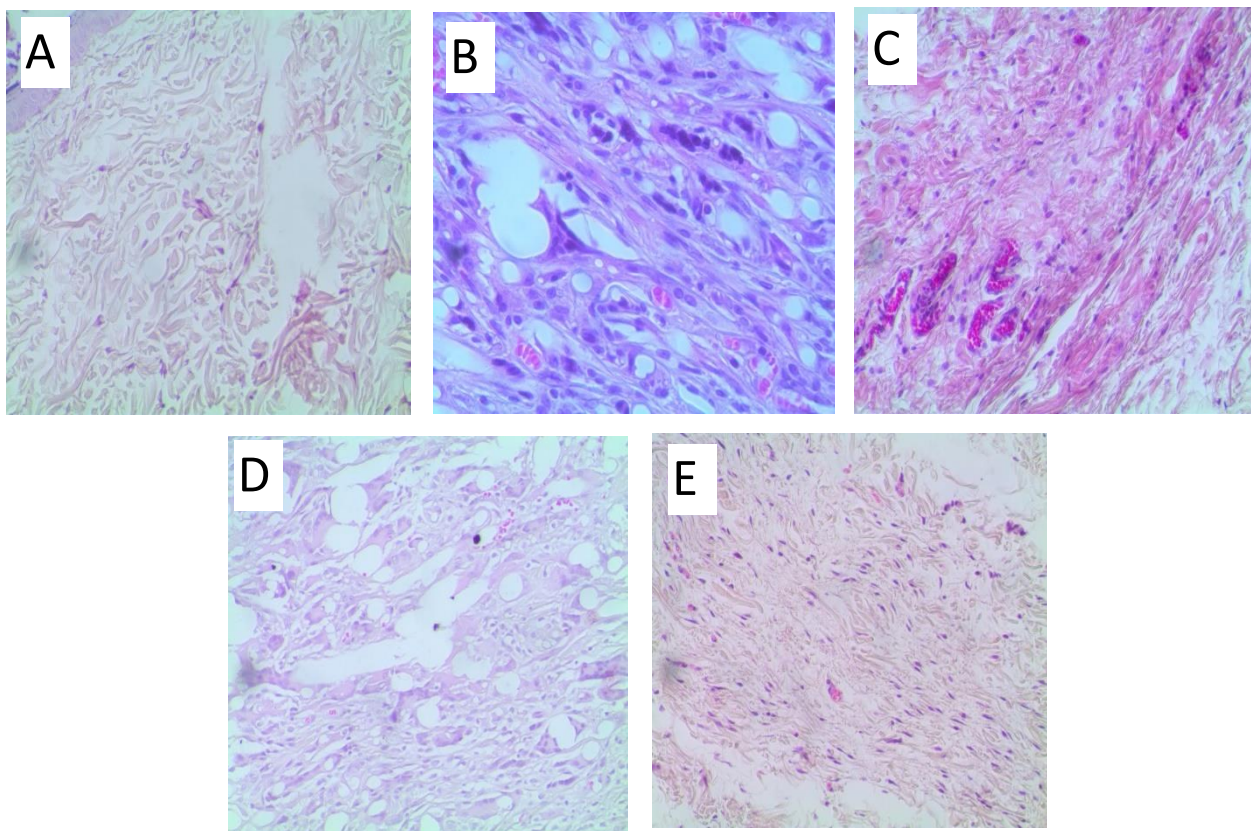


Figura 9. Microfotografías representativas de la lesión subcutánea después de 21 días. Sección histológica teñida con hematoxilina/eosina de la región de la incisión en los grupos: (A) C-, (B) PCL, (C)PCL/OG, (D) PCL/OG/COLp y (E) BG.

Al evaluar la presencia de linfocitos a una amplificación de 200x se encontró diferencia significativa entre el grupo de PCL/OG/COLp contra el grupo PCL ($p < 0.01$), C- ($p < 0.001$) y BG ($p < 0.001$) a los 7 días, mientras que a los 21 días la diferencia significativa del grupo PCL/OG/COLp contra el grupo BG ($p < 0.001$), por lo contrario, en la evaluación a los 63 días no existió diferencia entre los grupos (Figura 10).

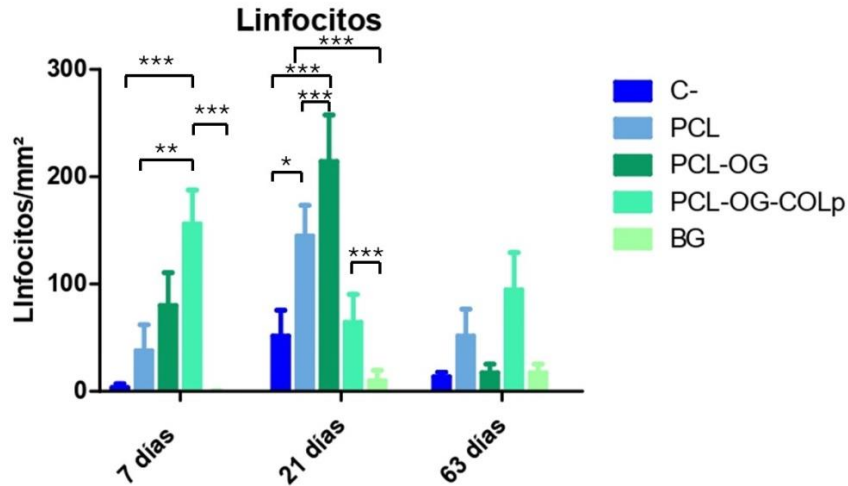


Figura 10. Linfocitos/mm² en las muestras correspondientes a las membranas C-, PCL, PCL/OG, PCL/OG/COLp y BG. Análisis estadístico de los resultados ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: p<0.05 (*), p<0.01 (**) y p<0.001(***)

Al analizar la presencia de macrófagos en los 3 periodos posteriores a la implantación (7, 21 y 63 días), no se encontró diferencia significativa entre el grupo PCL/OG/COLp contra el resto de los grupos. Por otra parte, el grupo BG si mostró diferencias significativas contra el grupo PCL y PCL/OG a los 21 y 63 días (Figura 11).

Se encontró diferencia significativa en el número de eritrocitos presentes en las muestras del grupo PCL/OG/COLp contra grupo PCL (p<0.05) y GB (p<0.01) a los 7 días, a los 21 días la diferencia significativa se observó entre PCL y PCL/OG/COLp (p<0.01) así como PCL y GB (p<0.01), mientras que en la evaluación a los 63 días disminuyó el número de eritrocitos sin diferencias significativas entre los grupos (Figura 12).

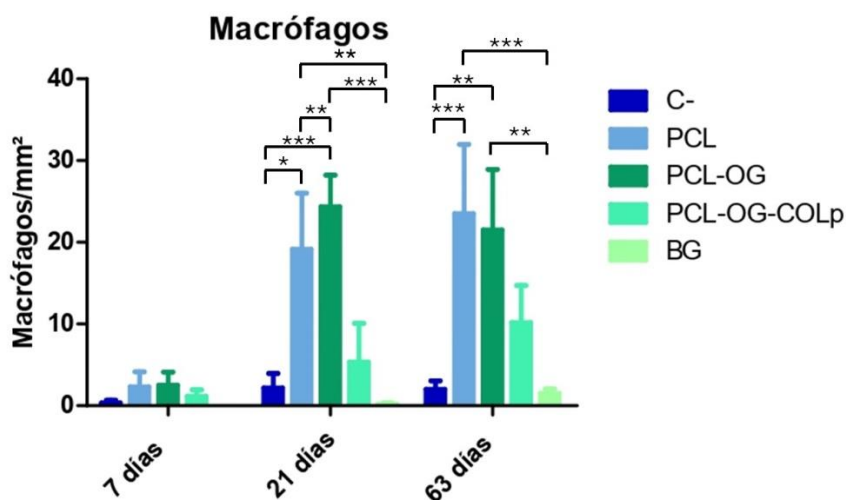


Figura 11. Macrófagos/mm² en las muestras correspondientes a las membranas C-, PCL, PCL/OG, PCL/OG/COLp y BG. Análisis estadístico de los resultados ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***).

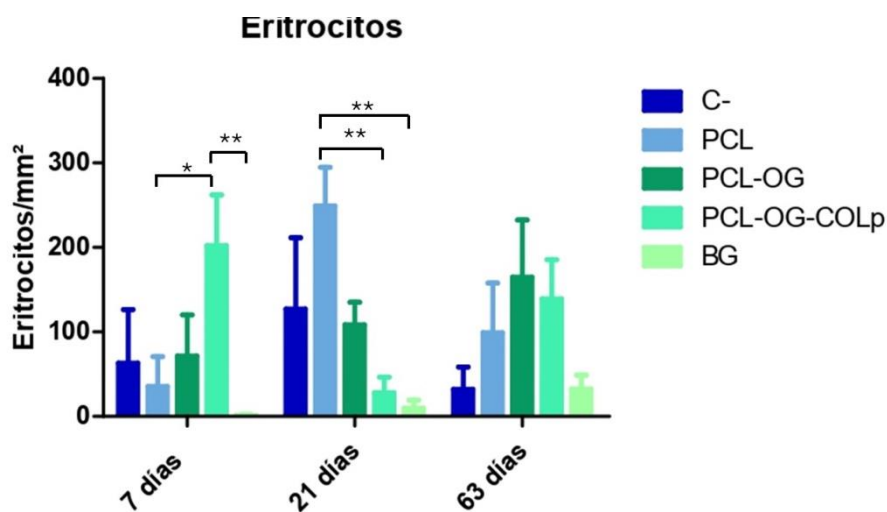


Figura 12. Eritrocitos/mm² en las muestras correspondientes a las membranas C-, PCL, PCL-OG, PCL/OG/COLp y BG. Análisis estadístico de los resultados ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***).

La formación de vasos sanguíneos es fundamental para proporcionar nutrientes y oxígeno a las células del tejido lesionado, así como eliminar productos de desecho, al examinar la presencia de vasos sanguíneos en los diferentes grupos no se encontró diferencia significativa entre los grupos a los 7 días, sin embargo, los grupos

PCL/OG/COLp y BG mostraron una diferencia significativa de ($p < 0.001$) contra el grupo PCL. En la evaluación a los 63 días el grupo BG presentó diferencia significativa contra el grupo PCL y PCL/OG (Figura 13).

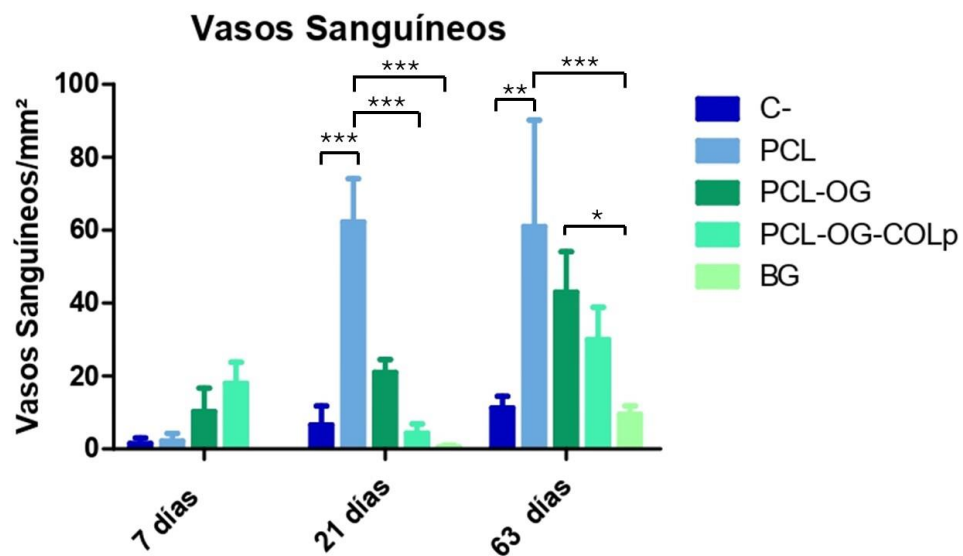


Figura 13. Vasos sanguíneos/mm² en las muestras correspondiente a las membranas C-, PCL, PCL/OG, PCL/OG/COLp y BG. Análisis estadístico de los resultados ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***).

11. DISCUSIÓN

El presente estudio se basó en la evaluación semicuantitativa de la biocompatibilidad *in vivo* de membranas de PCL/OG/COLp en comparación de sus correspondientes controles incluida la membrana comercial (BG). Se evaluó la cantidad de células proinflamatorias presentes en el tejido epitelial posteriores a la implantación de la membrana, a los 7, 21 y 63 días. En el estudio se eligió un modelo murino para la implantación de la membrana de forma subcutánea en la zona dorsal, debido a su facilidad de manipulación, obtención de la muestra y bajo costo, se respetó la Norma 062 que da las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (45).

Este tipo de membrana podría estar indicada para la ROG, para actuar como una barrera que permita la proliferación celular aislada de los diferentes tejidos. Este estudio no evalúa su eficacia como barrera, sino que permite la evaluación de la biocompatibilidad de las membranas, ya que es importante comprender como responde el tejido ante la presencia de diversos biomateriales y disminuir el rechazo biológico.

Se determinó que la respuesta celular inflamatoria provocada por la membrana PCL/OG/COLp es similar a la respuesta obtenida por la membrana BG y que ambas membranas tienen una respuesta parecida al grupo sin membrana C-. A pesar de que la membrana propuesta tiene una respuesta favorable, las membranas que no contienen COLp no presentaron la misma respuesta de biocompatibilidad. Esto está relacionado a lo mencionado por Hui et al. en 2019, quienes elaboraron una membrana de poliácido láctico-co-glicólico reforzado con COL de origen marino para la regeneración ósea y destacaron al COL como una proteína abundante en el cuerpo y principal constituyente de la matriz celular de la mayoría de los tejidos con propiedades como biodegradabilidad, bioabsorbibilidad y no citotoxicidad, por lo tanto, se usa como ingrediente activo para modificar otros biomateriales, ellos concluyen que las características del COLp mejoran las propiedades de la membrana con resultados de biocompatibilidad (47).

La diferencia en la respuesta inflamatoria está determinada por la composición de las membranas. Las membranas del grupo PCL únicamente están compuestas por dicho

polímero, que tiene características de biodegradabilidad, resistencia, estabilidad estructural, propiedades mecánicas y es el componente de relleno de la membrana. Se ha utilizado en reconstrucciones de la piel, ingeniería de tejido óseo, estructuras medicinales y membranas para prevenir la adhesión de tendones (48). Por otra parte, la membrana de PCL/OG une los dos polímeros al añadir a la PCL las características del OG como actividad antibacterial, diferenciación osteogénica, rigidez, rugosidad y bioactividad lo que hace que al unir los polímeros mejoren sus características (49).

En este sentido, la membrana de PCL/OG/COLp contiene colágeno tipo I de origen marino que está indicado para el uso en hemorragias, heridas, quemaduras, etc. con el principal objetivo de regenerar tejidos debido a que imita tridimensionalmente a la matriz extracelular natural (31). En la actualidad, distintos artículos describen la creación de andamios para la regeneración de tejidos que crean entornos propios para el crecimiento y regeneración celular. Añadir este componente a la membrana mejora sus propiedades para la regeneración ósea (50). Aunado a esto, el COLp muestra biocompatibilidad en sus aplicaciones médicas y menores riesgos de transmisión de enfermedades. En este sentido, los resultados del estudio muestran la presencia de infiltrado inflamatorio que corresponden a membranas de COLp que puede estar principalmente relacionado con una respuesta inflamatoria normal posterior a la lesión.

En la respuesta inflamatoria, tanto aguda como crónica, participan diferentes tipos de células con comportamientos específicos. La inflamación aguda, es la respuesta inmediata de los tejidos posterior a una lesión, se caracteriza por la migración masiva de neutrófilos, esta respuesta es rápida con una duración de tres días con presencia de neutrófilos, macrófagos y mastocitos, posteriormente, en la inflamación crónica hay una sustitución por células mononucleares como linfocitos, macrófagos activos, células dendríticas y células plasmáticas (51).

Los resultados de este estudio muestran que a los primeros 7 días la respuesta celular es similar para todos los grupos con un ligero aumento de vasos sanguíneos y eritrocitos. La membrana PCL/OG y PCL/OG/COLp presentaron un aumento de células mononucleares y mayor vascularidad a diferencia del grupo C- que presenta un aumento

de eritrocitos asociado al procedimiento quirúrgico tal como lo demuestran los resultados de Lindener et al. en 2022 y Días et al. en 2022, quienes evaluaron la biodegradabilidad de PCL-electrohilada y realizaron estudios histológicos donde se destaca que la presencia de PCL aumenta el número de linfocitos y de vascularidad (52 (53).

Las membranas de PCL/OG y PCL/OG/COLp presentaron un aumento de linfocitos y macrófagos a diferencia del grupo control, lo que indica que hay mayor presencia de reacción inflamatoria y comienza un proceso de reabsorción de la membrana. En el análisis de las muestras a los 21 días, se observó la aparición de una mayor cantidad de macrófagos, lo que demuestra un proceso temprano de degradación de las membranas de PCL y PCL/OG, mientras que la membrana BG, PCL/OG/COLp y en el grupo C-, muestran una respuesta con menor cantidad de macrófagos, linfocitos y una ligera presencia de fibroblastos y fibras colágenas, lo que se asocia a la intención de reparar el tejido dañado a diferencia de lo publicado por Abdu et al. en el 2020 quienes al comparar la biodegradabilidad y biocompatibilidad en membranas con COL tipo I de origen bovino y porcino refieren que a los 21 días la respuesta celular de la membrana Bio-Gide aumenta y posteriormente disminuye a los 63 días (39).

A los 63 días de la exposición de la membrana al tejido, los resultados mostraron que se mantuvo el infiltrado inflamatorio mononuclear en el grupo PCL y PCL/OG lo que sugiere que el proceso de degradación puede llevar más tiempo, entonces, es necesario extender el periodo de observación para comprobarlo (54). Por otra parte, las muestras que corresponden a las membranas PCL/OG/COLp y BG, mostraron la presencia de poco infiltrado inflamatorio, hubo un ligero aumento de macrófagos en las muestras correspondientes a la membrana PCL/OG/COLp y BG, además, de la degradación de la membrana; aunado a esto, hubo un mayor número de fibroblastos y fibras colágenas lo que es similar a la respuesta inflamatoria del grupo C- donde se observó ausencia de linfocitos y macrófagos lo que resultó de una zona reparada (55).

Es importante continuar las investigaciones para identificar el tiempo de biodegradabilidad *in vivo* de la membrana y su relación con la respuesta inflamatoria.

12. CONCLUSIONES

A los 63 días de evaluación la disminución de la respuesta celular inflamatoria del grupo PCL/OG/COLp es similar al grupo BG y el grupo C-; también, se identifica respuesta reparativa con presencia de fibroblastos y fibras colágenas lo que sugiere que esta membrana es biocompatible en el modelo murino.

Los grupos con mayor respuesta inflamatoria y con menor índice de regeneración son PCL y PCL/OG, lo que da lugar a la inflamación celular crónica a los 63 días; por lo que, la presencia de COL y COLp contribuye positivamente a la reparación tanto en la membrana comercial como en la experimental (PCL/OG/COLp).

La respuesta de biocompatibilidad observada ante las membranas de PCL/OG/COLp en el modelo murino sugiere la pronta aplicación clínica en humanos.

13. EXPECTATIVAS:

Los resultados obtenidos permiten continuar con las pruebas de caracterización de la membrana como son: biodegradabilidad *in vivo*, viabilidad celular y pruebas microbiológicas para garantizar la eficacia y total seguridad de estas membranas en humanos.

13. Bibliografía

1. Nejatian T, Khurshid Z, Zafar MS, Najeeb S, Zohaib S, Mazafari M, et al. Dental biocomposites. In: Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering. 1er ed. Estados Unidos: Elsevier; 2017.
2. Mohanty AK, Misra M, Hinrichsen G. Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview Summary of contents. *Macromol. Mater. Eng.* 2000;(277): 1-24.
3. Ilyas RA, Zuhri MYM, Norrrahim MNF, Misenan MSM, Jenol MA, Samsudin SA, et al. Natural Fiber-Reinforced Polycaprolactone Green and Hybrid Biocomposites for Various Advanced Applications. *Polymers*, 2022;(14):1-28.
4. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomater*, 2000;(21):2529-2543.
5. Aguilar A, Zein N, Harmouch E, Hafdi B, Bornert F, Offner D, et al. Application of chitosan in bone and dental engineering. *Molecules*, 2019;(24):1-17.
6. Sam G, Radhamoni B, Pillai M. Evolution of Barrier Membranes in Periodontal Regeneration-“Are the third Generation Membranes really here?”. *JCDR*. 2024;8(12):14-17.
7. Wessing B, Lettner S, Zechner W. Guided Bone Regeneration with Collagen Membranes and Particulate Graft Materials: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018;33(1):87–100.
8. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur. J. Oral Sci.* 2017;(125):315–337.
9. Calciolari E, Ravanetti F, Strange A, Mardas N, Bozec L, Cacchioli A, et al. Degradation pattern of a porcine collagen membrane *in vivo* model of guided bone regeneration. *J Periodontal Res*. 2018;53(3):430–439.
10. Zhang Y, Zhang X, Shi B, Miron RJ. Membranes for guided tissue and bone regeneration. *Ann. Maxillofac. Surg.* 2013;1(1):1-10.

11. Zellin G, Linde A. Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. *Biomaterials*.1996;(17):695-702.
12. Bubalo M, Lazić Z, Matić S, Tatić Z, Milović R, Ćurčin AP, et al. The impact of the thickness of the resorption membrane of human origin on the ossification of bone defects – Pathohistological study. *Vojnosanitetski Pregl*. 2012;69(12):1076–83.
13. Bornert F, Herber V, Sandgren R, Witek L, Coelho PG, Pippenger BE, et al. Comparative barrier membrane degradation over time: Pericardium versus dermal membranes. *Clin Exp Dent Res*. 2021;7(5):711–718.
14. Lisset M, Regal L, Borges A, De Armas O, Alvarado L, Varens J. et al. Inflammatory Acute Response. *Biochemical and Cellular Considerations*. J. Finlay. 2015;(5):47-62.
15. Felzani R. Tissue healing of interest in oral surgery: review of the literature. *Acta odontol*. 2005;43(3):310-318.
16. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29(20):2941–2953.
17. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 1: Evaluación y ensayos mediante un proceso de gestión de riesgo. ISO 10993-1 (5-10-2021).
18. Ríos V, Romero N, Valencia C, Balanta J. Methods for determining the biocompatibility of dental materials. *Rev. Estomatol*. 2014;(22):7-12.
19. St John K. Biocompatibility of Dental Materials. *Dent. Clin. N. Am*. 2007;(51):747–760.
20. Schlegel A, Mijhler H, Busch F, Mehli A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide®). *Biomaterials*. 1997;(18):535-538.
21. Kozlovsky A, Aboodi G, Moses O, Tal H, Artzi Z, Weinreb M, et al. Bio-degradation of a resorbable collagen membrane (Bio-Gide®) applied in a double-layer technique in rats. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(10):1116–23.
22. Staedt H, Dau M, Schiegnitz E, Thiem DGE, Tagadiuc O, Palarie V, et al. A collagen membrane influences bone turnover marker *in vivo* after bone augmentation with xenogenic bone. *Head Face Med*. 2020;16(1):1-9.
23. Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):1–19.

24. Balakrishnan S, Selvam R, Sundar K, Chittibabu S, Ramamoorthy U, Kannan CBN. Studies on calcification efficacy of stingray fish skin collagen for possible use as scaffold for bone regeneration. *Tissue Eng Regen Med*. 2015;12(2):98–106.
25. Quintero L, Busato A, Zingaretti N, Conti A, Biswas R, Governa M, et al. Tissue-Material Integration and Biostimulation Study of Collagen Acellular Matrices. *Tissue Eng Regen Med*. 2022;19(3):477–90.
26. Sbricoli L, Guazzo R, Annunziata M, Gobbato L, Bressan E, Natri L. Selection of collagen membranes for bone regeneration: A literature review. *Materials*. 2020;13(3):1-16.
27. Meyer M. Processing of collagen-based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomed Eng Online*. 2019;18(1):1-74.
28. Moses O, Vitrial D, Aboodi G, Sculean A, Tal H, Kozlovsky A, et al. Biodegradation of Three Different Collagen Membranes in the Rat Calvarium: A Comparative Study. *J Periodontol*. 2008;79(5):905–11.
29. Cruz MA, Fernandes KR, Parisi JR, Vale GCA, Junior SRA, Freitas FR, et al. Marine collagen scaffolds and photobiomodulation on bone healing process in a model of calvaria defects. *J Bone Miner Metab*. 2020;38(5):639–47.
30. De Souza A, De Araújo T, Parisi J, Do Vale G, dos Santos J. Fish collagen for skin wound healing: a systematic review in experimental animal studies. *Cell and Tissue Research. Sci. Rev*; 2022;(388):489–502.
31. Jafari H, Lista A, Siekapen MM, Ghaffari-Bohlouli P, Nie L, Alimoradi H, et al. Fish collagen: Extraction, characterization, and applications for biomaterials engineering. *Polymers*. 2020;(12):1–37.
32. Papi M, Palmieri V, Bugli F, De Spirito M, Sanguinetti M, Ciancico C, et al. Biomimetic antimicrobial cloak by graphene-oxide agar hydrogel. *Sci Rep*. 2016;(6):1-7.
33. Şelaru A, Herman H, Vlăsceanu GM, Dinescu S, Gharbia S, Baltă C, et al. Graphene-oxide porous biopolymer hybrids enhance *in vitro* osteogenic differentiation and promote ectopic osteogenesis *in vivo*. *Int J Mol Sci*. 2022;23(1):1-26.

34. Guazzo R, Gardin C, Bellin G, Sbricoli L, Ferroni L, Ludovichetti FS, et al. Graphene-based nanomaterials for tissue engineering in the dental field. *Nanomaterials*. 2018;(28):1-31.
35. Pinto AM, Gonçalves I, Magalhães F. Graphene-based materials biocompatibility: A review. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2013;(11):188–202.
36. Zeng Y, Zhou M, Chen L, Fang H, Liu S, Zhou C, et al. Alendronate loaded graphene oxide functionalized collagen sponge for the dual effects of osteogenesis and anti-osteoclastogenesis in osteoporotic rats. *Bioact Mater*. 2020;5(4):859–70.
37. Du Z, Wang C, Zhang R, Wang X, Li X. Applications of Graphene and Its Derivatives in Bone Repair: Advantages for Promoting Bone Formation and Providing Real-Time Detection, Challenges and Future Prospects. *Int J Nanomedicine*. 2020;(15)7523–7551.
38. Neto A, Sartoretto S, Duarte I, Resende R, Alves A, Mourão C, et al. In vivo comparative evaluation of biocompatibility and biodegradation of bovine and porcine collagen membranes. *Membranes (Basel)*. 2020;10(12):1–14.
39. Raghavankutty G, Muraleedhara K, Geena M, Mohsin S, Muraleedhara K. Evaluating the biocompatibility of marine-derived chitosan– collagen polymeric blends for biomedical applications. *J. Bioact. Compat. Polym*. 2017;33(4):1–17.
40. Li D, Gao Y, Wang Y, Yang X, He C, Zhu M, et al. Evaluation of biocompatibility and immunogenicity of micro/nanofiber materials based on tilapia skin collagen. *J Biomater Appl*. 2019;33(8):1118–27.
41. Lau CS, Hassanbhai A, Wen F, Wang D, Chanchareonsook N, Goh BT, et al. Evaluation of decellularized tilapia skin as a tissue engineering scaffold. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(10):1779–91.
42. 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;10(8):1–19.
43. Rojo A. Cálculo del tamaño muestral en procedimientos de experimentación con animales. Valoración de las incidencias. *Animales de Laboratorio*. 2014;(62):31-33.

44. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. NOM-062-ZOO-1999_220801. (22-8-2021).
45. Balls M. The principles of humane experimental technique: timeless insights and unheeded warnings. ALTEX. 2010;144–8.
46. Grosset A, Loayza K, Adam É, Birlea M, Gilks B, Nguyen B, et al. Hematoxylin and Eosin Counterstaining Protocol for Immunohistochemistry Interpretation and Diagnosis. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2017;1-7.
47. Hui X, Geng X, Jia L, Xu Z, Ye L, Gu Y, et al. Preparation and *in vivo* evaluation of surface heparinized small diameter tissue engineered vascular scaffolds of poly(ϵ -caprolactone) embedded with collagen suture. J Biomater Appl. 2020;34(6):812–26.
48. Gürbüz S, Doğan A, Karakeçili A, Toközlü B. *In vivo* behavior of a collagen-coated nano-hydroxyapatite enriched polycaprolactone membrane in rat mandibular defects. Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi. 2023;29(10):1081–90.
49. Tenorio DL, Valencia CH, Valencia C, Zuluaga F, Valencia ME, Mina JH, et al. Evaluation of the biocompatibility of cs-graphene oxide compounds *in vivo*. Int J Mol Sci. 2019;20(7):1-9.
50. Portela LCPN, Cahú TB, Bezerra TS, Santos DKD do N, Sousa GF, Portela RWS, et al. Biocompatibility and immunostimulatory properties of fish collagen and shrimp chitosan towards peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Int J Biol Macromol. 2022;(210):282–291.
51. Da Silva B, Orsso C, Gonzalez M, Sicchieri J, Mialich M, Jordao A, et al. Phase angle and cellular health: inflammation and oxidative damage. Rev Endocr Metab Dis; 2023;(24):543–562.
52. Dias J, Sousa A, Augusto A, Bártolo P, Granja P. Electrospun Polycaprolactone (pcl) Degradation: An *In Vitro* and *In Vivo* Study. Polymers. 2022;(16):1-14.
53. Lindner C, Alkildani S, Stojanovic S, Najman S, Jung O, Barbeck M. *In Vivo* Biocompatibility Analysis of a Novel Barrier Membrane Based on Bovine Dermis-Derived Collagen for Guided Bone Regeneration (GBR). Membranes. 2022 Apr 1;12(4).

54. Maruyama M, Rhee C, Utsunomiya T, Zhang N, Ueno M, Yao Z, et al. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Frontiers in Endocrinology*. 2020;(11):1-14.
55. Kozlovsky A, Aboodi G, Moses O, Tal H, Artzi Z, Weinreb M, et al. Biodegradation of a resorbable collagen membrane (Bio-Gide ®) applied in a double-layer technique in rats. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(10):1116–23.