



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Tesis para obtener el título de Maestro en Estomatología con opción terminal en
Rehabilitación Oral:

**“COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES BIOMECÁNICAS
DE MEMBRANAS DE COLÁGENO DE PESCADO Y ÓXIDO DE GRAFENO CONTRA
MEMBRANA COMERCIAL”**

Presenta:

José Antonio Rosas García

Matrícula: 220450012

Director de tesis:

D.C. Julia Flores Tochihuitl

I.D. 100228022

Director disciplinario:

MRI. Guillermo Franco Romero

I.D. 100526470

Director metodológico:

D.C. Carolina Sámano Valencia

I.D. 100526470

Asesor Externo:

D.C. Jéssica Rosaura Campos Delgado

JUNIO 2022



BUAP

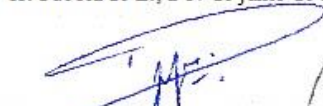
Oficio No. FESIEP/082/2022

C. José Antonio Rosas García
Matrícula: 220450012
Alumno de la Maestría en Estomatología
Con opción Terminal en Rehabilitación Oral
De la Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
P R E S E N T E.

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 esta Secretaría aprueba la impresión de la Tesis titulada "Comparación de las características y propiedades biomecánicas de membranas de colágeno de pescado y óxido de grafeno contra membrana comercial", misma que presentará para realizar su examen profesional y obtener el grado de Maestro en Estomatología con Opción Terminal en Rehabilitación Oral

Sin más por el momento, deseándole lo mejor, le reitero mi distinguida consideración.

A t e n t a m e n t e
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 17 de junio de 2022.


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



Facultad
de Estomatología

31 Fuente 1304, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C. P. 72413
01 (722) 229 55 00 Ext. 5400

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL

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

Registro CIFE: **2021151**

Fecha: 17 de junio de 2022

Título de la Tesis: "Comparación de las características y propiedades biomecánicas de membranas decolágeno de pescado y óxido de grafeno contra membrana comercial"

Nombre del alumno: José Antonio Rosas García

Matrícula: 220450012

Domicilio: Camino Nacional #102, Lomas De Romero, Tecamachalco, Pue.

Tel: 222 373 65 08

Fecha de ingreso a la Facultad: enero 2019

Firma: _____

Director de tesis: D.C. Julia Flores Tochiuitl
Biológicas
Adscripción: Facultad de Estomatología

Grado académico: Doctora en Ciencias Químico

ID: 100228022 TEL: 222 546 67 11

Firma: _____

Director disciplinario: MEI. Guillermo Franco Romero
Estomatología Integral
Adscripción: Facultad de Estomatología

Grado académico: Maestría En

ID: 100526470 TEL: 222 212 06 57

Firma: _____

Director metodológico: D.C. Carolina Sámano Valencia
Adscripción: Facultad de Estomatología

Grado académico: Doctorado en Biomateriales

ID: 100526470 TEL: 444 819 18 22

Firma: _____

Asesora externa: D.C. Jessica Rosaura Campos Delgado
Avanzados con opción en Nanociencias y nanotecnología
Adscripción:

Grado académico: Doctorado en Materiales

TEL: 4441896234

Firma: _____

Lector: Mtro. Enrique Pérez Martínez
Implantología

Grado académico: Especialidad en Prótesis Bucal e

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100188222 TEL: 222 426 76 28

Firma: _____

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

MRI. 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 Dipp Velázquez

Fecha: 17 de junio de 2022

Sello _____



AGRADECIMIENTOS

A Dios, que nos bendice y ama, porque siempre está con nosotros, que guía siempre los pasos de mi existencia en mi andar diariamente, que me brinda todo lo necesario en la vida, principalmente: familia, salud, amor, alimentos, hogar, vestido, amistades, todo esto, fundamental para poder cumplir todos y cada uno de los anhelos más deseados en mi vida.

A mi madre, que es la principal promotora de mis sueños; con mucho amor, respeto, admiración y sobretodo agradecimiento. Por su paciencia, por haber confiado en mí, por brindarme su apoyo y sacrificio en todo momento, de todas las maneras posibles, habidas y por haber, por ser y fungir como madre y padre al mismo tiempo para que yo fuera afortunado de contar con todo lo que cuento. Por sus consejos, sus valores y principios. “Es un gran honor y privilegio ser tu hijo”.

A mi abuelita que, de igual manera, gracias a ella, que ejerció durante mi infancia y hasta la fecha, el papel de madre, enfermera, médico, ama de casa, asistente personal, niñera, yo puedo disfrutar y gozar de esta maravillosa vida, pude vivir esta hermosa experiencia de estudiar y cursar el posgrado y maestría.

A mis hermanos, Altagracia y David, que siempre estuvieron presentes, que me apoyaron moralmente en mi tomar de decisiones, confiaron en mí, y que siempre me motivaron a seguir adelante, ¡los amo!

A mis sobrinos, que me enseñaron el valor de la responsabilidad y del amor de una manera distinta; que vieron en mí un modelo a seguir, y que sin duda alguna, representaron en mí una figura importante para que todo esto fuera posible.

A mi demás familia y amistades: tías, tíos, padrinos, primos, primas, sobrinos, sobrinas, que confiaron y creyeron en mí, me apoyaron en todo lo que estaba a su alcance y dentro de sus posibilidades.

A mi pareja y a toda su gran familia, por confiar en mí, porque me han enseñado en gran medida el valor de la familia, del trabajo, esfuerzo y sacrificio para conseguir lo que se quiere en esta vida, que me han brindado sus hogares y sus amables atenciones, que me han dejado estar en los momentos más difíciles pero también los momentos más gratos y plácidos de sus vidas, porque cada uno de ellos y ellas, me demostraron que en la vida existen segundas y terceras oportunidades, y que se puede comenzar de nuevo sin importar las circunstancias.

A la Dra. Julia Flores Tochiuitl, por su amistad, por haber depositado en mí su confianza, por compartir su conocimiento, entrega, tiempo, pasión y dedicación por la investigación para poder concluir este proyecto durante todo el trayecto como estudiante de la maestría; además, por permitirme el acceso a las instalaciones del laboratorio multidisciplinario y facilitarme el uso de sus materiales e instrumentos, incluso, para recibir el apoyo de todos integrantes de este mismo; por abrirme las puertas de su hogar y darme la dicha de conocer a su gran familia. “Doctora, gracias a usted todo esto fue posible”.

Al Dr. Guillermo Franco Romero, por ser un gran líder y coordinador, brindándome su apoyo durante todo el trayecto de esta etapa en mi vida, por compartirme sus conocimientos y plasmar en mí sus enseñanzas; “doctor, usted me cambió la vida”, se lo dije y se lo diré siempre.

A la Dra. Carolina Sámano Valencia, por su excelente trabajo y apoyo hacia todo este gran equipo, porque a pesar de las circunstancias y adversidades por las que atraviesa usted y su familia, logró compartir su conocimiento y tiempo para realizar nuestras pruebas, análisis y redacción para poder concluir este proyecto.

A la Dra. Jéssica Rosaura Campos Delgado y al Dr. Carlos Achete, por habernos otorgado uno de los reactivos más importantes y fundamentales para el desarrollo de este trabajo de investigación, como es el Óxido de Grafeno; además de apoyarnos en todo momento para realizar parte de nuestras pruebas en su institución laboral.

A mis maestros y docentes en mi formación académica y profesional, a todos ellos que conforman nuestro gran equipo en la clínica de rehabilitación; a mis compañeros de generación: Diana, Selene, Ricardo, Luis, Paco, a los cuales admiro demasiado por ser las personas y profesionales que son, “he aprendido mucho de cada uno de ustedes”, a mis demás compañeros de clínica: Adriana, Jessica, Gaby, Martín, Brenda, Mariana, Dulce, Lucas, Bryan, Rodrigo; gracias infinitas por todo su apoyo.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por permitir el desarrollo de esta investigación, por darme las herramientas necesarias para realizarme y pulirme como profesional y como persona; es un honor y orgullo ser miembro BUAP y pertenecer a esta casa de estudios desde la preparatoria hasta el posgrado.

A CONACyT por el apoyo de la beca otorgada con número de becario: 1034372, para realizar mis estudios de maestría.

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

No. CVU

Número de beca: 1034372.

ÍNDICE

RESUMEN	1
3. INTRODUCCIÓN	2
4. PALABRAS CLAVE.....	4
5. ANTECEDENTES	5
5.1 ANTECEDENTES GENERALES	5
5.1.1 Regeneración ósea guiada	5
5.1.2 Biocompósitos	6
5.1.3 Andamios.....	7
5.1.4 Membranas para Regeneración Ósea Guiada.....	8
5.1.5 Nuevos biomateriales para agregar a las membranas.....	12
5.1.6 Técnica para la elaboración de andamios fibrilares: hilado por propulsión de gas, de sus siglas en inglés AJA (air jet spinning).....	14
5.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	15
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
7. JUSTIFICACIÓN.....	21
8. HIPÓTESIS	22
Hipótesis científica (Hi).....	22
Hipótesis nula (Ho)	22
9. OBJETIVOS	23
9.1 Objetivo general.....	23
9.2 Objetivos específicos.....	23
10. MATERIAL Y MÉTODOS	24
10.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	24
10.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	24
10.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	25
10.3.1 INCLUSIÓN.....	25
10.3.2 EXCLUSIÓN	25
10.3.3 ELIMINACIÓN	25
10.4 VARIABLES	25
10.5 CONCORDANCIA Y FIABILIDAD.....	26
10.6 UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL.....	27
10.7 PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN.....	27
10.7.1 Técnica elaboración de membranas:	27
10.7.2 Pruebas de Caracterización.....	28

10.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
10.10 LOGÍSTICA.....	35
10.10.1 RECURSOS HUMANOS.....	35
10.10.2 RECURSOS MATERIALES.....	35
10.10.3 RECURSOS FINANCIEROS.....	36
11. BIOÉTICA.....	36
12. RESULTADOS	37
12.1 Preparación de membranas por la técnica “AJS”	37
12.2 Morfología Superficial	37
12.3 Composición Elemental: Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (ATR FTIR)....	39
12.4 Propiedades Físicas.	42
12.4.1 Propiedades Mecánicas.	42
12.4.2 Hidrofobicidad.....	43
12.4.3 Capacidad de absorción (hinchamiento).....	44
12.4.4 Porosidad.	44
12.4.5 Degradación.	45
12.4.6 Rugosidad.....	46
13. DISCUSIÓN.....	48
13.1 Morfología superficial.	48
13.2 ATR FTIR.....	49
13.3 Hidrofobicidad.....	49
13.4 Porosidad.....	50
13.5 Rugosidad.....	50
13.6 Grosor.....	50
13.7 Biodegradación.....	51
13.8 Capacidad de absorción (hinchamiento).....	51
13.9 Propiedades Mecánicas.....	52
14. CONCLUSIÓN	55
15. BIBLIOGRAFÍA.....	56
16. ANEXOS	60

RESUMEN

La ingeniería tisular desarrolla sustitutos biológicos o biomateriales, que mediante la Regeneración Ósea o Tisular Guiada, se colocan sobre algún defecto óseo o de tejido para que este pueda ser restaurado, conservado, aumentado o regenerado y mejorar o continuar así con su función. El COL marino, puede tener el potencial de ser utilizado para el desarrollo de membranas debido su biodisponibilidad y a su fácil extracción, su biocompatibilidad, sus limitaciones religiosas y éticas menos importantes.

El OG puede ser usado para modificar sustancialmente andamios originales, además muestra características hidrofílicas. Estudios experimentales recientes han demostrado la factibilidad de incorporar OG a la estructura de las membranas de COL de pescado, el cual aporta características adicionales, tales como mejor biocompatibilidad, resistencia a la tensión, compresión, degradación y absorción, además de brindar un efecto antimicrobiano.

Se prepararon membranas de COL-OG mediante la técnica de AJS, bajo temperatura ambiente en una campana de extracción. El hilado por propulsión de gas "AJS" se emplea para el diseño de andamios fibrilares, al igual que el electrohilado, permite también la síntesis de membranas fibrilares a escalas micro y nanométricas. Posee como ventaja su bajo costo y no requiere de una fuente de alto voltaje. A estas membranas se les realizaron pruebas biomecánicas las cuáles se compararon contra la membrana comercial Bio Gide.

Con las limitaciones de este estudio, se lograron sintetizar membranas de COL-OG con una rugosidad aceptable. La técnica "AJS", es prometedora para la síntesis de membranas útiles para procedimientos de ROG. Las membranas sintetizadas de COL-OG, muestran diferencias significativas en relación a la membrana comercial, por lo que es necesario probar otras concentraciones de OG para mejorar las propiedades biomecánicas. Es necesario seguir investigando la correlación entre las propiedades mecánicas y el grosor para poder diseñar y utilizar estas membranas de forma más racional.

3. INTRODUCCIÓN

La ingeniería tisular desarrolla sustitutos biológicos o biomateriales, que mediante la Regeneración Ósea o Tisular Guiada, se colocan sobre algún defecto óseo o de tejido para que este pueda ser restaurado, conservado, aumentado o regenerado y mejorar o continuar así con su función.

Un biocompósito se forma cuando dos o más materiales se combinan física y químicamente con una interfaz distinta para crear una sola sustancia con diferentes y mejores propiedades a las de los materiales de origen; tal es el caso de membranas, que pueden ser reabsorbibles, elaboradas en su mayoría a partir de colágeno (COL) de origen mamífero (porcino o bovino) y recientemente, de origen marino, este último, posee un bajo riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas en humanos. Las membranas funcionan como barrera física estable, que mantiene determinado espacio, y evita que tejidos de crecimiento rápido como el fibroso o epitelial invadan el espacio del lecho o defecto, y con ello controlar algunos factores ambientales en matrices extracelulares o tejidos adyacentes y así crear microambientes físicos y químicos idóneos, para guiar el destino de células madre mesenquimales humanas, y lograr su supervivencia, proliferación y diferenciación correcta.

La integridad estructural de la membrana debe mantenerse durante la formación y maduración del nuevo tejido. Las membranas reabsorbibles de colágeno, debido a su alta biocompatibilidad y poca citotoxicidad en el organismo, ofrecen la ventaja de ser degradadas por el cuerpo, por lo que solo requieren un tiempo quirúrgico para ser retiradas, por ello son menos traumáticas, y menos costosas para el paciente, sin embargo, cuentan con propiedades biomecánicas deficientes y una estabilidad débil cuando se utilizan solo de este biomaterial.

La identificación de nuevos biomateriales es crucial para reforzar este tipo de membranas, para que además de ser biocompatibles y no citotóxicas en el organismo, deben tener la capacidad de apoyar la diferenciación, crecimiento y proliferación celular, y mejorar sus propiedades biomecánicas. Un posible material funcional es el óxido de grafeno (OG). Este se ha aplicado recientemente en la ingeniería de tejidos con resultados prometedores, ya que pueden mostrar una mejora de la hidrofiliidad, el

crecimiento celular, la diferenciación osteogénica en este tipo de membranas, aportando también, un efecto antimicrobiano a la vez y la mejora en sus propiedades biomecánicas, confiriendo una menor deformabilidad, mayor rigidez, resistencia a la tensión, compresión, degradación y absorción, aumentando también la rugosidad de superficie y la bioactividad.

La membrana actúa como una barrera física para evitar que los tejidos fibrosos o epiteliales (gingival) de crecimiento rápido, invadan el espacio del defecto, la membrana guía al éxito de la regeneración de los tejidos defectuosos, aislándose del tejido circundante y extendiéndose 2 o 3 mm más allá de los márgenes del defecto, lo que favorece la migración de células derivadas de tejidos con potencial regenerativo (ligamento periodontal y hueso alveolar), y acumulación de factores locales de crecimiento y de sustancias que favorecen la formación de hueso.

Estudios experimentales recientes han demostrado la factibilidad de incorporar OG a la estructura de las membranas de COL de pescado, el cual aporta características adicionales, tales como mejor biocompatibilidad, resistencia a la tensión, compresión, degradación y absorción, además de brindar un efecto antimicrobiano. La suma de todas estas características contribuye de manera importante a los objetivos de la ingeniería tisular en procedimientos de RTG/ROG en el campo de la medicina y la estomatología.

En esta investigación como parte del proyecto de investigación general denominado: Membranas de colágeno de pescado/óxido de grafeno para regeneración ósea guiada en un defecto óseo simple de la sínfisis mandibular de la rata diabética Zucker, se pretende sintetizar membranas de COL de pescado adicionadas con iguales o mejores características que las membranas de COL de origen mamífero. Con la meta a mediano plazo de poder probarlas en modelos murinos experimentales, para contribuir con la generación a largo plazo de productos innovadores para uso clínico en humanos, confiables, de buena calidad, a menor costo que las haga disponible para la población que lo requiera.

4. PALABRAS CLAVE

Membranas, síntesis, caracterización, colágeno, óxido de grafeno.

5. ANTECEDENTES

5.1 ANTECEDENTES GENERALES

5.1.1 Regeneración ósea guiada

Para aumentar el volumen óseo en las zonas de defectos óseos, se han desarrollado diversos métodos de regeneración ósea, como andamios, revestimientos y membranas de barrera para la regeneración ósea guiada (ROG). El concepto de ROG consiste en utilizar una membrana no reabsorbible o absorbible que sirva de barrera para impedir el crecimiento de tejido conectivo blando en el defecto óseo y ofrece un espacio para guiar la reconstrucción del hueso. La ingeniería de tejidos se centra en el desarrollo de sustitutos biológicos (biomateriales) que se implantan en el sitio lesionado para ser restaurado, mantener o mejorar su función. Estos biomateriales deben reproducir la función de los tejidos vivos en sistemas biológicos, que pueden permanecer de forma temporal o permanente en el cuerpo, para conseguir la restauración de un defecto o suplantar un órgano faltante (1–3).

Según Abou, la regeneración tisular guiada (RTG) es una de las estrategias más prometedoras para reparar y regenerar tipos específicos de tejidos como periodonto, defectos óseos alrededor de los dientes o implantes, cresta alveolar atrófica, defectos de furcación, para preservar los alveolos después de la extracción dentaria, así como para el aumento óseo (3).

El proceso de regeneración que ocurre dentro de la membrana de barrera (flexible y resistente), para Dimitriou, implica angiogénesis y migración de células osteogénicas desde la periferia hacia el centro del defecto para crear un tejido de granulación bien vascularizado. La organización inicial del coágulo es seguida por crecimiento vascular y deposición de tejido óseo, formación de hueso laminar posterior y, finalmente, la remodelación, que se asemeja al crecimiento óseo. Uno de los principales objetivos de la ingeniería tisular es controlar factores ambientales, interacción con otros factores de crecimiento solubles, matrices extracelulares y células vecinas, creando microambientes físicos y químicos diseñados por medio de una barrera física (membrana), para guiar el

destino final de las células madre mesenquimales humanas (hMSC), y lograr su supervivencia, proliferación y diferenciación (2,4).

La RTG se lleva a cabo al utilizar también sustitutos óseos, entre los que se pueden mencionar: autoinjertos (AI): hueso obtenido del mismo paciente, aloinjertos (AL): biomaterial procesado para ser incorporado a sujetos de la misma especie, aloplásticos (AP): sustitutos óseos sintéticos (cerámicas, polímeros, hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico (TCP), sulfato de calcio, xenoinjertos o matrices óseas (XE): biomaterial procesado a partir de especies no humanas. La RTG es un procedimiento aceptado en la práctica clínica, técnicamente exigente y económicamente costoso (1).

5.1.2 Biocompósitos

Cuando dos o más materiales se combinan física y químicamente con una interfaz distinta entre los materiales para formar una sola sustancia se puede llamar compuesto. Los diferentes materiales se diferencian generalmente como fase de matriz y fase dispersa (refuerzo). El refuerzo es el miembro que soporta la carga, mientras que la matriz une el material de refuerzo y distribuye la carga entre ellos. Tanto la matriz como el material de refuerzo tienen diferentes propiedades, pero cuando se combinan juntos dan un material con propiedades superiores a las de los materiales de origen (5).

Park y Lakes definieron los biomateriales como cualquier material utilizado para fabricar dispositivos para reemplazar una parte o una función del cuerpo de forma segura, fiable, económica y fisiológicamente aceptables. La ingeniería de tejidos óseos implica el uso de biomateriales en forma de prótesis completas, andamios e hidrogeles, células y factores de crecimiento para tratar la pérdida de hueso debido a fracturas, osteoporosis, osteoartritis y neoplasias. Entre los biomateriales utilizados inicialmente, están los metales, las cerámicas y los polímeros (6).

Los polímeros sintéticos de monómeros naturales comúnmente utilizados incluyen el ácido poliláctico (PLA), la policaprolactona (PCL) y el polihidroxibutirato (PHB). Los polímeros naturales son intrínsecamente biocompatibles y biodegradables y, por lo tanto, se prestan fácilmente a aplicaciones de ingeniería tisular; tienen una propiedad de reconocimiento biológico (celular) que mejora la adhesión y diferenciación celular.

Comprenden polisacáridos como el almidón, el alginato, la quitina/quitosán y derivados del ácido hialurónico o proteínas como el colágeno (COL), la soja, los geles de fibrina, la seda, polinucleótidos como el ADN y el ARN. Las ventajas de las fibras naturales incluyen su peso ligero, no son abrasivas, no son irritantes, no son tóxicas y son biodegradables (5–7).

Los cuatro principios fundamentales en la ingeniería de tejidos: 1) diseño de un andamiaje que favorezca la adhesión, proliferación y diferenciación celular, 2) el aislamiento y el cultivo de células trocates mesenquimales, 3) un sistema de liberación de fármacos y/o de factores de crecimiento y, 4) el mantenimiento del espacio para inducir o guiar la regeneración del tejido (8).

5.1.3 Andamios

Un andamio es una estructura mecánica temporal diseñada para imitar la matriz extracelular de los tejidos óseos. Actualmente, se han aplicado y utilizado andamios artificiales como estructura de soporte para cultivos celulares y el dominio del crecimiento celular en la reparación de tejidos u órganos dañados. El andamio contribuye temporalmente en la regeneración celular y se biodegrada gradualmente, ya sea en el curso del proceso de curación o después, y se produce un nuevo tejido con la forma y las propiedades deseadas (9,10).

Un andamiaje ideal para la ingeniería de tejidos óseos debe poseer varias características bioactivas importantes, entre ellas la biocompatibilidad, la osteoconductividad, la osteoinductividad, una buena integridad mecánica durante todo el proceso de curación de los huesos, una tasa de degradación que mantenga la resistencia del andamiaje hasta que el tejido regenerado pueda proporcionar el apoyo mecánico necesario, y una porosidad interconectada con un diámetro de poro, que es necesaria para la penetración celular, la vascularización del tejido en formación y el transporte de nutrientes y desechos (7).

5.1.4 Membranas para Regeneración Ósea Guiada

La membrana actúa como una barrera física para evitar que los tejidos fibrosos o epiteliales (gingival) de crecimiento rápido, invadan el espacio del defecto, la membrana guía al éxito de la regeneración de los tejidos defectuosos, aislándose del tejido circundante y extendiéndose 2 o 3 mm más allá de los márgenes del defecto, lo que favorece la migración de células derivadas de tejidos con potencial regenerativo (ligamento periodontal y hueso alveolar), y acumulación de factores locales de crecimiento y de sustancias que favorecen la formación de hueso. La integridad estructural de la membrana debe mantenerse durante la maduración del tejido recién formado y varía de acuerdo a la aplicación, es decir, 4-6 semanas para la RTG, o más de 6 meses en la ROG, para garantizar formación y maduración ósea. Se han desarrollado diferentes materiales llamados barreras o membranas para lograr este propósito (2,3).

Yang, considera que las membranas reducen la resorción ósea osteoclástica y previene la invasión de células indeseables en el defecto óseo durante su reparación. Esta debe tener características tales como biocompatibilidad, la integración al tejido, oclusividad celular, mantenimiento del espacio, estabilidad, facilidad de uso y biodegradación ajustable. En la actualidad, existen varios tipos de membranas, que pueden clasificarse en reabsorbibles y no reabsorbibles (3).

5.1.4.1 Clasificación de las membranas

5.1.4.1.1 Reabsorbibles

Las membranas reabsorbibles ofrecen la ventaja de ser reabsorbidas por el cuerpo, por lo que solo requieren un tiempo quirúrgico, son menos traumáticas y menos costosas para el paciente; al no requerir una segunda intervención no traumatizan el tejido neoformado y tienen menos riesgo de exposición. Los materiales reabsorbibles que se utilizan como membranas, pertenecen a los grupos de los polímeros naturales y sintéticos. De estos, el COL y poliésteres alifáticos, como el ácido poliglicólico, son mejor conocidos por su aplicabilidad médica (2).

5.1.4.1.1.1 Colágeno de mamífero

El colágeno, es la proteína (fibrosa) más abundante en los mamíferos (bovino, porcino), es un constituyente principal de la matriz extracelular natural, ha sido empleado como biomaterial por el fácil procesamiento y la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria e inmune mínima, debido a su alta biocompatibilidad y su reconocimiento biológico intrínseco. Mejora la adhesión y la propagación celular, lo que a su vez determina las vías de diferenciación, crecimiento y supervivencia de las células. Sin embargo, tiene propiedades mecánicas deficientes y una estabilidad débil cuando se utiliza solo (3,11).

En los tejidos humanos se conocen alrededor de 16 tipos de colágeno diferentes; aunque los más abundantes y los más estudiados son los de tipo I (presentes en el hueso), también se reconocen los de tipo II (presente en el cartílago hialino) y los de tipo III (presentes en la piel). Para regeneración periodontal, se suele usar el tipo I. Su condición semipermeable favorece el paso de nutrientes, posee propiedades hemostáticas por su capacidad de agregar plaquetas y posibilita con esto la estabilización de un coágulo necesario en el proceso de regeneración. Es quimiotáctica para fibroblastos, promueve la migración celular al facilitar un cierre de primera intención y reduce el riesgo de la exposición de la membrana, es absorbida naturalmente y es reemplazada por tejidos del huésped, lo cual puede aumentar el volumen del tejido regenerado (2).

Se ha informado de que el COL de origen bovino está asociado con un mayor riesgo de encefalopatía espongiiforme bovina (EEB); en general, el COL de mamífero puede estar limitado por razones religiosas, además presenta deficiencias, entre ellas, la falta de resistencia suficiente y una tasa de degradación impredecible a la temperatura corporal (2,3,12).

5.1.4.1.1.2 Membrana comercial Bio-Gide (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suiza)

Es una membrana de colágeno tipo I biorreabsorbible derivada de dermis porcina, ha sido aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados

Unidos y se utiliza ampliamente en procesos de regeneración guiada tisular y ósea. Su estructura de dos capas, por su lado liso evita que el tejido blando crezca hacia el defecto y sirve como andamio para la unión de fibroblastos, por su capa externa (porosa y rugosa) promueve la adhesión de células y vasos sanguíneos. Es fácil de aplicar y se ajusta rápidamente a los tejidos subyacentes, tiene el potencial de facilitar el crecimiento óseo. Su completa degradación es a los 3-4 meses de su implantación (13–15).

Recientemente, ha habido interés en las fuentes de colágeno no mamíferas, principalmente en el colágeno de pescado como el de tiburón y salmón, ya que, a diferencia del colágeno bovino, se sabe que tiene un bajo riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas a los humanos (16).

5.1.4.1.1.3 Colágeno de pescado

El COL marino derivado de escamas, piel, cartílago y huesos de pescado, puede tener el potencial de ser utilizado para el desarrollo de membranas para GTR/GBR; la explotación de los subproductos marinos como nueva fuente de COL ha atraído cada vez más atención, debido su biodisponibilidad y a su fácil extracción, su alto contenido de COL, su absorción por el cuerpo humano (hasta 1.5 veces más eficiente) teniendo en cuenta su bajo peso molecular, su biocompatibilidad, su ausencia de riesgos de enfermedades y patógenos para los animales, su inocuidad para el medio ambiente, su contenido insignificante en contaminantes biológicos y toxinas, sus limitaciones religiosas y éticas menos importantes y sus pequeños problemas de reglamentación y control de calidad. Se ha investigado ampliamente para su aplicación como soporte y portador debido a sus propiedades bioactivas, que incluyen excelente biocompatibilidad, baja antigenicidad, alta biodegradabilidad y potencial de crecimiento celular. El COL de pescado tipo I es un material eficaz como andamio o espaciador biodegradable que replica la matriz extracelular natural, sirve para organizar a las células, proporcionándoles señales ambientales y dirigiendo la regulación celular específica del sitio. Tiene generalmente una baja temperatura degenerativa (25-30 °C para la mayoría de las especies de peces) en comparación con el COL de los mamíferos (39-40 °C). El bajo contenido de aminoácidos (prolina e hidroxiprolina) en el COL marino causa la baja temperatura de desnaturalización, lo que hace que sea difícil de manejar ya que se

desnaturaliza a la temperatura del cuerpo humano. Se derrite cuando se pone en contacto con el cuerpo humano para su aplicación clínica, lo que hace que este biomaterial sea difícil de manejar *in vivo*, a las temperaturas físicas reales utilizadas en las aplicaciones médicas humanas. Se cree que el COL del pescado tilapia es un poderoso candidato para su uso en la fabricación de un andamiaje clínico en RTG para la restauración de los defectos del tejido periodontal como alternativa al colágeno bovino.

Las especies de peces de aguas frías presentan menor contenido de aminoácidos, por lo que su COL muestra una menor temperatura de desnaturalización/fusión (15-20 °C) que el derivado de las especies de aguas cálidas (30-35 °C). Las temperaturas de desnaturalización fueron alrededor de 30 °C - 37 °C. (Tilapia 32-37 °C). El COL de tilapia, presenta una resistencia térmica superior a la de otras especies marinas, parecen ser fuentes alternativas prometedoras de colágeno para uso clínico.

En particular, la piel de pescado suele contener COL de tipo I, demuestra una excelente capacidad para retener el agua y no presenta ningún potencial irritante, por lo que es adecuado para aplicaciones dérmicas. Se mostró una temperatura de desnaturalización del COL de varias especies en un rango de 16 a 33 °C.

La utilización de los desechos de la industria de elaboración de pescado como fuente de colágeno ofrece la doble ventaja de reducir la contaminación al tiempo que se valorizan los descartes. Muestra la capacidad de mejorar la proliferación celular, la renovación y la cicatrización de heridas, reducir la inflamación, ayudar a la absorción del calcio y otros minerales, inhibir el crecimiento bacteriano, actuar como antioxidante y ayudar en el control del peso corporal y la diabetes de tipo 2 (12,17-19).

5.1.4.1.2 No reabsorbibles

Las membranas no reabsorbibles ofrecen una función de barrera eficaz en términos de biocompatibilidad, pueden mantener el espacio durante un período suficiente, son más predecibles en su comportamiento, tienen un menor riesgo de complicaciones a largo plazo y son sencillas de manipular clínicamente (3).

Las membranas no reabsorbibles (MNR) fueron los primeros materiales aprobados para uso clínico, mantienen su integridad estructural y pueden ser dejadas por mucho tiempo sobre los tejidos. Su estabilidad composicional y diseño permiten al operador un completo control en el tiempo de aplicación y así como minimizar las variaciones en la efectividad. Las membranas no reabsorbibles de politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE) han sido ampliamente usadas, a pesar de requerir de una intervención quirúrgica adicional para su remoción. Este tipo de material permite el bloqueo del área para epitelio gingival y permite también el paso de los vasos sanguíneos para la vascularidad del área (2).

5.1.5 Nuevos biomateriales para agregar a las membranas

La ciencia desarrolla ahora membranas para regeneración periodontal, las cuales se espera que en un futuro liberen agentes o factores (antibióticos, factores de crecimiento, factores quimiotácticos o factores de adhesión) que conduzcan a una mejor cicatrización periodontal. El futuro de la RTG probablemente será diseñar y manufacturar barreras con una o más propiedades biológicas, las que asegurarían resultados regenerativos más predecibles en defectos y situaciones clínicas aún difíciles de tratar. Los materiales de la familia del grafeno tienen probabilidad de ser un candidato de elección para los próximos materiales de regeneración ósea (2).

5.1.5.1 Ingeniería tisular con nanocompuestos a base de carbono: Óxido de Grafeno (OG)

El éxito de la ingeniería de tejidos óseos depende en gran medida de la funcionalidad del andamiaje. La identificación de nuevos materiales de andamiaje con propiedades como una buena biocompatibilidad, una biodegradación controlada y no tóxica, la capacidad de apoyar la diferenciación, el crecimiento y la proliferación celular, y una resistencia mecánica adecuada, es crucial para la eficiencia del proceso de regeneración de los tejidos. Un posible material funcional de andamiaje para aplicaciones de ingeniería de tejidos óseos es el grafeno (20).

En los últimos años, el grafeno y sus derivados han surgido como una nueva clase de nanomateriales. El grafeno es una monocapa plana basada en el carbono, dispuesta en una estructura hexagonal bidimensional, con propiedades mecánicas, electroquímicas y físicas únicas. Los nanomateriales de la familia del grafeno incluyen varios derivados, que se diferencian en términos de propiedades superficiales, número de capas y tamaño: grafeno de pocas capas (FLG), el grafito ultrafino, el óxido de grafeno (OG), el óxido de grafeno reducido (OGr) y las nano hojas de grafeno (21).

La familia de los grafenos también comprende compuestos basados en grafeno, que se derivan de la funcionalización del grafeno con polímeros, pequeñas moléculas o nanopartículas mediante interacciones covalentes o no covalentes. La funcionalización de la superficie del grafeno con moléculas de diversa naturaleza permite el desarrollo de diferentes estructuras, que pueden mejorar o alterar las propiedades requeridas para una aplicación específica. Nayak y colaboradores han demostrado que el grafeno proporciona un prometedor andamiaje biocompatible que apoya la proliferación de las células madre mesenquimales humanas (hMSC) y acelera la diferenciación en células óseas (4).

En el contexto de la ingeniería tisular, el grafeno tiene el módulo de Young más alto (0,51 TPa) entre todos los materiales conocidos, y sin embargo no es quebradizo. El grafeno acelera la diferenciación celular incluso en ausencia de los factores de crecimiento habituales como la BMP-2. Teniendo en cuenta las propiedades mecánicas intrínsecas del grafeno, se considera que el papel funcional de este nuevo material es una plataforma versátil para futuras aplicaciones médicas en general y para las terapias con células madre en particular (4).

El grafeno, el óxido de grafeno (OG) y el óxido de grafeno reducido (OGr) se han estudiado intensamente como posibles agentes antimicrobianos en biomateriales de ingeniería tisular con una toxicidad mínima para las células de mamíferos. Su biocompatibilidad, su gran superficie, su gran resistencia mecánica, así como su capacidad para inducir un crecimiento sostenido de las células madre y diferenciación a diversos linajes son ventajas adicionales. Se ha reportado que las nano hojas tanto de OG como de OGr inhiben eficazmente el crecimiento de *E. coli*. El OG es un material de carbono bidimensional que ha recibido mucha atención en el área de ingeniería biomédica. Es un excelente material debido a sus óptimas propiedades de elasticidad,

flexibilidad y mecánicas para producir andamios sintéticos con alta probabilidad de éxito en ingeniería tisular. El OG no sólo aumenta la proliferación celular, sino que influye en la diferenciación de las células madre en ciertas líneas celulares (4,22,23).

Se ha mostrado un futuro prometedor del OG, en aplicaciones médicas, incluyendo el diagnóstico de enfermedades, la detección y terapia contra el cáncer, la administración de medicamentos, la entrega de genes y los efectos antibacterianos. Hay aplicaciones de los nanomateriales basados en grafeno en implantes dentales, membranas, resinas, cementos y adhesivos, así como en el blanqueamiento dental (21,24).

El OG puede ser usado para modificar sustancialmente andamios originales, muestra características hidrofílicas debido a los grupos hidroxilo (OH) y carboxilo (COOH). Como resultado de la interacción entre el OG y la matriz de polímeros, los andamiajes modificados pueden mostrar una mejora de la hidrofiliidad, el crecimiento celular, la diferenciación osteogénica, las propiedades mecánicas, confiriendo una menor deformabilidad, mejorando la rigidez, aumentando la rugosidad y la bioactividad. El OG se ha aplicado recientemente en la ROG con resultados prometedores, tiene un gran potencial para ser utilizado como modificador de andamiajes biocompuestos; debido al grado impredecible de reabsorción de las membranas de colágeno, puede alterar significativamente la cantidad de formación ósea. Cuando las membranas están expuestas y/o asociadas con reacciones inflamatorias en el tejido adyacente, la actividad enzimática de los macrófagos y neutrófilos hace que la membrana se reabsorba rápidamente, lo que afecta la integridad estructural de esta, provoca disminución de la función de barrera y menor regeneración ósea (2,3,11).

5.1.6 Técnica para la elaboración de andamios fibrilares: hilado por propulsión de gas, de sus siglas en inglés AJS (air jet spinning).

Existen distintas técnicas para la fabricación de andamios fibrilares; la técnica de electrohilado es una de las más utilizadas en la ingeniería tisular, la cual es considerada un método sencillo y versátil para producir fibras en rangos micro y nanométricos, puesto que ofrece ventajas como alta área superficial y la capacidad de incorporar componentes orgánicos e inorgánicos. El electrohilado está limitado por su lenta tasa de producción, requiere una adecuada conductividad para formar la eyección de la solución polimérica

que dará lugar a la fibra, la necesidad de un voltaje elevado, alto costo y complejidad del proceso (8).

El hilado por propulsión de gas (air jet spinning “AJS”, por sus siglas en inglés) es otra alternativa para el diseño de andamios fibrilares, al igual que el electrohilado, permite también la síntesis de membranas fibrilares a escalas micro y nanométricas. Posee como ventaja su bajo costo, hasta 100 veces más económico que el electrohilado; tasa de producción 10 veces más rápida que el electrohilado, y no requiere de una fuente de alto voltaje. La técnica de “AJS” se basa en el uso de un gas a presión (aire, nitrógeno o argón) que se dispensa a una velocidad entre los 10 a 35 libras por pulgada cuadrada o *psi*, de sus siglas en inglés (Pound-force per Square Inch), con el fin de esparcir la solución polimérica en forma de fibras finas en la salida de la boquilla del aerógrafo. Las fibras se forman debido a que en el mismo instante que se eyecta la solución polimérica de la punta, el disolvente comienza a evaporarse debido a que el aire/gas propulsor compite por el oxígeno y continúa haciéndolo después de que las fibras se han depositado sobre el colector (8).

5.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En 2014, Nishida (25) concluyó que el recubrimiento con OG (sintetizado por la técnica de Hummers modificada) mejoró varias propiedades biomédicas de un andamiaje de COL, incluyendo la estructura de la superficie, la resistencia a la compresión y el crecimiento celular de *células madre mesenquimales*. Una baja concentración de OG (0.1, 0.5 y 1%) en la película de colágeno no inhibió la proliferación o diferenciación de osteoblastos *in vitro*. Sus estudios realizados en ratas demostraron que estos andamios mejoraron la biocompatibilidad y la biodegradabilidad.

En 2015, mediante métodos de acoplamiento, Mitra et al., (26) incorporaron curcumina a membranas de COL (1%) de pescado y OG al 2% (sintetizado por la técnica de Hummers modificada). Resultó en una apreciable resistencia mecánica de las membranas, adherencia, proliferación celular, biocompatibilidad (estudios *in vivo* realizados en ratas) y actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Actúa como un material de apósito para las heridas.

Ortolani et al., en 2015 (27), realizaron un estudio *in vitro* donde a través de medidas dimensionales y mecánicas, compararon y calificaron tres membranas comerciales de COL que se utilizan en técnicas de ROG/RTG: BioGide, Collprotect y Jason. Se realizaron pruebas mecánicas (ensayos de tracción) y dependientes del tiempo (ensayo de relajación del esfuerzo) junto con una prueba funcional (ensayo de desgarro) para determinar las respuestas de estas membranas en diferentes condiciones de carga. Cada membrana mostró diferente comportamiento, diferentes valores de deformabilidad y grosor, siendo Bio-Gide la más gruesa, y la que mostró mejores características y valores de las pruebas mecánicas y funcionales. También observaron diferencias similares en cuanto a la densidad de la superficie.

En otro estudio *in vivo* e *in vitro* Nishida et al., en 2016 (28), mostraron que la aplicación de OG (sintetizado por la técnica de Hummers y Offeman) mejoró las propiedades físicas de un andamiaje de COL, como la fuerza de compresión, la resistencia a las colagenasas y la adsorción de calcio y proteínas. Se recubrió la superficie de un andamio de esponja de COL con 0.1 y 1 $\mu\text{g/mL}$ de OG. Se demostró que la modificación de la superficie por OG puede proporcionar una notable bioactividad a los andamios 3D producidos a partir del COL. La proliferación de células *in vitro* fue fuertemente inducida por el OG, así como los efectos del crecimiento interno de células y vasos sanguíneos *in vivo* en modelos murinos.

En 2016, Zhou et al., (29) mediante la técnica de electrohilado, sintetizaron novedosas membranas compuestas de nanofibras de COL de piel de pescado tilapia, biomiméticas y electroscópicas, y concluyeron que aceleran la cicatrización de heridas de manera rápida y eficaz sin inducir ninguna respuesta inmunológica. Promueven además, la adhesión, proliferación y diferenciación de queratinocitos humanos (HaCaTs).

En un estudio *in vitro*, realizado por Vladkova et al., en 2017 (22), concluyeron que los compuestos de COL/OGr son prometedores como material biológico antimicrobiano contra Gram-positivos: *L. innocua* y *B. cereus* y contra el hongo *C. lusitaniae*. Indicaron que el efecto de refuerzo dependiente de la concentración del OGr ofrece la posibilidad de ajustar la resistencia mecánica de los compuestos de COL/OGr (2:1) a los requisitos del correspondiente biomaterial de ingeniería tisular.

El grupo de Radunovic et al., en 2017 (23), concluyeron que las membranas de COL de dermis porcina recubiertas de OG sintetizadas por la técnica de Hummers modificada, son capaces mantener y favorecer el proceso de formación ósea mediante la diferenciación osteoblástica y al mismo tiempo, controlar eficazmente la ocurrencia de eventos inflamatorios en comparación con membranas convencionales de OGr. Además, el efecto depende de la dosis, ya que la eficiencia es mejor a mayor concentración de OG (10 µg/mL).

Zhou et al., en 2017 (12), en un estudio *in vitro* e *in vivo*, desarrollaron con éxito una membrana biomimética de nanofibras de COL de pescado de tilapia al 8%, vidrio bioactivo (BG) y quitosano (CS), mediante la técnica de electrohilado, que mostró un cierto grado de actividad antibacteriana contra el *S. mutans* y fue capaz de promover la adhesión, la viabilidad y la diferenciación osteogénica de las células del ligamento periodontal humano (HPDLC). Los experimentos con animales mostraron además que la membrana COL/BG/CS fue capaz de promover la regeneración ósea en el defecto de furca en dientes de perros.

En 2017 el grupo de Zhou (30), en un estudio *in vitro* e *in vivo* con la técnica de electrohilado, fabricaron nanofibras de COL de pescado tilapia al 8% y BG biomiméticos, que mejoraron la resistencia a la tracción de las nanofibras compuestas y estas presentaron un cierto grado de actividad antibacteriana contra el *S. aureus*. Además, indujeron la proliferación y migración de queratinocitos humanos (piel) y estimularon la proliferación de células endoteliales de la vena umbilical humana.

Granados et al., en 2017 (8), sintetizaron mediante la técnica AJS andamios a base de fibras poliméricas de ácido poli-láctico (PLA), a diferentes concentraciones (6, 7, y 10 %), en cloroformo y alcohol etílico anhidro absoluto a una razón de 3:1. Concluyeron que la técnica de "AJS" permite sintetizar andamios con topografías nanofibrilares no citotóxicos.

En 2018, Senthil et al., (31) mediante electrohilado obtuvieron un andamiaje de nanofibras de alcohol polivinilo al 8%, COL de pescado al 2% y nanopartículas de OG al 0.3% (sintetizado por la técnica de Hummers y Offeman), siendo evaluado como material de vendaje en una herida. La característica única del andamiaje preparado se logró explotando las ventajas de los polímeros naturales y sintéticos y mediante el uso de

nanopartículas GO para mejorar la bioactividad del andamiaje. Los estudios *in vivo* e *in vitro* mostraron sus propiedades de curación acelerada de las heridas actuando como apósito.

De Marco et al., en 2018 (32) enriquecieron membranas de COL de dermis porcina con dos concentraciones diferentes de OG obtenido mediante la técnica de Hummers modificada (2 µg/mL y 10 µg/mL) y probaron el efecto sobre Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF). Demostraron que la presencia de OG en las membranas de COL alteraba las características de la membrana, confería una menor deformabilidad, mayor rigidez, menor hidratación y mayor rugosidad en comparación con las membranas no recubiertas. Estos cambios favorecieron la proliferación de los HGF, evitando cualquier respuesta inflamatoria, como se demostró con la reducción de la secreción de interleucina 6 (IL-6) y Prostaglandina E2 (PGE2), se facilitó la adhesión proteica, diferenciación osteoblástica y viabilidad celular.

En 2019, Jin et al., (33) prepararon una membrana de COL de escamas y piel de pescado y nanohidroxiapatita (n-HA) bioactiva reforzada con poli ácido láctico- co- glicólico (PLGA) al 20% mediante electrohilado. Presentó buena resistencia mecánica, mejoró la citocompatibilidad de esta membrana con células madre mesenquimales óseas (BMSC) y HGF. Se mejoró la actividad osteogénica.

Rethinam (2019) (34) realizó un estudio *in vitro*, en donde con la técnica de electrohilado creó una membrana nanofibrosa a partir de una mezcla de PVA y n-HA, utilizó COL tipo I de hueso de pescado y OG al 0.5 % sintetizado por la técnica de Hummers y Offeman. La membrana nanofibrosa preparada se caracterizó por poseer propiedades fisicoquímicas y mecánicas, también de buena biocompatibilidad probada en la línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT).

En 2019, otro estudio *in vitro*, realizado por Aidun et al., (35). demostraron que los andamios sintetizados por la técnica de electrohilado, compuestos de policaprolactona/CS/COL 5% (de piel de ternera) con OG (sintetizado mediante técnica de Hummers modificada) mostraron una morfología, biocompatibilidad y actividad biológica aceptables. La hidrofiliidad y la bioactividad de la superficie, así como la adhesión y la proliferación de células, aumentaron en correspondencia con un incremento de OG. La mayor proporción de OG también mejoró la actividad de osteogénesis. La

proporción de OG no pudo hacer un cambio significativo en el efecto antibacteriano de los andamios contra *E. coli* and *S. aureus*. Concluyeron que la proporción de 3% y 6% de OG dio como resultado las características deseadas y pareció suficiente para la modificación de los andamios

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Realizar un procedimiento de RTG/ROG es muy exigente y costoso, puesto que se requiere de una gran destreza por parte del clínico, realizar los procedimientos necesarios y correctos, usar los materiales adecuados y más convenientes. Las membranas reabsorbibles de colágeno de origen porcino o bovino ya comercializadas que se utilizan en la ingeniería tisular, debido a su rápida absorción por su poca resistencia en contacto con temperaturas corporales humanas, tienden a perder su capacidad de mantener el espacio requerido en condiciones de humedad, pudiendo así alterar la cantidad de formación ósea y al mismo tiempo la integridad de esta, lo que provoca que pierda la función principal de barrera. Por lo que es necesario sintetizar y probar nuevas membranas elaboradas a base de colágeno obtenido de otras fuentes, como el de origen marino, sin que altere la biocompatibilidad y baja toxicidad de este tipo de biocompósito, y que pueda brindar mejores propiedades biomecánicas: como la rigidez, resistencia a la compresión y a la degradación proteica provocada por las colagenasas, mejorar la rugosidad superficial para que la absorción de diversos iones y la adhesión celular y proteica se vean beneficiadas y así favorecer el proceso de diferenciación osteoblástica (osteogénesis).

Lo anterior nos lleva a plantearnos la siguiente ***pregunta de investigación***:

¿Son similares las características y propiedades biomecánicas que presentan las membranas de colágeno de pescado y óxido de grafeno a la membrana comercial Geistlich Bio-Gide®?

7. JUSTIFICACIÓN

Existen diversos biomateriales de uso reciente, que se están probando para proporcionar mejores características biomecánicas y biológicas a las membranas de colágeno utilizadas en la ingeniería tisular. Una alternativa innovadora al uso de colágeno de origen bovino o porcino, es utilizar el colágeno de origen marino, como el proveniente del pescado tilapia, que ofrece las mismas características que el colágeno mamífero: biocompatibilidad, baja toxicidad y con la ventaja de ser más económico, debido a que algunas partes del pescado de las cuales se extrae el colágeno, son considerados deshechos, por ejemplo, la piel, las escamas y los huesos. Además, es de fácil extracción, ausencia de riesgos de enfermedades animales y patógenas, respeto hacia el medio ambiente, contenido insignificantes de contaminantes biológicas y toxinas, limitaciones religiosas y éticas menos importantes y problemas menores de reglamentación y control de calidad.

Estudios experimentales recientes han demostrado la factibilidad de incorporar OG a la estructura de las membranas de COL de pescado, el cual aporta características adicionales, tales como mejor biocompatibilidad, resistencia a la tensión, compresión, degradación y absorción, además de brindar un efecto antimicrobiano. La suma de todas estas características contribuye de manera importante a los objetivos de la ingeniería tisular en procedimientos de RTG/ROG en el campo de la medicina y la estomatología.

La propuesta de la presente investigación es contribuir al proyecto de investigación general denominado: membranas de COL de pescado/OG para regeneración ósea guiada en un defecto óseo simple de la sínfisis mandibular de la rata diabética Zucker, a través de la síntesis de membranas de COL de pescado adicionadas con OG para igualar o mejorar las características biológicas y biomecánicas de las membranas ya comercializadas de COL de mamífero. Teniendo como meta a corto plazo la síntesis y caracterización de las membranas propuestas, a mediano plazo probarlas en modelos murinos experimentales, y contribuir a la generación a largo plazo de productos innovadores para uso clínico en humanos, a menor costo que las haga disponibles para la población que lo requiera.

8. HIPÓTESIS

Hipótesis científica (Hi)

Las membranas de colágeno de pescado y óxido de grafeno presentan características y propiedades biomecánicas similares a la membrana comercial Geistlich Bio-Gide®.

Hipótesis nula (Ho)

Las membranas de colágeno de pescado y óxido de grafeno no presentan características y propiedades biomecánicas similares a la membrana comercial Geistlich Bio-Gide®.

9. OBJETIVOS

9.1 Objetivo general

Comparar las características y propiedades biomecánicas de la membrana sintetizada de colágeno de pescado y óxido de grafeno contra la membrana comercial Geistlich Bio-Gide®.

9.2 Objetivos específicos

- Sintetizar membranas de colágeno de pescado, óxido de grafeno y de colágeno de pescado con óxido de grafeno.
- Describir la morfología superficial de las membranas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
- Realizar el análisis químico sobre composición elemental, grupos funcionales de superficie, orientación molecular mediante espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (ATR FT-IR).
- Analizar la resistencia mecánica, el porcentaje de deformación en la ruptura, así como el módulo de Young de las membranas, en una máquina universal Instron.
- Determinar la porosidad, hidrofobicidad, capacidad de absorción, rugosidad y grosor de las membranas sintetizadas y comparar contra los grupos controles.
- Comparar las propiedades biomecánicas de la membrana de colágeno de pescado y óxido de grafeno contra la membrana comercial Geistlich Bio-Gide®.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

10.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Diseño: experimental.

De acuerdo al número de las mediciones: **transversal** para las variables: morfología superficial, composición elemental, resistencia mecánica, hidrofobicidad, rugosidad, grosor, porosidad, capacidad de absorción (hinchamiento), y **longitudinal** para las variables: degradación.

De acuerdo a la medición del fenómeno en el tiempo: prospectivo.

De acuerdo con la interpretación del fenómeno: analítico.

10.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se tratará de membranas para Regeneración Ósea Guiada, y se utilizarán 3 membranas de 25x25 mm de cada uno de los grupos, para obtener de cada membrana, 3 muestras para cada prueba de caracterización de acuerdo a las medidas establecida para cada prueba y que se encuentran descritas en los procedimientos. Se realizarán las pruebas de caracterización por triplicado.

GRUPO	CLAVE
3 membranas comerciales de 25x25mm Geistlich Bio-Gide®	BG
3 membranas de 25x25mm de Colágeno de Pescado	COL
3 membranas de 25x25mm de Óxido de Grafeno	OG
3 membranas de 25x25mm de Colágeno de Pescado con Óxido de Grafeno	COL-OG

10.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

10.3.1 INCLUSIÓN

Membranas que tengan un grosor de 200 micras.

10.3.2 EXCLUSIÓN

Membranas cuya mezcla no sea homogénea: que se observen dos fases.

10.3.3 ELIMINACIÓN

Membranas que durante el proceso se rompan.

Membranas contaminadas con agentes microbiológicos (se observará la invasión por hongos).

10.4 VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable (Categoría)	Categoría de variable	Unidad escala
Membrana colágeno- óxido de grafeno (composición)	Barrera que aísla el sitio del defecto óseo del tejido blando no osteogénico.	Barrera construida mediante la técnica de "AJS", constituida de COL y OG.	Independiente	Cualitativa	Sin unidad
Morfología superficial	Aspecto de la microestructura y homogeneidad de un material.	Aspecto de la microestructura (rugosidad) y homogeneidad (presencia de aglomerados) de la membrana de COL y OG, analizado mediante SEM.	Dependiente	Cualitativa/ Dicotómica	Descripción del aspecto de la microestructura y homogeneidad Homogénea/ No Homogénea. Rugosa/No Rugosa
Composición estructural (ATR FTIR)	Composición elemental de las membranas, grupos funcionales de superficie, orientación molecular.	Identificación de los grupos funcionales, y orientación molecular de la membrana de COL -OG mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (ATR FTIR).	Dependiente	Cuantitativa	cm ⁻¹
Resistencia a la tensión (resistencia mecánica)	Resistencia de un material a una fuerza estática o dinámica.	Resistencia de la membrana de COL-OG a la tensión desarrollada, por medio de una máquina de pruebas universales (INSTRON)	Dependiente	Cuantitativa	Megapascales (Mpa)
Porcentaje de deformación	Relación existente entre los incrementos de tensión aplicados en el ensayo de tracción y los incrementos de deformación longitudinal unitaria.	Propiedad mecánica que representa la rigidez de un material sólido, medido a través de una máquina de pruebas universales (INSTRON)	Dependiente	Cuantitativa	Porcentaje

Módulo de Young	Parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico, según la dirección en la que se aplica una fuerza.	Propiedad mecánica que representa el aumento relativo de longitud, se mide mediante una máquina de pruebas universales (INSTRON)	Dependiente	Cuantitativa	Gigapascales (MPa)
Porcentaje de porosidad	Espacios vacíos en la estructura de un material.	Ganancia de peso de la membrana (dependiente de la porosidad que le permita la absorción) después de la inmersión en etanol.	Dependiente	Cuantitativa	Porcentaje
Hidrofobicidad	Capacidad que tiene un material de repeler el agua de su superficie.	Ángulo que forma un líquido al entrar en contacto con un sólido, medido mediante un goniómetro.	Dependiente	Cuantitativa	Grados
Hinchamiento	Ganancia de agua de un material después de su inmersión en un ambiente acuoso.	Ganancia de peso neto de la membrana COL-OG después de su inmersión en solución PBS.	Dependiente	Cuantitativa	Porcentaje
Degradabilidad	Pérdida de la integridad estructural de un material.	La pérdida de peso neto de la membrana COL-OG cuando se sumerge en solución PBS.	Dependiente	Cuantitativa	Porcentaje
Rugosidad	Conjunto de irregularidades que posee una superficie.	Topografía de la superficie de la membrana COL-OG.	Dependiente	Cuantitativa	Micras
Grosor	Anchura o espesor de un cuerpo.	Medida del grosor de la membrana COL-OG.	Dependiente	Cuantitativa	Milímetros

10.5 CONCORDANCIA Y FIABILIDAD

Los reactivos fueron de grados analítico y medidos con instrumentos de laboratorio precisos y calibrados. Los equipos utilizados estuvieron calibrados y en buen estado.

El tesista adquirió la capacitación en el manejo de todas las técnicas, en el caso de las pruebas en la máquina de pruebas universales (INSTRON) se utilizó la prueba estadística CCI (coeficiente de correlación intraclase o coeficiente r^2 de Pearson), esto para determinar la confiabilidad, reproducibilidad y concordancia entre las mediciones (nivel de significancia 5% = 0.05). El gold standard fueron las medidas que registró el experto, quien posee la mayor experiencia, destreza y habilidad, por tanto, una vez replicadas y existiendo un nivel aceptable de acuerdo al índice de las medidas del tesista con las del experto, se procedió a realizar las pruebas.

En el caso de las pruebas en SEM/ ATR FTIR, estas se realizaron por el investigador a cargo del equipo.

10.6 UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL

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

Laboratorio de materiales y biomateriales dentales, Facultad de Estomatología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Laboratorio de Nanotecnología, Universidad de las Américas Puebla.

Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento (DITco), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

10.7 PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN

10.7.1 Técnica elaboración de membranas:

Se preparó una solución a la que se le agregaron los componentes en el siguiente orden: PVA al 3.8%, carboximetilcelulosa al 1.1% (solubilizados a una temperatura de 60°C y a una agitación inicial de 350 rpm), posteriormente se disminuyó la temperatura a 40°C para agregar el COL al 5.7%; finalmente se tomaron 200 ml de esta solución a la que se agregó el OG al 0.001%. La solución se mantuvo en agitación de 800-900 rpm a una temperatura de 40 °C durante 16 horas. Se prepararon dos membranas más bajo las mismas condiciones, una con solo COL y otra con OG. La síntesis de estas, se realizó mediante la técnica de AJS, bajo temperatura ambiente en una campana de extracción, de acuerdo a la técnica modificada de Granados, et al., 2017 (8).

Se verificó que las muestras secas no estuvieran contaminadas con hongos, se sometieron a luz ultravioleta a una longitud de onda entre 100 y 400 nm por 24 horas para posteriormente ser almacenadas hasta el día de las pruebas de caracterización.

El investigador a cargo asignó a cada uno de los grupos de membranas una clave y las colocó en sobres, que entregó al estudiante, este tomó las tres muestras necesarias de cada sobre para realizar las pruebas de caracterización correspondientes.

10.7.2 Pruebas de Caracterización

A. Morfología Superficial

La morfología superficial de la membrana, la presencia o no de aglomerado, microestructura y homogeneidad se examinaron con un microscopio electrónico de barrido (de las siglas en inglés SEM) de la marca JEOL, modelo JSM-6610LV. Se obtuvieron tres muestras de diferentes zonas de cada membrana con un tamaño aproximado de 3mm por 3mm, posteriormente la muestra se colocó en un pin con cinta doble cara de carbón para poder adherirse, las muestras se revistieron con oro mediante un sputtering (DENTON VACUUM, DESK V). El rango de voltaje del equipo fue de 15kv a 30kv, con una magnificación en un rango de 500x a 1000x (12).

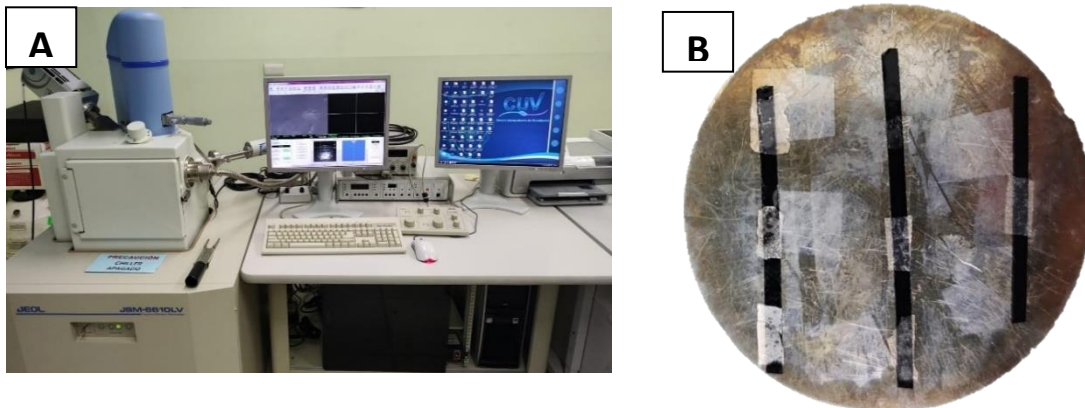


Figura 1. A) Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) con que se analizó la morfología superficial de las membranas, B) Muestras impregnadas de oro sobre papel carbón en base metálica. Fuente propia.

B. Composición Elemental

El análisis químico de la composición elemental, grupos funcionales de superficie y orientación molecular, se realizó mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier, de la marca BRUKER, modelo VERTEX 70, para detectar las interacciones entre COL y OG, así como sus posibles cambios estructurales. Se analizó cada muestra por triplicado de 3mm por 3 mm y se graficó un espectro por cada una. El espectro de absorbancia de cada muestra fue medido en un rango de longitud de onda de 4000/5000 a 400cm^{-1} , a temperatura ambiente (aproximadamente 26°C), se promediaron los cuatro escaneos por ciclo de muestra a una resolución de 4cm^{-1} . Se utilizó el programa IR Cary 360 para identificar en los espectros las bandas de absorción de los grupos.

C. Resistencia mecánica.



Figura 2. A) Equipo de ATR FTIR con que se analizó la composición elemental de las membranas. B) Cabezal y parte activa del ATR FTIR. Fuente propia.

Se evaluó la propiedad mecánica de resistencia a la tensión, es decir la relación de peso más óptima que puede resistir cada membrana, módulo de elasticidad y la deformación a la carga máxima con una máquina de pruebas universales (INSTRON 4465).

La resistencia mecánica se midió por triplicado en tiras de 10mm por 5mm de cada membrana, con una carga de 5kN, una velocidad de tensión de 5.0 mm/min y una longitud inicial de 100 mm y un lapso de 10mm a una frecuencia de 50 Hz a temperatura ambiente o 23°C . Se midió la carga máxima soportada por las muestras en megapascales (MPa),

el porcentaje de deformación en la ruptura, así como el módulo de Young en gigapascales (MPa) (36–38).

La resistencia a la tensión en porcentaje se calculó de la siguiente manera (Di Martino y cols. 2019 (39)).

$$TS\% = \frac{F}{C} \times 100$$

Donde F es la fuerza de ruptura (N) y el área de la sección transversal de la muestra (mm²). El alargamiento a la rotura € en porcentaje se calculó mediante la ecuación:

$$E\% = \frac{\Delta L}{L} \times 100$$

Donde ΔL es el aumento de longitud en el punto de ruptura (mm), y L es la longitud inicial (mm) (39).

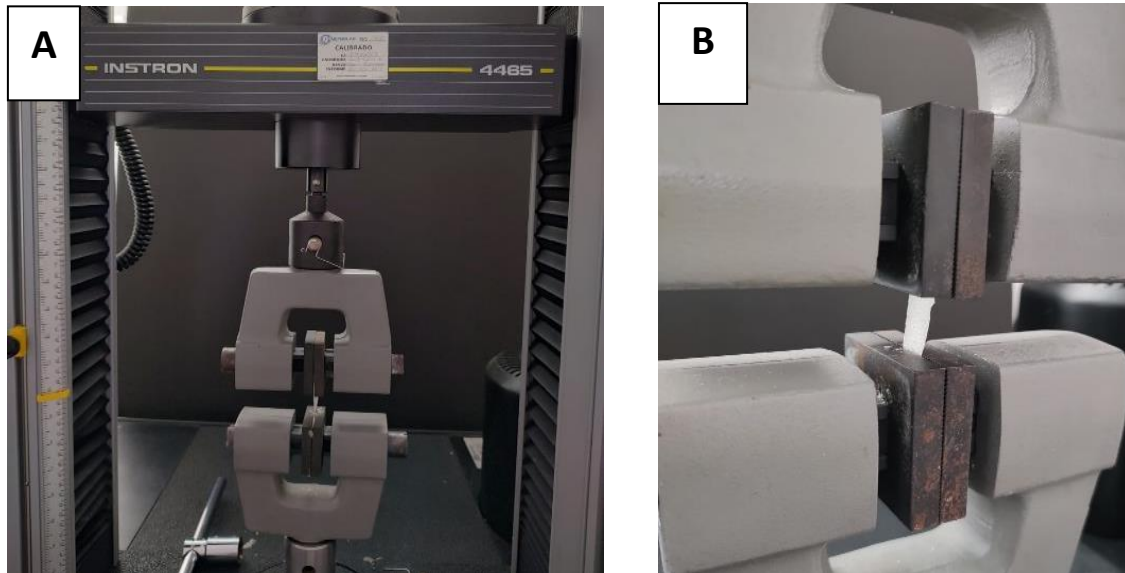


Figura 3. A) Máquina Universal de Pruebas (INSTRON 4465), con que se llevaron a cabo las pruebas de resistencia mecánica de las membranas. B) Cabezal, tenazas y parte activa de la máquina universal. Fuente propia.

La porosidad de las membranas se determinó mediante el método descrito por Anbazhagan (2018) y Poonguzhali (2018). Se utilizó un vernier para medir las

dimensiones de las membranas para calcular el volumen (V). Se registró el peso inicial (Wi) de las membranas, y se sumergieron en un volumen conocido de etanol en un vaso graduado durante 24 h, y se registró el peso final (Wf) de las mismas. Los datos experimentales se obtuvieron por triplicado y los resultados se mostraron en media \pm desviación estándar (n = 3).

La membrana previamente pesada se sumergió en etanol absoluto hasta que se sature y luego se retiró para registrar el peso final. La porosidad (P) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$P(\%) = \frac{(W_f - W_i)}{(\rho V)} \times 100\%$$

Donde, Wi y Wf son el peso de las muestras por triplicado de cada membrana antes y después de la inmersión en etanol, respectivamente. V es el volumen de la membrana antes de la inmersión en etanol; ρ es la densidad del alcohol (40,41).

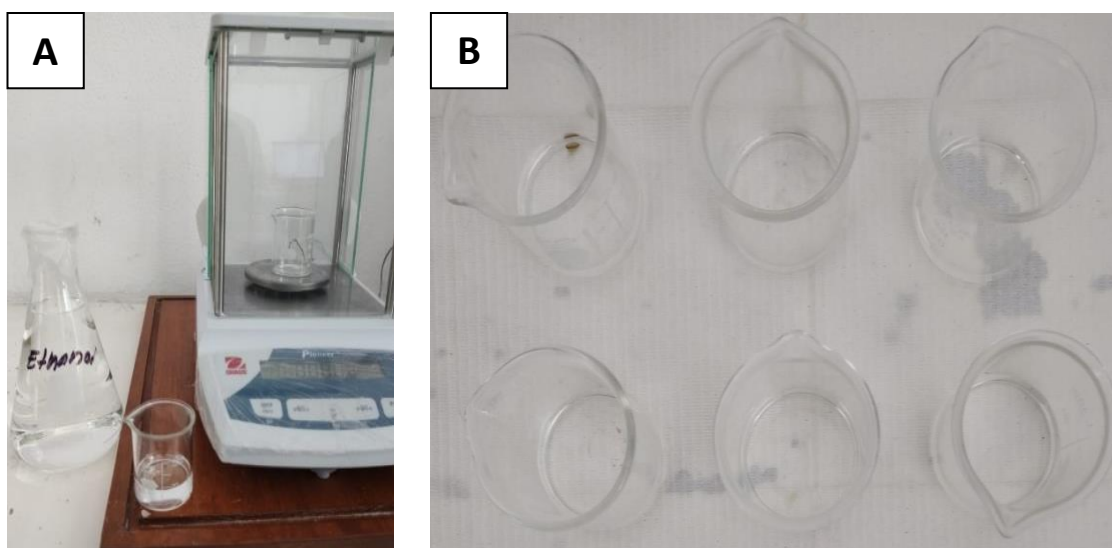


Figura 4. A) Balanza Pioneer (OHAUS), con que se pesaron las muestras de las membranas antes de ser sumergidas en el etanol absoluto. B) Vasos de precipitado que contienen las muestras de las membranas sumergidas en el etanol absoluto. Fuente propia.

D. Hidrofobicidad

La hidrofobicidad se determinó por medio del ángulo de contacto entre la superficie de la muestra por triplicado de 3mm² de cada membrana y gotas de agua desionizada. Si el ángulo es menor a 90° se considera que la muestra es hidrofílica y si es mayor a 90°, entonces será hidrofóbica. El ángulo de contacto para las diferentes muestras se evaluó con un goniómetro. Se hicieron 3 mediciones por muestra para obtener el promedio (37).

E. Capacidad de absorción (hinchamiento)

La capacidad de absorción de agua se determinó midiendo el índice de hinchamiento (swelling), en 3 muestras; de cada muestra por triplicado de 1cm² de cada membrana cortadas en forma cuadrangular de 1cm². Se realizaron las pruebas de acuerdo a la metodología de Poonguzhali (2018), Oğuz y cols. (2019), Di Martino (2019), se sumergió una muestra seca previamente pesada en medio de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (0.1 M, pH = 7.4) a 37 ° C en un intervalo dado (1, 5, 10, 15 minutos, y 1, 2, 24 y 48 horas). El exceso de agua superficial se quitó con papel de filtro antes de pesar. El porcentaje de hinchamiento de la muestra se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Relación de hinchamiento}(\%) = \frac{(W_f - W_i)}{(W_i)} \times 100$$

Donde W_{24 h} es la masa de la membrana después de 24 horas de incubación y W₀ es la masa inicial de la membrana (35,38,39).

F. Degradación

Las muestras se incubaron en 5 ml de solución PBS a 37 °C, y las mediciones se realizaron en intervalos de tiempo predeterminados. El peso se midió tanto antes como después del remojo utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = \frac{(W - W_0)}{(W_0)} \times 100$$

Donde W_0 y W son los pesos secos inicial y final de las muestras después de 0, 7, 14 o 28 días de la incubación (35,38).

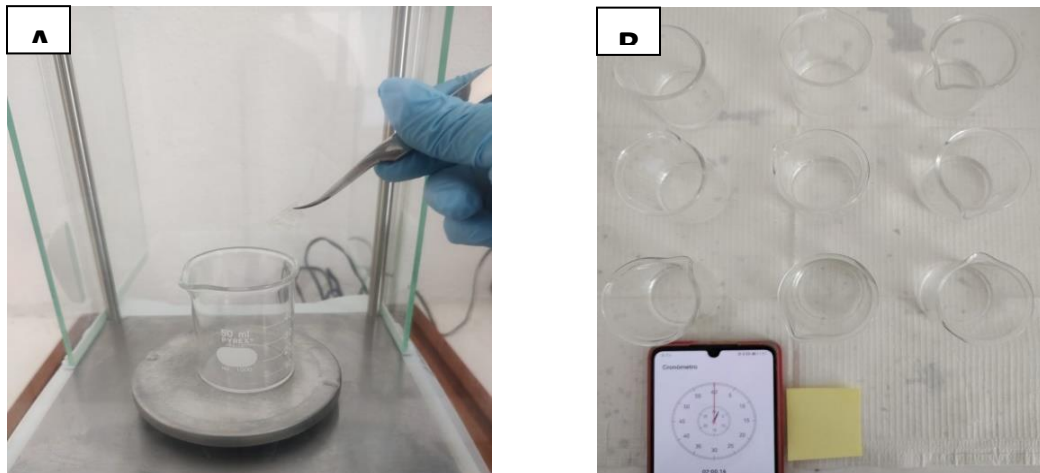


Figura 5. A) Balanza analítica donde se encuentra el vaso de precipitado que contiene la membrana pesada antes de sumergirla en la solución PBS. B) Fotografía de los vasos de precipitado que contienen las membranas sumergidas en la solución PBS.

G. Rugosidad (Perfilometría)

La rugosidad de la superficie de la membrana se investigó utilizando un interferómetro óptico no destructivo NewView 7100 (Zygo Corporation, Middlefield, CT, EE.UU.) para medir los parámetros de rugosidad R_a , R_{sk} , R_{ms} , R_{ku} , PV , R_{pk} , R_k y R_{3z} . El significado, las definiciones y las ecuaciones matemáticas para calcular los términos están disponibles en la norma técnica ISO 4287 (ISO 4287:1997 Geometrical Product Specifications (GPS)-Surface texture: Profile method-Terms, definitions, and surface texture parameters).

Para medir la rugosidad y topografía de la superficie de tres muestras por triplicado de 3mm² de cada membrana, se utilizó un medidor de rugosidad de la superficie perfilómetro de la marca Mitutoyo, modelo SJ-301. El perfil tridimensional del valor medio de la rugosidad de la superficie (Ra) se obtuvo utilizando el perfilómetro con interferometría de apantallamiento de fase, que es una técnica óptica común para la perfilometría de superficie sin contacto. El valor de la rugosidad se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$R_a = \frac{\int |z(y)| dy}{L}$$

Donde L es la longitud del eje y, y z (y) representa la curva de rugosidad (42).

RA: Valor promedio de rugosidad.

RZ: Media de la profundidad de rugosidad entre 5 espacios adyacentes.



Figura 6. A) Perfilómetro que se utilizó para realizar las pruebas de rugosidad a las membranas. B) Parte activa del perfilómetro colocada sobre la muestra de la membrana. Fuente propia.

H. Grosor

De acuerdo a Di Martino y cols. (2019) y Slimane (2018), los espesores de todas las membranas preparadas se midieron con un micrómetro (Baxlo 4000 / F) con una precisión de 0,001 mm / probador de espesor (Thwing-Albert Instrument, ProGage, NJ, EE. UU.). El espesor se midió en 5 posiciones diferentes, 4 ubicadas a lo largo del borde (1–4) y 1 en el centro (5) y se calculó el valor promedio (36).

10.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron vaciados en una tabla de Excel y se llevaron a un programa SPSS versión 22 y al programa StatGraphicsCenturion, se hizo estadística descriptiva para variables cualitativas, se utilizaron porcentajes y gráficos correspondientes; las variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central, de dispersión y de forma, con atención especial a la asimetría y la curtosis para determinar la normalidad de los datos. Posteriormente la distribución se corroboró con la prueba de Shapiro Wilk.

Para determinar la diferencia entre los grupos (COL, OG, COL-OG y membrana comercial), se utilizaron las pruebas de ANOVA de Kruskal Wallis para medidas repetidas en distribución no normal. Todas, con su respectiva significancia estadística, esto es: $p \leq 0.05$.

Los datos experimentales de módulo de Young, resistencia a la tracción y deformación a la carga máxima, se analizaron mediante el ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de Tukey.

10.10 LOGÍSTICA

10.10.1 RECURSOS HUMANOS

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

10.10.2 RECURSOS MATERIALES

Los materiales utilizados fueron:

1. Colágeno de pescado Tilapia marca Hefei Dielegance Biotechnology Co., LTD.
2. Óxido de Grafeno (preparado a partir de óxido de grafito proporcionado por el Dr. Carlos Achete, INMETRO, Brasil).
3. Carboximetilcelulosa (CMC) (Sigma- Aldrich).

4. Alcohol Polivinílico (PVA) (MW 85,000–124,000, 98–99% hidrolizado) (Sigma-Aldrich).
5. Etanol absoluto (HYCEL).
6. Solución de Hank (Sigma- Aldrich).
7. Solución salina tamponada con fosfato PBS (HYCEL).

Los equipos utilizados fueron: parrilla de agitación (Thermo Scientific), balanza analítica Pioneer (OHAUS), Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (ATR FTIR), de la marca BRUKER, modelo VERTEX 70, Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) de la marca JEOL, modelo JSM-6610LV, máquina de prueba universales (INSTRON 4465), perfilómetro Mitotuyo SJ-301.

10.10.3 RECURSOS FINANCIEROS

Los recursos para esta investigación serán financiados por el responsable de la tesis, asesor externo y el tesista.

11. BIOÉTICA

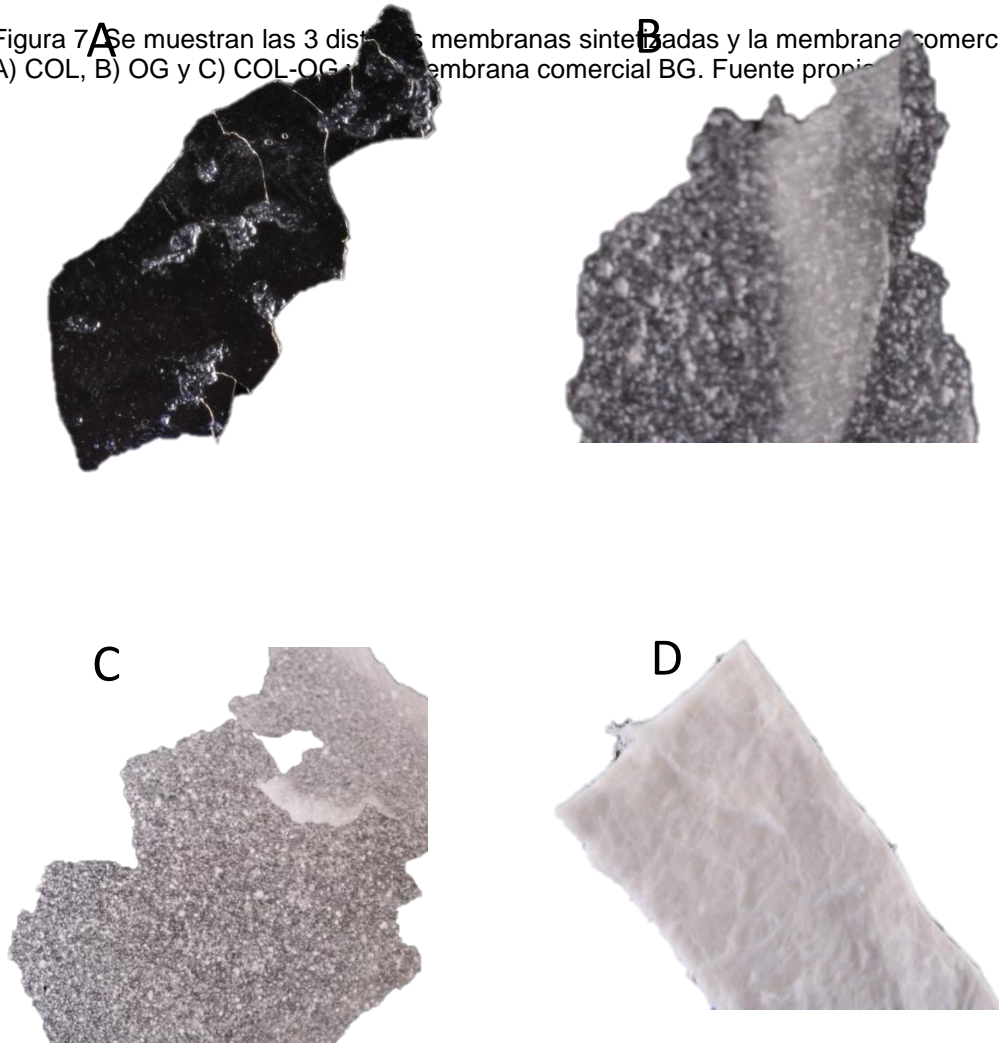
Para el control del manejo de los residuos peligrosos biológico- infecciosos nos basamos en la norma oficial mexicana: NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

12. RESULTADOS

12.1 Preparación de membranas por la técnica "AJS".

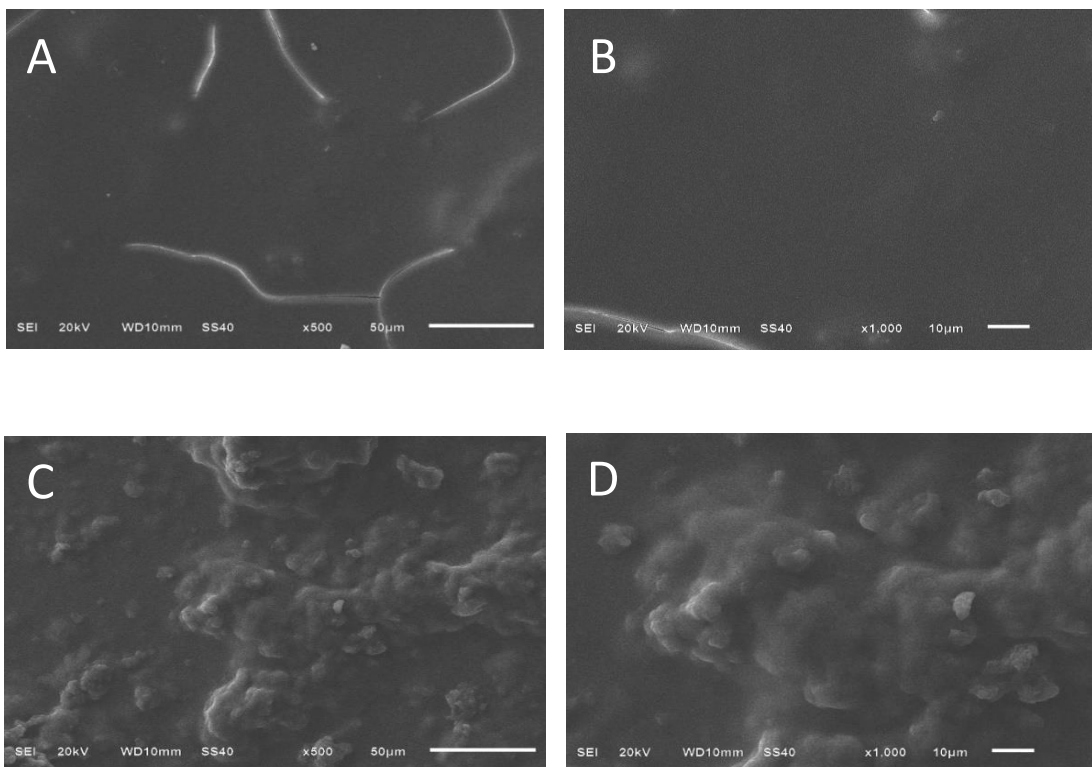
Se obtuvieron membranas de a) COL, b) OG, y c) COL-OG, delgadas, translúcidas, homogéneas, con una cara superficial rugosa y otra lisa; se compararon con membrana comercial d) BG (Fig. 7).

Figura 7. Se muestran las 3 distintas membranas sintetizadas y la membrana comercial: A) COL, B) OG y C) COL-OG; D) membrana comercial BG. Fuente propia.



12.2 Morfología Superficial

Mediante SEM, a 500x y 1000x se analizó la morfología superficial de las membranas sintetizadas y se comparó contra la morfología de la membrana comercial. No se encontraron fibras ni poros en ninguna de las membranas elaboradas, menos aún, en la membrana comercial; de hecho, desconocemos la técnica de elaboración de la membrana comercial. Lo que es interesante resaltar, es la homogeneidad y conglomeraciones en las membranas de OG (B, C) y COL-OG (E, F), que hacen que se observen rugosas, lo que es posible favorezca la adhesión celular.



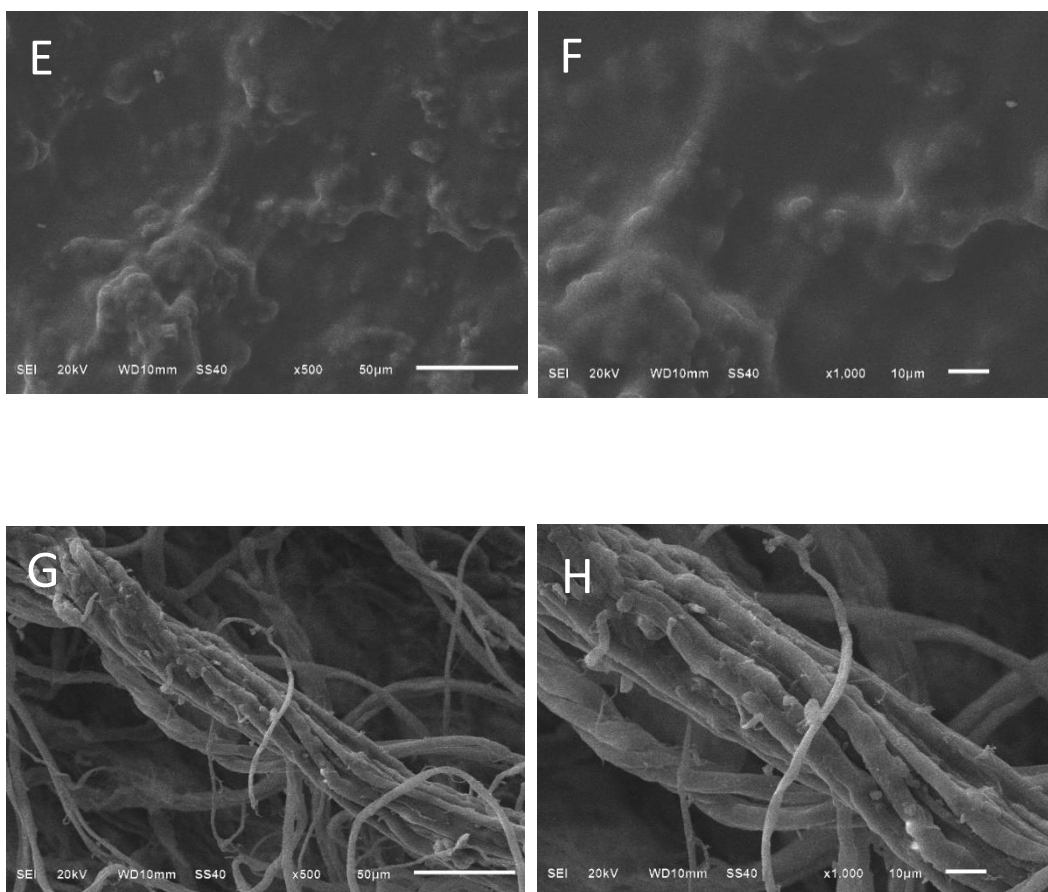


Figura 8. Imágenes obtenidas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), de las membranas de: a) y b) COL de pescado (5.7%), c) y d) OG (0.001%), f) y e) COL-OG (5.7% y 0.001% respectivamente) y g) y h) BG.

12.3 Composición Elemental: Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (ATR FTIR).

Los espectros ATR FTIR se presentan en la Figura 9: A) COL, B) OG, C) COL-OG, D) BG. Se encontraron varios picos característicos del COL de acuerdo con lo reportado con Aidun et al., en 2019 (35), donde se observan bandas típicas en torno a 3300 cm^{-1} para la amida A (vibración de estiramiento del grupo NH), la banda de 1632 cm^{-1} para el CNH_2 .

En el espectro ATR FTIR del GO, la banda ancha entre 2900 y 3700 cm^{-1} es característica de los grupos OH. Los picos a 1630 y 1740 cm^{-1} corresponden con los grupos funcionales carbonilo y carboxilo.

En la membrana COL-OG, se observaron todas las bandas características del COL y del OG, pero poco desplazadas hacia los números de onda inferiores. La membrana COL-OG mostró picos comunes en 1550 cm^{-1} (CNH_2). El pico de absorción en 1600 cm^{-1} corresponde al pico característico del OG, que originalmente estaban situados en 1630 cm^{-1} , se desplazaron hacia números de onda relativamente más bajos.

En cuanto a la membrana de COL, se pueden apreciar los principales grupos funcionales que lo caracterizan: el grupo hidroxilo (OH), el grupo carboxilo (CH), el grupo carbonilo (C=O) y el grupo amino (NH_2) (figura 9).

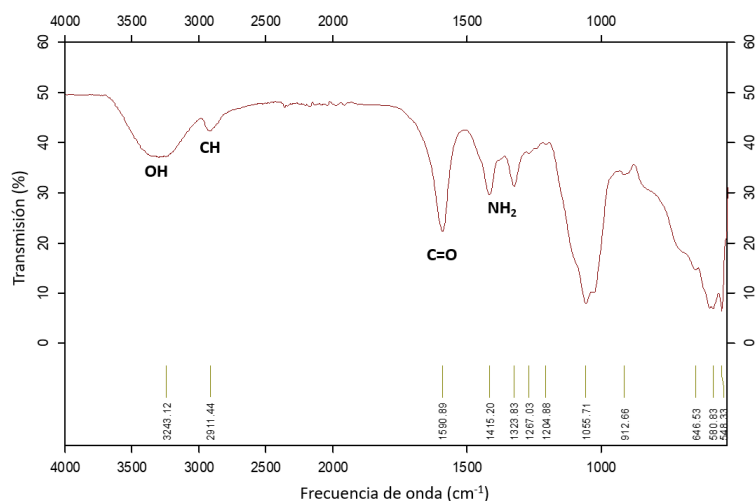


Figura 9. Espectros de la membrana de COL.

En los espectros de la membrana de OG, se identifican los principales grupos funcionales que lo caracterizan: el grupo hidroxilo (OH), el grupo carboxilo (CH), y el grupo carbonilo (C=O) (figura 10).

Los espectros de la membrana de COL-OG, donde se pueden apreciar los principales grupos funcionales que caracterizan a ambos componentes: el grupo hidroxilo (OH), el grupo carboxilo (CH), y el grupo carbonilo (C=O) (figura 11).

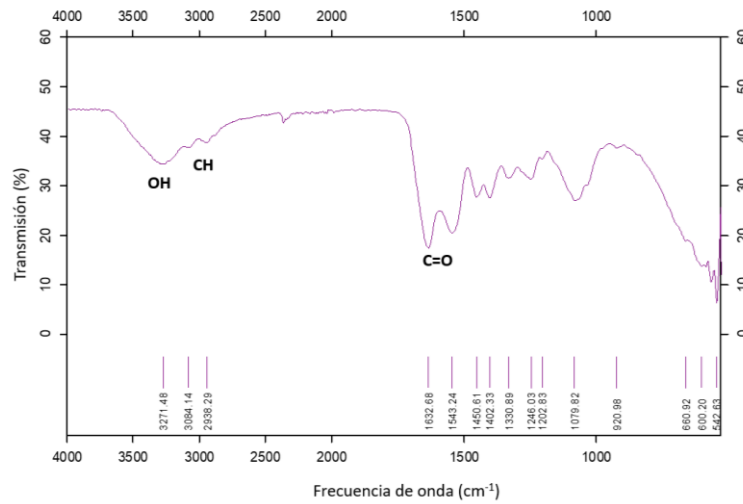


Figura 10. Espectros de la membrana de OG.

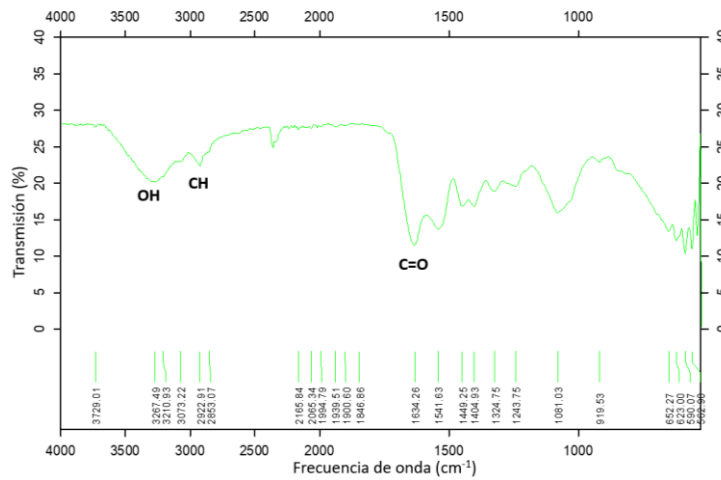


Figura 11. Espectros de la membrana de COL-OG.

Los espectros de la membrana de BG, donde se observan los principales grupos funcionales que lo caracterizan: el grupo hidroxilo (OH), el grupo carboxilo (CH), el grupo carbonilo (C=O) y el grupo amino (NH₂) (figura 12).

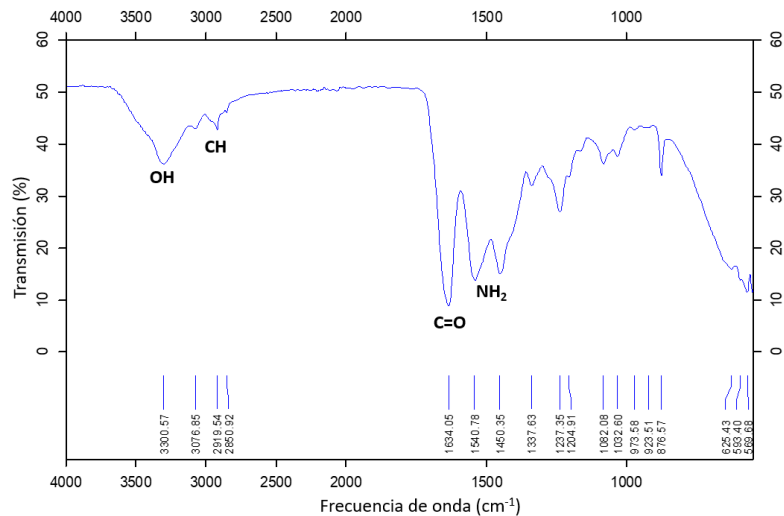


Figura 12. Espectros de la membrana de BG.

12.4 Propiedades Físicas.

12.4.1 Propiedades Mecánicas.

Se muestran los valores del módulo de Young, de la resistencia a la tracción y la deformación a la carga máxima. La membrana experimental (COL-OG), en comparación con la membrana comercial BG, muestra valores inferiores en todas las pruebas. Al realizar la prueba de normalidad para la prueba de módulo de Young se observa un valor de $p > 0.013$ (Shapiro-Wilk), por lo que se realizó el ANOVA de un factor y no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las membranas de COL, OG y COL-OG. Al hacer la comparación de estas membranas contra la membrana comercial BG, se observan diferencias estadísticas significativas, mientras que a la resistencia a la tracción y la deformación no.

Todas las membranas son translúcidas e incoloras, homogéneas. Para cada muestra en forma rectangular, se midió el espesor en 5 puntos diferentes, 4 situados a lo largo del borde y uno en el centro. Al realizar la prueba de normalidad, se observó un valor de $p = 0.001$ (Shapiro-Wilk). Se observó que el grosor promedio de las membranas de COL-OG fue de 0.432 mm., mayor que el de las membranas de COL ($p = 0.061$ ANOVA de un factor) y OG (0.126 y 0.022 mm., respectivamente) (tabla 3).

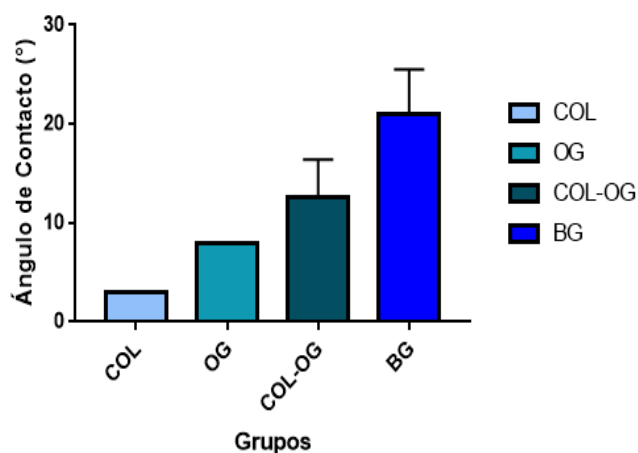


Figura 13. Hidrofobicidad.

Tabla 3. Propiedades mecánicas de las membranas de COL, OG, COL-OG, BG a 5 mm de extensión y grosor.

GRUPOS	DEFORMACIÓN A							
	MÓDULO DE YOUNG		RESISTENCIA A LA TRACCIÓN		LA CARGA MÁXIMA		GROSOR	
	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR
COL	0	0	0.00	0.00	0	0	0.13	0.01
OG	0	0	-0.03	0.04	0.26	0.13	0.02	0.00
COL-OG	0	0	0.25	0.20	0	0	0.43	0.02
BG	23.49	3.43	0.30	0.23	0.05	0.05	0.45	0.03

12.4.2 Hidrofobicidad.

El valor de hidrofobicidad calculado para la membrana experimental (COL-OG), en comparación con los controles (COL, OG y BG) se muestra en la figura 13. Al realizar la prueba de normalidad se observa un valor de $p > 0.05$ (Shapiro-Wilk), por lo que se realizó un ANOVA de un factor que arrojó un valor de $p = 0.058$. Al realizar el análisis de la comparación de la membrana comercial con la membrana de COL, existen diferencias significativas ($p = 0.010$, post hoc Tukey), pero al compararla contra la membrana de OG

($p= 0.054$, post hoc Tukey) y la de COL-OG ($p= 0.258$, post hoc Tukey), no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

12.4.3 Capacidad de absorción (hinchamiento).

Debido a la consistencia de las membranas sintetizadas, para esta prueba solo fue posible comparar los resultados obtenidos en el primer minuto; no se observa diferencia estadísticamente significativa en la capacidad de hinchamiento en la membrana BG en comparación con las membranas de COL, OG y COL-OG para ese primer minuto ($p: 0.460$ Kruskal-Wallis) (figura 14).

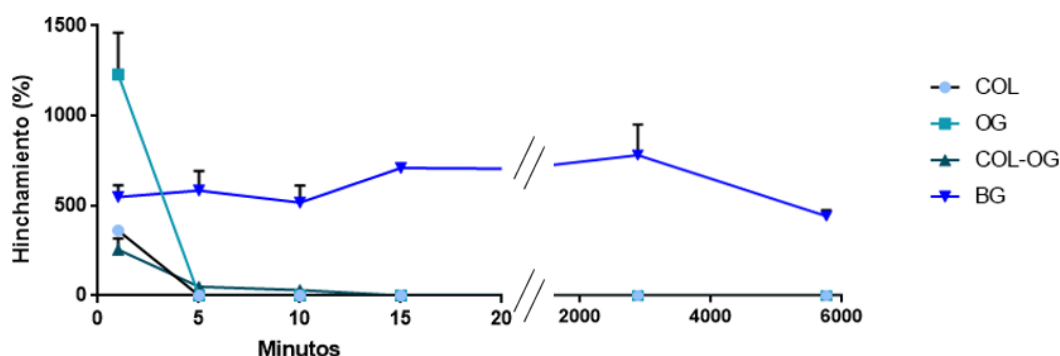


Figura 14. Gráfico de capacidad de absorción (hinchamiento).

12.4.4 Porosidad.

Se muestra el porcentaje de porosidad calculado para la membrana experimental (COL-OG), en comparación con los controles (COL, OG y BG). Al realizar la prueba de normalidad ($p= 0.002$ Shapiro Wilk), encontramos que la distribución de los datos es no normal. El análisis no paramétrico, se muestra el valor de $p= 0.16$ (Kruskal-Wallis). Al realizar la comparación entre los grupos encontramos que la membrana COL-OG y la membrana comercial BG ($p= 0.308$, Kruskal-Wallis) no presentan diferencia significativa estadística, tampoco cuando se compara la membrana de COL contra la membrana de comercial ($p= 0.308$, Kruskal-Wallis). Cuando se compara la membrana de COL-OG con la membrana de OG ($p= 0.002$, Kruskal-Wallis), y la membrana de OG con la membrana

comercial BG ($p= 0.042$, Kruskal-Wallis), sí se observa una diferencia estadística significativa (figura 15).

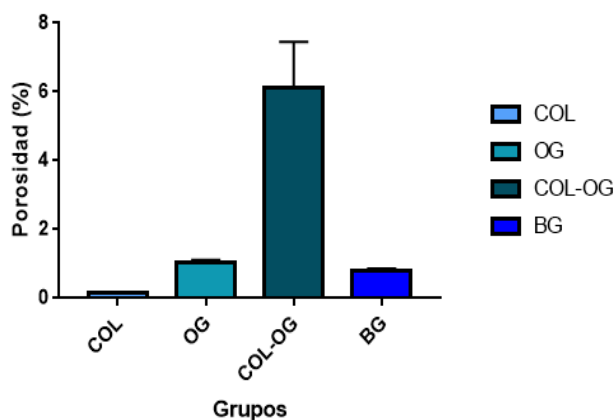


Figura 15. Porcentaje de porosidad.

12.4.5 Degradación.

El porcentaje de degradación calculado para la membrana experimental (COL-OG), en comparación con los controles (COL, OG y BG) se muestra en la figura 16. Se observa una similitud del porcentaje de degradación entre la membrana comercial BG y las membranas de COL ($p= .072$, Kruskal-Wallis) y de OG ($p= .175$, Kruskal-Wallis), por lo que no se presenta una diferencia estadística significativa. En contraparte, al comparar a la membrana sintetizada de COL-OG contra las membranas de COL ($p= 0.000$, Kruskal-

Wallis), de OG ($p = .010$, Kruskal-Wallis) y la membrana comercial BG ($p = .036$, Kruskal-Wallis), se muestra que sí existe una diferencia estadísticamente significativa.

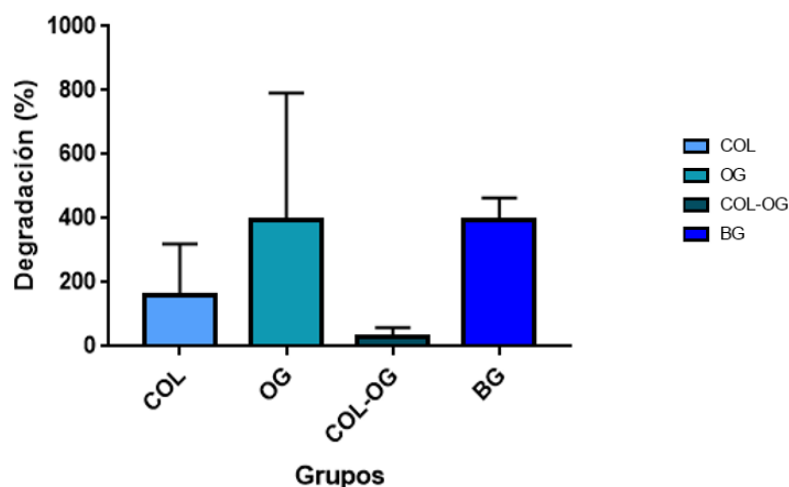


Figura 16. Gráfico de degradación.

12.4.6 Rugosidad.

Se representa el valor de rugosidad calculado para la membrana experimental (COL-OG), en comparación con los controles (COL, OG y BG). Al realizar la prueba de normalidad ($p = 0.007$ Shapiro Wilk), se muestra que la distribución de los datos es anormal. El análisis no paramétrico, se muestra el valor de $p = 0.18$ (Kruskal-Wallis). Al realizar la comparación entre los grupos encontramos que la membrana COL-OG y la membrana comercial BG ($p = 0.307$, Kruskal-Wallis) no presentan diferencia significativa estadística. Cuando se compara la membrana de comercial BG contra las membranas de COL ($p = 0.003$, Kruskal-Wallis) y de OG ($p = 0.031$, Kruskal-Wallis), sí se observa una diferencia estadística significativa (figura 17).

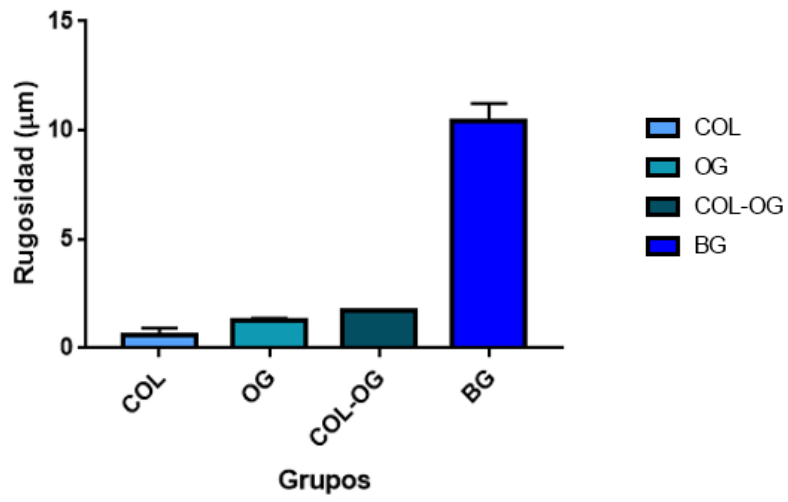


Figura 17. Gráfico de rugosidad.

13. DISCUSIÓN

Para examinar la hipótesis de esta investigación, usamos tres soluciones distintas, que contenían a los diversos reactivos, mezclados a 350 rpm, a una temperatura de 40 °C, con el objetivo de crear tres grupos diferentes y así probar que el OG, sí mejora las propiedades físicas y biomecánicas de las membranas de COL de pescado. En este estudio se utilizaron estos reactivos para sintetizar membranas aceptables para procedimientos de ROG, fiables y económicas. Se Analizó la morfología superficial de todos los grupos de membranas, también su composición elemental; se determinó la deformación a la carga máxima (%), la resistencia a la tracción, el módulo de Young, así como la porosidad, la solubilidad, la hidrofobicidad, la degradación y la rugosidad.

13.1 Morfología superficial.

La presencia del OG en las membranas, proporcionó una rugosidad evidente a manera de conglomerados que no se observa en las membranas de COL de pescado. No se observa la presencia de fibras en ninguna de ellas. Posiblemente, será necesario modificar la técnica AJS, como puede ser reducir la distancia de disparo desde la boquilla hasta la lámina recolectora.

En ninguna de las membranas se observó la presencia de poros, a diferencia de lo mencionado por Mitra et al., en 2015 (26) que refieren que la presencia de OG en andamios compuestos de Curcumina, COL de pescado y nano OG, aumentó el tamaño del poro. Mientras que los resultados de Aidun et al., en 2019 (35) muestran, que el tamaño del poro de andamios que contenían OG al 0.5%, 3% y 6% disminuyó conforme se aumentaba la concentración; cabe mencionar que estas membranas contenían además COL, CS y PCL. Es importante que las membranas contengan poros en su estructura, para favorecer la angiogénesis y que, con el paso de vasos sanguíneos a través de estos, se favorezca el aporte de nutrientes y de oxígeno. Por lo que es importante, apoyados en la experiencia de otros autores, mejorar estas membranas para lograr esta cualidad, ya que han probado distintas concentraciones de OG y nanopartículas en la construcción de otros biocompósitos, como los andamios.

13.2 ATR FTIR

La adición de OG a la membrana de COL no causó un cambio significativo en los picos, pero sí apareció la onda relacionada al grupo funcional OH, correspondiente a este. La incorporación del OG en la membrana desplazó ligeramente el espectro hacia las longitudes de onda más altas. Además, existen algunas interacciones entre los grupos amino, carbonilo e hidroxilo de estos componentes, que se observan como picos altos. Estas interacciones pueden deberse al enlace de hidrógeno que posiblemente se formó entre los grupos amino y los grupos hidroxilo del COL con los grupos carbonilo del OG.

Los espectros obtenidos de la membrana sintetizada de COL de pescado, con respecto a los espectros de la membrana comercial, fueron muy similares, se observa la presencia de grupos funcionales como el OH y el grupo amino NH.

13.3 Hidrofobicidad

Interesantemente, las membranas que sintetizamos obtuvieron un ángulo de contacto inferior a los 90° , lo que sugiere que son hidrofílicas; esta propiedad es importante porque de acuerdo a lo referido por Aidun et al., en 2019 (35) la humectabilidad de las superficies de los andamios es un factor esencial que determina la adhesión y la proliferación de las células. Es importante garantizar una hidrofiliidad adecuada en los biocompuestos como las membranas, porque una superficie muy hidrofílica tiene como desventaja la adhesión más notoria de microorganismos o contaminantes, lo que disminuye la autolimpieza (41). Por el contrario, la acumulación de las formas hidrofóbicas de los nanomateriales basados en grafeno sobre la superficie de las membranas celulares pueden resultar tóxicas (21).

La incorporación de OG en las membranas, no modifica significativamente el ángulo de contacto en comparación con las membranas que contenían solo COL de pescado, lo que representa una hidrofiliidad similar entre las membranas de COL, OG, COL-OG, en relación con la membrana comercial, la hidrofiliidad de estas, es mayor. Lo anterior, sugiere disminuir la hidrofiliidad en las membranas de COL-OG sintetizadas.

13.4 Porosidad

La estructura porosa de los materiales compuestos desempeña un papel importante en el proceso de cicatrización de los defectos óseos, como el suministro adecuado de oxígeno y la absorción de los exudados de la herida (40,41). En nuestro estudio, las membranas de COL-OG tuvieron un porcentaje de porosidad del 6%, que fue superior a los valores de las membranas de COL y OG (0.3% y 1% respectivamente); dicho porcentaje se aproxima al valor observado del porcentaje de porosidad de las membranas BG (1%). Cabe resaltar que la membrana de OG alcanza un porcentaje de porosidad aceptable, pero cuando se combinan el COL y OG, este aumenta. Lo que nos sugiere disminuir el porcentaje de porosidad en las membranas en la medida que permita un adecuado intercambio gaseoso y transporte de nutrientes sin afectar sus propiedades biomecánicas.

13.5 Rugosidad

La rugosidad es una propiedad complementaria de las membranas utilizadas en ROG, deben tener una rugosidad con dimensiones micrométricas alrededor de 1.2 μm para permitir la adhesión y diferenciación de las células osteoblásticas (43). La perfilometría realizada en las membranas sintetizadas, muestra que el promedio de la rugosidad de las membranas de COL-OG y OG, presentan resultados similares, superiores a los de la membrana de COL, los cuales se acercan al valor de referencia, esto indica que muy probablemente la presencia de OG aumenta la rugosidad. También se observa que el valor promedio de la rugosidad de las membranas sintetizadas, es inferior al de la membrana comercial BG, por lo que se sugiere adicionar otros polímeros para mejorar este aspecto.

13.6 Grosor

El grosor de las membranas sintetizadas de COL-OG (0.43 μm) se encuentra dentro del rango reportado por otros investigadores (27), incluso es similar al grosor

reportado para la membrana comercial BG (0.44 μm), lo que es favorable para tener mayor material por unidad de superficie.

13.7 Biodegradación

La tasa de biodegradación de los biocompuestos, como los andamios y membranas, que debería ser idealmente igual a la tasa de formación de hueso nuevo (35). En nuestro estudio, la tasa de degradación se presenta como un porcentaje de masa restante tras la inmersión de las membranas en 35 ml de solución PBS a 37 °C con intervalos de tiempo de 0, 14, 28 días. En los primeros días, debido a las propiedades químicas y mecánicas de las mismas, no hubo degradación significativa, pero después del segundo día, probablemente la penetración del fluido aceleró este proceso, lo que originó que las membranas de COL y OG, conservaran su integridad hasta los 3 días, a diferencia de las membranas de COL-OG, que mantuvieron su integridad hasta los 6 días. Lo anterior sugiere continuar con la investigación de la concentración ideal de OG para mejorar la biodegradación, ya que no existen estudios concluyentes; por ejemplo, los resultados de Aidun et al. en 2019 (35), quienes al sintetizar andamios de COL de pescado, CS, PLC incorporados con OG a las siguientes concentraciones: 0%, 0.5, 3% y 6%, reportan que pierden más peso conforme aumenta la concentración, lo que quiere decir que se degradan más rápido.

13.8 Capacidad de absorción (hinchamiento).

El hinchamiento es importante para la transferencia de nutrientes y la absorción de fluidos corporales (35). Al realizar esta prueba con las membranas sumergidas en solución PBS, en intervalos de 1, 5, 10, 15 minutos, una hora (60 min), dos horas (120 min), un día (2880 min), dos días (5760 min). Se observa que todas se degradaron después de 5 minutos, por lo que fue imposible poder manipularlas para evaluar la capacidad de hinchamiento en los intervalos de tiempo restantes. Estos resultados son similares a lo reportado por Öguz et al., en 2019 (38), quienes indicaron que la composición de sus andamios (metilcelulosa, sulfato de calcio, fosfato de calcio) que fueron incorporados con OG, este no afectó significativamente la capacidad de absorción

de estas; distinto de lo reportado por Mitra et al. en 2015 (26) quienes al sintetizar andamios de COL de pescado y nanopartículas de OG, enfatizan que los grupos COOH e OH, son hidrofílicos, lo que hace que estos compuestos tengan una mayor capacidad de retención de agua. Por lo anterior expuesto, será necesario probar otros polímeros para mejorar esta propiedad.

13.9 Propiedades Mecánicas

En este estudio, se sintetizaron membranas de COL, OG y COL-OG, mediante la técnica "AJS", se obtuvieron membranas con la presencia de conglomerados en su superficie; al comparar con otros estudios similares como el de Mitra et al., en 2015 y Di Martino et al., en 2019 (26,27); se identifica que los biocompósitos que prepararon mediante la técnica de evaporación, presentaron fibras muy delgadas y superficie rugosa. Estas diferencias en la microestructura afectan significativamente las propiedades biomecánicas de las membranas, como se observó en este estudio.

Es importante considerar el tamaño de las muestras analizadas, porque existen diferencia en nuestros resultados en comparación a los resultados obtenidos por el grupo de Mitra, quienes al igual que nosotros utilizaron muestras de 5x20 mm², a diferencia de Di Martino y Ortolani, que utilizaron muestras de 10x50 mm² y de 2x15 mm² respectivamente.

También es importante considerar las concentraciones de OG y COL que se utilizaron, ya que Mitra utilizó en sus andamios COL de pescado (1%), cargados con curcumina y reforzados con nano OG (2%), y Di Martino empleó en sus películas sintetizadas CS (1%) y COL (0.1%); mientras que para sintetizar las membranas de este estudio preparadas en este estudio, se utilizó OG (0.001%) y COL (5.7%); en la tabla 4 se resumen los parámetros utilizados para las pruebas mecánicas, comparados con otros autores. En relación al OG, nosotros agregamos un porcentaje significativamente menor al de los otros investigadores, lo que pudo haber influido en las propiedades mecánicas; lo anterior nos sugiere probar otras concentraciones de OG.

Tabla 4. Resumen de características de las membranas y compuestos.							
Autor	Año	Compuestos	Técnica de Síntesis	Microestructura	Tamaño de muestra	Concentración	Configuración de Máquina Universal
Mitra et al.	2015	Andamios COL de pescado, cargados con curcumina y reforzados con nano OG.	Evaporación	Fibras muy delgadas.	5x20 mm ²	COL (1%) NOG (2%)	Velocidad de cruceta de 5 mm/min, a 25 °C, y 60% de humedad relativa.
Di Martino et al.	2019	Películas de COL Y CS.	Evaporación	Superficie rugosa.	10x50 mm ²	CS (1%) COL (0.1%)	Velocidad de 0,5 mm/s hasta una distancia de 5 cm.
Ortolani et al.	2015	BG.	-	Fibras delgadas y gruesas.	2x15 mm ²	-	-
Resultados del presente estudio	2022 (resultados no publicados)	Membranas de COL, OG y COL-OG.	"AJS"	Conglomerados en la superficie.	5x20 mm ²	COL (5.7%) OG (0.001%)	Velocidad de cruceta de 5 mm/min.

El valor promedio del grosor de las membranas de COL-OG (0.43 ± 0.02 mm²) que sintetizamos es similar al de la membrana BG (0.45 ± 0.03 mm²), ambas con valores superiores al de las membranas de COL (0.13 ± 0.01 mm²) y OG (0.02 ± 0.00 mm²), como se muestra en la tabla 3. El grosor de las membranas de COL y COL-OG no parecer ser un factor que haya influido en las propiedades mecánicas, ya que presentan valores muy cercanos a los de la membrana comercial (BG).

Debido a la fragilidad de las membranas, no fue posible obtener el módulo de Young en los tres grupos de membranas experimentales, pero sí para la membrana comercial BG (23.49 ± 3.43 Mpa); en cuanto a la resistencia a la tracción, la membrana de COL no pudo ser evaluada (0 Mpa) y la de OG (-0.03 ± 0.04 Mpa) presentó valores inferiores a los de la membrana de COL-OG (0.25 ± 0.20 Mpa). Los valores negativos obtenidos en las pruebas, podrían ser atribuidos a la presencia de microfracturas en las muestras. El porcentaje de la deformación a la carga máxima en la membrana de OG

(0.26 ± 0.13 %), fue superiores al de las membranas de COL (0 %), COL-OG (0%) y la membrana comercial BG (0.05 ± 0.05 %).

Al comparar los valores de resistencia a la tracción y el porcentaje a la carga máxima de las membranas elaboradas con los biocompuestos construidos por Mitra y Di Martino, se aprecian valores más bajos con respecto a los resultados reportados por estos autores, como se muestra en la tabla 5. Sin embargo, se observa que la combinación de COL con OG mostró valores más altos que las membranas de COL, como lo reporta Mitra et al., en 2015 (26), que se atribuye a la interacción covalente entre el COL y el OG; nuestros resultados evidencian que las membranas de COL-OG tuvieron valores similares a los de la membrana comercial, lo que es un parámetro a tomar en cuenta para futuras investigaciones.

Autor	Biocompuesto	Módulo de Young	Resistencia a la tracción	Porcentaje a carga máxima
Mitra	COL	6.58 (± 0.5)	0.09 (± 0.004)	1.36 (± 0.4)
	Andamios de COL, Curcumina y NOG.	23.73 (± 1.2)	3.19 (± 0.05)	25.85 (± 1.76)
	CS-COL	-	59.12 \pm 1.23	18.34 \pm 2.11
Ortolani	BG.	15.7	4.8	46.8

Realizar una comparativa de los resultados de las pruebas mecánicas es complicado, porque existen diferencias importantes en las condiciones y técnicas de preparación de las membranas elaboradas en este proyecto y los resultados reportados en estudios previos. Por ejemplo, existió dificultad al momento de cortar y colocar las muestras en la parte activa de la máquina universal, debido a la fragilidad de las membranas; además, la máquina universal de pruebas, no cuenta con un soporte adecuado para este tipo de ensayos, esto último, se vuelve un área de oportunidad porque nos daremos a la tarea de construir un adaptador.

14. CONCLUSIÓN

Con las limitaciones de este estudio, se lograron sintetizar membranas de COL-OG con una rugosidad aceptable.

La técnica "AJS", es prometedora para la síntesis de membranas útiles para procedimientos de ROG.

Las membranas sintetizadas de COL-OG, muestran diferencias significativas en relación a la membrana comercial, por lo que es necesario probar otras concentraciones de OG para mejorar las propiedades biomecánicas.

Es necesario seguir investigando la correlación entre las propiedades mecánicas y el grosor para poder diseñar y utilizar estas membranas de forma más racional.

15. BIBLIOGRAFÍA

1. Cheng X, Wan Q, Pei X. Graphene Family Materials in Bone Tissue Regeneration: Perspectives and Challenges. *Nanoscale Res Lett.* 2018;13.
2. Calzada Bandomo A, Calzada Bandomo A, Mora Pérez C de la C. Terapia periodontal regenerativa: antecedentes y perspectivas. *MediSur.* 2013;11(5):518–26.
3. Morales Navarro D, Vila Morales D. Guided bone regeneration in dental practice. *Rev Cubana Estomatol.* 2016;53(1):45–55.
4. Tapas N, Henrik A. Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ACS Nano.* 2011;5(6):4670–8.
5. Shekar HSS, Ramachandra M. Green Composites: A Review. *Mater Today Proc* [Internet]. 2018;5(1):2518–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.11.034>
6. Ramesh N, Moratti SC, Dias GJ. Hydroxyapatite–polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2018;106(5):2046–57.
7. Yunus Basha R, Sampath SK, Doble M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2015;57:452–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.016>
8. Granados M V., Montesinos-Montesinos JJ, Álvarez-Pérez MA. Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de médula ósea en andamios fibrilares de poli (ácido L-láctico) (PLA). *Rev Mex Ing Biomed.* 2017;38(1):288–96.
9. Eltom A, Zhong G, Muhammad A. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Adv Mater Sci Eng.* 2019;2019.
10. Wubneh A, Tsekoura EK, Ayranci C, Uludağ H. Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomater* [Internet]. 2018;80:1–30. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.031>
11. Ramos Fernández G. Efecto de la química superficial del óxido de grafeno en el desarrollo de aplicaciones. *Univ Alicant.* 2017;
12. Zhou T, Liu X, Sui B, Liu C, Mo X, Sun J. Development of fish collagen / bioactive glass / chitosan composite nanofibers as a GTR / GBR membrane for inducing periodontal tissue regeneration Development of fish collagen / bioactive glass / chitosan composite nanofibers as a GTR / GBR membrane f.
13. Tawil G, El-Ghoule G, Mawla M. Clinical evaluation of a bilayered collagen membrane (Bio-Gide) supported by autografts in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 2001;16(6):857–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11769837>
14. Zhuang H, Bu S, Hua L, Darabi MA, Cao X, Xing M. Gelatin-methacrylamide gel

- loaded with microspheres to deliver GDNF in bilayer collagen conduit promoting sciatic nerve growth. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:1383–94.
15. Schorn L, Handschel J, Lommen J, Von Beck FP, Depprich R, Kübler N, et al. Evaluation of biocompatibility of different membrane surfaces using unrestricted somatic stem cells. *In Vivo (Brooklyn)*. 2019;33(5):1447–54.
 16. Quintero J, Zapata JE. Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta. *Inf Technol*. 2017;28(1):109–20.
 17. Yamamoto K, Igawa K, Sugimoto K, Yoshizawa Y, Yanagiguchi K, Ikeda T, et al. Biological safety of fish (tilapia) collagen. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 18. 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 (Basel)*. 2020;12(10):1–37.
 19. Salvatore L, Gallo N, Natali ML, Campa L, Lunetti P, Madaghiele M, et al. Marine collagen and its derivatives: Versatile and sustainable bio-resources for healthcare. *Mater Sci Eng C [Internet]*. 2020;113(April):110963. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110963>
 20. Shadjou N, Hasanzadeh M, Khalilzadeh B. Graphene based scaffolds on bone tissue engineering. *Bioengineered [Internet]*. 2018;9(1):38–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21655979.2017.1373539>
 21. 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;8(5):1–31.
 22. Vladkova TG, Ivanova IA, Staneva AD, Albu MG, Shalaby ASA, Topousova TI, et al. Preparation and Biological Activity of New Collagen Composites Part II: Collagen/Reduced Graphene Oxide Composites. *J Arch Mil Med*. 2017;5(1).
 23. Milena R, Mariana DC. Graphene oxide enrichment collagen membranes improves DPSCs differentiation and controls inflammation occurrence. *Rev Investig Mater Biomédicos*. 2017;105:2312–2320.
 24. Omid M, Fathinia A, Farahani M, Niknam Z, Yadegari A, Hashemi M, et al. Bio-Applications of Graphene Composites: From Bench to Clinic. *Adv 2D Mater*. 2016;433–71.
 25. Nishida E, Miyaji H, Takita H, Kanayama I, Tsuji M, Akasaka T, et al. Graphene oxide coating facilitates the bioactivity of scaffold material for tissue engineering. *Jpn J Appl Phys*. 2014;53(6 SPEC. ISSUE).
 26. Tapas M, Piyali M. Curcumin loaded nanographene oxide reinforced fish scale collagen - A 3D scaffold biomaterial for wound healing application. *Ann Ist Super Sanità*. 2015;5:98653–98665.
 27. Emanuela O, Fabrizio Q. Quality of life in mental health services with a focus on psychiatric rehabilitation practice. *Ann Ist Super Sanità*. 2011;47(4):363–72.

28. Nishida E, Miyaji H, Kato A, Takita H, Iwanaga T, Momose T, et al. Graphene oxide scaffold accelerates cellular proliferative response and alveolar bone healing of tooth extraction socket. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:2265–77.
29. Zhou T, Wang N, Xue Y, Ding T, Liu X, Mo X, et al. Electrospun tilapia collagen nanofibers accelerating wound healing via inducing keratinocytes proliferation and differentiation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2016;143:415–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.052>
30. 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;12:3495–507.
31. Senthil R, Berly R, Ram TB, Gobi N. Electrospun poly(Vinyl) alcohol/collagen nanofibrous scaffold hybridized by graphene oxide for accelerated wound healing. *Int J Artif Organs*. 2018;41(8):467–73.
32. De Marco P, Zara S. Graphene oxide improves the biocompatibility of collagen membranes in an in vitro model of human primary gingival fibroblasts. *Biomed Mater*. 2017;12(5):055005.
33. 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;20(5):2058–67.
34. Rethinam S, Wilson Aruni A, Vijayan S, Munusamy C, Gobi N. Enhanced bone regeneration using an electrospun nanofibrous membrane – A novel approach. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2019;53(June):101163. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101163>
35. Aidun A, Safaei Firoozabady A, Moharrami M, Ahmadi A, Haghighipour N, Bonakdar S, et al. Graphene oxide incorporated polycaprolactone/chitosan/collagen electrospun scaffold: Enhanced osteogenic properties for bone tissue engineering. *Artif Organs*. 2019;43(10):E264–81.
36. Slimane E Ben, Sadok S. Collagen from cartilaginous fish by-products for a potential application in bioactive film composite. *Mar Drugs*. 2018;16(6).
37. Luis M. Obtención y caracterización de membranas poliméricas para desalinización de agua. 2017.
38. Demir Oğuz Ö, Ege D. Preparation of graphene oxide-reinforced calcium phosphate/calcium sulfate/methylcellulose-based injectable bone substitutes. *MRS Commun*. 2019;9(4):1174–80.
39. Di Martino A, Drannikov A. Chitosan-collagen based film for controlled delivery of a combination of short life anesthetics. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;140:1183–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.228>
40. Anbazhagan S, Thangavelu KP. Application of tetracycline hydrochloride loaded-fungal chitosan and Aloe vera extract based composite sponges for wound dressing. *J Adv Res* [Internet]. 2018;14:63–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.005>

41. Poonguzhali R, Khaleel Basha S, Sugantha Kumari V. Fabrication of asymmetric nanostarch reinforced Chitosan/PVP membrane and its evaluation as an antibacterial patch for in vivo wound healing application. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2018;114:204–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.092>
42. Kim Y, Kim G. Collagen/alginate scaffolds comprising core (PCL)-shell (collagen/alginate) struts for hard tissue regeneration: Fabrication, characterisation, and cellular activities. *J Mater Chem B*. 2013;1(25):3185–94.
43. Brum I da S, Elias CN, Nascimento ALR, de Andrade CBV, de Biasi RS, de Carvalho JJ. Ultrastructural and physicochemical characterization of a non-crosslinked type 1 bovine derived collagen membrane. *Polymers (Basel)*. 2021;13(23):1–15.

16. ANEXOS



BUAP

La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
A través de la Facultad de Estomatología
otorga la presente

CONSTANCIA

A: **José Antonio Rosas García**

Por su participación académica, en la presentación de carteles
En el marco de las actividades del

XIV Congreso Nacional de Posgrados en Prosthodontia

Con el cartel titulado: Características físicas y morfológicas de membranas de colágeno de
pescado y oxido de grafeno.

En la ciudad de Puebla.

Realizado los días 11, 12 y 13 de mayo de 2022

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., a 13 de mayo de 2022

Mtra. Rubí Alejandra González Manrique
Colaboradora de Educación Continua y Vinculación

Mtro. Floriberto Calixto Arellano
Responsable de Educación Continua y Vinculación



Universidad Autónoma de Zacatecas
 Área de Ciencias de la Salud
 Unidad Académica de Odontología



“VII Jornadas Internacionales de Investigación en Odontología, 2020”

Entregan la presente

CONSTANCIA DE PONENTE DE CARTEL

A: RAÚL BASTIDA HERNÁNDEZ; JULIA FLORES TOCHIHUILT;
 FELIPE CÓRDOBA LOZANO; JOSÉ ANTONIO ROSAS GARCÍA

SÍNTESIS DE ÓXIDO DE GRAFENO PARA ADICIONAR A
 MEMBRANAS DE COLÁGENO EN REGENERACIÓN ÓSEA

Por haber presentado la ponencia en cartel durante las **VII Jornadas Internacionales de Investigación Odontológicas, 2020**, realizadas por la Unidad Académica de Odontología de la Universidad Autónoma de Zacatecas, los días 11, 12 y 13 de Noviembre del 2020.

Libro: 1 Foja: 11 Folio: 242 Horas Crédito: 30

Dr. José Luis Elías Salazar
 Director de la UAO/UAMZ

Dr. Antonio Guzmán Fernández
 Rector de la UAZ

Dr. Eduardo Médrano Cortés
 Coordinador General

