



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, MECÁNICAS
Y BIOLÓGICAS DE UNA NUEVA MEMBRANA DE COLÁGENO DE
MATRIZ ACELULAR DE VEJIGA URINARIA DE CERDO CON
OTRAS SEIS MEMBRANAS DE COLÁGENO DE ORIGEN
PORCINO, EQUINO Y BOVINO

D. Marcos Rodríguez Sánchez

2024



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

**COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, MECÁNICAS Y
BIOLÓGICAS DE UNA NUEVA MEMBRANA DE COLÁGENO DE
MATRIZ ACELULAR DE VEJIGA URINARIA DE CERDO CON OTRAS
SEIS MEMBRANAS DE COLÁGENO DE ORIGEN PORCINO,
EQUINO Y BOVINO**

Autor: D. Marcos Rodríguez Sánchez

Director/es: D. Fabio Camacho Alonso

D. Mario Pérez-Sayáns García



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Marcos Rodríguez Sánchez

doctorando del Programa de Doctorado en

Ciencias de la Salud

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino.

y dirigida por,

D./Dña. Fabio Camacho Alonso

D./Dña. Mario Pérez-Sayáns García

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 30 de septiembre de 2024

Fdo.:

En la DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertado en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpo@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, gracias ellos he podido conseguir todas las metas académicas que me he propuesto. Mi padre me ha inculcado las ganas de dar el 100% en cada tarea que se me presente. Mi madre, con su dedicación plena a la odontología, me motivó a seguir sus pasos y a buscar mis inquietudes particulares dentro de esta profesión.

A mi mujer, sin ella, estos últimos 10 años no habrían sido tan bonitos y llenos de momentos especiales, aun en las épocas más exigentes a nivel personal y profesional.

A mis hermanos, Pablo y Ana, gracias a ellos he disfrutado de mi infancia plenamente y moldeado mi carácter para poder afrontar las dificultades académicas.

A todos mis amigos y mis compañeros del trabajo y del Morales Meseguer, sin ellos, todo esto tampoco hubiera sido posible.

Por último, a mis directores, Mario y Fabio. Desde que en 2018 conocí a Fabio para inscribirme en el máster de Cirugía e Implantología, ha sido un trampolín de conocimientos y un referente a seguir.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

4VBC: 4-vinilbencilo

Ala: alanina

ALP: fosfatasa alcalina

AMART: terapia antirresortiva

AMP: péptidos antimicrobianos

ARNem: ácido ribonucleico modificado químicamente

BAT: tendón de Aquiles bovino

BBT: Grupo de Biomecánica e Ingeniería Tisular

bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos básico

bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos básico

BMP: proteínas morfogénicas óseas

BMSC: células madre estromales derivadas de la médula ósea

BP: pericardio bovino

BSP-1 o BNSP: hueso/sialoproteína I

BV/TV: volumen de hueso nuevo/volumen total

Co: cobalto

CPC: cloruro de cetilpiridinio

CRIS: Guía para publicar casos *in vitro*

CXCR4: receptor de quimiocina CXC tipo 4

DAPI: diclorhidrato de 4'6-diamino-2-fenilindol, D952

DHT: radiación o tratamiento dehidrotermal

DMEM: solución de Medio de Eagle Modificado de Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DPC: células de la pulpa dental

d-PTFE: politetrafluoretileno denso

EAT: tendón de Aquiles equino

EDC-NHS: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

EGCG: epigallocatequina-3-galato

EGF: factor de crecimiento epidérmico

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima

EP: pericardio equino

e-PTFE: politetrafluoretileno expandido

FESEM: microscopio electrónico de barrido por emisión de campo

GA: glutaraldehído

GAG: glucosaminoglicanos

Gly: glicina

H₂O: agua

HA: hidroxiapatita

HAp/TCP/Col: complejo hidroxiapatita/fosfato tricálcico/colágeno

HE: Hematoxilina y Eosina

HFDF: fibroblastos dérmicos del prepucio humano

hFOB: osteoblastos fetales humanos

HOB: osteoblastos humanos

HUVEC: células endoteliales de la vena umbilical humana

Hyp: hidroxiprolina

IGF: factor de crecimiento epidérmico

kDa: kilodalton

KGF: factor de crecimiento de queratinocitos

kV: kilovoltio

MA: anhídrido metacrílico

MAVU: matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo

MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1

Mg: magnesio

MMP: metaloproteinasas de la matriz

MNGC: células gigantes multinucleadas

MOF: cristales de estructura metal-orgánica

MPa: megapascal

MSC: células madre mesenquimales

mTG: transglutaminasa microbiana

MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio

N: newton

NaCl: cloruro sódico

NMP: N-metil-2-pirrolidona

OPG: osteoprotegerina

OSA: sodio alginato de óxido

PA: proantocianidinas

PBS: solución salina tamponada con fosfato

PCL/Col: policaprolactona/colágeno

PCL: policaprolactona

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGF-BB: factor de crecimiento derivado de plaquetas BB

PDLLA: poli-D,L-lactida

PDO: polidioxanona

PEG: polietilenglicol

PEI: complejo polietilenimina

PGA: ácido poliglicólico

PLA: ácido poliláctico

PLGA: ácido poliláctico/ ácido poliglicólico

PLLA: poli- L-lactida o ácido poliláctico

PMMA: polimetilmetacrilato

POC: proantocianidinas oligoméricas

PP: pericardio porcino

PPE: peritoneo porcino

Pro: prolina

ROG: regeneración ósea guiada.

RTG: regeneración tisular guiada.

SBF: Suero Bovino Fetal

SDF-1: factor 1 derivado de células estromales

SEM: microscopía electrónica de barrido

Sr: estroncio

TG: pérdida de peso en función de la temperatura

TG2: transglutaminasa tisular

TGF: factor de crecimiento transformante

TGF-beta 1: factor de crecimiento transformante beta 1

Ti: titanio

UV: ultravioleta

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

X: aumento de lente

Zn: zinc

ZnO: óxido de Zinc

RESUMEN

Objetivo: Comparar las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo (MAVU) con otras seis membranas de colágeno de fuentes de colágeno porcino, equino y bovino. **Materiales y Métodos:** Un total de 70 membranas de colágeno (10 por grupo) fueron incluidas en este estudio *in vitro*, en el que se compararon las propiedades de una nueva membrana de MAVU con el resto de membranas de colágeno animal existentes en el mercado, de tejido cardíaco y no cardíaco, de origen porcino, equino y bovino. Cardíaco: pericardio porcino (PP), pericardio equino (EP), pericardio bovino (BP). No cardíacos: peritoneo porcino (PPE), tendón de Aquiles equino (EAT), tendón de Aquiles bovino (BAT). En todos los grupos analizamos cuatro propiedades físicas (morfología de la superficie, propiedad hidrofílica, ratio de degradación y estabilidad térmica), dos propiedades mecánicas (resistencia a la tracción y elongación en seco y húmedo) y cinco propiedades biológicas (viabilidad celular, cuantificación de colágeno tipo I, cuantificación de osteopontina, actividad de ALP y depósito de calcio). **Resultados:** Las membranas de MAVU mostraron una morfología superficial (en superficies lisas y rugosas) muy similar a las de PP, EP, EAT y BAT. La membrana más hidrofílica (en ambas superficies) fue la de PPE. Las membranas de MAVU mostraron un bajo índice de degradación y una estabilidad térmica similar al resto de membranas. En relación a las propiedades mecánicas las membranas de MAVU tenían una resistencia a la tracción (seca y húmeda) y una elongación (seca) similar al resto de membranas estudiadas. Sin embargo, su elongación fue mucho mayor que el resto cuando se humedecían. Finalmente, la nueva membrana de colágeno de MAVU fue la que mostró mejores propiedades biológicas. **Conclusiones:** La nueva membrana de colágeno de MAVU mostró propiedades físicas y mecánicas similares a las otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino. Sin embargo, al humedecerlas fueron las membranas con mayor capacidad de elongación, y además mostraron tener las mejores propiedades biológicas. En este sentido, la MAVU podría ser una fuente de colágeno ideal para la fabricación de membranas de colágeno para la regeneración ósea guiada (ROG), pero son necesarios más estudios clínicos.

Palabras clave: Matriz acelular de vejiga urinaria, membranas de colágeno, regeneración ósea guiada, actividad de osteoblastos, potencial osteogénico.

SUMMARY

Objective: To compare physical, mechanical, and biological properties of a new collagen membrane of porcine acellular urinary bladder matrix (AUBM) with six other collagen membranes from porcine, equine, and bovine collagen sources. **Materials and Methods:** A total of 70 collagen membranes (10 per group) were included in this *in vitro* study in which the properties of a new membrane of AUBM were compared with those of other commercially available animal collagen membranes from heart and non-heart sources of porcine, equine, and bovine origin. Heart: porcine pericardium (PP), equine pericardium (EP), bovine pericardium (BP). Non-heart: porcine peritoneum (PPE), equine Achilles tendon (EAT), bovine Achilles tendon (BAT). In all groups, we analyzed four physical properties (surface morphology, hydrophilic properties, degradation ratio, and thermal stability), two mechanical properties (tensile strength and elongation in dry and wet), and five biological properties (cell viability, quantification of type I collagen, quantification of osteopontin, ALP activity, and calcium deposition). **Results:** The AUBM membranes showed a surface morphology (in smooth and rough surfaces) very similar to those of PP, EP, EAT, and BAT. The most hydrophilic membrane (in both surfaces) was that of PPE. The AUBM membranes showed a low degradation ratio and a thermal stability similar to the rest of the membranes. Regarding the mechanical properties, the AUBM membranes had a tensile strength (dry and wet) and an elongation (dry) similar to the rest of the membranes studied. However, their elongation was much greater than the rest when wet. Finally, the new collagen membrane of AUBM was the one that showed the best biological properties. **Conclusions:** The new collagen membrane of AUBM showed physical and mechanical properties similar to the other six collagen membranes from porcine, equine, and bovine collagen sources. However, when wetted, they were the membranes with the highest elongation capacity, and also showed the best biological properties. In this sense, AUBM could be an ideal collagen source for the fabrication of collagen membranes for guided bone regeneration (GBR), but further clinical studies are necessary.

Keywords: Acellular urinary bladder matrix, collagen membranes, guided bone regeneration, osteoblast activity, osteogenic potential.

ÍNDICE

<u>1. Introducción</u>	1
1.1 Implicaciones actuales tras la pérdida dentaria y el tejido periodontal	1
1.2 Fundamentos de la membrana, regeneración tisular y regeneración ósea	2
1.3 Clasificación de las membranas en regeneración tisular	3
1.3.1 Membranas reabsorbibles	3
1.3.2 Membranas no reabsorbibles	17
1.3.3 Potenciación con agentes bioactivos	21
1.4 Técnicas de uso o aplicación de las membranas de colágeno	28
1.4.1 Preservación alveolar con o sin implante inmediato	30
1.4.2 Regeneración de la cresta alveolar antes y durante la colocación de implantes	31
1.4.3 Aplicación en defectos intraóseos	32
1.4.4 Aplicación en defectos de furca	33
1.4.5 El uso de la membrana de colágeno en procedimientos de cobertura radicular	34
1.4.6 Otros usos o aplicaciones de la membrana de colágeno	34
1.5 Factores a tener en cuenta respecto a las membranas de colágeno	35
1.6 Futuro y búsqueda de la membrana ideal	36
<u>2. Justificación y objetivos</u>	37
2.1 Justificación	38
2.2 Objetivos	42
<u>3. Metodología</u>	44

3.1 Diseño de estudio <i>in vitro</i>	45
3.2 Materiales de membrana de colágeno.....	45
3.3 Preparación de membrana de colágeno de MAVU.....	46
3.4 Propiedades físicas 1: morfología superficial con microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).....	50
3.5 Propiedades físicas 2: propiedad hidrofílica.....	50
3.6 Propiedades físicas 3: ensayo de ratio de degradación.....	51
3.7 Propiedades físicas 4: análisis de estabilidad térmica.....	51
3.8 Propiedades mecánicas 1 y 2: resistencia a la tracción y elongación.....	52
3.9 Propiedades biológicas 1: viabilidad celular (ensayo de proliferación celular).....	53
3.10 Propiedades biológicas 2 y 3: cuantificación de colágeno tipo I y osteopontina.....	54
3.11 Propiedades biológicas 4: actividad ALP.....	54
3.12 Propiedades biológicas 5: tinción con rojo de alizarín (depósitos de calcio).....	55
3.13 Análisis estadístico.....	55
<u>4. Resultados</u>	56
4.1 Propiedades físicas 1: Morfología de la superficie con microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).....	57
4.2 Propiedades físicas 2: propiedad hidrofílica.....	58
4.3 Propiedades físicas 3: ensayo de ratio de degradación.....	60
4.4 Propiedades físicas 4: análisis de estabilidad térmica.....	62
4.5 Propiedades mecánicas 1 y 2: resistencia a la tracción y elongación.....	63
4.6 Propiedades biológicas 1: viabilidad celular	

(ensayo de proliferación celular).....	66
4.7 Propiedades biológicas 2 y 3: cuantificación de colágeno tipo I y osteopontina.....	67
4.8 Propiedades biológicas 4: actividad ALP.....	69
4.9 Propiedades biológicas 5: tinción con rojo de alizarín (depósitos de calcio).....	70
<u>5. Discusión</u>	71
<u>6. Conclusiones</u>	79
<u>7. Bibliografía</u>	82
<u>8. Anexos</u>	120

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Implicaciones actuales tras la pérdida dentaria y el tejido periodontal

Vivimos en una sociedad en la que, la imagen, nuestra salud y la forma de comunicarnos cada vez tienen un papel más importante. El avance de la tecnología ha supuesto que cada día seamos más conscientes de cómo nos vemos nosotros mismos y como nos ven los demás (calidad de las fotografías, redes sociales, marketing, asesores de imagen, estilistas, etc.). Esto ha llevado a que la exigencia en lo que a la estética se refiere, tanto a nivel personal como profesional haya aumentado considerablemente. Además, existe una mayor concienciación a nivel de salud general y del cuidado de la higiene personal. La pérdida de un diente conlleva una alteración estética y funcional que, debido al aumento de la esperanza de vida, es cada vez más frecuente. Además, se considera un factor importante en nuestra salud general. La presencia de edentulismo total o parcial puede afectar al paciente, no solo en su capacidad funcional, sino que, con el tiempo también puede provocar problemas nutricionales y, por los cambios estéticos ocasionados en el rostro, pueden provocar alteraciones psicológicas (Palkovics y cols., 2023, Roohafza y cols., 2014). El edentulismo puede tener un efecto crítico en muchos aspectos de nuestra calidad de vida, como la masticación, el habla, la sonrisa, risa, imagen personal, relaciones sociales, tipo de nutrición y desórdenes gastrointestinales. En Europa, la prevalencia de edentulismo oscila entre el 15% y el 72% en la población adulta de 65-74 años (Lee y cols., 2018). De hecho, perder un diente está asociado con acontecimientos negativos como depresión, estrés crónico y ansiedad (Roohafza y cols., 2014). En las últimas décadas, la rehabilitación bucal mediante implantes dentales, se ha convertido en una técnica con resultados muy predecibles y con una elevada tasa de éxito y supervivencia, tanto de los implantes como de las prótesis dentales implantosoportadas o implantoretenidas (Tang y cols., 2023). La Sociedad Italiana de Periodoncia e Implantología realizó un estudio sobre 2157 sujetos, en los que, de media, cada sujeto había perdido 3.8 ± 0.3 dientes y el 66% de ellos presentaba al menos una extracción dental, excluyendo los terceros molares. Muy frecuentemente se utilizaron implantes (46% llevaban prótesis). En los periodos entre 2015-2017 hubo un aumento en la colocación de implantes respecto a los periodos 2010-2014. Estos resultados representan una tendencia en aumento en cuanto al uso de implantes en la población (Cairo y cols., 2018). Con este tratamiento quirúrgico-prótesis los pacientes pueden reponer los dientes

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

perdidos, cumpliendo no solo con la función principal de los dientes, que es masticar los alimentos (favoreciendo una adecuada digestión), sino que también desempeñan un importante papel social, ya que los dientes son cruciales para la fonación y para mantener una expresión facial armoniosa (Frisch y cols., 2020).

Sin embargo, la presencia de defectos óseos verticales u horizontales en el maxilar o la mandíbula, es la principal condición que dificulta la colocación de implantes dentales osteointegrados mediante una técnica convencional. Estos defectos óseos están, en su mayoría, causados por patologías infecciosas, tumorales o traumáticas (Lian y cols., 2020); aunque la propia pérdida dental, también provoca una atrofia del hueso alveolar (de Azambuja y cols., 2019). De hecho, en el estudio de Cairo y cols., en 2018 (Cairo y cols., 2018) los pacientes que afirmaban ellos mismos haber tenido enfermedad periodontal mostraban valores mucho más altos en cuanto a pérdida dentaria (10.1 ± 0.3 por cada paciente). Por tanto, gran parte de los pacientes a rehabilitar cuentan con un periodonto, al menos reducido, y con probables defectos óseos. Esto hace que, en ciertos casos, sea necesario regenerar parte del hueso perdido de manera previa o de forma simultánea a la colocación de los implantes dentales. En este sentido, fue la búsqueda y la investigación de la regeneración de los tejidos periodontales la que llevó a los conceptos de regeneración que conocemos actualmente. (Prichard y cols., 1957).

1.2 Fundamentos de la membrana, regeneración tisular y regeneración ósea

La técnica más estudiada y con mayor respaldo científico para corregir defectos óseos maxilares es la conocida como Regeneración Ósea Guiada (ROG). Esta fue descrita por Dahlin y cols., (Dahlin y cols., 1988) en el año 1988, donde aplicaron a la regeneración ósea los conceptos previamente descritos en la técnica de Regeneración Tisular Guiada (RTG) para la regeneración de defectos periodontales (Melcher y cols., 1976; Nyman y cols., 1982). Ambas técnicas, están basadas en la utilización de una membrana que, a modo de barrera física, produce una compartimentalización del defecto, impidiendo la colonización de este por estirpes celulares no deseadas, de esta forma, el tipo de célula que primero colonice el defecto va a determinar el tejido que se formará en él. De esta manera, las membranas biocompatibles impiden la migración celular de la mucosa y del epitelio periodontal hacia el defecto óseo, favoreciendo la regeneración ósea (Gottlow y cols., 1984).

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

1.3 Clasificación de las membranas en regeneración tisular

Las membranas para ROG se pueden clasificar en dos grandes grupos: reabsorbibles y no reabsorbibles (Tabla 1).

MEMBRANAS REABSORBIBLES (ORIGEN ANIMAL)			MEMBRANAS NO REABSORBIBLES (d-PTFE, e-PTFE)	
EQUINO	PORCINO	BOVINO	Refuerzo de Ti	Sin Refuerzo de Ti
Pericardio Tendón Aquiles	Pericardio Peritoneo	Pericardio Tendón Aquiles	Tabla 1. Clasificación de membranas según las principales fuentes de origen y reabsorción.	
MEMBRANAS REABSORBIBLES (ORIGEN SINTÉTICO) (PLA, PGA, PCL)				

1.3.1 Membranas reabsorbibles

La ventaja principal de estas membranas de barrera frente a las membranas no reabsorbibles es que no existe la necesidad de tener que retirarlas en una segunda intervención quirúrgica. Además, destacan por tener un menor número de complicaciones postoperatorias (Sanz y cols., 2019). Al mismo tiempo, tienen el desafío de equiparar su tiempo de reabsorción con el periodo de regeneración tisular donde se localicen, aunque su capacidad de regeneración es más limitada que las no reabsorbibles, debido principalmente a que su ratio de degradación es variable. La rápida degradación de la membrana y su potencial degradación de subproductos, en ocasiones, lleva a un fracaso clínico de la ROG. Su falta de estabilidad causada por su baja fuerza mecánica comparada a las no reabsorbibles es su mayor limitación clínica (Ren y cols., 2022).

Dependiendo de su origen, las membranas reabsorbibles se dividen en polímeros naturales, representados por el colágeno, y los polímeros sintéticos representados por poliésteres alifáticos, como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), y la policaprolactona (PCL) (Gentile y cols., 2011).

Membranas reabsorbibles basadas en compuestos sintéticos

La mayoría de las membranas de compuestos sintéticos reabsorbibles actuales en el mercado se basan en poliésteres alifáticos, como el PLA, PGA, PCL, el ácido polihidroxivalérico y el ácido polihidroxibutírico, así como sus copolímeros. El inconveniente principal de estas membranas es la posible inflamación que causan los productos generados con su degradación, aumentando el riesgo de reacción a cuerpo extraño (Yang y cols., 2021). En un estudio compararon la cantidad de regeneración conseguida respecto a las membranas no reabsorbibles y encontraron peores resultados en los polímeros sintéticos (PLA y PGA) (Gueldenpfennig y cols., 2020). Cuando comparamos además con las otras membranas reabsorbibles existentes, en este caso las naturales, otra característica más crucial si aún cabe, es que típicamente no tienen una actividad proliferativa o biológica tan potente (Sheikh y cols., 2016). Sin embargo, debido a la facilidad para modificar su biodegradabilidad, sus propiedades mecánicas (facilidad del manejo), y la posibilidad de implementar fármacos en su composición (Sbricoli y cols., 2020; Wessing y cols., 2017) se han establecido ampliamente para su aplicación, tanto en experimentos en laboratorio, como en la práctica clínica, especialmente para las técnicas de RTG y ROG.

PLA y copolímero de ácido poliláctico/ácido poliglicólico (PLGA)

El PLA es un polímero sintético derivado del ácido láctico, con una tasa de reabsorción baja, que se utiliza de manera frecuente en los procedimientos de RTG y ROG debido a sus adecuadas propiedades mecánicas y biocompatibilidad. Se trata de un polímero biodegradable y en su degradación genera agua y dióxido de carbono. El método de fabricación es mediante electrohilado (generación de nanofibras a partir de un polímero) (Tatakis y cols., 1999). Dentro de su composición se suelen sintetizar copolímeros para mejorar su velocidad de degradación o la hidrofilicidad (lactida, caprolactona y glicólido). El PLGA es una de las combinaciones más conocidas y utilizadas. Existen numerosas empresas que comercializan este tipo de membranas y cada una de ellas tiene propiedades distintas, ya sea su estabilidad en el tiempo o su tasa de reabsorción completa.

Guidor[®] Matrix Barrier (Sunstar Americas, Chicago, IL, EE. UU.), fue la primera y actualmente la más ampliamente estudiada como membrana sintética, fabricada en una

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

matriz aloplástica, posee dos capas y está hecha de una mezcla homogénea de dos polímeros, poli-D,L-lactida (PDLA) y poli- L-lactida (PLLA), junto con citrato de acetil tri-n-butilo. GUIDOR® Matrix Barrier sostiene que su función de barrera se mantiene durante un mínimo de 6 semanas, mientras que se reabsorbe gradualmente en 13 meses. Resolut Adapt® y Resolut Adapt® LT (W.L. Gore y asociados, Flagstaff, AZ, EE. UU) están fabricadas en PLGA y se mantienen estables durante 8 a 10 semanas y se reabsorben en 16 a 24 semanas, respectivamente, para combinar las posibles necesidades en función de la ROG o RTG que se quiera aplicar. Por último, Vivosorb® (Polyganics, Groningen, Países Bajos) posee uno de los tiempos de estabilidad más altos, en torno a 10 semanas, y un tiempo de reabsorción de 24 meses (Lundgren y cols., 1994).

La membrana de PLGA ha mostrado resultados similares en la regeneración del alveolo post-extracción en comparación con la membrana de colágeno (Hua y cols., 2014). Además, algunos estudios informaron que tanto las membranas no reabsorbibles como Resolut Adapt® (W.L. Gore y asociados, Flagstaff, AZ, EE. UU) fueron igualmente efectivas para mejorar la regeneración periodontal (Wadhawan y cols., 2012). Sin embargo, en un ensayo controlado aleatorizado, la membrana PLGA demostró resultados deficientes para mantener el espesor óseo horizontal regenerado respecto a la membrana de politetrafluoetileno expandido, con refuerzo de titanio, y ésta última reveló menos complicaciones en los tejidos blandos (Schneider y cols., 2014). Para corregir la rigidez que conlleva el proceso de fabricación de las membranas de PLA y PLGA, se han introducido una serie de suavizantes, como N-metil-2-pirrolidona (NMP). Algunos estudios recientes han demostrado que la NMP podría suavizar las membranas de PLGA y acelerar la maduración de las células preosteoblásticas y la regeneración ósea. Similar a lo anterior, se ha visto que tiene un papel positivo en estas membranas de PLGA con respecto al crecimiento óseo en su capa interna. Cuando se combina con sustituto mineral óseo bovino desproteinizado, el PLGA puede funcionar de manera similar al colágeno natural (Karfeld-Sulzer y cols., 2017; Jung y cols., 2011).

Aunque las membranas basadas en PLA y PLGA no son citotóxicas y son biodegradables, las liberaciones de oligómeros y subproductos ácidos durante su degradación pueden desencadenar reacciones inflamatorias y respuestas a cuerpo extraño *in vivo* (Van Leeuwen y cols., 2012), por lo que se han llevado a cabo muchos estudios

para modificar sus propiedades, por ejemplo, añadiendo a su composición hidroxiapatita (HA) u óxido de Zinc (ZnO).

Policaprolactona (PCL)

La PCL es un polímero biomédico interesante y ha sido ampliamente estudiado en el campo de la ROG/RTG debido a su biocompatibilidad, fácil procesabilidad, bajo costo y alta resistencia mecánica (De Santis y cols., 2015). La PCL no produce un ambiente ácido local durante el procedimiento de degradación en comparación con el PLA y el PLGA. Sin embargo, la bioresorción completa *in vivo* de las membranas de PCL es de aproximadamente 2 a 3 años, lo que es demasiado tiempo para su aplicación en el tratamiento de RTG y ROG, además de su baja osteoconductividad y baja bioactividad. Además, su hidrofobicidad reduce la adhesión y proliferación celular. Por lo tanto, el PCL siempre se mezcla o copolimeriza con otros polímeros antes de la aplicación biomédica. (Dehnavi y cols., 2018; Pitaluga y cols., 2018; Castro y cols., 2018; Münchow y cols., 2015; Wang y cols., 2020)

Polietilenglicol (PEG)

El PEG es un polímero biodegradable y biocompatible que también se utiliza como sustrato en la preparación de las membranas en ROG y RTG. El hidrogel de PEG ha demostrado una alta biocompatibilidad e integración tisular en ratas, y la tasa de degradación dependía de la composición del PEG. En un ensayo controlado aleatorizado, la membrana de hidrogel de PEG obtuvo resultados similares a la membrana de colágeno en el tratamiento de las dehiscencias óseas periimplantarias con una técnica simplificada de tratamiento. Además, estudios recientes encontraron que las membranas de PEG exhibían potencial para el aumento de defectos óseos horizontales y la preservación de la integridad de la cresta alveolar (Thoma y cols., 2009; Herten y cols., 2009; Jung y cols., 2009).

Los polímeros sintéticos son altamente personalizables, permitiendo un control preciso de la forma de la membrana, su grosor, porosidad, fuerza mecánica y sus propiedades de degradación a través de modificar su estructura química y sus condiciones de preparación. Debido a estas ventajas, el desarrollo de membranas de polímeros sintéticos ha sido el foco de la próxima generación de membranas. Aunque la mayoría de los polímeros sintéticos se consideran no citotóxicos y degradables, las membranas de polímeros sintéticos todavía siguen teniendo el riesgo de desencadenar intensas

reacciones inflamatorias causadas por oligómeros y subproductos ácidos liberados durante el proceso de degradación, así como el período de degradación de algunos polímeros (como el PCL) que es demasiado prolongado (24 a 36 meses) para los procedimientos de regeneración.

Membranas reabsorbibles basadas en compuestos naturales

La característica más sorprendente de las membranas poliméricas naturales es su bioactividad inherente, es decir, que por sí solas ya tienen una alta biocompatibilidad y un microambiente de regeneración de tejidos muy ventajoso (Ricard-Blum y cols., 2011). Al mismo tiempo, los polímeros naturales plantean ciertos problemas en cuanto a reacciones inmunogénicas, procesos de preparación complejos y cierto riesgo de transmisión de enfermedades, aunque bastante improbable (Aprile y cols., 2020). El colágeno y el quitosano son dos de las membranas poliméricas naturales más representativas que han atraído la mayor parte de la investigación, y el colágeno en particular domina el panorama clínico. El colágeno, como componente predominante de la matriz extracelular, exhibe una excelente biocompatibilidad debido a su soporte estructural y propiedades regenerativas. Entre los más de veinte tipos de colágeno que se han clasificado, el colágeno tipo I y tipo III de los tejidos porcinos y bovinos son las fuentes predominantes en este tipo de membranas. El colágeno tiene muchas propiedades que lo hacen adecuado para procedimientos de RTG. Además de las ventajas de una sola intervención quirúrgica, las membranas de colágeno aceleran clínicamente la estabilización temprana de la zona quirúrgica y el cierre inicial del defecto. Las membranas de colágeno también muestran bajas tasas de exposición, especialmente en comparación con las membranas no reabsorbibles. Igualmente, su rápida absorción después de la exposición también elimina eficazmente el microambiente abierto para la infección bacteriana. Además, en cuanto a sus propiedades biológicas, el colágeno es el único material de membrana de barrera de origen animal cuya baja inmunogenicidad, así como la adhesión y quimiotaxis a fibroblastos y osteoblastos, pueden mediar una excelente integración tisular y angiogénesis.

También se ha demostrado que las membranas de colágeno adsorben factores activos liberados por las células adyacentes (como el TGF- β), como mecanismo molecular que contribuye a la regeneración ósea. Por tanto, las membranas de colágeno

han despertado mucho interés como biomateriales con funciones bioactivas únicas (Von Arx y cols., 2006; Caballé-Serrano y cols., 2017).

Se han desarrollado y se utilizan en la práctica clínica muchos tipos diferentes de membranas de colágeno, como Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza), BoneProtect® (Dentegris Alemania GmbH, Duisburgo), HEART® (Bioteck S.p.A., Arcugnano, Italia), Biocollagen® (Bioteck S.p.A., Arcugnano, Italia)

Debido a las diferentes fuentes de colágeno y procesos de extracción, estas membranas de colágeno muestran diferentes estructuras químicas y físicas.

La membrana de colágeno comercial más importante y estudiada, con más de 400 artículos publicados, es Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza). Está compuesta de colágeno de tipo I y tipo III de origen porcino. Contiene una estructura bicapa formada por una capa densa y una capa porosa, que permite la regulación de la función de barrera. Esta estructura bicapa facilita la migración y diferenciación de osteoblastos al tiempo que previene la invasión de fibroblastos, lo que la convierte en una solución clásica para el diseño estructural de membranas de barrera. La capa densa de Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza) permanece intacta hasta 60 días después de su colocación, mientras que la capa porosa se degrada con mayor rapidez.

En la actualidad, el origen del colágeno usado para la fabricación de estas membranas reabsorbibles es: porcino, equino y bovino; y los lugares anatómicos para su obtención son pericardio (porcino, equino y bovino), tendón de Aquiles (equino y bovino), y peritoneo (porcino) (Marques y cols., 2023; Felice y cols., 2023; Wu y cols., 2017; Rezvanian y cols., 2017; Shi y cols., 2023; Tamburaci y Tihminlioglu, 2021; Zhu y cols., 2023; Pierfelice y cols., 2022).

El colágeno, según la fuente de donde provenga, difiere mucho en estructura y composición, lo que también afecta en gran medida la respuesta celular y el patrón de degradación de las membranas de colágeno *in vivo*. Un estudio reciente ha comparado las propiedades de dos membranas porcinas, una provenía del tejido pericárdico (Jason®, Instituto Straumann AG, Peter Merian-Weg, Suiza) y la otra del peritoneo (Bio-Gide®, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza). Sus conclusiones fueron, que la membrana de pericardio porcino podría ser útil para procedimientos de regeneración ósea menos complejos o que requieran un proceso más rápido y la membrana de peritoneo porcino puede ser apropiada para procedimientos complejos, más lentos o para pacientes con

condiciones de salud que no garanticen una buena vascularización. Si bien es cierto que ambas se consideraron eficaces para el proceso de regeneración de defectos complejos en modelo animal (Ramos y cols., 2024). En general, se pueden extraer conclusiones sobre el origen y la localización del colágeno y las propiedades resultantes de la membrana de barrera. El principal colágeno disponible actualmente proviene predominantemente del pericardio y de la piel de mamíferos con una alta similitud con el colágeno humano. De ellos, la piel y los tendones son los más utilizados debido a su alto contenido de colágeno. La dermis de los mamíferos contiene hasta un 60-70% de colágeno y sus fibras están distribuidas anisotrópicamente a lo largo de la línea más larga. Las fibras de colágeno de la dermis están dispuestas en una red suelta y contienen una mezcla de macromoléculas como el ácido hialurónico, el dermatán sulfato y sulfato de condroitina que, en combinación con una gran cantidad de agua, llenan los espacios entre las fibras de colágeno. Además, el tejido de la piel contiene una gran cantidad de vasos sanguíneos, vasos linfáticos, folículos pilosos y glándulas sudoríparas, de modo que el proceso de purificación es más complicado. Aunque las membranas de colágeno porcino han mostrado diferencias temporales en su patrón de biodegradación, parece que este tipo de membrana se degrada más rápido en comparación con las membranas basadas en materiales obtenidos de otros tejidos o fuentes animales.

El colágeno derivado del tendón representa hasta el 85% de su peso seco y está compuesto casi en su totalidad por colágeno tipo I. Por lo tanto, esta área tiene el nivel más bajo de contaminantes de colágeno y es el mejor sitio para la extracción de colágeno tipo I. Además, la estructura del tendón permite que las fibras de colágeno se enrollen y alineen en la dirección principal de carga. Incluso después del procedimiento de extracción, las fibras de colágeno del tendón conservan su disposición de apilamiento lateral. La teoría anterior, apoya la hipótesis de que las membranas derivadas del tendón de Aquiles tienen una mayor estabilidad físico-química. Sin embargo, las membranas de colágeno derivadas del tendón son escasas en el mercado, debido a su elevado coste (Meyer y cols., 2019; Terzi y cols., 2020; Matinong y cols., 2022; Barbeck y cols., 2015).

Se ha descrito que el colágeno del tendón equino tiene niveles más altos de lisina e hidrógeno lisina en comparación con el tendón de otros mamíferos, haciendo que sus productos biológicos sean teóricamente más resistentes a la degradación y al desgarramiento. Sin embargo, Biocollagen® (Bioteck by Bioteck SpA, Arcugnano, Italia), una membrana de colágeno derivada del tendón de Aquiles equino, no ha mostrado un patrón de

degradación satisfactorio, con un tiempo de estabilidad o mantenimiento de solo 4 a 6 semanas, lo que parece contradecir la hipótesis inicial. Más aún, en el estudio de Toledano y cols., en 2020 (Toledano y cols., 2020), demostraron que, de las tres membranas de colágeno analizadas, las membranas de colágeno de la dermis porcina tuvieron la mayor resistencia a la degradación en comparación con el pericardio equino y el colágeno liofilizado equino. Resultados similares fueron confirmados por el estudio de Vallecillo-Rivas y cols., en 2021 (Vallecillo-Rivas y cols., 2021) en el que las membranas de colágeno equino mostraron la resistencia a la degradación más débil entre las cinco membranas analizadas. Entre ellas, Biocollagen® (Bioteck S.p.A., Arcugnano, Italia), procedente de tendón de Aquiles equino y Heart® (Bioteck S.p.A., Arcugnano, Italia), de tejido pericárdico equino. Sin embargo, esta rápida degradación también podría atribuirse a la especie; por lo que aún se necesita más evidencia para esclarecer el patrón de degradación de las membranas derivadas del tendón de Aquiles. La carne de origen equino y sus productos biológicos no son aceptados por judíos y musulmanes (Ghodbane y cols., 2016; Vallecillo-Rivas y cols., 2021; Toledano y cols., 2020).

El colágeno del pericardio también es muy interesante en cuanto a su comportamiento mecánico, pues posee las propiedades biomecánicas del tejido pericárdico. A menudo exhibe una elevada resistencia al desgarro multidireccional debido a que en su composición contiene fibras de colágeno delgadas, onduladas y orientadas multidireccionalmente en su interior. Además, el grado de reticulación natural parece aumentar el tiempo de estabilidad, ya que suelen permanecer estables como mecanismo de barrera hasta 12 semanas después de su colocación (Radenkovic y cols., 2021). Entre los mamíferos, los orígenes bovino y porcino son las fuentes más importantes de extracción de colágeno porque es la carne más consumida per cápita. Sin embargo, todavía se supone, en cierto modo, que podrían enfrentar reacciones inmunitarias y transmitir enfermedades infecciosas, además de diferentes prohibiciones religiosas.

1.3.1.1. Estrategias de reticulación de colágeno

Las malas propiedades mecánicas y las altas tasas de degradación de las membranas basadas en colágeno natural siguen siendo su mayor limitación en la práctica

clínica. Para mejorar su durabilidad y su resistencia mecánica, se ha planteado como un método eficaz la reticulación o cross-linking.

Se han realizado diferentes experimentos para potenciar las propiedades de las membranas de colágeno. Las moléculas de colágeno simples son inestables, por lo que, en la naturaleza, suelen tener una estructura de tres capas conocida como fibrillas de colágeno, y estas fibrillas se organizan juntas para formar fibras de colágeno mediante entrecruzamiento covalente. El colágeno se divide en varios tipos, según su ubicación y características. Entre más de 20 tipos de colágeno, el colágeno tipo I tiene una composición similar al tejido conectivo periodontal y es el componente principal del 90% de las membranas de colágeno comercializadas (Ricard-Blum y cols., 2011; Chau y cols., 2005).

En principio, la reticulación inhibe el deslizamiento entre moléculas de colágeno bajo presión, mediante la introducción de enlaces covalentes o no covalentes intramoleculares e intermoleculares, lo que aumenta la rigidez, la resistencia a la tracción, el módulo de compresión y reduce la extensibilidad de las fibras de colágeno. Al mismo tiempo, la reticulación intermolecular también mejora la resistencia del colágeno contra la degradación enzimática al enmascarar el lugar de escisión del colágeno. La reticulación del colágeno puede inducirse mediante una variedad de técnicas, que se revisan brevemente a continuación (Gao y cols., 2022; Oryan y cols., 2017).

Estrategias físicas de reticulación

Los métodos de reticulación física del colágeno comprenden principalmente la radiación deshidrotérmica (DHT) y la ultravioleta (UV). Ambos procesos no requieren la incorporación de ningún agente químico evitando la amenaza de toxicidad biológica. Los rayos UV inducen la formación de radicales libres altamente reactivos, que median la formación de enlaces covalentes basados en carbonilo intra y extrafibrilares en residuos de aminoácidos aromáticos (Jiang y cols., 2022). Este método es altamente germicida, ya que la luz ultravioleta destruye el material genético de los microorganismos. Sin embargo, la desnaturalización del colágeno inducida por los rayos UV, que contrarresta el efecto estabilizador, se produce continuamente durante la reticulación. La presencia de agua en la reticulación UV es necesaria para iniciar la producción de radicales libres, y la tasa y cantidad de producción de radicales libres es el principal factor limitante para el grado de

reticulación. Por este motivo, no se pueden lograr altas densidades de reticulación mediante la inducción UV únicamente. La combinación con reactivos activados por luz, como la riboflavina, parece ser más eficaz. En el año 2020, Zhang y cols., (Zhang y cols., 2020) fabricaron una membrana amniótica reticulada UV/riboflavina, que exhibía cambios estructurales similares al bambú acompañados de una mayor fragilidad y rigidez, lo que prolonga aún más la tasa de degradación *in vivo*. Recientemente, también se han desarrollado estrategias de reticulación UV basadas en precursores fotoactivos de atelocolágeno. Liang y cols., en 2020 (Liang y cols., 2020) diseñaron atelocolágeno funcionalizado con cloruro de 4-vinilbencilo (4VBC) y anhídrido metacrílico (MA) para fabricar una membrana ROG tratada con UV. Se ha demostrado ampliamente que el MA, como monómero altamente reactivo, genera redes entrecruzadas rápidamente a través de radicales libres fotoinducidos. Además, se demostró que el colágeno funcionalizado con 4VBC exhibe propiedades de compresión significativamente mayores en comparación con el colágeno metacrilado. También se descubrió que la introducción de 4VBC inhibe la actividad de las metaloproteinasas de la matriz (MMP). La membrana resultante mostró una excelente compresibilidad, buenos índices de tumefacción y mayor estabilidad proteolítica con respecto a Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza), como una de las membranas de colágeno comerciales más comunes (como hemos comentado anteriormente). En conjunto, la membrana reticulada UV está limitada principalmente por la dificultad de lograr propiedades mecánicas satisfactorias en comparación con la reticulación química (Gu y cols., 2019; Zhang y cols., 2020; Adamiak y cols., 2020).

Por lo tanto, se utiliza a menudo como método de reticulación auxiliar, en combinación con otros métodos de reticulación. Además, la reticulación UV es más adecuada para fabricar membranas delgadas o transparentes considerando la penetración de la radiación UV.

El tratamiento con DHT es otro método físico común para la reticulación del colágeno que implica la exposición a altas temperaturas en condiciones de vacío para provocar la formación de enlaces intermoleculares de amida y éster a través de la deshidratación. Ya en 1996, se demostró que la reticulación inducida por DHT exhibe una mayor temperatura de contracción de las fibrillas de colágeno, al tiempo que reduce su solubilidad en soluciones que contienen colagenasa en comparación con la reticulación por UV. La temperatura y el período de este tratamiento son los principales reguladores del grado de reticulación. A día de hoy, se sabe que la densidad de reticulación aumenta

con la temperatura y el tiempo dentro de un cierto rango. Sin embargo, las temperaturas y los períodos de procesamiento excesivos pueden provocar la alteración de la estructura de triple hélice del colágeno, lo que normalmente deteriora las propiedades mecánicas. Actualmente se acepta que la temperatura óptima para la DHT es de alrededor de 140-150°C. Chen y cols., en 2020 (Cheng y cols., 2020) demostraron que las propiedades mecánicas de las membranas de colágeno se veían gravemente afectadas cuando la temperatura del tratamiento con DHT excedía los 145°C o el tiempo de tratamiento excedía los 5 días.

Sin embargo, teniendo en cuenta la reacción a cuerpo extraño después de la implantación del material, el tiempo óptimo de tratamiento puede reducirse aún más. En el estudio de Nakada y cols., en 2013 (Nakada y cols., 2013) demostraron que el tratamiento térmico excesivo, da como resultado poca o ninguna infiltración celular del material de colágeno y una gran cantidad de células gigantes multinucleadas de tipo cuerpo extraño alrededor del material, lo que en última instancia puede impedir la regeneración tisular. Además, el estudio que realizaron en 2017 demostró que el tratamiento térmico a 140 ° C durante 6 h favorece la formación de hueso nuevo y la regeneración de fibras gingivales, lo que se considera un resultado favorable para la ROG. Este resultado también está respaldado por el estudio de An y cols., en 2018 (An y cols., 2018) donde las membranas DHT mostraron una mejor resistencia enzimática y resistencia a la tracción que Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza) además de exhibir una buena integración tisular *in vivo*. Así, la DHT muestra potencial como técnica de fabricación de membranas, especialmente para tratar aquellas de mayor espesor que son difíciles de tratar con radiación UV (Adamiak y cols., 2020; Gorham y cols., 1992; Nakada y cols., 2013; Chen y cols., 2020; An y cols., 2018)

Estrategias químicas de reticulación

El glutaraldehído (GA) es el agente reticulante químico tradicionalmente más empleado para el colágeno, debido a su bajo costo, alta reactividad y alta solubilidad en soluciones acuosas. Sin embargo, rara vez se ha utilizado para estudios de regeneración de tejidos en los últimos años debido a su citotoxicidad local e inducción de calcificación, así como a respuestas inflamatorias (Shi y cols., 2020).

Por el contrario, la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC-NHS) es un entrecruzante de “longitud cero” que activa químicamente los grupos de ácido carboxílico del ácido aspártico y del ácido glutámico en el colágeno para conjugarlos con hidroxilisina y aminos de residuos de lisina a través de enlaces covalentes directos, sin conectores ni espaciadores (Jiang y cols., 2022; Adamiak y cols., 2020). Todos los residuos de este método son solubles en agua y, por lo tanto, pueden eliminarse fácilmente del material con agua destilada después de la reticulación. Las membranas de colágeno reticulado con DHT/EDC muestran buena resistencia enzimática, propiedades mecánicas y una excelente integración del tejido periférico en comparación con las membranas de colágeno no reticulado disponibles comercialmente (Bio-Gide®, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza) en un modelo subcutáneo de rata. También se ha demostrado la capacidad de regeneración ósea de las membranas reticuladas EDC/NHS tanto en mandíbula de Beagle como en defectos en calvaria de conejo. Sin embargo, estudios recientes sobre las propiedades de interacción del colágeno modificado con EDC/NHS con las células muestran que tanto la afinidad como el patrón de interacciones celulares están modulados por el tratamiento con carbodiimida. El estudio de Bax y cols., (Bax y cols., 2016) parece indicar que el agotamiento de los grupos carboxilo del ácido glutámico en el colágeno mediante la reticulación EDC/NHS dificulta su unión a las integrinas y, por lo tanto, reduce la adhesión celular mediada por integrinas. Además, al aumentar la concentración de EDC, el patrón de adhesión celular al colágeno cambia de una unión dependiente de cationes metálicos divalentes, a una unión no dependiente de iones metálicos (Bax y cols., 2016; Nair y cols., 2020).

Reticulantes naturales

Los reticulantes naturales tienen importantes ventajas sobre los reticulantes químicos tradicionales en términos de biocompatibilidad. El genipín es el agente reticulante natural más conocido que se extrae principalmente de los frutos de *Gardenia jasminoides* L. o *Gardenia jasminoides*. Es solo un 0,01% más citotóxico que el glutaraldehído y exhibe importantes propiedades antiinflamatorias. Nair y cols., en 2020 (Nair y cols., 2020) demostraron que las membranas de colágeno reticuladas con Genipín proporcionaban una mayor viabilidad de los fibroblastos dérmicos humanos que las membranas reticuladas con EDC/NHS. Sin embargo, el Genipín actualmente está

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

limitado por su alto costo de producción en masa y se utiliza principalmente en estudios de laboratorio. He y cols., en el año 2022 (He y cols., 2022) prepararon una membrana de colágeno bicapa con un tamaño de poro controlado y una resistencia mecánica significativamente mejorada mediante la reticulación con alginato de sodio oxidado (OSA). Este estudio demostró que la reticulación con OSA mejoró significativamente la resistencia a la compresión y las propiedades de inflamación de las membranas de colágeno y prolongó el período de degradación. Con el aumento del contenido de OSA, la proporción de masa residual aumentó del 14,9% al 59% después de 21 días de degradación enzimática *in vitro* (He y cols., 2022).

Los polifenoles naturales también se utilizan ampliamente como reticulantes naturales del colágeno con excelentes propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y anticancerígenas. Las proantocianidinas (PA) o taninos son los compuestos polifenólicos naturales flavonoides más comunes y se consideran ampliamente eficaces para estabilizar el colágeno. Con una estructura altamente hidroxilada, las PA pueden formar fuertes enlaces de hidrógeno con el colágeno soluble, lo que las convierte en buenas candidatas para agentes reticulantes. La incorporación de PA de semillas de uva en adhesivos dentales puede promover la resistencia enzimática del colágeno en la interfaz dentina/adhesivo y prolongar significativamente el período de degradación de las fibras de colágeno (Shavandi y cols., 2018). Las PA también han mostrado una inhibición y antiadherencia significativas contra las principales bacterias cariogénicas (*Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*) y microorganismos que causan infecciones orales (*Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Clostridium difficile*). Además, las proantocianidinas oligoméricas (POC) liberadas de la dentina pueden inducir la diferenciación de las células de la pulpa dental (DPC) a un fenotipo que favorece la biomineralización. Las membranas de colágeno reticuladas con procianidinas han demostrado que podrían bloquear la migración de las células WS-1 y MG-63 (Yang y cols., 2021). Los experimentos *in vitro* demostraron que la proliferación, diferenciación y mineralización de las células MG-63 se promovían en la membrana resultante. Esto es consistente con el estudio de Li y cols., 2019 (Li y cols., 2019) en el que las membranas de colágeno reticuladas por OPC apoyan la proliferación de células L929 y MG-63, además de exhibir hasta 50 días de tiempo de estabilidad y respaldar el crecimiento de hueso nuevo *in vivo* (Green y cols., 2010; Bunte y cols., 2019; Yang y cols., 2021; Li y cols., 2019). La epigallocatequina-3-galato (EGCG), que tiene una alta similitud

estructural con las PA, es otro agente reticulante natural comúnmente utilizado. Las membranas de colágeno reticuladas con EGCG redujeron significativamente el nivel de factores inflamatorios secretados por las células MG63 en experimentos *in vitro*. Sin embargo, concentraciones más altas de EGCG mostraron una ligera inhibición de la viabilidad celular. La incorporación de polietilenglicol (PEG) en la membrana de colágeno de EGCG podría compensar en cierta medida la limitación de dosis. La submucosa del intestino delgado reticulada con EGCG (E-SIS) también mostró una mayor adhesión de fibroblastos y proosteoblastos y promovió la diferenciación osteogénica de las células MC3T3-E1 cultivadas en E-SIS. La membrana E-SIS también aceleró la regeneración ósea en un modelo de defecto craneal de rata (Gou y cols., 2019). Además, los estudios de Rung y cols., en 2021 y Chu y cols., en 2017 y 2019 (Rung y cols., 2021; Chu y cols., 2017; Chu y cols., 2019), demostraron que las membranas de colágeno reticuladas con EGCG facilitan el reclutamiento de macrófagos. En particular, la modificación de EGCG tiene una gran capacidad para promover la vascularización que implica la secreción de citocinas relacionadas con M2 (Rung y cols., 2021; Chu y cols., 2017; Chu y cols., 2019).

Estrategias enzimáticas de reticulación

La reticulación y la estabilidad del colágeno *in vivo* dependen en gran medida de reacciones enzimáticas. La más representativa es la transglutaminasa que cataliza la formación de enlaces isopeptídicos glutamyl-lisina para articular diversas proteínas relacionadas con la formación de tejido mineralizado (como el colágeno, la fibronectina, la osteopontina y la sialoproteína ósea) en formas poliméricas involucradas en la estabilización de la matriz, diferenciación de condrocitos y osteoblastos, y mineralización de la matriz. Se ha demostrado que el colágeno natural tipo I tratado con transglutaminasa tisular (TG2) y transglutaminasa microbiana (mTG) mejora la adhesión, diseminación y proliferación de osteoblastos humanos (HOB) y fibroblastos. También mostró una mayor resistencia a las proteasas endógenas y una mayor tasa de diferenciación de las células HOB.

Fortunati y cols., en el año 2014 (Fortunati y cols., 2014), mostraron resultados similares y propusieron un mecanismo por el cual el colágeno modificado con TG2 indujo una mayor adhesión de osteoblastos mediada por la promoción de la expresión de integrinas en osteoblastos humanos. El andamiaje HA/Coll reticulado con

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

transglutaminasa microbiana (mTGasa) también mostró una estabilidad térmica y un módulo de compresión significativamente mejorados. La modificación de la mTGasa también aumentó la adhesión, proliferación y diferenciación de células similares a osteoblastos MG63 y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en los andamiajes. También se observó una diferenciación mejorada de células madre mesenquimales humanas en osteoblastos en andamios de colágeno de escamas de tilapia reticulados con mTGasa y andamios de colágeno tipo XI (Fortunati y cols., 2014; Ciardelli y cols., 2010).

Yang y cols., en 2018 (Yang y cols., 2018) compararon esponjas de gelatina preparadas mediante diferentes métodos de reticulación, donde la reticulación con mTG mostró el mejor rendimiento integral en términos de resistencia mecánica y biocompatibilidad. Aunque la reticulación enzimática proporciona biocompatibilidad y propiedades biomiméticas teóricamente óptimas, su mejora de las propiedades mecánicas es mucho menor que la reticulación química. Junto con los bajos beneficios económicos asociados con los altos costos, las aplicaciones de producción en masa de reticulación enzimática no son prácticos a corto plazo (Yang y cols., 2018).

1.3.2 Membranas no reabsorbibles

Las membranas no reabsorbibles fueron las primeras en utilizarse, cuando comenzó su uso a mediados del siglo pasado en los procedimientos de RTG comentados anteriormente. El primer material empleado para ellas fue el Gore-tex[®] (W.L. Gore & Asociados, EEUU). Este nombre surge de la empresa que lo diseñó (Murphy, 1995; Scantlebury y Ambruster, 2012). Posteriormente se diferenciaron en politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) y politetrafluoretileno denso (d-PTFE). Estas tienen una mayor efectividad, en términos de ganancia ósea y estanqueidad, pero presentan más complicaciones postoperatorias, destacando la mayor incidencia de exposición y sobreinfección (Zitzman y cols., 1997; Makvandi y cols., 2020). Otra de las desventajas de las membranas no reabsorbibles es la necesidad de someter al paciente a una segunda cirugía para su retirada (Baipai y Rajasekar, 2022). Debido a estas desventajas, las membranas reabsorbibles son las que se usan con más frecuencia en ROG. Las membranas no reabsorbibles suelen estar fabricadas de politetrafluoretileno (PTFE).

Las membranas de e-PTFE se fabrican mediante extrusión de fibras moleculares de PTFE, generando así, dos tipos de fibra diferentes, es decir, materiales mono y multidireccionales (Feng y cols., 2018; Turri y cols., 2020).

La producción de e-PTFE monodireccional da como resultado un material cuyas fibras moleculares están orientadas en una dirección, mientras que el e-PTFE multidireccional, por otro lado, está orientada en muchas direcciones. Esto crea una estructura de fibra compleja que le da al material una resistencia excepcional a la fluencia tanto en dirección longitudinal como transversal (Trobos y cols., 2018; Tan y Rodrigue, 2019).

Además, su producción en combinación con un lubricante da como resultado una estructura de material microporoso caracterizado por nodos de conexión que están interconectados por fibrillas longitudinales de menos de 0,5 μm de diámetro. El grado de porosidad de un material de e-PTFE se puede controlar mediante la distancia entre los nodos (Feng y cols., 2018).

La estructura porosa del e-PTFE facilita el transporte de nutrientes y ha demostrado su estabilidad clínica y excelente biocompatibilidad (Soldatos y cols., 2017; Ronda y cols., 2013). Aunque todavía existe controversia sobre la relación entre el tipo de membrana y la tasa de exposición, un estudio clínico y una revisión sistemática mostraron una incidencia significativamente mayor de exposición a las membranas no reabsorbibles (20%) respecto a las reabsorbibles (5%) (Ghensi y cols., 2017, Chiapasco y Zaniboni, 2009). En un metaanálisis se observó que en las zonas donde no hubo exposición de la membrana se logró una ganancia ósea horizontal de un 74% mayor respecto a las áreas con exposición, en crestas edéntulas Ghensi y cols., 2017; Vroom; Garcia y cols., 2018).

Las membranas convencionales de e-PTFE demostraron un efecto de barrera débil contra la infección bacteriana después de la exposición de la membrana, lo que aumenta la dificultad del cuidado posoperatorio y el riesgo de fracaso en la regeneración ósea. Por el contrario, el politetrafluoroetileno denso (d-PTFE) es una forma menos porosa de PTFE, que también está en el mercado desde hace muchos años, especialmente en combinación con rejillas de titanio para mejorar la estabilidad del volumen. Aunque ambas membranas de PTFE mostraron resultados clínicos similares en el tratamiento de defectos óseos verticales periimplantarios, se considera que la estructura densa del d-PTFE es eficaz para prevenir la invasión bacteriana y al mismo tiempo conserva el

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

potencial de difusión de oxígeno y transporte de moléculas pequeñas. Además, la extracción posoperatoria de la membrana d-PTFE es más fácil que la de la membrana e-PTFE, que es esencial para la recuperación posterior y la curación general. Sin embargo, la mayor acumulación de biofilm en las membranas de d-PTFE observada en algunos estudios sugiere que la infección bacteriana parece estar relacionada no solo con la porosidad. Una evaluación *in vitro* realizada por Trobos y cols., en 2018 (Trobos y cols., 2018) de una nueva membrana bicapa de e-PTFE con espesor de capa optimizado, así como el grado y la dirección de la inflamación mostró una mejor resistencia a la permeabilidad bacteriana y la formación de biofilm que el d-PTFE. Esta conclusión también está respaldada por estudios clínicos aleatorizados en los que se observó una mayor acumulación de biomasa y biofilm en las membranas de d-PTFE (Vroom y cols., 2022; Ronda y cols. 2013; Korzinskas y cols., 2018; Trobos y cols., 2018; Turri y cols., 2021).

Membranas de PTFE reforzadas con titanio

Aunque el e-PTFE y el d-PTFE han demostrado una función de barrera y un mantenimiento del espacio adecuados, los espacios osteogénicos que crean son propensos a deformarse bajo presión ante grandes defectos óseos clínicos verticales, lo que es perjudicial para la regeneración ósea. Se han creado membranas reforzadas con titanio para superar este problema (Cucchi y cols., 2014).

Para ello se inserta un armazón de titanio con alta resistencia y rigidez en la membrana de PTFE para darle una excelente plasticidad y estabilidad de volumen. Las extremidades del Ti no solo proporcionan un excelente soporte mecánico sino que también permiten una fácil colocación clínica debajo del colgajo (Cucchi y cols., 2017; Gentile y cols., 2011).

A día de hoy, las membranas reforzadas con titanio, continúan siendo la mejor opción para proporcionar un espacio osteogénico estable, sobre todo en sentido vertical, que garantice la regeneración del tejido óseo en las regeneraciones óseas.

En un metaanálisis reciente, el d-PTFE reforzado con titanio sostenía la mayor regeneración ósea vertical con una baja tasa de complicaciones se consideró la mejor opción para los procedimientos de RTG y ROG (Zhang y cols., 2022).

Mallas y cajas de Titanio

El titanio es un material metálico popular en odontología y otras especialidades médicas. En particular, su idoneidad clínica para procedimientos de ROG no tiene comparación con otras membranas, pues es el material que genera más estabilidad y capacidad osteogénica.

Tradicionalmente, las mallas de titanio se han utilizado en clínica, principalmente para estabilizar los injertos óseos y mantener la morfología y el volumen óseo deseados en lugar de proporcionar una funcionalidad de barrera, ya que esta clase de material no tiene una función de mantenimiento del espacio debido al gran tamaño de los poros (Xie y cols., 2020). Dada su excepcional estabilidad de volumen, las mallas de titanio son indispensables en el tratamiento de defectos óseos verticales u horizontales grandes. Las mallas de titanio no solo demuestran alta resistencia y rigidez, sino que también exhiben buena plasticidad permitiéndoles adaptarse perfectamente a diversos defectos óseos mediante flexión y forma (Hasegawa y cols., 2021; Makeswki y cols., 2022). Aunque los bordes afilados creados al cortar, recortar o doblar la malla de titanio pueden aumentar el riesgo de exposición de la membrana, la malla de titanio tiene un impacto significativamente menor en la tasa de exposición posoperatoria respecto a la mayoría de las membranas de barrera y generalmente no es necesario retirarla inmediatamente porque la infección no suele ocurrir después de la exposición (Uehara y cols., 2015; Sagheb y cols., 2017).

Basándose en estas ventajas, una evaluación clínica sistemática de las mallas de titanio para la reconstrucción del hueso alveolar observó una tasa de éxito del 89,9%, una tasa media de supervivencia del 100% y una tasa de fracaso del 0%. Para mejorar aún más la idoneidad clínica de las mallas de titanio, en la clínica se ha utilizado tecnología de mallas de titanio adaptadas digitalmente. Las mallas de titanio fabricadas mediante impresión 3D y otras tecnologías suelen denominarse imaginativamente cajas de titanio, que permiten un ajuste perfecto al defecto óseo y evitan las consecuencias indeseables de una colocación incorrecta. Un estudio clínico en el que participaron 40 pacientes (65 implantes colocados) demostró que la malla digital de titanio redujo significativamente la resorción ósea vertical y horizontal y tuvo un buen desempeño en el mantenimiento de la estabilidad del tejido duro. En esta investigación, la tasa de exposición de las mallas digitales de titanio fue solo del 10 %, que es inferior a la tasa de exposición informada en

la mayoría de los estudios anteriores (Rasia dal Polo y cols., 2014; Bai y cols., 2019; Cucchi y cols., 2021; Li y cols., 2021).

La combinación de malla de titanio junto a una membrana de PTFE o una membrana de colágeno se utiliza habitualmente en la práctica clínica, donde la membrana de PTFE o colágeno proporciona la separación de las estructuras (tejido blando a tejido duro) y la malla de titanio proporciona estabilidad de las paredes del defecto (Cucchi y cols., 2021).

En particular, un estudio reciente en el que participaron 106 pacientes, demostró que, el hecho de utilizar una membrana de colágeno previene la adhesión del tejido periférico, la fibrosis y los problemas asociados, que son respuestas inflamatorias comunes a la malla de titanio y frecuentes cuando el tejido perióstico no se separa de la regeneración mediante una membrana (Tanaskovic y cols., 2019).

1.3.3 Potenciación con agentes bioactivos

La adhesión de diversas moléculas bioactivas a las membranas está ocupando una parte importante en la investigación de las mismas, debido a su papel multifuncional en la osteogénesis, particularmente en el reclutamiento, proliferación y diferenciación celular (Aprile y cols., 2020). Se basa en la hipótesis de que la exposición del área tratada a múltiples factores de crecimiento diferentes, puede desencadenar el desarrollo de un microambiente favorable y promover la regeneración ósea (Fujioka-Kobayashi y cols., 2022; Ji y cols., 2000).

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

El PDGF es un potente agente mitogénico y quimioinductor y, en particular, el PDGF-BB es más eficaz que otras isoformas como PDGF-AA y PDGF-AB para promover la mitosis en las células periodontales. El desarrollo del PDGF-BB recombinante (rhPDGF-BB) ha impulsado su uso en la regeneración ósea. El rhPDGF-BB también mostró potentes efectos mitogénicos, angiogénicos y quimiotácticos sobre las células óseas y periodontales. Se ha demostrado que la unión de rhPDGF-BB a las membranas de colágeno libera el 60% del factor en los primeros tres días, seguido de una liberación sostenida *in vitro* durante aproximadamente 3 semanas. En 2019, Joshi y cols.,

(Joshi y cols., 2019) demostraron en un estudio clínico que el PDGF-BB puede administrarse en membranas de colágeno y liberarse lentamente durante hasta 1 mes en localizaciones de defectos intraóseos (Boyan y cols., 1994; Nevins y cols., 2003).

Proteínas morfogénicas óseas (BMP)

Las BMP también son moléculas bioactivas en el campo de la regeneración ósea y han sido consideradas en varias revisiones como el factor de crecimiento más prometedor para la regeneración ósea. Entre las diversas isoformas, se cree que la BMP-2 y la BMP-7 desempeñan un papel importante en la diferenciación osteogénica; especialmente, se ha demostrado que la BMP-2 induce tanto la formación de cartílago como el endurecimiento de los tejidos, incluso dosis bajas de rhBMP-2 (0,2 mg/ml) introducidas junto al complejo hidroxiapatita/fosfato tricálcico/colágeno (HAp/TCP/Col) exhiben un fuerte potencial osteogénico en perros Beagle. Sin embargo, algunos estudios recientes parecen sugerir que la BMP-9 posee un potencial osteoinductivo más fuerte que la BMP-2 (Sun y cols., 2018).

Saulacic y cols., en 2018 (Saulacic y cols., 2018) demostraron que, en un modelo de defecto craneal de conejo, la BMP-9 colocada sobre membranas de colágeno indujo un mejor cierre del defecto óseo horizontal respecto a la colocación sobre mineral óseo bovino desproteinizado, y ambas combinaciones indujeron positivamente la regeneración ósea. Se ha demostrado también el importante potencial promotor óseo de la combinación de la BMP-9 y una membranas de colágeno en un modelo de ratón con terapia antirresortiva (AMART) (Kobayashi y cols., 2022).

Factor 1 derivado de células mesenquimales (SDF-1)

En otros estudios, el SDF-1 ha sido ampliamente aceptado para promover el reclutamiento, la proliferación y la diferenciación de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (BMSC) como una quimiocina clásica, mediando una importante regeneración ósea y angiogénesis. La combinación de SDF-1 y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) juega un papel activo en la regeneración de la membrana periodontal mediada por BMSC, ya que inducen a las BMSC a diferenciarse en células con características de fibroblastos de la membrana periodontal. En el caso de la administración del compuesto activo, la forma en que se fija a la membrana es de

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

fundamental importancia para la regeneración tisular *in situ*. Se ha demostrado que las membranas de colágeno conjugadas químicamente con SDF-1 promovieron significativamente la formación de hueso nuevo y microvasos en comparación con la fisisorción de SDF-1 y mostraron un efecto similar en la formación de hueso nuevo al método de cultivo de BMSC (Xu y cols., 2019; Yu y cols., 2020)

Aunque todos estos estudios demuestran la viabilidad de administrar moléculas activas a través de membranas, la inestabilidad (cambios conformacionales y degradación) y la liberación temprana de factores proteicos dificultan en gran medida su aplicación clínica. La dosis suprafisiológica de moléculas activas para compensar su inestabilidad también plantea preocupaciones sobre la toxicidad y los costos (Sam y cols., 2014).

Iones de metal

Se han realizado muchos estudios para demostrar que la adhesión con oligoelementos, como zinc (Zn), magnesio (Mg), cobalto (Co) y estroncio (Sr), puede mejorar aún más la actividad biológica del colágeno.

El interés por las propiedades osteogénicas del último (Sr), surge de los efectos terapéuticos del ranelato de estroncio en la osteoporosis. El Sr fomenta la diferenciación de los osteoblastos y activa la expresión de uno de los marcadores de osteoblastos, la osteopontina, un marcador de osteoblastos tardíos. A su vez, el Sr también tiene un efecto inhibitorio sobre la resorción ósea por parte de los osteoclastos. Con este doble efecto, el Sr genera un ambiente favorable para la remodelación y curación del tejido óseo. Además, estudios *in vitro* con células madre mesenquimales (MSC) humanas han demostrado que las membranas, con Sr adherido, no son citotóxicas, independientemente de la cantidad incorporada del mismo (Querido y cols., 2016; Glenske y cols., 2018).

También se sabe que el Zn es un potente inmunomodulador óseo que afecta la polarización de los macrófagos y la diferenciación de los osteoblastos. Wu y cols. demostraron que las membranas de colágeno a las que se le añadía Zn e HA al 1% y al 2% exhibían una biocompatibilidad superior y una mayor promoción de la formación de células gigantes multinucleadas (MNGC) *in vitro* e *in vivo* (Wu y cols., 2022; Liu y cols., 2018). Por otro lado, el Zn parece modular la actividad biológica de las metaloproteinasas de matriz (MMP) para regular la degradación del colágeno. También hay evidencia de

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

que tanto el factor de crecimiento transformante (TGF-) como la osteoprotegerina (OPG) aumentan cuando los osteoblastos se exponen a iones de Zn. Las membranas de policaprolactona/colágeno (PCL/Col) electrohiladas con cristales de estructura metal-orgánica (MOF) lograron una liberación de iones de Zn sensible al PH, mostrando una mayor osteoinductividad y angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* (Xue y cols., 2021; Chou y cols., 2016).

El Mg es uno de los materiales más prometedores para uso humano en cirugía debido a características del material como su módulo elástico, así como sus propiedades reabsorbibles y regenerativas. Además, es un elemento químico fundamental en el mantenimiento de la resistencia, densidad y formación ósea, lo cual, hace que sea promotor en los procedimientos de regeneración ósea. Se ha demostrado *in vitro* que el Mg tiene un efecto promotor sobre una variedad de células óseas (Balalaie y cols., 2018; Jung y cols., 2021).

La evidencia anterior sugiere un papel beneficioso de los oligoelementos en la regeneración del tejido óseo, que pueden considerarse moduladores bioactivos eficaces sin citotoxicidad. Sin embargo, los efectos de los iones metálicos suelen depender de la concentración y aún deben considerarse con precaución hasta que se obtenga una confirmación clínica suficiente.

Antimicrobianos y antibióticos

Otros agentes que podrían ser interesantes son los antimicrobianos y antibióticos, para minimizar el riesgo de infección y el rechazo a cuerpo extraño después de la colocación de la membrana de colágeno. Se han publicado diversos estudios en los que se ha añadido minociclina, vancomicina, amoxicilina, metronidazol e iones de plata, principalmente para prevenir infecciones bacterianas, especialmente cuando se produce exposición de la membrana (Wu y cols., 2021). Los estudios *in vitro* han demostrado que las membranas de colágeno recubiertas con AgNP muestran una excelente eficacia antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) sin citotoxicidad obvia. La membrana recubierta de AgNP también tiene efectos antiinflamatorios eficaces al inhibir la expresión y liberación de citocinas antiinflamatorias como IL-6 y TNF- α . Además, la membrana resultante fue capaz de inducir la diferenciación osteogénica de MSL, lo que demuestra su potencial osteogénico

(Chen y cols., 2018; Zhou y cols., 2022). Las membranas de poli (ácido D, L-láctico) tratadas con amoxicilina y colocadas *in vivo* muestran una reducción temprana de la inflamación y aceleran la reparación periodontal (Ho y cols., 2021).

Los resultados anteriores parecen indicar que la adición de agentes antimicrobianos y antibióticos también es beneficiosa para la regeneración ósea y tisular en lugar de solo ser un método de prevención infecciosa. Sin embargo, sus efectos sobre las células y los tejidos dependen en gran medida de la dosis. Xie y cols., en 2022 (Xie y cols., 2022), demostraron que las membranas de polimetilmetacrilato (PMMA) cargadas con concentraciones relativamente bajas de vancomicina (1 a 4 g para 40 g de cemento óseo) pueden promover ligeramente la viabilidad de los osteoblastos y la angiogénesis. Por el contrario, las concentraciones relativamente altas de vancomicina (6 a 10 g para 40g de cemento) mostraron una disminución de la viabilidad de los osteoblastos y una reducción de la angiogénesis. Ghavimi y cols., en 2020 (Ghavimi y cols., 2020), desarrollaron una membrana asimétrica que junto con la adición de curcumina y aspirina mostraron una sorprendente capacidad para promover la regeneración ósea. No obstante, aunque se han desarrollado muchas estrategias antimicrobianas en experimentos *in vitro* e *in vivo*, existe una preocupación generalizada sobre el riesgo de cepas bacterianas multirresistentes asociadas con el uso excesivo de antibióticos, especialmente antibióticos de amplio espectro, lo que dificulta la evaluación de la seguridad clínica de las estrategias antimicrobianas. En este dilema, parece necesario el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos naturales. Entre ellos, los péptidos antimicrobianos (AMP), ofrecen nuevas posibilidades para esta idea debido a su dificultad para provocar resistencia bacteriana y la versatilidad que se puede obtener mediante el diseño flexible de secuencias de aminoácidos.

Actividad inherente de la membrana de colágeno

Se ha demostrado que las membranas proporcionan algo más que una simple función de barrera en los procedimientos de ROG (Omar y cols., 2018). Es más, no solo las membranas de colágeno, sino incluso las membranas de PTFE no reabsorbibles, estimulan la expresión de una variedad de genes relacionados con la osteogénesis (como la fosfatasa alcalina (ALP), proteínas morfogénicas (BMP) y proteínas osteosalivales, genes de remodelación ósea y citoquinas inflamatorias (interleucina (IL) -6 e IL-1) (Elgali y cols., 2016). Esto desencadenó la hipótesis inicial de que una membrana aplicada

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

durante los procedimientos de ROG forma un microambiente específico debajo de la misma, para apoyar la migración y posterior diferenciación de los osteoblastos. Los estudios sobre membranas de colágeno han revelado un mecanismo molecular que proporciona evidencia parcial de una acción de reclutamiento de células submembranas, ya que la presencia de membranas de colágeno provoca la regulación positiva temprana de dos factores de reclutamiento celular, el receptor de quimiocina CXC tipo 4 (CXCR4) y la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1). El CXCR4 desempeña un papel clave en el reclutamiento de células progenitoras osteogénicas y células madre mesenquimales, que posteriormente se diferencian en osteoblastos y participan en la formación ósea, mientras que MCP-1 es la quimiocina principal en el reclutamiento de células progenitoras de osteoclastos, una célula clave en la remodelación ósea. La evidencia anterior sugiere que la membrana promueve un microambiente en la localización del defecto que favorece la rápida aparición de diferentes células, incluidos osteoblastos y osteoclastos, lo que promueve aún más una cascada molecular que facilita la remodelación ósea (Turri y cols., 2016).

La actual evidencia histológica en cuanto a la curación y regeneración ósea en el interior de las membranas de barrera es insuficiente para explicar el papel claro de las membranas en la curación de defectos. Lo que sí está claro es que su utilización conlleva inflamación, reclutamiento celular y remodelación ósea y se ha demostrado que la respuesta inmune es variable, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del material. Esta respuesta a cuerpo extraño, comienza con la rápida acumulación de proteínas en la superficie del material después de su colocación y ocurre en casi todos los tipos de biomateriales. Se ha demostrado que incluso las membranas de PTFE, que son completamente inertes biológicamente, pueden inducir una respuesta inmune *in vivo* (Bottino y Thomas, 2015; Korzinskas y cols., 2018)

Esto plantea la cuestión clave de si la respuesta a cuerpo extraño provocada por la membrana es necesaria y beneficiosa para la regeneración del tejido en el defecto. Esto se basa en el hecho de que la respuesta inmune parece mediar en la degradación del material y en la vascularización transmembrana. La respuesta inflamatoria del tejido es un efecto en cascada. Las células inflamatorias como los monocitos, macrófagos y neutrófilos dirigen el patrón de la cascada durante la respuesta inmune a través de su interacción con proteínas y la liberación de citoquinas (Mountziaris y cols., 2008). Dentro de esta cascada, los macrófagos desempeñan un papel regulador clave que implica su

transformación en dos tipos de variantes. Dependiendo de su expresión molecular, los macrófagos se pueden dividir en dos fenotipos: el fenotipo proinflamatorio M1 y el fenotipo antiinflamatorio M2. El fenotipo M1 ocurre principalmente en las primeras etapas de la curación del tejido y parece mediar en la degradación *in vivo* del material. Posteriormente, durante la fase de remisión inflamatoria aguda, el fenotipo M1 se polariza al fenotipo M2, que expresa principalmente factores reparativos. Por lo tanto, generalmente se acepta que una excelente regeneración tisular debe ir acompañada de una respuesta tisular M2 general, pero también es importante tener cuidado con la remodelación tisular fallida debido a la encapsulación fibrosa debido a la inflamación crónica. Las células gigantes multinucleadas (MNGC) son un tipo de célula inmune con mayor capacidad fagocítica resultante de la fusión de macrófagos. Al igual que los macrófagos, las MNGC también expresan factores pro y antiinflamatorios en el lecho de implantación y, por lo tanto, también parecen exhibir un fenotipo proinflamatorio M1-BMGC y un fenotipo antiinflamatorio M2-BMGC. Además, se ha demostrado que las MNGC median en la degradación fagocítica de diferentes materiales. Aunque la relación entre las diferentes propiedades de los materiales y los patrones de activación y expresión de las MNGC no está clara, se ha establecido que la respuesta inmune es crucial en el proceso de curación ósea. La modificación de las propiedades de los materiales puede optimizar la respuesta inmune de los biomateriales para favorecer mejor la curación ósea (Lee y cols., 2019; Brown y cols., 2009).

La angiogénesis es una parte crucial del microambiente necesario para que se produzca la regeneración ósea. Se ha propuesto el concepto de "vascularización transmembrana" para las membranas de barrera de colágeno (Herten y cols., 2009). Estudios anteriores han demostrado que la integración tisular de las membranas de colágeno de origen porcino no requiere que haya una mediada vascularización transmembrana, sino que la vascularización dependa del tejido de granulación (Ghanaati y cols., 2011). Sin embargo, la vascularización transmembrana sigue siendo atractiva para lograr mejores resultados regenerativos. Barbeck y cols., en 2015 (Barbeck y cols., 2015) evaluaron dos membranas de colágeno derivadas de la piel porcina. Por un lado Mucoderm®, Botiss, Berlín, Alemania) y por otro, Collprotect® (Botiss, Berlín, Alemania) y observaron que, aunque ninguna de las membranas mostró una vascularización transmembrana exitosa, la membrana Mucoderm® que contenía vasos sanguíneos intrínsecos, así como tejido adiposo permitió la penetración microvascular

asociada con el crecimiento interno del tejido conectivo. Esto proporciona evidencia para la hipótesis de que la vascularización transmembrana debe basarse en el crecimiento hacia adentro del tejido conectivo. Sin embargo, esta hipótesis parece contradecir la función principal de la membrana, es decir, su función barrera, ya que una vascularización transmembrana exitosa en esta situación implicaría la fragmentación y desintegración de la membrana y, por lo tanto, la imposibilidad de realizar esta función. Algunos estudios recientes en membranas de colágeno bovino parecen ofrecer una solución. Los resultados histopatológicos de las membranas de colágeno bovino sugieren que las membranas bovinas sufren una descomposición mediada por macrófagos y las MNGC en torno a los dos meses después de su colocación. Sin embargo, la membrana no perdió por completo su función protectora, ya que los fragmentos se superpusieron en una disposición en forma de mosaico debajo del tejido conectivo. El tejido reactivo pudo penetrar la membrana a través de los intersticios entre los fragmentos y se produjo una vascularización sustancial. Este patrón particular de integración y degradación no se observa en las membranas de colágeno porcino y ha sido definido por los investigadores como "porosidad secundaria" (Kapogianni y cols., 2021; Lindner y cols., 2022).

1.4 Técnicas de uso o aplicación

Cawood y Howell, en 1988 (Cawood y Howell, 1988), describieron el proceso de remodelación ósea postextracción y establecieron una clasificación de la cresta edéntula maxilar y mandibular. Actualmente, se ha comprobado que el proceso alveolar es un tejido dependiente del diente que se desarrolla junto con la erupción de los mismos. Además, el volumen y la forma del proceso alveolar están determinados por la forma de los dientes, su eje de erupción y su eventual inclinación (Araujo y cols., 2005). La extracción de un diente causa una disrupción fisiológica local que conlleva una respuesta inflamatoria inicial y subsecuentemente, un grado variable de atrofia de la cresta alveolar, en su mayoría, a causa de una reabsorción ósea. Fisiológicamente, la pared del alvéolo dentario consiste principalmente en una capa delgada de hueso cortical (también llamada "bundle bone", "hueso alveolar") con un espesor que varía de 0,22 a 0,54 mm, dependiendo de la región. Después de la extracción del diente, el alvéolo dental sufre una pérdida en altura y anchura. Una revisión sistemática publicada en 2021, describió una pérdida ósea horizontal del 29% al 63% (correspondiente a 2,5-4,5 mm) y una pérdida

ósea vertical del 11% al 22% (correspondiente a 0,8-1,5 mm) para la curación del alvéolo, de manera espontánea, dentro de los primeros 6 meses. A partir de entonces, estos cambios en la dimensión de la cresta parecen disminuir, pero continuar durante toda la vida (Ulm y cols., 2021).

Varios estudios preclínicos y clínicos han descrito que la mayor parte de la remodelación se produce en las primeras semanas tras la exodoncia y es más acentuada en la parte vestibulo-coronal de la cresta (Ulm y cols., 2021; Ávila-Ortiz y cols., 2014; Couso-Queiruga y cols., 2021).

Junto con la pérdida del diente, ya sea por un traumatismo o fractura, la enfermedad periodontal es otro de las causas más frecuentes de pérdida del tejido de soporte. La periodontitis es una inflamación crónica inducida por una infección bacteriana que se asocia con una mayor infiltración de neutrófilos y macrófagos, así como con la activación de osteoclastos a través de la señalización del ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL), que desencadena la diferenciación de precursores de osteoclastos (Bosshardt y Sculean, 2009). Esta enfermedad, mantenida activa en el tiempo, puede provocar una secuela periodontal grave, con la consiguiente pérdida de hueso alveolar. El tejido periodontal, así como el hueso alveolar y el cemento, forman parte de la región periodontal: una unidad formada por numerosos tejidos que rodean y sostienen funcionalmente los dientes. La enfermedad periodontal va destruyendo el periodonto, lo que puede provocar movilidad en los dientes y en su último término, la pérdida de los mismos (Van Dyke, 2008).

Los enfoques actuales para el tratamiento de la periodontitis se dirigen principalmente a los síntomas, incluida la eliminación de la placa y la reducción de la inflamación (Deas y cols., 2016; Graziani y cols., 2017). Aunque estas terapias detienen o frenan la progresión de la enfermedad, no abordan la reinserción del tejido periodontal al diente ni la regeneración del tejido periodontal; por tanto, la función dentaria permanece reducida, lo que se conoce como periodonto reducido (Kao y cols., 2015; Li y cols., 2017). Un enfoque ideal para tratar la periodontitis es restablecer la compleja estructura jerárquica del tejido periodontal, que incluye cemento, hueso alveolar, así como ligamento periodontal y tejido gingival. La regeneración del tejido periodontal mediante las técnicas de RTG/ROG es un desafío cada vez más importante al que se enfrentan los especialistas (Bosshardt y Sculean, 2009).

1.4.1 Preservación alveolar con o sin implante inmediato

La preservación de la cresta alveolar después de una extracción dentaria es esencial para mantener unas dimensiones óseas y de tejido blando ideales, que nos permitan la colocación del implante en una posición ideal tanto protésicamente como biológicamente (Sheikh y cols., 2015; Iasella y cols., 2003). Mantener los márgenes óseos y de tejido blando es fundamental para reproducir o simular el complejo dento-gingival (tener éxito en la estética dental y rosa) (Draenert y cols., 2014). Diversos estudios afirman que se consiguen mejores resultados al combinar el uso de injerto óseo para la creación de espacio junto a una membrana (Zitzmann y cols., 1999; Zitzmann y cols., 1998; Hürzeler y cols., 1998) respecto a colocar solo una membrana. No obstante, es cierto que se puede lograr disminuir la reabsorción de la cresta alveolar con el uso de membranas de colágeno reabsorbibles únicamente (Vance y cols., 2004).

En un estudio clínico de 16 pacientes, se compararon los alveolos post-extracción en los que se utilizaba una membrana reabsorbible con alveolos controles con extracciones dentales y curación espontánea. A los 6 meses de reentrada, se encontró que todos los alveolos habían cicatrizado correctamente, y los alveolos de ensayo mostraban menos pérdida ósea vertical y horizontal y mayor recubrimiento óseo (Lekovic y cols., 1998). En un estudio clínico sobre 24 pacientes, se compararon las zonas de control de alvéolos de extracción no regenerados con las zonas de ensayo, tratados con injertos óseos liofilizados y colocación de membranas de colágeno, en los que estos últimos, mostraron resultados significativos de reducción de la reabsorción de la cresta alveolar posterior a la extracción en aquellas zonas regeneradas (Iasella y cols., 2003). La resorción general de las crestas alveolares en las zonas posteriores a la extracción se puede reducir significativamente mediante la aplicación de los principios de ROG (Retzepi y cols., 2010).

La técnica de colocación inmediata de implantes en alveolos post-extracción, se ha sugerido, desde hace más de 30 años, incluso en aquellos con infección activa, para la preservación de la integridad de la cresta y el contorno alveolar. La preservación alveolar con implantes y membranas de colágeno o e-PTFE promueve tanto la regeneración ósea periimplantaria como la osteointegración. Sin embargo, la selección del caso cuando se utilizan membranas de colágeno puede afectar a los resultados del tratamiento. Un estudio realizado sobre pacientes con incisivo superior avulsionado, concluyó que el uso de una membrana de colágeno (Biocollagen[®], Bioteck S.p.A., Arcugnano, Italia), junto con un

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

sustituto óseo y un implante, es un tratamiento predecible en cuanto a la osteointegración y la estabilidad periimplantaria pasados los 24 meses del tratamiento. La membrana de colágeno, utilizada en combinación con injertos óseos, mantiene el espacio generado por el alveolo, dando como resultado una mejor estabilidad y éxito de la ROG en comparación con la RTG sin la utilización de sustituto óseo. La utilización de una membrana alrededor de implantes colocados transmucosamente en alveolos de extracción en el maxilar anterior ha mostrado resultados favorables y significativos en la reducción de la pérdida en la lámina ósea horizontal (Novaes y cols., 1995; Mcallister y Haghighat, 2007; Vijayanathan y cols., 2013; Sevor y cols., 1992; Gotfredsen y cols., 1993).

1.4.2 Regeneración de la cresta alveolar antes y durante la colocación de implantes

Los procedimientos de ROG han permitido el uso de implantes en áreas del hueso maxilar que previamente eran demasiado deficientes (en sentido horizontal, vertical o una combinación de ambas), o en áreas donde inicialmente se colocaron implantes y estos fracasaron. La cresta alveolar puede aumentarse vertical u horizontalmente antes de la colocación del implante y la adición de un sustituto óseo a la técnica de ROG aumenta la técnica de regeneración vertical (Tinti y cols., 1996). El uso combinado de injertos/sustitutos óseos con membranas de barrera se recomienda en defectos óseos más grandes (Mcallister y cols., 2007). Se han observado casos de éxito en el aumento óseo antes de la colocación del implante (Hämmerle y cols., 1998). Otros estudios informaron un aumento exitoso del 75 % de las zonas para la colocación de implantes que anteriormente se consideraban deficientes, mediante el uso de ROG con membranas de colágeno (Parodi y cols., 1996; Parodi y cols., 1998). En un estudio clínico de 42 pacientes, el uso de injertos en bloque con membranas de colágeno utilizando la técnica de ROG proporcionó tasas predecibles de aumento óseo y los autores mencionaron la simplificación del método quirúrgico logrado mediante el uso de una membrana de colágeno, debido a la facilidad de manejo y menor tasa de complicaciones (Von Arx y cols., 2006).

El abordaje combinado de ROG en el momento de la colocación del implante ofrece los beneficios de una sola intervención quirúrgica, menor tiempo de tratamiento y menores costes. En base a esto, se postula que este debería ser el enfoque preferido (Hämmerle y cols., 2001). Dahlin y cols., en 1989 (Dahlin y cols., 1989) presentaron las primeras pruebas que respaldaron la formación de hueso periimplantario mediante la

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

aplicación de membranas y estudios posteriores han documentado el éxito clínico y radiográfico de la ROG. Históricamente, la mayoría de los estudios han documentado el uso de membranas de ePTFE, que se considera un biomaterial clásico para la ganancia ósea en ROG, aunque ahora están siendo reemplazadas en gran medida por membranas de colágeno para superar las desventajas de un segundo procedimiento quirúrgico y una exposición temprana (Zitzmann y cols., 1997; Juodzbals y Wang, 2007). En una revisión sistemática realizada por Chiapasco y Zaniboni, en 2009 (Chiapasco y Zaniboni, 2009) se concluyó que la ROG está indicada cuando una dehiscencia es mayor de 2 mm en la dimensión vertical, y aunque las tasas de éxito de las membranas reabsorbibles y no reabsorbibles son comparables, las membranas no reabsorbibles tienen mayores tasas de complicaciones en comparación con las membranas reabsorbibles (20-5 %, respectivamente). El uso de membranas de colágeno con sustitutos óseos es una alternativa a los métodos tradicionales en el tratamiento de los defectos tipo dehiscencias alrededor de los implantes (Zitzmann y cols., 1997). Aunque los datos científicos aún son insuficientes sobre las membranas de colágeno en el tratamiento de dehiscencias periimplantarias, un estudio publicado en 2003, demostró que la ROG de estos defectos, en perros Beagle con una membrana de colágeno (periotoneo porcino y tendón bovino) en el momento de la colocación del implante puede mejorar significativamente la cicatrización ósea. El mantenimiento del espacio y la durabilidad de la misma fueron dos factores importantes que afectaron la ROG utilizando membranas de colágeno (Oh y cols., 2003).

1.4.3 Aplicación en defectos intraóseos

El uso de membranas de colágeno para la regeneración de defectos intraóseos se lleva aplicando desde hace más de 30 años. En una revisión realizada en el año 2001, se observó que la literatura anterior respalda cambios clínicos y mejoras significativamente mayores con la membrana de colágeno en comparación con los grupos de desbridamiento abierto en exclusiva (Bunyaratavej y Wang, 2001). Hubo una mayor reducción en la profundidad de sondaje, mayor inserción clínica y recubrimiento óseo. En el estudio en humanos realizado por Chung y Salkin en 1990 (Chung y Salkin., 1990), la cirugía de reentrada en las localizaciones experimentales con colágeno mostró un aumento óseo en comparación con un aumento insignificante en las zonas de control. Un estudio más reciente, realizado por Elkhatat y cols., en 2015, (Elkhatat y cols., 2015) comparó el uso

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

de una membrana de colágeno (Biocollagen[®], Bioteck SpA, Arcugnano, Italia) respecto a un grupo control en la cirugía de acceso, y demostró resultados mejores en la profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica y densidad mineral en el grupo donde se utilizó membrana. Se ha informado que el uso de membranas de colágeno y membranas de ePTFE muestran resultados similares, teniendo el beneficio adicional de no realizar una segunda cirugía y menor riesgo de fracaso relacionado con la exposición (Chiapasco y Zaniboni, 2009; Mattson y cols., 1999).

1.4.4 Aplicación en defectos de furca

La anatomía del diente en la zona de la furca y los contornos de la raíz presentan un enfoque más desafiante para el tratamiento de los defectos de furca en comparación con los defectos en los que no está involucrada la furca (Wang y Carroll, 2001). El tratamiento de los dientes con exposiciones de furca clase II mediante la utilización de membranas de colágeno ha mostrado mayores recubrimientos de defectos en comparación con las zonas donde no se utilizó membrana. La literatura más reciente muestra un mayor recubrimiento de defectos con los grupos tratados con colágeno en comparación con los controles de desbridamiento abierto únicamente, especialmente cuando se intentó la cobertura primaria (Van Swol y cols., 1993). El estudio de Jenabian y cols. en 2013 (Jenabian y cols., 2013), comparaba la utilización de injerto de tejido conectivo respecto al uso de una membrana de colágeno (Biocollagen[®], Bioteck S.p.A., Arcugnano, Italia) en regeneración de furcas clase II. En los resultados clínicos, aquellos tratados con injerto de conectivo obtuvieron mejores resultados, pero en la exploración radiográfica no hubo diferencias significativas. Los peores resultados de los estudios pueden deberse a la colonización bacteriana de las membranas expuestas (Chen y cols., 1997; Black y cols., 1994), aunque las membranas de colágeno son comparables en resultados clínicos a las membranas de e-PTFE (Wang y cols., 2001; Blumenthal y Steinberg, 1990; Chiapasco y Zaniboni, 2009), incluso mejores, como fue el caso del estudio de Yukna y Yukna, en 1996 (Yukna y Yukna, 1996), donde la membrana de colágeno de tendón de Aquiles bovino (COLL), mostró los mejores resultados clínicos, respecto al grupo control y al grupo e-PTFE.

1.4.5 El uso de membrana de colágeno en procedimientos de cobertura radicular

La regeneración de tejidos gingivales afectados, inflamados o ausentes a menudo ha implicado múltiples procedimientos para lograr los resultados estéticos requeridos. Los procedimientos convencionales a menudo requieren una zona donante de injerto o zona quirúrgica secundaria, lo que provoca mayor molestia y posibilidad de hemorragia en el paciente. Con la llegada de ciertos biomateriales, se han introducido técnicas quirúrgicas basadas en RTG que implican el uso de membranas de colágeno, y se ha descubierto que son comparables a los injertos de tejido conectivo subepitelial en resultados clínicos, aunque ambos procedimientos dan una mejora estadísticamente significativa en comparación con el estado preoperatorio, informaron una ganancia significativa en la inserción clínica con membranas de colágeno en comparación con los colgajos desplazados coronalmente, pero no hay diferencias significativas entre los dos en los resultados de cobertura radicular. Se puede concluir que, aunque se necesitan más datos, los procedimientos que evolucionan a partir de la RTG producen resultados comparables a los de los injertos de tejido subepitelial, mientras que el uso de una barrera mejora la ganancia de inserción clínica (Wang y Macneil, 1998; Trombelli y cols., 1998; Ozcan y cols., 1997; Wang y Carroll, 2001).

1.4.6 Otros usos de las membranas de colágeno

Se ha experimentado y utilizado la membrana de colágeno a modo de barrera en diversas especialidades médicas, además de en el campo de la odontología. Sin ir más lejos, Lyoplast[®] (B.Braun Biotech International, Melsungen, Alemania) se ha utilizado para el tratamiento de pacientes con fractura craneal anterior (Vrankovic y cols., 1999), hernia diafragmática (Meyer y cols., 2020), defectos congénitos de la pared abdominal (Meyer y cols., 2006), para el aumento de la vejiga (Winde y cols., 2019), en durotomías de defectos duros de la columna torácica (Lee y cols., 2016) y en la fractura de la pared medial orbital (Procacci y cols., 2016).

1. 5 Factores a tener en cuenta respecto a las membranas de colágeno

La morfología del defecto óseo tiene una influencia importante en el éxito de los procedimientos de ROG, siendo críticos la profundidad general del defecto y el número de paredes óseas asociadas. Distancias mayores requeridas para la repoblación celular del defecto conducen a una mayor posibilidad de regeneración ósea incompleta (Murphy y Gonselley, 2003). El mantenimiento del espacio es importante para garantizar que el defecto no se rellene con tejido blando que crece más rápido que el tejido óseo durante la regeneración. Además de la rigidez de la membrana, de la que carecen la mayoría de las membranas de colágeno, el uso de tornillos a modo de “tienda de campaña”, injertos en bloque óseos corticoesponjosos e injertos óseos de partículas se utilizan con frecuencia para mantener el espacio (Draenert y cols., 2014). El espesor del colgajo gingival, que cubre la membrana barrera, es fundamental para el éxito de la RTG, ya que la membrana suele impedir el suministro de sangre desde el hueso al tejido del colgajo. Para mantener el suministro de sangre y prevenir la necrosis del colgajo, se requiere un espesor gingival de más de 1,5 mm (Simion y cols., 1996). Cuando la ROG se realiza en defectos óseos profundos con colgajos gingivales delgados en la región anterior del maxilar, puede ocurrir una recesión de la papila interdental. Una de las complicaciones postoperatorias más frecuentes es la exposición de la membrana a la cavidad bucal. Esta exposición suele producirse debido a la dehiscencia postoperatoria de los tejidos blandos y a la necrosis de un fino colgajo de tejido gingival que cubre la membrana (Murphy, 1995). La exposición de la membrana da como resultado una reducción del recubrimiento óseo (Becker y cols., 1994). Las citas frecuentes de seguimiento del paciente y el manejo exhaustivo del área expuesta son esenciales para reducir la probabilidad de infección. Las membranas después de su colocación fomentan la contaminación bacteriana en la zona receptora, y está bien establecido que el control de la placa es un determinante crítico en el éxito o fracaso de la terapia periodontal. Se ha observado que las zonas de ROG tienen más probabilidades de ser colonizadas por bacterias periodontales que las zonas tratadas sin membranas. La presencia y acumulación de placa en el área local de la ROG se asocia con una ganancia significativamente menor en los niveles de inserción clínica y una disminución de recubrimiento óseo (Shanaman y cols., 1994; Hugoson y cols., 1995)

1.6 Futuro y búsqueda de la membrana ideal

Una de las propiedades más importantes de las membranas para ROG es que tengan capacidad de estimular la adhesión, proliferación, y diferenciación osteoblástica. Esta capacidad además de ser crucial, debe estar acompañada de un proceso de degradación acorde a la regeneración ósea, pues como hemos hablado en los apartados anteriores, algunas membranas reabsorbibles, sobre todo las no reticuladas tienen porcentajes de degradación deficitarios y dependiendo del origen de las mismas (tanto de la localización anatómica como de la especie animal), el tiempo de degradación y sus propiedades físico-químicas pueden variar sustancialmente. En cambio, aquellas no reabsorbibles siempre van a requerir de una intervención para retirarlas, además del riesgo de que se expongan y la consiguiente infección. Por tanto, es imprescindible obtener nuevas fuentes de colágeno que tengan aplicación en el área de la medicina regenerativa y que tengan mayor capacidad de estimulación osteogénica, sin necesidad de tener que añadir sustancias bioactivas como BMP, Sr u otras. Más aún, que no sea necesario tener que realizar una reticulación o cross-linking para mejorar sus propiedades físicas y de degradación.

En este sentido, creemos que la Matriz Acelular de Vejiga Urinaria (MAVU) de Cerdo, podría usarse como membrana reabsorbible de colágeno para ROG.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Justificación

Los implantes dentales han representado en las últimas décadas, el tratamiento más importante para la rehabilitación de los dientes ausentes. La implantología oral ha incrementado la calidad de vida de pacientes con edentulismo unitario, parcial o total, al mejorar la masticación, la salud física y la estética oral y facial (Homsí y cols., 2023); constituyendo actualmente un tratamiento seguro con altos niveles de éxito sobre el 95% en periodos de seguimiento largos (Moraschini y cols. 2014). Sin embargo, uno de los parámetros clínicos más importantes para conseguir el éxito funcional y estético de los implantes dentales, consiste en la colocación adecuada en las tres dimensiones del espacio dentro de los huesos maxilares, lo que permitirá una correcta restauración protésica y aumentará las tasas de éxito de estos. Así pues, la disponibilidad de un tejido óseo adecuado es fundamental para realizar un tratamiento implantológico predecible (Berglundh y cols., 2003; Benic y Hämmerle, 2014).

Los defectos óseos alveolares, verticales u horizontales, son la principal condición que dificulta la colocación de implantes dentales osteointegrados mediante una técnica convencional. Estos defectos óseos pueden estar causados como resultado de patología infecciosa, malformaciones congénitas, traumatismos, cirugías resectivas por cáncer (Buurman y cols., 2020), e incluso por la propia pérdida de dientes, ya que esta situación ocasiona una atrofia del hueso alveolar (Rocuzo y cols., 2022). Esto hace que, en ciertos casos, sea necesario regenerar parte del hueso perdido, de manera previa o de forma simultánea a la colocación de los implantes dentales (Buser y cols., 2023). Para este propósito, la técnica más estudiada y con mayor respaldo científico es la ROG, la cual fue descrita por Dahlin y cols., en 1988 (Dahlin y cols., 1988), basada en los principios de RTG, propuestos por Nyman y cols. en 1982 (Nyman y cols., 1982), para la regeneración de defectos periodontales. La ROG es una terapia que permite inducir la regeneración de defectos óseos, o al menos, mantener el nivel óseo ya existente en zonas edéntulas (Toledano-Orsorio y cols., 2021). Esta técnica se basa en la utilización de una membrana a modo de barrera física que permite una compartimentalización del defecto óseo, impidiendo la colonización de este por estirpes celulares no deseadas provenientes del epitelio gingival y del tejido conectivo, permitiendo que las células con capacidad de formar el tejido óseo deseado accedan al espacio quirúrgico (Schröger y cols., 2024).

Desde 1988, las técnicas y biomateriales usados han ido mejorando, con una gran variedad de biomateriales que han sido desarrollados como sustitutos del hueso autólogo, incluyendo aloinjertos, xenoinjertos y alopásticos (poliméricos, metálicos, o cerámicos) (Machtei y cols., 2019). Actualmente, las membranas usadas en ROG se pueden clasificar en reabsorbibles y no reabsorbibles. Las primeras destacan por tener un menor número de complicaciones postoperatorias, aunque tienen una capacidad de regeneración más limitada, debido fundamentalmente a que su ratio de degradación es variable (Sanz y cols., 2019). Por el contrario, las no reabsorbibles tienen una mayor efectividad, pero presentan más complicaciones postoperatorias, destacando la mayor incidencia de exposición y sobreinfección; además tienen como principal desventaja la necesidad de someter al paciente a una segunda cirugía para su retirada (Bornert y cols., 2021; Calciolari y cols., 2018). Estas membranas no reabsorbibles suelen estar fabricadas en PTFE, que es un polímero similar al polietileno, donde los átomos de hidrógeno son reemplazados por átomos de flúor ($\text{CF}_2=\text{CF}_2$). El PTFE tiene las propiedades fisicoquímicas ideales para la confección de estas membranas no reabsorbibles, debido a su biocompatibilidad, pues es un material prácticamente inerte que no reacciona con otras sustancias químicas (Shan y cols., 2022). El PTFE tiene un bajo coeficiente de fricción, es impermeable (manteniendo sus propiedades en ambientes húmedos como la cavidad bucal), tiene una constante dieléctrica, es antiadherente y tiene una estabilidad térmica y resistencia mecánica inusualmente altas. Sin embargo, el PTFE se asocia con una baja adhesividad para las células, una ausencia total de capacidad de conexión al tejido óseo y de osteointegración, y frecuentes infecciones debido a la exposición de la membrana a la cavidad bucal y a la falta de propiedades antibacterianas (Mizraji y cols., 2023). Finalmente, debido a que este polímero es flexible, podemos encontrar membranas no reabsorbibles de politetrafluoretileno expandido PTFE (e-PTFE), denso (d-PTFE) y e-PTFE reforzadas con titanio (Alotaibi y cols., 2023).

Posteriormente se introdujeron membranas reabsorbibles (naturales o sintéticas), eliminando la necesidad de una segunda cirugía, siendo las más utilizadas en la actualidad. Las membranas reabsorbibles sintéticas están fabricadas de polímeros sintéticos. Las principales ventajas de las membranas poliméricas son su manejabilidad, capacidad de procesamiento, biodegradación ajustada y capacidad de encapsulación de fármacos. Sin embargo, su degradación puede provocar una gran respuesta inflamatoria que puede afectar al hueso neoformado y la tasa de resorción de este tipo de membranas

depende en gran medida del tipo de polímero utilizado (Sanz y cols., 2019). Los polímeros sintéticos más usados para la fabricación de membranas reabsorbibles son los poliésteres alifáticos tales como el PLLA y el PLGA, la PCL (Hutmacher, 2000; Gentile y cols., 2011; Abe y cols., 2024) y el PEG (Mizraji y cols., 2023). En los últimos años, también se han fabricado membranas reabsorbibles combinando estos polímeros sintéticos con álcali-celulosa (Novaes y cols., 1995), alginato (una sal derivada del ácido algínico) (Yang y cols., 2022) y agarosa (Zhao y cols., 2019). Por otro lado, las membranas reabsorbibles naturales pueden ser de quitosano, que es un polisacárido lineal natural compuesto de D-glucosamina unida a β -(1-4) y N-acetil-D-glucosamina (Camacho-Alonso y cols., 2022) con propiedades regenerativas en tejido blando y hueso, es un buen agente hemostático, biocompatible y con una potente acción antimicrobiana. Éste, facilita la pérdida de componentes intracelulares y la lisis, que es causada por la unión del quitosano cargado positivamente a la membrana bacteriana provocando un cambio en la permeabilidad de la membrana (Shin y cols., 2005; Peña y cols., 2013). Finalmente, dentro de las membranas reabsorbibles naturales, además del quitosano, las más estudiadas y usadas en ROG son las membranas de colágeno (Sanz y cols., 2019). El colágeno es el más abundante de todas las proteínas en los vertebrados superiores (alrededor de un tercio de la proteína total del cuerpo), constituyendo el mayor componente estructural de los tejidos (Abtahi y cols., 2013). Aunque el colágeno de las distintas especies difiere algo en su secuencia de aminoácidos, la gran mayoría contiene alrededor de un 35% de glicina (Gly), un 11% de alanina (Ala), un 21% de prolina (Pro), y un 9% de hidroxiprolina (Hyp). La hélice de colágeno es levógira y consta de tres residuos por vuelta. Esta hélice se estabiliza al unirse a otras dos, formando una molécula de tropocolágeno, donde este enrollamiento superhelicoidal es dextrógiro (en sentido opuesto a la hélice de la cadena simple). Las fibrillas de colágeno se forman a partir de moléculas de tropocolágeno alineadas de manera escalonada y entrecruzadas por enlaces covalentes que implican residuos de lisina e hidroxilisina (Halder y cols., 2024); esta disposición de las fibrillas de colágeno ofrece a estas membranas reabsorbibles naturales su correcta porosidad, oclusividad y flexibilidad (Patino y cols., 2002). Los principales componentes de las membranas de colágeno disponibles actualmente son el colágeno tipo I y/o tipo III, y a su vez pueden ser divididos en no reticulados y modificados químicamente. En las segundas, para ralentizar el proceso de bioabsorción de las membranas de colágeno, se han desarrollado varios métodos diferentes de

entrecruzamiento físico/químico, que también pueden mejorar las propiedades mecánicas de la membrana (Bunyaratavej y Wang, 2001).

Actualmente, las membranas de colágeno son de origen porcino, equino y bovino, y estas se pueden clasificar según la localización anatómica de la fuente de colágeno en: cardíacas (membrana de pericardio) y no cardíaca. Aunque en el mercado disponemos de membranas de pericardio de las tres especies animales (Say y cols., 2024; Shi y cols., 2023), la localización de colágeno no cardíaco es el tendón de Aquiles, que es una buena fuente de colágeno en el caballo y la vaca (Marr y cols., 2020; Li y cols., 2023), pero no en el cerdo. Por este motivo, la localización anatómica para fabricar las membranas de colágeno no cardíaco en el cerdo son la dermis (Felice y cols., 2023) y el peritoneo (Peter y cols., 2023). Estas membranas de colágeno son altamente biocompatibles (sin efectos adversos para los tejidos circundantes durante la degradación) (Dimitriou y cols., 2012), promueven la cicatrización de heridas (Bunyaratavej y Wang, 2001), permiten una buena integración con el tejido conectivo y pueden promover la unión y proliferación celular (Rothamel y cols., 2004). Sin embargo, como resultado del informe de consenso del grupo 2 del 15º Workshop Europeo de Periodoncia en Regeneración Ósea, se estableció la necesidad de desarrollar membranas de colágeno que, además de su capacidad básica de aislamiento, mostraran biocompatibilidad, actividad biológica, correcta porosidad y oclusividad, buenas propiedades mecánicas, adecuada integración a los tejidos circundantes, tolerancia a la exposición y una ratio de biodegradabilidad adecuada (Sanz y cols., 2019). Además, la resistencia al desgarró mecánico al evaluar la capacidad de manipulación de la membrana, ya que las membranas deben ser lo suficientemente resistentes para ser manipuladas y fijadas en su lugar durante su colocación (Su y cols., 2021). En este sentido, la elastina es una proteína cuyo componente principal es la tropoelastina, una molécula biológicamente activa que no solo media procesos celulares como la organización del citoesqueleto, la quimiotaxis, la proliferación y la diferenciación, sino que también modula el ambiente tisular local a través de la regulación de proteasas de la matriz. Su estabilidad mecánica, elasticidad y bioactividad, hacen que sea necesario buscar nuevas fuentes de colágeno rico en esta proteína para la fabricación de membranas reabsorbibles (Pandini y cols., 2022).

La matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo (MAVU) es una estructura heterogénea tridimensional de colágenos fibrilares tipo I, III, IV y VI (Brown y cols., 2006); rica en elastina, laminina, fibronectina y glucosaminoglicanos (GAG) (Farhat y

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

cols., 2008). Su carácter acelular la hace biocompatible, su adecuada estabilidad tridimensional, la alta resistencia mecánica, elasticidad y la presencia de diversas moléculas como proteínas de adhesión celular, factores de crecimiento y enzimas, (Camacho-Alonso y cols., 2019) han permitido que la MAVU haya sido utilizada con fines quirúrgicos, para el refuerzo de tejido blando donde existe debilidad y el tratamiento general de heridas, indicaciones por las cuales este andamiaje ha sido aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. (FDA) (Parekh y cols., 2009, Zhu y cols., 2011). Estas propiedades, unidas a su capacidad antibacteriana contra bacterias gram-positivas y gram-negativas (relacionadas con algunos péptidos de bajo peso molecular) presentes en la MAVU (Song y cols., 2013) y a la existencia de vías de mecanotransducción, íntimamente relacionadas con el módulo de elasticidad de la MAVU y que pueden favorecer la diferenciación de los osteoblastos y por tanto a la ROG, hacen pensar que este “scaffold” o andamiaje podría ser usado como membrana de colágeno reabsorbible (Huebsch y cols., 2015). Sin embargo, hasta la fecha, las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de MAVU para su posible uso en ROG no han sido estudiadas.

El objetivo de este estudio fue comparar las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de MAVU con otras seis membranas de colágeno de fuentes de colágeno porcino, equino y bovino.

2.2 Objetivos

El **objetivo general** del presente estudio fue comparar las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino.

Este puede ser desglosado en una serie de **objetivos específicos** que permiten sistematizar y responder a los diferentes aspectos que plantea el presente estudio.

Objetivos específicos:

1. Estudiar y comparar la morfología de las superficies lisa y rugosa de una nueva membrana de colágeno de MAVU con la de las membranas de colágeno de PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.

2. Analizar y comparar la propiedad hidrofílica de las superficies lisa y rugosa de una nueva membrana de colágeno de MAVU con la de las membranas de colágeno de PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.
3. Valorar y comparar el ratio de degradación a los 7, 14 y 21 días de una nueva membrana de colágeno de MAVU con el de las membranas de colágeno de PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.
4. Determinar y comparar la estabilidad térmica de una nueva membrana de colágeno de MAVU con la de las membranas de colágeno de PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.
5. Estudiar y comparar la resistencia a la tracción en ambiente seco y húmedo de una nueva membrana de colágeno de MAVU con la de las membranas de colágeno de PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.
6. Analizar y comparar la capacidad de elongación en ambiente seco y húmedo de una nueva membrana de colágeno de MAVU con la de las membranas de colágeno de PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.
7. Valorar y comparar la viabilidad celular de osteoblastos humanos a las 24, 48 y 72 horas de incubación sobre una nueva membrana de colágeno de MAVU y sobre las membranas de colágeno de PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.
8. Determinar y comparar la expresión de colágeno tipo I por osteoblastos humanos a los 3, 5 y 7 días de incubación sobre una nueva membrana de colágeno de MAVU y sobre las membranas de colágeno de PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.
9. Estudiar y comparar la expresión de osteopontina por osteoblastos humanos a los 3, 5 y 7 días de incubación sobre una nueva membrana de colágeno de MAVU y sobre las membranas de colágeno de PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.
10. Analizar y comparar los niveles de ALP tras 7 días de incubación de osteoblastos humanos sobre una nueva membrana de colágeno de MAVU y sobre las membranas de colágeno de PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.
11. Valorar y comparar los depósitos de Ca tras 14 días de incubación de osteoblastos humanos sobre una nueva membrana de colágeno de MAVU y sobre las membranas de colágeno de PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

3.1. Diseño de estudio *in vitro*

Todo el estudio se desarrolló siguiendo las recomendaciones de la Lista de verificación para la presentación de informes de estudios *in vitro* (CRIS) (Krithikadatta y cols., 2014). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia (594/2023) y se realizó entre mayo de 2023 y febrero de 2024 en la Clínica Odontológica Universitaria y el Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia y en el Departamento de Biomateriales. Así como el Grupo de Biomecánica e Ingeniería Tisular (BBT) de la Universidad Politécnica de Cataluña.

3.2. Materiales de membrana de colágeno

Para comparar las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de la nueva membrana propuesta en el estudio, obtenida de la lámina propia de la vejiga urinaria del cerdo, con el resto de membranas de colágeno animal existentes en el mercado, seleccionamos un total de seis tipos de membrana de colágeno procedentes de tejido cardíaco o no, y a su vez, de origen porcino, equino. y bovino. Cardíacos: pericardio porcino (PP), pericardio equino (EP), pericardio bovino (BP). No cardíacos: peritoneo porcino (PPE), tendón de Aquiles equino (EAT), tendón de Aquiles bovino (BAT), y la nueva membrana de colágeno de la vejiga urinaria porcina (MAVU) (Tabla 2). Un total de 10 membranas por grupo fueron usadas en este estudio *in vitro*, 5 para analizar las propiedades físicas y mecánicas y 5 para analizar las propiedades biológicas.

Para realizar la comparación, junto con la nueva membrana de colágeno de MAVU se han utilizado 6 membranas de colágeno, como hemos comentado, tres de ellas provienen del tejido cardíaco, BoneProtect® (Dentegris Deutschland GmbH, Duisburgo), HEART® (Biotech S.p.A., Arcugnano, Italy), Lyoplant® (B.Braun Biotech International, Melsungen, Alemania), y las otras tres de diferente localización, Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza) de peritoneo porcino, Biocollagen® (Biotech S.p.A., Arcugnano, Italia) de tendón de Aquiles equino y COLLA® (MedPark Co, Ltd., Busan, República de Corea) de tendón de Aquiles bovino.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Fuente de colágeno	Marca	Fabricante	LOTE	Constituyente	Abreviaciones
Cardiaco					
Pericardio porcino	BoneProtect®	Dentegris Deutschland GmbH, Duisburgo, Alemania	22GA51180	Colágeno heterólogo	PP
Pericardio equino	HEART®	Bioteck S.p.A., Arcugnano, Italia	234004	Colágeno heterólogo	EP
Pericardio bovino	Lyoplant®	B.Braun Biotech International, Melsungen, Alemania	223373	Colágeno heterólogo	BP
No cardíaco					
Peritoneo porcino	Bio-Gide®	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suiza	82300440	Colágeno heterólogo	PPE
Tendón de Aquiles Equino	Biocollagen®	Bioteck S.p.A., Arcugnano, Italia	223871	Colágeno heterólogo	EAT
Tendón de Aquiles Bovino	COLLA®	MedPark Co, Ltd., Busan, República de Corea	BS220425A	Colágeno heterólogo	BAT
Vejiga Urinaria de Cerdo	-----	-----	-----	Colágeno heterólogo	MAVU

Tabla 2. Membranas de colágeno utilizadas para el estudio.

3.3 Preparación de membrana de colágeno de MAVU

Las membranas de colágeno de MAVU se fabricaron a partir de la vejiga urinaria porcina de cuatro cerdos macho que pesaban entre 147 y 155 kg (peso medio 150 kg), como se describe en la literatura (Machingal y cols., 2011; Moon do y cols., 2008).

Las vejigas se lavaron y recortaron para obtener la lámina propia (Figura 1A), que se colocó en tripsina al 0,05% (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) durante 1 h a 37°C.

Posteriormente, se colocó en una solución de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) al 10 % y antibiótico/antimicótico al 1 % y se mantuvo durante la noche a 4 °C.

Al día siguiente, la preparación se lavó en una solución de Triton X al 1% (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) e hidróxido de amonio al 0,1% (Fisher Scientific, S.L., Madrid España) en agua desionizada durante 4 días. a 4°C.

Seguidamente, se lavaron las vejigas en agua desionizada durante 3 días a 4°C.

Para asegurar la ausencia de elementos celulares y la preservación adecuada de los componentes estructurales, se retiró una porción de la lámina propia del proceso de descelularización para usarla como muestra de control (Camacho y cols., 2018; Camacho y cols., 2020).

Ambos se evaluaron histológicamente utilizando Hematoxilina y Eosina (HE) (Figuras 2A y 2B), la tinción tricrómica de Masson (Figuras 2C y 2D) y diclorhidrato de 4'6-diamino-2-fenilindol, D952 (DAPI) (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España). Las muestras teñidas con DAPI se observaron bajo un microscopio de fluorescencia Leica® DRMB (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con un filtro de banda DAPI (filtro de excitación de longitud de onda configurado en BP 340-380, filtro dicrónico RKP 400 y filtro de emisión LP425) (Figuras 2E y 2F). Posteriormente, la lámina propia descelularizada se desecó mediante un Rotovapor (Büchi, Dlawil, Suiza).

Posteriormente, el material seco se calentó a 140°C en un baño de aceite durante 90 minutos en condiciones de vacío (Figura 1B).

Por último, las membranas de colágeno fueron recortadas en de 20 x 30 mm (Figura 1C) y esterilizadas a 25 kGy de radiación gamma (Figura 1D).

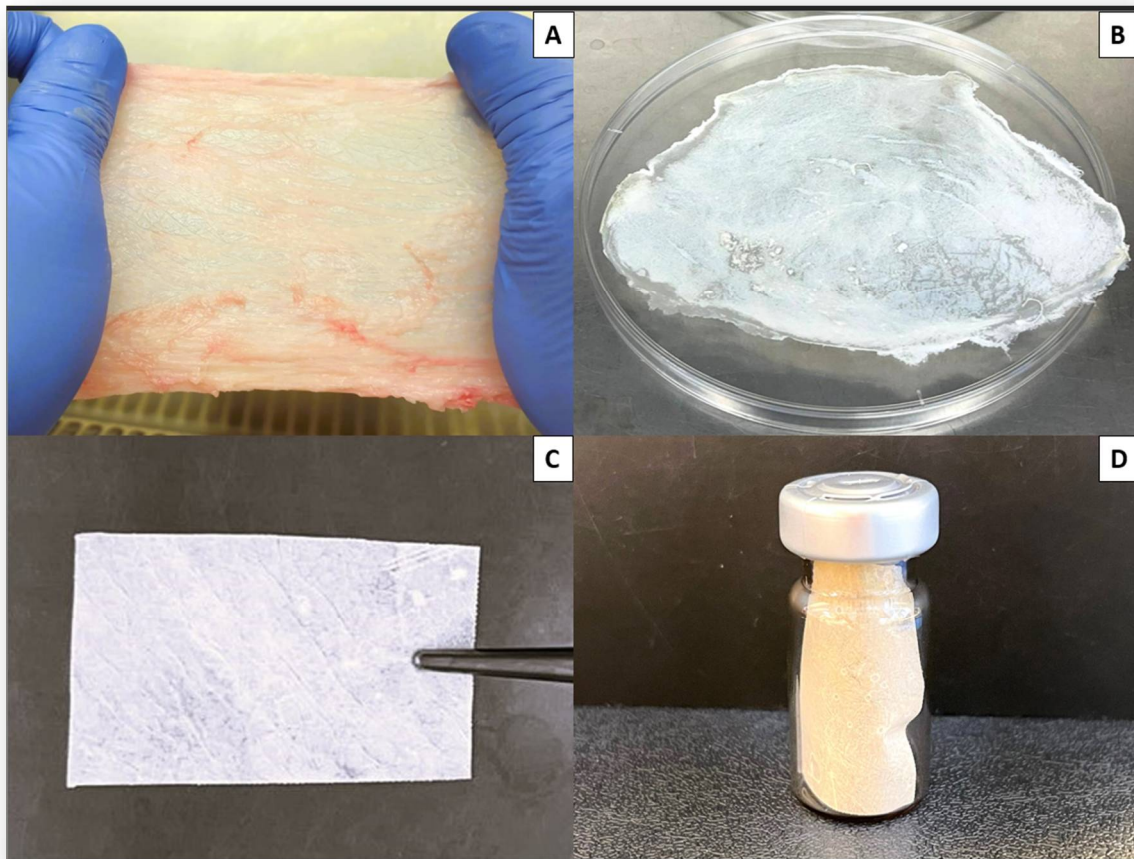


Figura 1. Preparación de la membrana de colágeno de MAVU. **A:** Obteniendo la MAVU de la lámina propia de la vejiga urinaria del cerdo, después de eliminar la capa serosa y muscular. **B:** lamina propia después del proceso de descelurización. **C:** membrana de MAVU de 20 x 30 mm. **D:** nueva membrana de colágeno de MAVU después de su esterilización.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

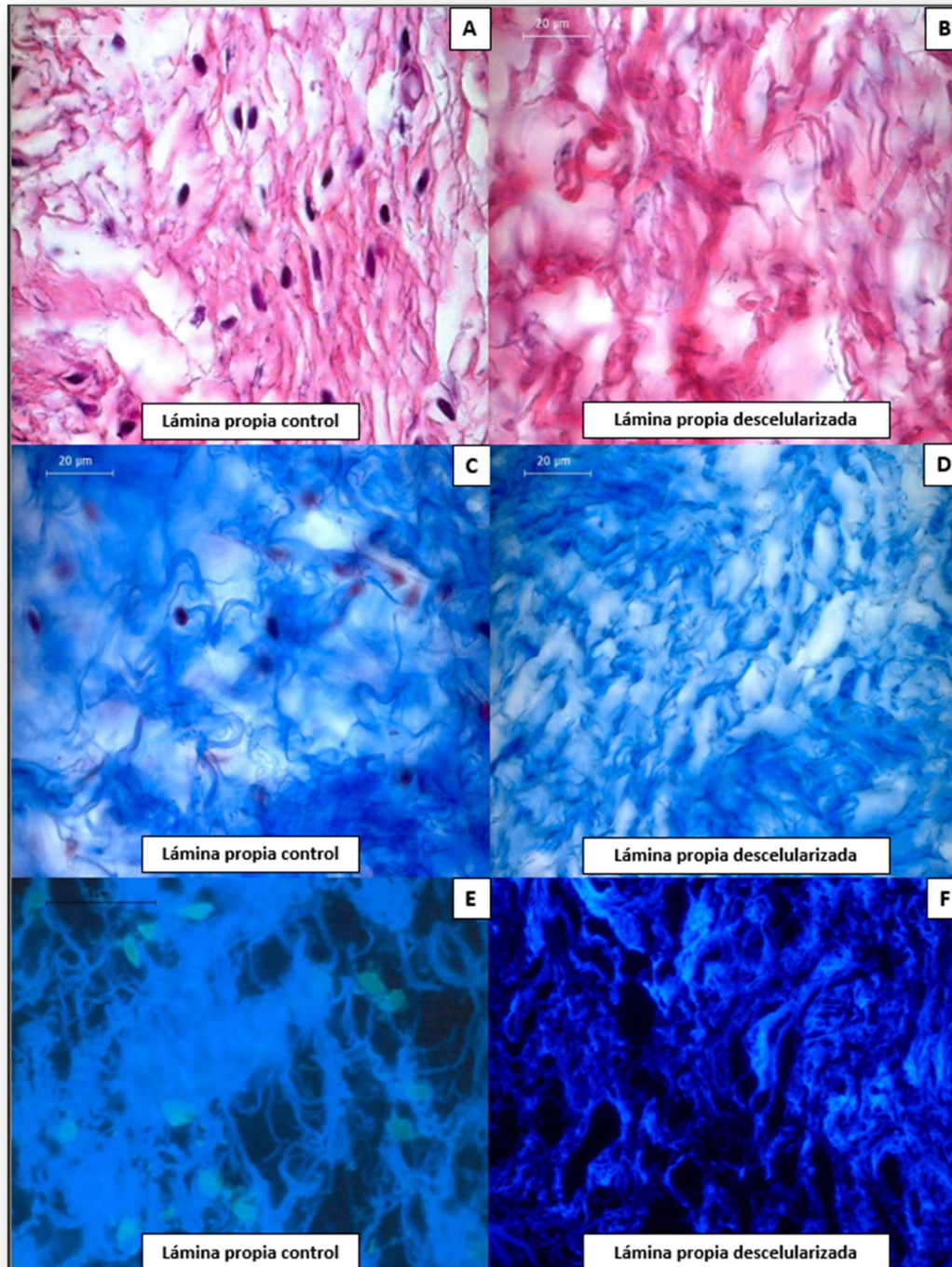


Figura 2. Comparación de la ausencia de elementos celulares entre la lámina propia control y la lámina propia descelularizada. **A y B:** Imágenes de tinción con hematoxilina y eosina a 500x. **C y D:** Imágenes de tinción tricrómica de Masson a 500x. **E y F:** Imágenes de tinción con DAPI a 500x.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Propiedades físicas

3.4. Propiedades físicas 1: morfología superficial con microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

Se utilizaron un total de 25 muestras de cada grupo (5 porciones de las 5 membranas por grupo). Las muestras se pulverizaron con platino con una capa delgada (5,0 nm) utilizando una Leica ACE600 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania) y los ejemplares de cada superficie fueron fotografiados. Siguiendo las distintas morfologías de superficies de colágeno descritas por Shi y cols., en 2023 (Shi y cols., 2023), las superficies lisas y rugosas se clasificaron como:

- Los haces de colágeno eran regulares y estaban dispuestos estrechamente.
- Los haces de colágeno eran ligeramente irregulares y estaban dispuestos de forma laxa.
- Los haces de colágeno estaban entrelazados entre sí para formar una cuadrícula tridimensional (3D), con poros regulares.

3.5 Propiedades físicas 2: propiedad hidrofílica

La hidrofiliidad de las caras delantera y trasera de cada una de las membranas fue evaluada por medición de los ángulos de contacto.

Se utilizaron un total de 25 muestras de cada grupo (5 porciones de las 5 membranas por grupo).

En resumen, se dejaron caer 3 μ L de H₂O destilada sobre la superficie de la membrana de colágeno, y luego se midió el ángulo de contacto a los 4 segundos con un instrumento óptico de medición del ángulo de contacto DataPhysics modelo OCA 15 (DataPhysics, Filderstadt, Alemania) equipado con el software de análisis de imagen SCA20 (DataPhysics, Filderstadt, Alemania) a temperatura ambiente. Este dispositivo permite cuantificar la relación que existe entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido y las fuerzas cohesivas del líquido.

Cuando las fuerzas adhesivas con la superficie del sólido son mayores que las cohesivas, el ángulo de contacto es menor de 90°, lo que indica una mayor capacidad hidrofílica de las membranas de colágeno.

3.6 Propiedades físicas 3: ensayo de ratio de degradación

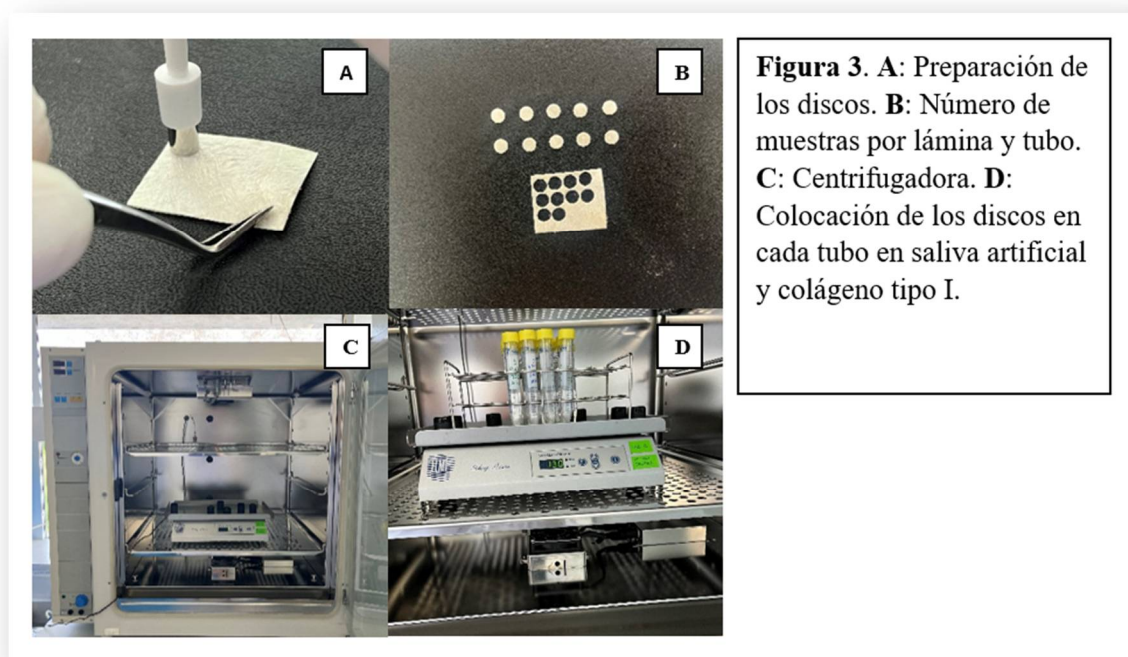
Los siete tipos de membranas de colágeno se cortaron en círculos (diámetro 6 mm) (Figura 3A) y se transfirieron a un tubo de centrífuga de 15 ml.

Seguidamente se añadió saliva artificial (10 mL) (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España), con filtro esterilizado (10 ejemplares en cada grupo) (Figura 3B).

Posteriormente las muestras se incubaron a 37°C y 130 rpm. Las muestras residuales se extrajeron los días 7, 14 y 21, a continuación se liofilizaron y finalmente se pesaron (Tamburaci y Tihminlioglu, 2021) (Figura 3D).

La ratio de degradación se expresó como el porcentaje de pérdida de peso, calculado mediante la siguiente ecuación:

- $\text{Peso perdido (\%)} = (W_0 - W_d) \times 100 / W_0$, donde W_0 es el peso antes de la degradación y W_d es el peso seco después de la degradación.



3.7 Propiedades físicas 4: análisis de estabilidad térmica.

Se utilizaron un total de 3 muestras de cada grupo. La calorimetría termogravimétrica y diferencial de barrido se realizó en un analizador térmico SDT 650 (TA Instruments, New Castle, EE. UU.) calibrado con indio, zinc, oro y zafiro.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Los análisis se realizaron bajo atmósfera de oxígeno, con una velocidad de flujo de 100 mL/min desde temperatura ambiente hasta 800 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

Propiedades mecánicas

3.8. Propiedades mecánicas 1 y 2: resistencia a la tracción y elongación

Se utilizaron un total de 10 muestras de cada grupo (2 porciones de las 5 membranas por grupo), 5 para la prueba seca y 5 para la prueba húmeda.

Las membranas de colágeno en la prueba húmeda se empaparon en saliva artificial (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) durante 2 minutos antes de la prueba.

Cada una de las muestras tenía unas dimensiones de 20 mm x 5 mm y montadas en la unidad de agarre del probador, a temperatura ambiente, se calculó la resistencia a la tracción usando una máquina universal de ensayos mecánicos Bionix 358 (Bionix, Massachusetts, USA) con una célula de carga de 500 N.

Se aplicó una fuerza de tracción a una velocidad de cruceta de 5 mm/min hasta que la muestra se rompió. La resistencia a la tracción y elongación hasta la rotura se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

1. Resistencia a la tracción (MPa) = Carga máxima para la fractura (N)/ Área de la sección transversal (m²) (Wu y cols., 2017)
2. Elongación (%) = Extensión de la longitud en la fractura x 100/Longitud inicial (Rezvanian y cols., 2017).

Los datos fueron analizados utilizando el software TRIOS (TA Instruments, New Castle, EEUU) y expresados como peso (%) para la curva TG (pérdida de peso en función de la temperatura) (Zhu y cols., 2023).

Propiedades biológicas

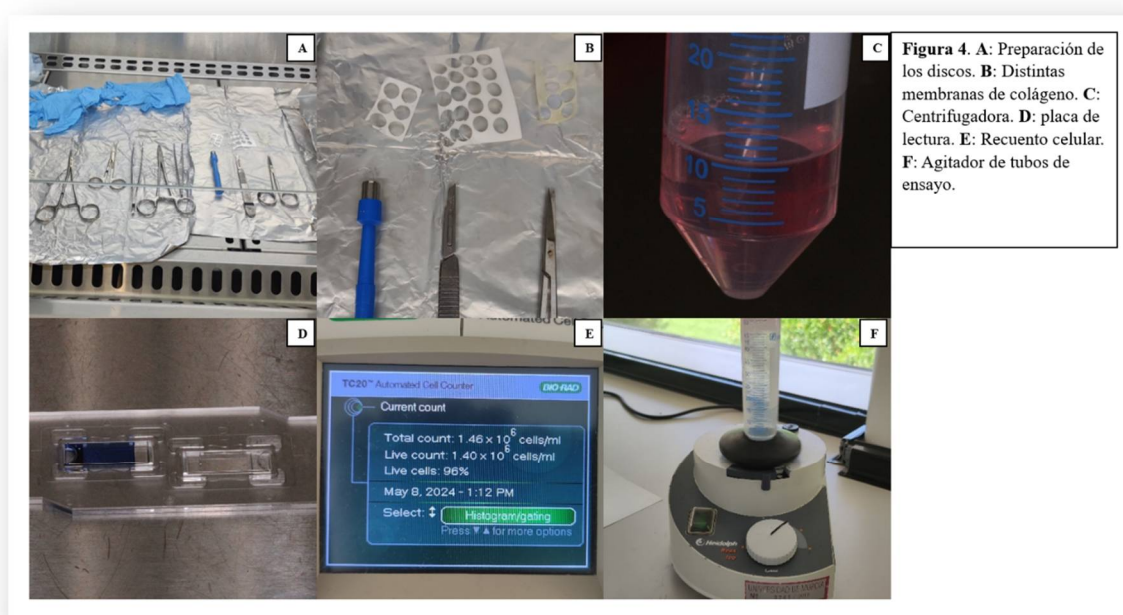
3.9 Propiedades biológicas 1: viabilidad celular (ensayo de proliferación celular)

Se utilizaron un total de 5 muestras de cada grupo (1 porción de las 5 membranas por grupo) (Figura 6). Los siete tipos de membranas de colágeno se cortaron en círculos (diámetro de 8 mm) y se transfirieron a placas de cultivo de 96 pocillos (Figura 4A).

Se sembraron en las membranas células hFOB 1.19 de osteoblastos humanos CRL-113TM (ATTC, VA, EE. UU.) a una densidad de 1×10^3 células por pocillo (Figura 6b). La proliferación celular se evaluó a los 24, 48 y 72 horas de incubación mediante el ensayo de (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio) (MTT) (Figura 4B).

Primero, se agregaron 20 μL de MTT (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) a una concentración de 5 mg/mL a 180 μL de medio, para dar una concentración final de 1 mg/mL y se incubó durante 4 horas, después se eliminó el medio y se agregaron a cada pocillo 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

Los resultados se analizaron midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm utilizando un lector de placas FLUOstar Omega (BGM LabTech, Ortenberg, Alemania). Todos los experimentos se realizaron a ciegas, por triplicado biológico (Marques y cols., 2023).



Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

3.10 Propiedades biológicas 2 y 3: cuantificación de colágeno tipo I y osteopontina

Después de 3, 5 y 7 días, se cuantificó el colágeno tipo I y la osteopontina secretados por las células sembradas en las diferentes superficies mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Para el colágeno tipo I utilizamos el kit ELISA de colágeno humano tipo I AB285250 (Abcam Inc., Cambridge, Reino Unido) y para la osteopontina utilizamos el kit ELISA de osteopontina humana (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) (Figura 5C y 5D).

El sobrenadante se aspiró y se centrifugó a 5000 g durante 15 min a 4°C y se tomaron alícuotas de cada muestra mediante ELISA para determinar los niveles de colágeno tipo I y osteopontina, según condiciones del fabricante.

Los resultados se analizaron midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm utilizando un lector de placas FLUOstar Omega (BGM LabTech, Ortenberg, Alemania). (Marques y cols., 2023).

Todos los experimentos se realizaron a ciegas, por triplicado biológico.

3.11 Propiedades biológicas 4: actividad ALP

Se sembraron células hFOB 1.19 de osteoblastos humanos CRL-113TM (ATTC, VA, EE. UU.) a una densidad de 5×10^4 en la parte superior de la matriz durante 7 días (Figura 5E).

Se utilizó el kit de ensayo colorimétrico de ALP AB83369 (Abcam Inc., Cambridge, Reino Unido) para evaluar los niveles de ALP, de acuerdo con las condiciones del fabricante.

Los resultados se analizaron midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm utilizando un lector de placas FLUOstar Omega (BGM LabTech, Ortenberg, Alemania).

Todos los experimentos se realizaron a ciegas, por triplicado biológico.

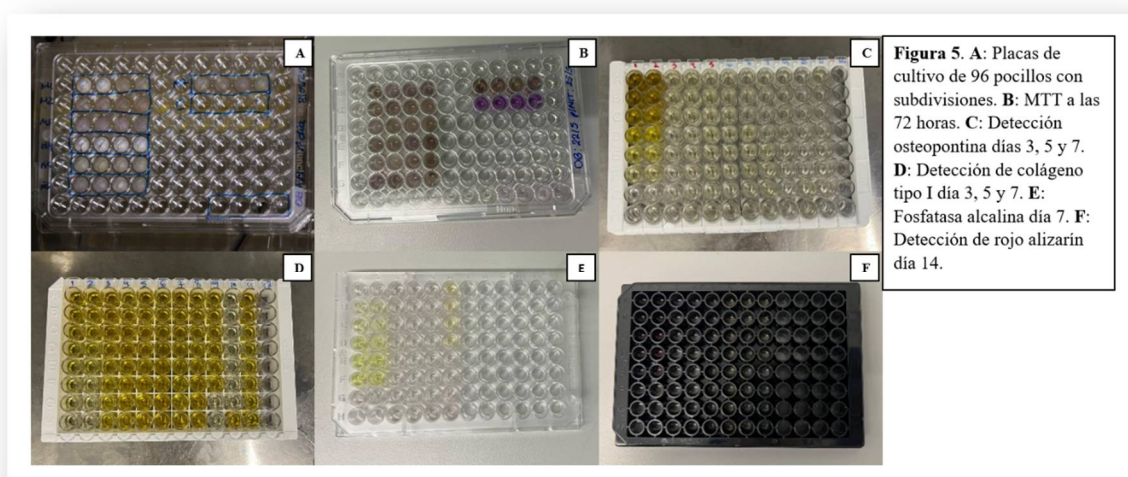
3.12 Propiedades biológicas 5: tinción con rojo de alizarín (depósitos de calcio)

Se sembraron células hFOB 1.19 de osteoblastos humanos CRL-113TM (ATTC, VA, EE. UU.) a una densidad de 5×10^4 en la parte superior de la matriz durante 14 días (Figura 5F).

Para evaluar los niveles de deposición de calcio se utilizó el kit de cuantificación de osteogénesis EMC815 (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España), según las condiciones del fabricante.

Los resultados se analizaron midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm utilizando un lector de placas FLUOstar Omega (BGM LabTech, Ortenberg, Alemania).

Todos los experimentos se realizaron a ciegas, por triplicado biológico.



3.13 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico SPSS 20.0 (SPSS® Inc, Chicago, IL, EE. UU.).

Se realizó un estudio descriptivo para cada variable. Las asociaciones entre variables cualitativas se estudiaron mediante la prueba de chi-cuadrado de Pearson. A las variables cuantitativas se les aplicaron pruebas ANOVA y Tukey, determinando en cada caso si las varianzas eran homogéneas.

Se aceptó significación estadística cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4.1 Propiedades físicas 1: morfología de la superficie con microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

La nueva membrana de colágeno de MAVU mostró en ambas superficies (lisa y rugosa) haces de colágeno regulares y dispuestos estrechamente, al igual que las membranas de PP, EP, EAT y BAT. Las membranas de colágeno de PPE mostraron en ambas superficies haces de colágeno ligeramente irregulares y dispuestos de manera suelta, y las membranas de BP mostraron en ambas superficies haces de colágeno que se entrelazaban entre sí para formar una cuadrícula tridimensional (3D) con poros regulares. (Figuras 6 y 7).

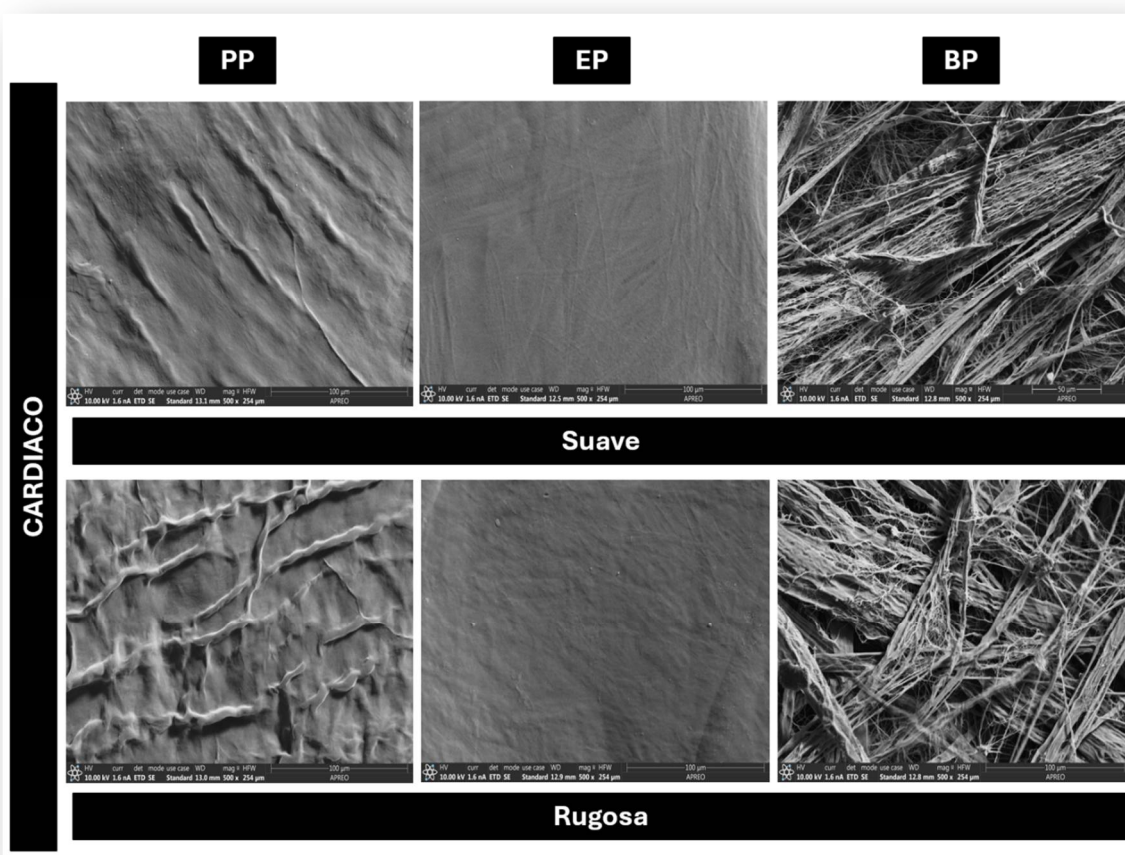


Figura 6. Morfología superficial de las membranas de colágeno de tejido cardiaco vistas en FESEM a 500x.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

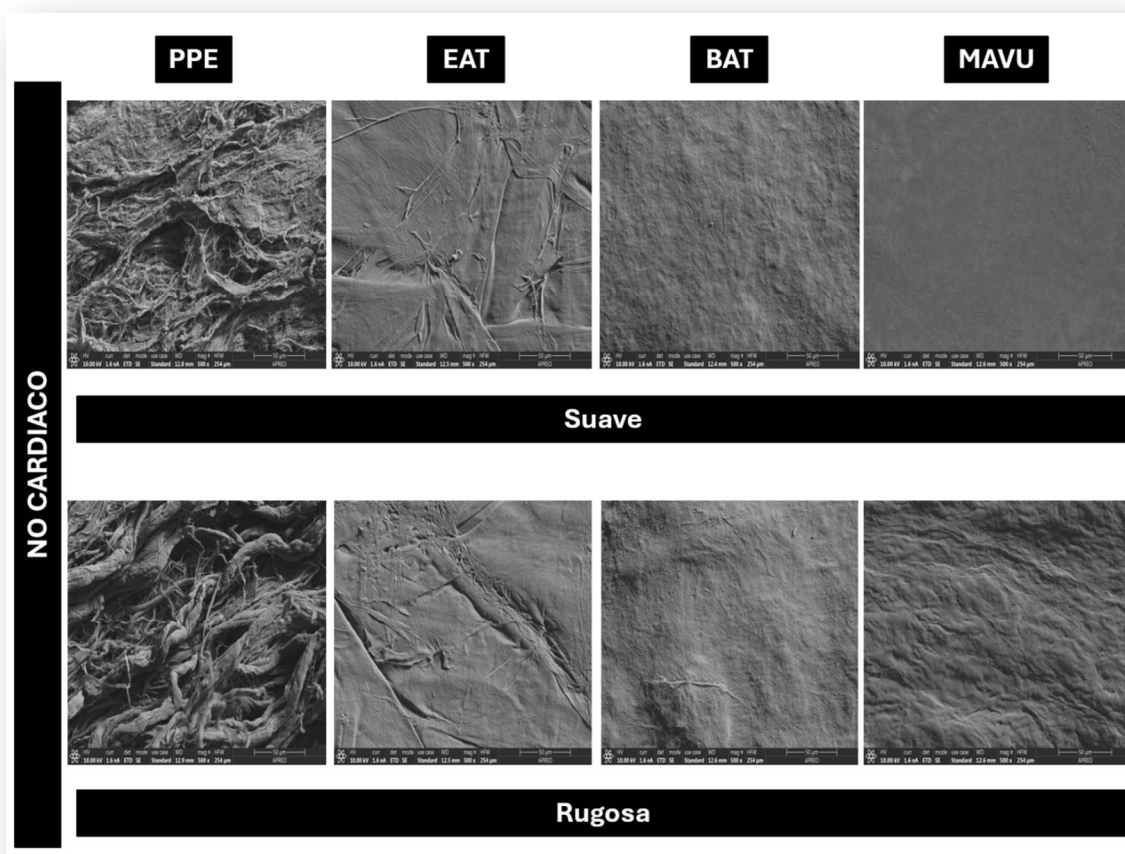


Figura 7. Morfología superficial de las membranas de colágeno de tejido no cardiaco vistas en FESEM a 500x.

4.2 Propiedades físicas 2: propiedad hidrofílica

El ángulo de contacto (ángulo de menor a mayor capacidad hidrofílica) de las membranas de colágeno en ambas superficies (lisa y rugosa) en orden de menor a mayor fue $PPE < MAVU < EP < BP < BAT < PP < EAT$. Las membranas de colágeno de PPE fueron las más hidrofílicas con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,050$) respecto al resto de membranas estudiadas. De hecho, el ángulo de contacto de la gota de H₂O destilada no pudo ser medida a los 4 segundos en ninguna de sus superficies, porque se absorbió en menos de 4 milisegundos.

La nueva membrana de colágeno de MAVU mostró en ambas superficies (lisa y rugosa) ser más hidrofílica que PP, EP, BP, EAT y BAT, con diferencias estadísticamente significativas con PP ($p < 0,001$ en ambas superficies), EAT ($p < 0,001$ en ambas

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

superficies) y BAT ($p=0,007$ en superficie lisa y $p=0,005$ en superficie rugosa) (Tabla 3 y Figura 8).

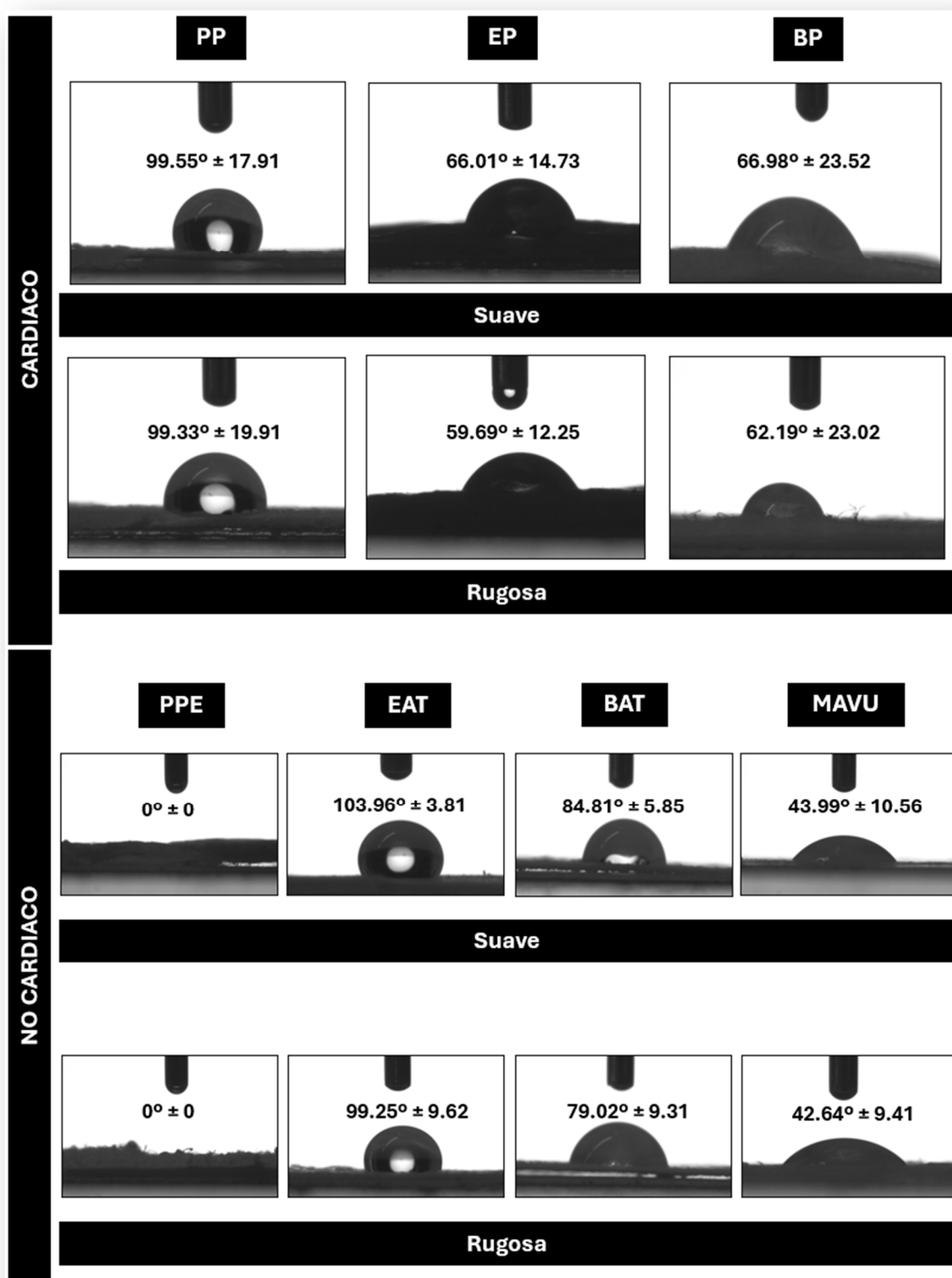


Figura 8. Medición del ángulo de contacto de las membranas del estudio.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Tabla 3. Comparación de las propiedades hidrofílicas (test de Tukey)

Membranas de colágeno	Ángulos de contacto (superficie suave) media $\pm$ DE	Á. contacto (s. rugosa) media $\pm$ DE
PP	99.55 $\pm$ 17.91 ^{b,c,d,g}	99.35 $\pm$ 19.91 ^{b,c,d,g}
EP	66.01 $\pm$ 14.73 ^{a,d,e}	59.69 $\pm$ 12.25 ^{a,d,e}
BP	66.98 $\pm$ 23.52 ^{a,d,e}	62.19 $\pm$ 23.02 ^{a,d,e}
PPE	0 $\pm$ 0 ^{a,b,c,e,f,g}	0 $\pm$ 0 ^{a,b,c,e,f,g}
EAT	103.96 $\pm$ 3.81 ^{b,c,d,g}	99.25 $\pm$ 9.62 ^{b,c,d,g}
BAT	84.81 $\pm$ 5.85 ^{d,g}	79.02 $\pm$ 9.31 ^{d,g}
MAVU	43.99 $\pm$ 10.56 ^{a,d,e,f}	42.64 $\pm$ 9.41 ^{a,d,e,f}
^a Diferencias significativas comparadas con PP, ^b Diferencias significativas comparadas con EP, ^c Diferencias significativas comparadas con BP, ^d Diferencias significativas comparadas con PPE, ^e Diferencias significativas comparadas con EAT, ^f Diferencias significativas comparadas con BAT, ^g Diferencias significativas comparadas con MAVU		

4.3 Propiedades físicas 3: ensayo de ratio de degradación

La pérdida de peso por degradación (%) de las membranas de colágeno a los 7, 14 y 21 días en orden de menor a mayor fue MAVU < PPE < EP < BP < BAT < PP < EAT. Las membranas de colágeno de EAT fueron las que mostraron un mayor ratio de degradación a los 7, 14 y 21 días, con diferencias estadísticamente significativas a los 7 días con las de MAVU ($p=0,024$), a los 14 días con las de EP, BP, PPE, BAT y MAVU ($p<0,001$), y a los 21 días con las de EP, BP, PPE y MAVU ($p<0,001$).

La nueva membrana de colágeno de MAVU fueron las que mostraron un menor ratio de degradación a los 7, 14 y 21 días, con diferencias estadísticamente significativas a los 7 días con las de EAT ($p=0,024$), y a los 14 y 21 días con las de PP, EAT y BAT ($p<0,001$) (Figura 9).

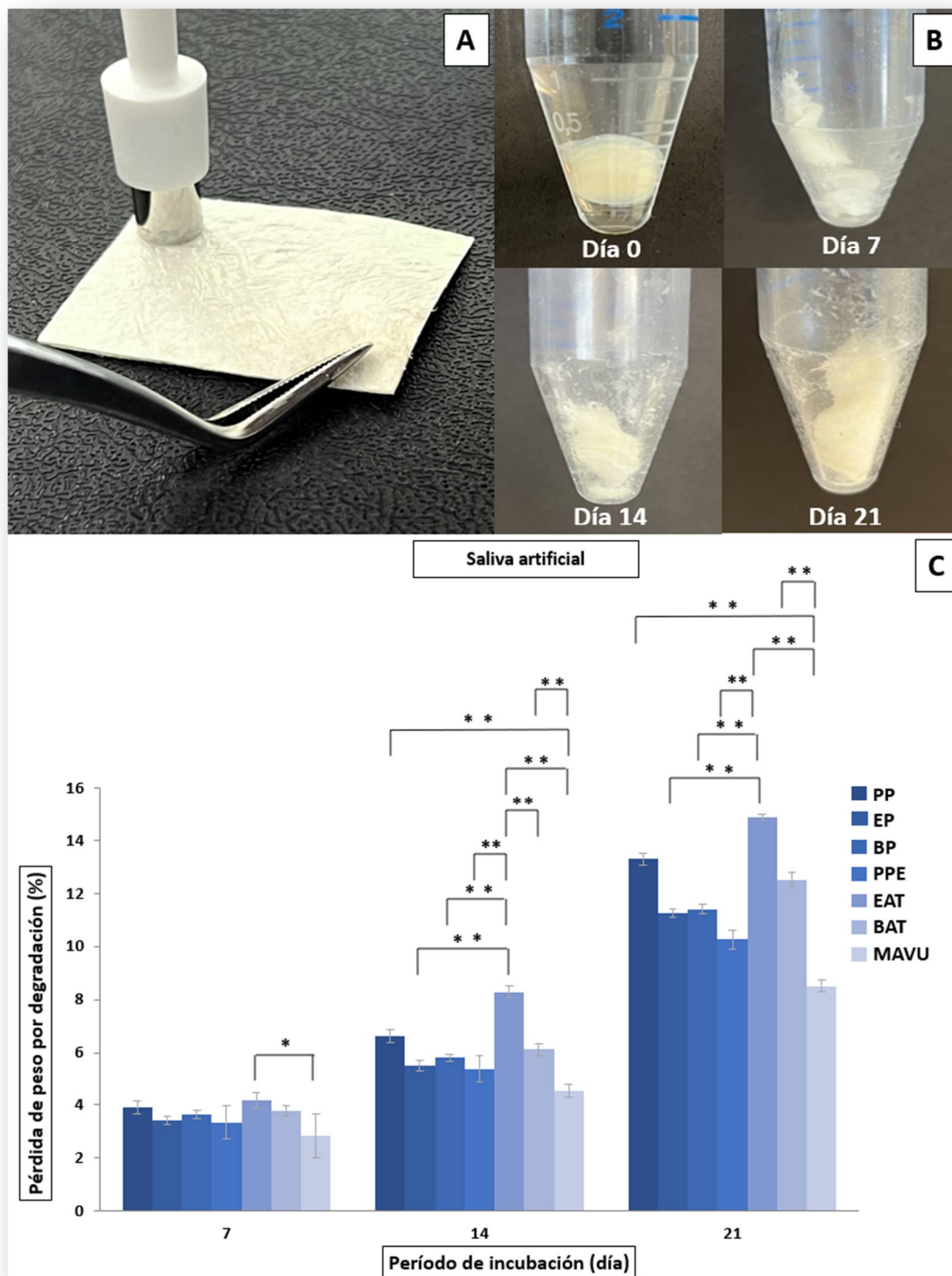


Figura 9. Ensayo de relación de degradación. **A:** Membranas de colágeno cortadas en círculo utilizando un bisturí circular de 6 mm de diámetro. **B:** Fotografías de la membrana de colágeno de AUBM antes de 7, 14 y 21 días después de la degradación en saliva artificial. **C:** Pérdida de peso por degradación (%) de las membranas de colágeno incubadas con saliva artificial (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,001$).

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

4.4 Propiedades físicas 4: Análisis de estabilidad térmica

Las curvas TG de pérdida de peso (%) en función de la temperatura fueron muy similares en las siete membranas estudiadas, observándose tres picos de temperatura donde se producía un mayor porcentaje de pérdida de peso en todas las membranas a los 80° C, 300° C y 550° C (Figura 10). Al comparar la pérdida de peso (%) en estos tres picos de temperatura, fueron muy similares en todas las membranas, sin diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4). Finalmente, todas las membranas se destruirían totalmente a partir de los 660° C.

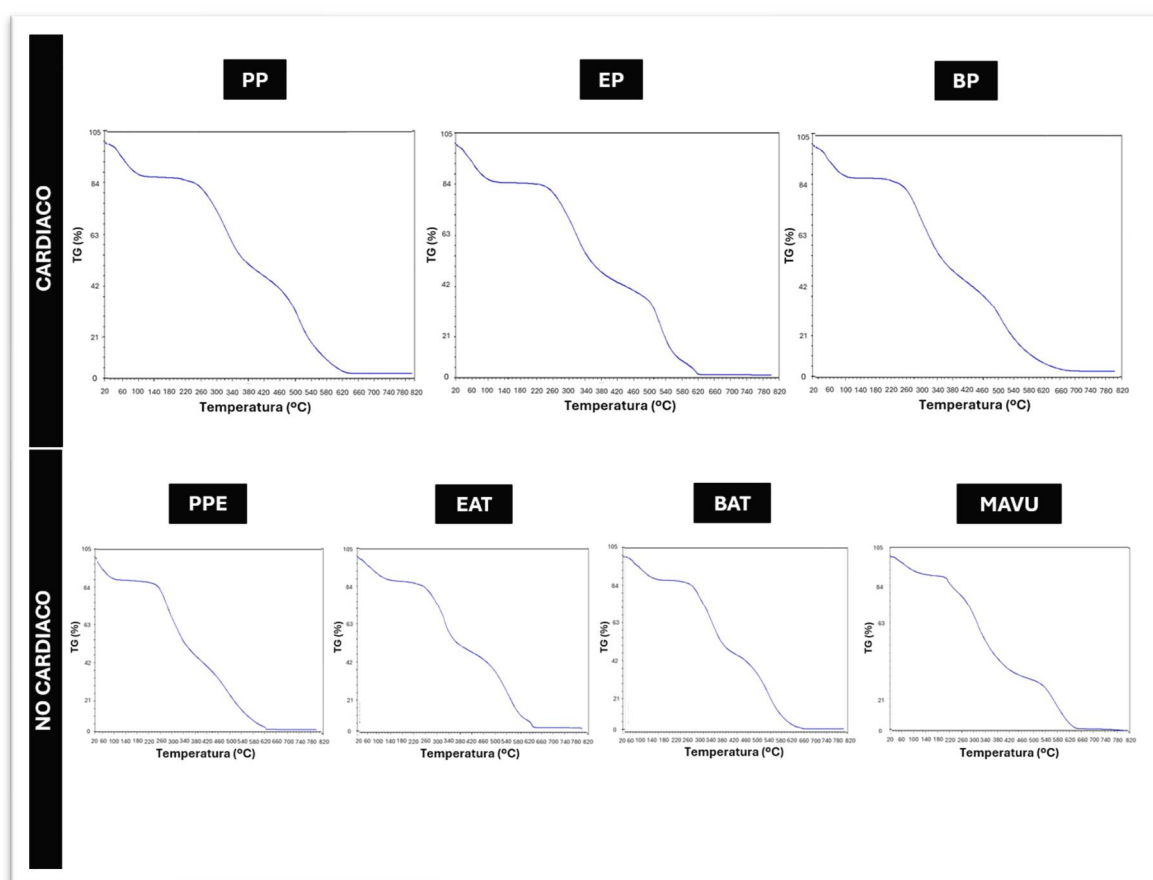


Figura 10. Curvas TG de pérdida de peso (%) en función de la temperatura.

Tabla 4. Análisis de estabilidad térmica (test de Tukey)

Membranas de colágeno	Pérdida de peso (%) a 80° C media ± DE	P. peso (%) a 300° C media ± DE	P. peso (%) a 550° C media ± DE
PP	14.12 ± 2,11	40.84 ± 2.14	72.91 ± 3.79
EP	16.23 ± 1.36	43.41 ± 3.16	69.35 ± 2.68
BP	13.42 ± 2.03	43.92 ± 4.68	68.91 ± 3.46
PPE	12.81 ± 1.06	45.86 ± 2.79	71.68 ± 5.23
EAT	13.05 ± 2.08	40.51 ± 4.16	73.26 ± 4.67
BAT	13.15 ± 1.09	42.34 ± 5.67	72.57 ± 5.26
MAVU	10.66 ± 2.07	59.44 ± 2.68	71.56 ± 3.68
^a Diferencias significativas comparadas con PP, ^b Diferencias significativas comparadas con EP, ^c Diferencias significativas comparadas con BP, ^d Diferencias significativas comparadas con PPE, ^e Diferencias significativas comparadas con EAT, ^f Diferencias significativas comparadas con BAT, ^g Diferencias significativas comparadas con MAVU			

4.5 Propiedades mecánicas 1 y 2: resistencia a la tracción y elongación

La resistencia a la tracción (MPa) de las membranas de colágeno secas en orden de mayor a menor fue EAT > BAT > MAVU > EP > BP > PP > PPE. Las membranas de EAT fueron las que mostraron mayor resistencia a la tracción en seco, con diferencias estadísticamente significativas con las de PP ($p=0,032$) y PPE ($p=0,022$). La nueva membrana de colágeno de MAVU fueron las terceras en mayor resistencia a la tracción en seco, sin diferencias estadísticamente significativas con ninguna de las otras membranas (Figura 11A).

La resistencia a la tracción de las membranas de colágeno humedecidas fue menor que en seco en todas las membranas, el orden de mayor a menor fue BAT > BP > EP > EAT > MAVU > PP > PPE. Las membranas de BAT fueron las que mostraron mayor resistencia a la tracción en húmedo, con diferencias estadísticamente significativas con las de PP ($p<0,001$), PPE ($p<0,001$), EAT ($p=0,007$) y MAVU ($p<0,001$). La nueva membrana de colágeno de MAVU fueron las quintas en mayor resistencia a la tracción en húmedo (Figura 11A).

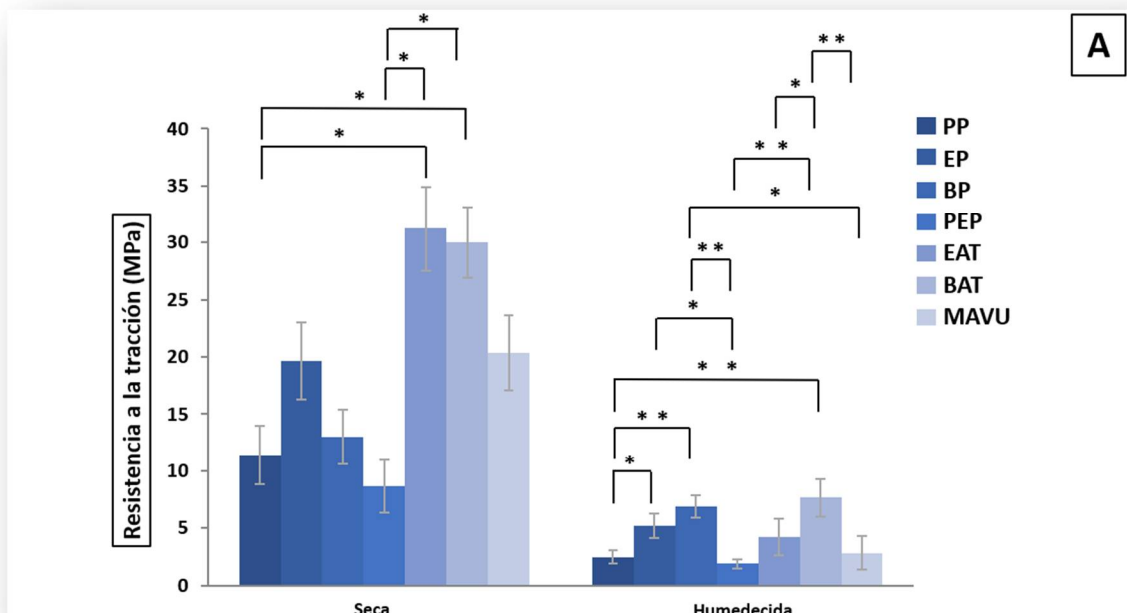


Figura 11A. Resistencia a la tracción (MPa) (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,001$).

La elongación (%) de las membranas de colágeno secas en orden de mayor a menor fue PPE > BP > EP > BAT > PP > EAT > MAVU. Las membranas de PPE fueron las que mostraron mayor capacidad de elongación en seco, con diferencias estadísticamente significativas con las de PP ($p < 0,001$), EP ($p = 0,001$), EAT ($p < 0,001$), BAT ($p < 0,001$), y MAVU ($p < 0,001$) (Figura 11B).

La de las membranas de colágeno húmedas fue mayor que en seco en todas las membranas, el orden de mayor a menor fue MAVU > PPE > BP > EP > EAT > PP > BAT. La nueva membrana de colágeno de MAVU fueron las que mostraron mayor capacidad de elongación en húmedo, con diferencias estadísticamente significativas con todos los demás: PP ($p < 0,001$), EP ($p < 0,001$), BP ($p < 0,001$), PPE ($p = 0,019$), EAT ($p < 0,001$) y BAT ($p < 0,001$) (Figuras 11B y 11C).

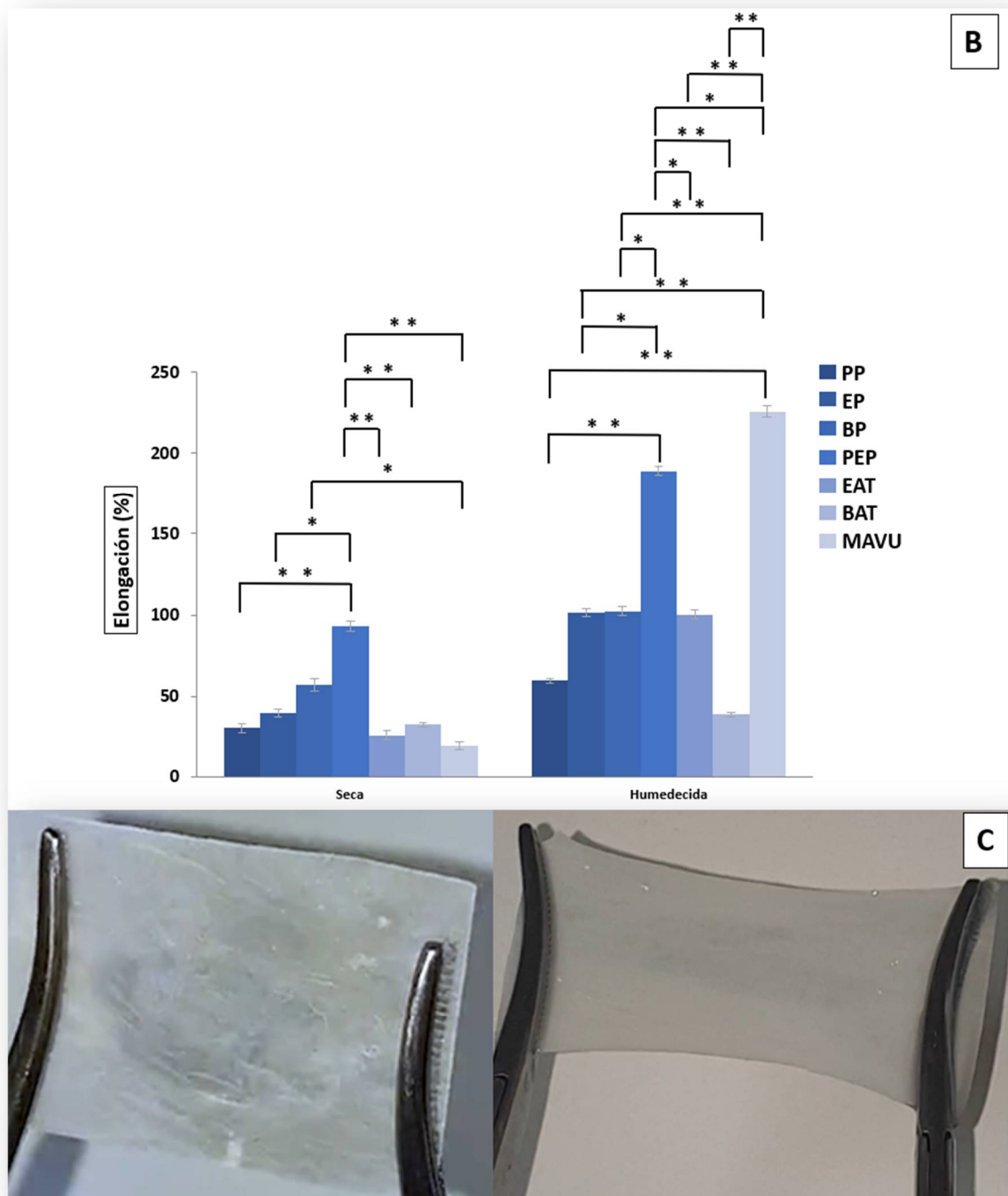


Figura 11. B: Elongación (%) (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,001$). **C:** Aumento de la resistencia a la tracción y elongación de la nueva membrana de colágeno, después de sumergirla en saliva artificial durante 2 minutos.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

4.6 Propiedades biológicas 1: viabilidad celular (ensayo de proliferación celular)

La proliferación celular a las 24, 48 y 72 horas de incubación (expresada en porcentaje respecto al control) de las membranas de colágeno en orden de mayor a menor fue: MAVU > PPE > EP > PP > BP > BAT > EAT; observando diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas de incubación de la nueva membrana de colágeno de MAVU con PP ($p<0,001$), PE ($p<0,001$), BP ($p<0,001$), EAT ($p<0,001$), y BAT ($p<0,001$); a las 48 horas con PP ($p<0,001$), EP ($p<0,001$), BP ($p<0,001$), PPE ($p=0,022$), EAT ($p<0,001$), and BAT ($p<0,001$); y a las 72 horas con PP ($p<0,001$), EP ($p<0,001$), BP ($p<0,001$), EAT ($p<0,001$), y BAT ($p<0,001$) (Figura 12).

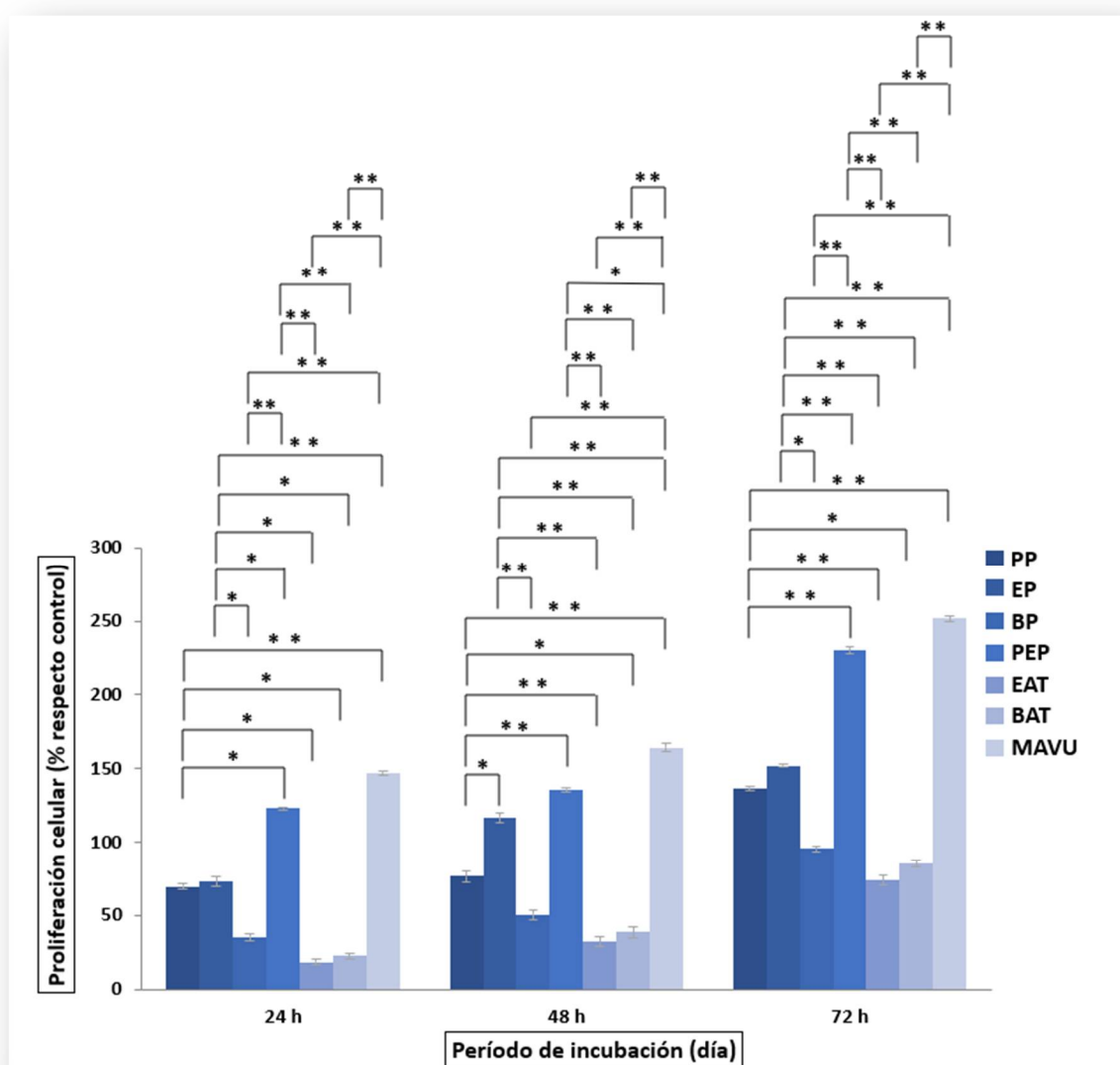


Figura 12. Proliferación celular a las 24, 48 y 72 horas de incubación. Los datos se presentan como porcentaje sobre el control.

4.7 Propiedades biológicas 2 y 3: cuantificación de colágeno tipo I y osteopontina

La cuantificación de colágeno tipo I secretado por células osteoblásticas sembradas sobre las membranas de colágeno a los 3, 5 y 7 días de incubación (expresada en porcentaje respecto al control) en orden de mayor a menor fue MAVU > PPE > EP > PP > BP > BAT > EAT; observando diferencias estadísticamente significativas a los 3 días de incubación de la nueva membrana de colágeno de MAVU con PP ($p=0,009$), EP ($p=0,019$), BP ($p<0,001$), EAT ($p<0,001$), y BAT ($p<0,001$); a los 5 días con PP ($p=0,029$), EP ($p=0,031$), BP ($p=0,017$), PPE ($p=0,042$), EAT ($p<0,001$), y BAT ($p<0,001$); y a los 7 días también con PP ($p=0,018$), EP ($p=0,029$), BP ($p=0,012$), PPE ($p=0,036$), EAT ($p<0,001$), y BAT ($p<0,001$) (Tabla 5).

Tabla 5. Cuantificación de colágeno tipo 1 secretado por las células osteoblásticas cultivadas en las membranas de colágeno a los días 3, 5 y 7. Los datos están presentados en % respecto a control (test de Tukey)

Membranas de colágeno	Día 3 (%) media $\pm$ DE	Día 5 (%) media $\pm$ DE	Día 7 (%) media $\pm$ DE
PP	101.44 $\pm$ 0.78 ^{a,f,g}	108.36 $\pm$ 0.91 ^{e,f}	115.39 $\pm$ 1.01 ^{e,f}
EP	101.85 $\pm$ 1.04 ^{a,f,g}	109.57 $\pm$ 1.22 ^{e,f}	125.44 $\pm$ 0.84 ^{e,f}
BP	98.67 $\pm$ 1.05 ^{d,e,f,g}	101.51 $\pm$ 1.14 ^{e,f}	108.25 $\pm$ 1.11 ^{e,f}
PPE	103.71 $\pm$ 2.24 ^{c,e,f}	115.61 $\pm$ 1.04 ^{e,f,g}	132.41 $\pm$ 1.2 ^{e,f,g}
EAT	49.34 $\pm$ 0.49 ^{a,b,c,d,f,g}	72.37 $\pm$ 1.12 ^{a,b,c,d,g}	86.41 $\pm$ 0.89 ^{a,b,c,d,g}
BAT	58.47 $\pm$ 0.75 ^{a,b,c,d,e,g}	82.53 $\pm$ 1.11 ^{a,b,c,d,g}	99.33 $\pm$ 0.99 ^{a,b,c,d,g}
MAVU	105.76 $\pm$ 1.29 ^{a,b,c,e,f}	123.61 $\pm$ 0.86 ^{a,b,c,d,e,f}	156.34 $\pm$ 0.99 ^{a,b,c,d,e,f}

^a Diferencias significativas comparadas con PP, ^b Diferencias significativas comparadas con EP, ^c Diferencias significativas comparadas con BP, ^d Diferencias significativas comparadas con PPE, ^e Diferencias significativas comparadas con EAT, ^f Diferencias significativas comparadas con BAT, ^g Diferencias significativas comparadas con MAVU

La cuantificación de osteopontina secretada por células osteoblásticas sembradas sobre las membranas de colágeno a los 3, 5 y 7 días de incubación (expresada en porcentaje respecto al control) en orden de mayor a menor fue MAVU > PPE > EP > PP > BP > BAT > EAT ; observando diferencias estadísticamente significativas a los 3 días de incubación de la nueva membrana de colágeno de MAVU con BP ($p=0,030$), EAT ($p<0,001$), y BAT ($p<0,001$); a los 5 días también con BP ($p=0,013$), EAT ($p<0,001$), y BAT ($p<0,001$); y a los 7 días con EAT ($p<0,001$), y BAT ($p<0,001$) (Tabla 6).

Tabla 6. Cuantificación de la osteopontina secretada por las células osteoblásticas sembradas sobre las membranas de colágeno a los 3, 5 y 7 días. Los datos se presentan como % sobre el control (test de Tukey)

Membranas de colágeno	Día 3 (%) media $\pm$ DE	Día 5 (%) media $\pm$ DE	Día 7 (%) media $\pm$ DE
PP	141.31 $\pm$ 4.56 ^{e,f}	174.72 $\pm$ 3.36 ^{e,f}	185.91 $\pm$ 5.07 ^{e,f}
EP	143.73 $\pm$ 7.01 ^{e,f}	176.75 $\pm$ 5.46 ^{e,f}	189.87 $\pm$ 5.09 ^{e,f}
BP	135.51 $\pm$ 4.24 ^{e,f,g}	160.44 $\pm$ 6.78 ^{d,e,f,g}	171.25 $\pm$ 12.41 ^{e,f}
PPE	147.72 $\pm$ 9.33 ^{e,f}	179.17 $\pm$ 6.29 ^{c,e,f}	191.59 $\pm$ 5.08 ^{e,f}
EAT	62.94 $\pm$ 2.16 ^{a,b,c,d,g}	95.06 $\pm$ 3.69 ^{a,b,c,d,g}	111.87 $\pm$ 7.03 ^{a,b,c,d,g}
BAT	73.35 $\pm$ 2.69 ^{a,b,c,d,g}	101.67 $\pm$ 6.67 ^{a,b,c,d,g}	120.46 $\pm$ 15.05 ^{a,b,c,d,g}
MAVU	154.46 $\pm$ 9.39 ^{c,e,f}	181.71 $\pm$ 9.41 ^{c,e,f}	195.93 $\pm$ 4.98 ^{e,f}
^a Diferencias significativas comparadas con PP, ^b Diferencias significativas comparadas con EP Diferencias significativas comparadas con BP, ^d Diferencias significativas comparadas con PPE, ^e Diferencias significativas comparadas con EAT, ^f Diferencias significativas comparadas con BAT, ^g Diferencias significativas comparadas con MAVU			

4.8 Propiedades biológicas 4: actividad ALP

A los 7 días de cultivo, la actividad enzimática ALP (expresada en porcentaje respecto al control) en orden de mayor a menor fue MAVU > PPE > EP > PP > BP > BAT > EAT, aunque fue muy similar en MAVU, PPE, EP, PP, y BP; de hecho se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) de estas cinco membranas al compararlas con BAT o EAT (Figura 13A).

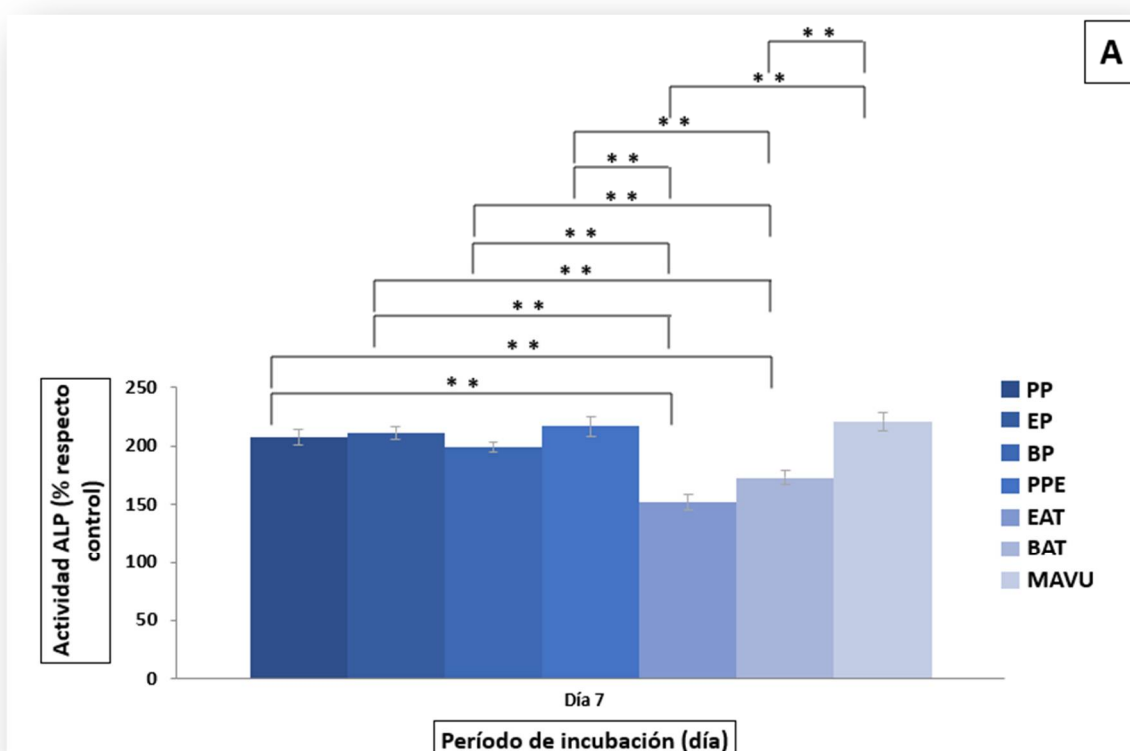


Figura 13A. Actividad ALP (%) en función del periodo de incubación (día) (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,001$).

4.9 Propiedades biológicas 5: tinción con rojo de alizarín (depósitos de calcio)

A los 14 días de cultivo, la precipitación de calcio (expresado en porcentaje respecto al control) en orden de mayor a menor fue MAVU > PPE > EP > PP > BP > BAT > EAT, aunque fue muy similar en MAVU, PPE, EP, PP, y BP; de hecho se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) de estas cinco membranas al compararlas con BAT o EAT (Figura 13B).

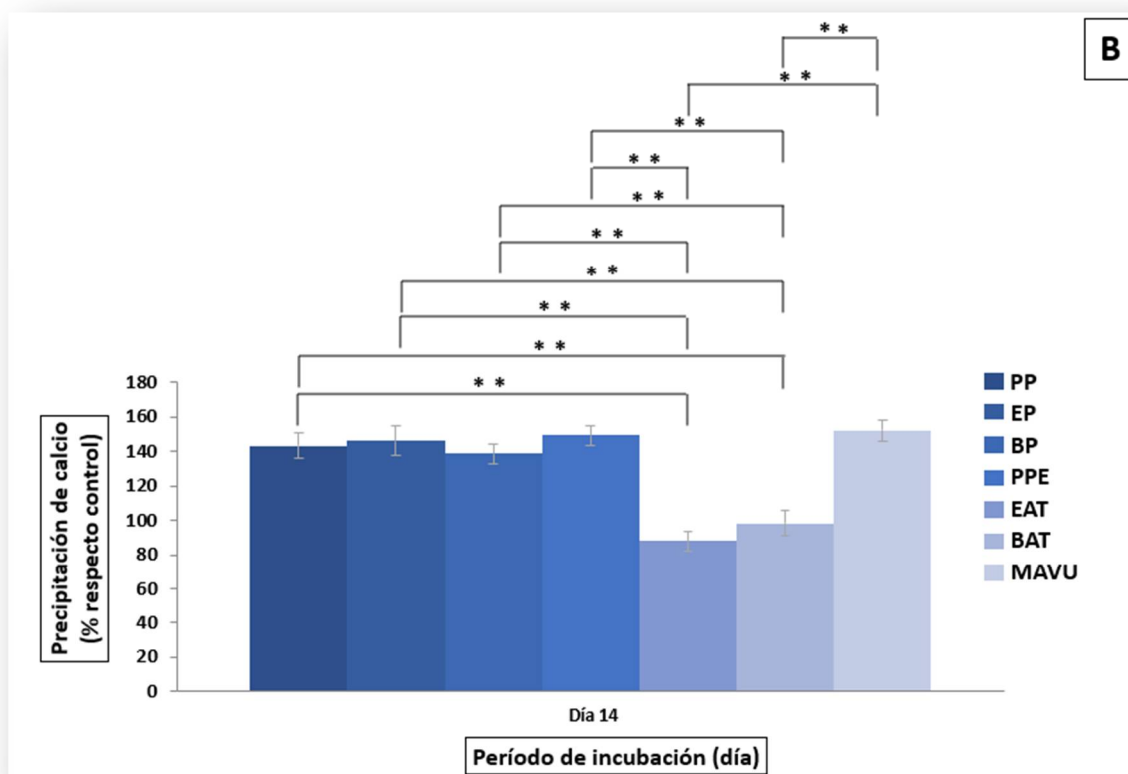


Figura 13B. Precipitación de Ca (%) en función del periodo de incubación (día) (* $p \leq 0,05$; ** $p < 0,001$).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El presente estudio comparó las **propiedades físicas** (morfología de la superficie, propiedad hidrofílica, ratio de degradación y estabilidad térmica), **mecánicas** (resistencia a la tracción y elongación) y biológicas (viabilidad celular, cuantificación de colágeno tipo I, cuantificación de osteopontina, actividad ALP y precipitación de calcio) de una nueva membrana de colágeno de MAVU con seis membranas de colágeno de fuentes de colágeno porcino (PP y PPE), equino (EP y EAT) y bovino (BP y BAT).

En relación a la morfología de la superficie, la nueva membrana de colágeno de MAVU mostró en ambas superficies (lisa y rugosa) haces de colágeno regulares y dispuestos estrechamente, al igual que las membranas de BP, EP, EAT y BAT, mientras que las de PPE mostraron en ambas superficies haces de colágeno que eran ligeramente irregulares y estaban dispuestos de forma laxa. En nuestro análisis con FESEM, solo las membranas de BP mostraron en ambas superficies haces de colágeno que se entrelazaban entre sí para formar una rejilla 3D con poros regulares. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Shi y cols. en 2023, (Shi y cols., 2023), que analizaron con microscopía electrónica de barrido (SEM) la morfología de la superficie de la membrana de colágeno de PPE, dermis bovina y BP. Los resultados obtenidos indicaron que también la membrana de dermis bovina mostró haces de colágeno regulares y dispuestos como nuestras membranas de MAVU, EP, EAT y BAT; que las membranas de PPE mostraron también en ambas superficies haces de colágeno ligeramente irregulares y dispuestos de manera laxa; y que las membranas de BP mostraban en ambas superficies haces de colágeno que se entrelazaban entre sí para formar una rejilla 3D con poros regulares. Sin embargo, parece ser que la disposición de los haces de colágeno dispuestos de forma próxima, laxa o con poros puede influir en algunas propiedades físicas como la hidrofiliidad pero no en el resto de propiedades físicas, mecánicas o biológicas, donde la variable que más puede influir desde el punto de vista morfológico no es tanto la disposición de las haces de colágeno, sino su disposición homogénea en toda la membrana (Paul y cols., 1992). En nuestro estudio, las siete membranas estudiadas tenían una disposición del colágeno homogénea (estrecha, suelta o con poros) en toda la superficie de cada una de las membranas analizadas.

La propiedad hidrofílica de las membranas de colágeno (en ambas superficies) fue estudiada mediante el ensayo de ángulos contacto. Este dispositivo permite cuantificar la relación entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y la membrana y las fuerzas

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

cohesivas del líquido; de esta forma, cuando las fuerzas adhesivas con la superficie de la membrana son mayores que las cohesivas, el ángulo de contacto es menor de 90° , lo que indica la capacidad hidrofílica de las membranas. Lo primero que debemos resaltar es que, de las siete membranas de colágeno estudiadas, solo las membranas de EAT y PP mostraron ángulos de contacto por encima de 90° tanto en la superficie lisa como en la rugosa, indicando que son poco hidrofílicas. En segundo lugar, observamos que en las siete membranas estudiadas los ángulos de contacto fueron menores en la superficie rugosa que en la superficie lisa, estos resultados están en relación con las indicaciones clínicas para la orientación de las membranas de colágeno en ROG, ya que superficies con los ángulos de contacto bajos pueden aumentar la adhesión celular y la regeneración de tejidos (Schieber y cols., 2017; Strong y Eaves, 2017). Por esto mismo, en ROG la superficie lisa (menos hidrofílica) debe estar en contacto con el tejido blando y no con el hueso, mientras que la superficie rugosa (más hidrofílica), debe estar en contacto con el tejido óseo. En tercer lugar, observamos que las membranas de colágeno de PPE eran las más hidrofílicas con diferencias estadísticamente significativas con las otras seis membranas de colágeno en ambas superficies, ya que el ángulo de contacto de la gota de H₂O destilada no pudo ser medida a los 4 segundos en ninguna de sus superficies, porque se absorbió en menos de 4 milisegundos. Del mismo modo, Shi y cols., (2023) también observaron que las membranas de PPE eran mucho más hidrofílicas (en ambas superficies), al compararlas con membranas de colágeno de dermis bovina y BP, aunque estos autores no indicaban a cuántos segundos median los ángulos de contacto. Finalmente, la nueva membrana de colágeno de MAVU mostró en ambas superficies (lisa y rugosa) ser más hidrofílica que PP, EP, BP, EAT y BAT. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Rodrigues y cols., en el año 2020 (Rodrigues y cols., 2020), que compararon la propiedad hidrofílica de una membrana de poliuretano con otra fabricada también en poliuretano, pero rica en colágeno y elastina y observaron que los ángulos de contacto eran mucho menores en la membrana rica en colágeno y elastina, con una composición muy similar a la nueva membrana de colágeno de MAVU (Camacho-Alonso y cols., 2021).

En relación a la ratio de degradación en saliva artificial, estudiando la pérdida de peso por degradación (%) de las membranas de colágeno a los 7, 14 y 21 días observamos que en orden de menor a mayor fue MAVU < PPE < EP < BP < BAT < PP < EAT. La ROG se basa en el concepto de exclusión celular y mantenimiento del espacio para

permitir el tiempo suficiente para la formación de hueso nuevo. Para que se produzca la regeneración, se espera que la membrana permanezca intacta hasta 4-6 meses. En el estudio de Vallecillo-Rivas y cols. en 2021 (Vallecillo-Rivas y cols., 2021), la membrana de colágeno PP (Evolution Xfine®, Osteobiol by TecnoSS, Torino, Italia); mostró ser la membrana más resistente a las pruebas de degradación seguida de BP (CopiOs®, Zimmer Biomet Dental, FL, EEUU). Además de su origen, porcino y bovino, respectivamente, estas membranas presentaron la superficie menos porosa cuando se evaluaron con microscopía óptica antes de la inmersión. Se han observado cambios morfológicos en las matrices de colágeno después de la degradación. Estos son el desorden de la red de colágeno y el agrandamiento de los poros, a través del ensanchamiento de los espacios interfibrilares. Estos hallazgos son consistentes con alteraciones descritas previamente que se encontraron después de la degradación del colágeno humano con agua. Estudios previos que correlacionan la estructura de la membrana con la degradación mostraron que las fibras de colágeno más gruesas, una mayor densidad de colágeno y una estructura más compacta pueden producir una biodegradación más lenta. Teniendo en cuenta que el tiempo medio de degradación de las membranas de colágeno reabsorbibles en estudios *in vivo* oscila entre 8 y 12 semanas (Bornert y cols., 2021; Rothamel y cols., 2012), nuestros resultados indicaron que incluso la membrana que más pérdida de peso (%) había tenido a los 21 días, la de EAT, su pérdida de peso era inferior al 15% de su peso inicial, por lo que podemos esperar que todas se mantendrían sin degradar totalmente, al menos hasta las 12 semanas. En relación a la baja ratio de degradación de las membranas de MAVU y PPE, autores como Camacho-Alonso y cols., en el año 2021 usaron la MAVU como andamiaje de mioblastos neonatales para reparar la pérdida muscular volumétrica en ratas Lewis hemiglosectomizadas, sus hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos mostraron la evidencia de restos de MAVU a los 42 días de realizar los tratamientos. Del mismo modo en relación a las membranas de colágeno de MAVU, Shi y cols., en 2023 (Shi y cols., 2023), observaron que el orden de menor a mayor ratio de degradación en saliva artificial a los 7, 14 y 21 días fue PPE, dermis bovina y BP. En este estudio observaron que no hubo diferencias significativas entre los tres tipos de membranas (PPE, BP y dermis bovina) el día 7. Además, la pérdida de peso por degradación aumentó gradualmente con el tiempo de tratamiento hasta el día 21. como hemos mencionado anteriormente, la membrana de dermis bovina sufrió la mayor pérdida de peso por degradación, seguida por la membrana BP y luego la membrana PPE.

Con respecto a la estabilidad térmica, las curvas TG de pérdida de peso (%) en función de la temperatura fueron muy similares en las siete membranas estudiadas, observándose tres picos de temperatura donde se producía un mayor porcentaje de pérdida de peso en todas las membranas a los 80° C, 300° C y 550° C. Al comparar la pérdida de peso (%) en estos tres picos de temperatura, fueron muy similares en todas las membranas, sin diferencias estadísticamente significativas. Estos tres picos de degradación del colágeno en función de la temperatura fueron descritos por Qi y cols., en el año 2018 (Qi y cols., 2018) y corresponden a la pérdida de agua fisosorbida, por debajo de los 100° C, la degradación del colágeno, centrada alrededor de 300° C aproximadamente, y la combustión del colágeno, alrededor de 550° C. Resultados similares fueron observados por Zhu y cols., en el año 2023 (Zhu y cols., 2023), al comparar las curvas TG de pérdida de peso (%) de membranas de colágeno de PPE y dermis bovina. Estos autores encontraron curvas TG muy similares en ambas membranas, con los mismos tres picos de temperatura donde se producía un mayor porcentaje de pérdida de peso.

Cuando analizamos la resistencia a la tracción (MPa) de las membranas de colágeno secas y humedecidas, lo primero que observamos es que la resistencia a la tracción era menor cuando las membranas se humedecieron en saliva artificial durante 2 minutos antes de la prueba. Este es un dato a tener en cuenta por los clínicos, que deben saber que además de que las membranas reabsorbibles de colágeno tienen menor resistencia a la tracción que las no reabsorbibles, cuando se humedecen con la saliva del paciente, reducen esta resistencia a la tracción (Raz y cols., 2019). Nuestros resultados indicaron que las membranas con mayor resistencia a la tracción en seco fueron las de EAT, y en húmedo las de BAT; la membrana con menor resistencia a la tracción en seco y húmedo fue la de PPE. Resultados similares fueron observados por Shi y cols. en 2023 (Shi y cols., 2023), donde las membranas de PPE tuvieron menor resistencia a la tracción que las de BP y dermis bovina. Del mismo modo, Zhu y cols., en el año 2023 (Zhu y cols. 2023), observaron que las de PPE tenían menos fuerza tensional que las de dermis bovina: Finalmente, Raz y cols., en el año 2019 (Raz y cols., 2019) también observaron menor resistencia a la tracción de las membranas de PPE al compararlas con otras dos membranas de colágeno porcino, RemaixTM (Matricel GmbH, Herzogenrath, Alemania) y Ossix Plus[®] (Datum Dental Biotech, Lod, Israel). Finalmente, la nueva membrana de colágeno de MAVU mostró una resistencia a la tracción en seco superior a 20 MPa siendo

superior a las membranas de EP, BP, PP, PPE. Resultados similares en resistencia a la tracción de la MAVU fueron observados por Garriboli y cols., en el año 2020 (Garriboli y cols., 2020), que estudiaron las propiedades mecánicas de la MAVU para su aplicación en reconstrucción de vejiga mediante ingeniería de tejidos. En el estudio de Shi y cols. en 2023 (Shi y cols., 2023), se compararon las propiedades mecánicas (resistencia a la tracción, elongación y módulo de Young) de los tres tipos de membranas de colágeno tanto en estado seco como húmedo (PPE, BP, y dermis bovina). Los resultados indicaron que la resistencia a la tracción y el módulo de Young de la membrana BP tanto en estado seco como húmedo fueron significativamente más altos que los de los otros grupos ($p < 0,0001$), aunque no se encontró ninguna diferencia significativa entre las membranas de dermis bovina y PPE ($p > 0,05$) excepto el módulo de Young en estado húmedo ($p = 0,034$). La membrana PPE, mostró los resultados más altos en cuanto a la elongación, independientemente del estado. Fue intermedia para la membrana de dermis bovina y más baja para la membrana BP. En el presente estudio, los resultados son similares en BP y PPE, donde BP, muestra mejores resultados, sin embargo sus resultados son limitados, pues la amplia variedad de membranas de colágeno disponibles en el mercado hace que sea muy complicado establecer unas bases para elección de cada una según el tratamiento a realizar. Vemos que por ejemplo, las membranas cuyo origen provienen del tendón de Aquiles muestran resultados más altos en la resistencia a la tracción en seco. Además, para todas las membranas de colágeno, la resistencia a la tracción y el módulo de Young fueron más bajos en el grupo húmedo que en el grupo seco, mientras que la elongación mostró la tendencia opuesta.

Sin embargo, dentro de las propiedades mecánicas estudiadas (tracción y elongación), debemos señalar que en las membranas de colágeno usadas para ROG es muy importante que tengan una elevada elongación, independientemente de su resistencia a la tracción, ya que los MPa a los que se someten las membranas en los ensayos *in vitro*, son tan elevados, que difícilmente se reproduzcan en una situación clínica real (Shi y cols., 2023). La elongación (%) es un índice vital para caracterizar la suavidad, plasticidad y elasticidad de las fibras de colágeno en las membranas. Esta propiedad física es la que va a permitir que las membranas tengan la elasticidad suficiente para poder cubrir diferentes tamaños y morfologías de los defectos óseos, y que puedan ser suturadas o fijadas con chinchetas, sin someterse a grandes tensiones o poder desgarrarse (Raz y cols., 2019). Hasta ahora, las membranas de pericardio se han postulado como las indicadas en

defectos grandes por su elevada elasticidad, seguramente debido a la alta concentración en elastina y distintas fibras de colágeno (I, V y VI), y sobre todo a su actividad inherente, como tejido cardíaco contractil. Por ello, la MAVU ha sido empleada en el presente estudio, junto con las otras membranas estudiadas, buscando la mayor variedad de localizaciones anatómicas y de especie posibles, para plantear una guía de uso para futuros ensayos clínicos. Nuestros resultados indicaron que, cuando las membranas de colágeno estaban hidratadas, independientemente de la fuente de colágeno de la que eran obtenidas (diferentes localizaciones anatómicas y origen animal), todas aumentaban su capacidad de elongación. Resultados similares fueron obtenidos por Shi y cols., en 2023 (Shi y cols., 2023) al hidratar las membranas de colágeno de PPE, dermis bovina y BP. Finalmente, la nueva membrana de colágeno de MAVU mostró que su elongación (%) pasaba de $19,86 \pm 16,32$ a $225,78 \pm 16,32$, siendo la que más elasticidad mostró de las siete membranas estudiadas. Esto es debido a su riqueza en elastina (Caves y cols., 2011), y también a que la matriz extracelular de la MAVU está compuesta por colágenos tipo I, III, IV y VI, y fibras elásticas (Garriboli y cols., 2022).

Respecto a las propiedades biológicas (viabilidad celular, cuantificación de colágeno tipo I, cuantificación de osteopontina, actividad ALP y depósito de calcio) después de sembrar osteoblastos humanos en las membranas, el orden de mejor a peor de las propiedades biológicas fue el mismo en las 5 variables estudiadas: MAVU > PPE > EP > PP > BP > BAT > EAT; lo que indicaba que las membranas de MAVU tenían una importante acción sobre la actividad osteoblástica y el potencial osteogénico. La MAVU es conocida como andamiaje en ingeniería tisular donde se han cultivado numerosas estirpes celulares debido a que, en ella existen diversas moléculas como proteínas de adhesión celular, factores de crecimiento y enzimas (Camacho-Alonso y cols., 2019). La MAVU es rica en factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-beta 1), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) (Pokrywczynska y cols., 2015). Estos factores bioactivos proporcionan un entorno excelente para el crecimiento, la proliferación y la migración de los osteoblastos (Pokrywczynska y cols., 2022). Además de estas características en su composición, que facilitaron que la nueva membrana de colágeno de MAVU fuera en la que más aumentaba

la proliferación celular de osteoblastos humanos a las 24, 48 y 72 horas de incubación; observamos que a los 3, 5 y 7 días de incubación, usando los puntos de tiempo propuestos por Marques y cols., en el 2023 (Marques y cols., 2023) para cuantificar los niveles de colágeno tipo I y osteopontina secretados por células recubiertas en las membranas, la mayor expresión de ambos se produjo en las nuevas membranas de MAVU. El colágeno tipo I es una proteína que necesita ser expresada por los osteoblastos durante la formación de la matriz ósea mineralizada, así como para la nucleación de cristales de HA. Además, es necesario que se sintetice y exprese el colágeno tipo I para que se expresen posteriormente de forma secuencial, la ALP, la osteocalcina y la sialoproteína ósea (Mizuno y cols., 2000). La osteopontina es una proteína no colagenosa también conocida como hueso/sialoproteína I (BSP-1 o BNSP), es una glicoproteína de 33 kDa que pertenece a la familia de las glicoproteínas ligadas a N del ligando de unión a integrinas pequeñas (SIBLING) y se reconoce como un marcador importante de diferenciación osteogénica, ya que modulan las funciones de los osteoblastos a través de la señalización de sus receptores y además juegan un papel importante en la mineralización de la matriz ósea ayudando a controlar la formación de cristales de hidroxiapatita (Larsson y cols., 2016). Finalmente, en relación a que la MAVU tuvo un importante potencial osteogénico sobre los osteoblastos, observamos que la actividad de ALP a los 7 días, usando el intervalo de tiempo propuesto por Felice y cols., en el 2023 (Felice y cols., 2023) y la precipitación de calcio a los 14 días, usando el intervalo de tiempo propuesto por Pierfelice y cols., en el 2022 (Pierfelice y cols., 2022), fueron los mayores al compararla con las otras seis membranas estudiadas.

Una de las principales limitaciones del estudio fue la imposibilidad de comparar los resultados con cualquier otra investigación publicada, ya que el presente trabajo constituye la primera investigación que estudia las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de la MAVU para su posible uso en ROG.

Otra limitación de este estudio fue que se trata simplemente de un estudio *in vitro* y es posible que no se pueda trasladar completamente a situaciones clínicas. En este sentido, se requieren estudios adicionales *in vivo* para comparar la efectividad de las membranas de colágeno de MAVU en ROG, con las de PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La nueva membrana de colágeno de MAVU mostró en ambas superficies (lisa y rugosa) haces de colágeno regulares y dispuestos estrechamente, al igual que las membranas de PP, EP, EAT y BAT.
2. El orden de mayor a menor capacidad hidrofílica (en ambas superficies) de las membranas de colágeno analizadas fue PPE>MAVU>EP>BP>BAT>PP>EAT. La nueva membrana de MAVU mostró ser más hidrofílica que PP, EP, BP, EAT y BAT, con diferencias estadísticamente significativas con PP, EAT y BAT.
3. Al analizar el ratio de degradación a los 7, 14 y 21 días observamos que el orden de menor a mayor degradación (en los 3 días) fue MAVU<PPE<EP<BP<BAT<PP<EAT, observando diferencias estadísticamente significativas entre MAVU y EAT a los 7 días y con PP, EAT y BAT a los 14 y 21 días.
4. La estabilidad térmica de las siete membranas de colágeno analizadas fue muy similar, mostrando todas ellas picos máximos de degradación a los 80°C, 300°C y 550°C.
5. Al estudiar la resistencia a la tracción de las membranas en ambiente seco, el orden de mayor a menor resistencia a la tracción fue EAT>BAT>MAVU>EP>BP>PP>PPE; mientras que en ambiente húmedo fue BAT>BP>EP>EAT>MAVU>PP>PPE.
6. Cuando analizamos la capacidad de elongación de las membranas de colágeno en ambiente seco, el orden de mayor a menor fue PPE>BP>EP>BAT>PP>EAT>MAVU; sin embargo, en ambiente húmedo el orden de mayor a menor capacidad de elongación fue MAVU>PPE>BP>EP>EAT>PP>BAT, observando diferencias estadísticamente significativas entre MAVU y las otras seis membranas.

7. La viabilidad celular de los osteoblastos a las 24, 48 y 72 horas de incubación fue mayor en las membranas de colágeno de MAVU. El orden de mayor a menor fue MAVU>PPE>EP>PP>BP>BAT>EAT, observando diferencias estadísticamente significativas entre MAVU y PP, EP, BP, EAT y BAT a las 24 horas, y a las 48 y 72 horas con PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.
8. La cuantificación de colágeno tipo I a los 3, 5 y 7 días de incubación fue mayor en las membranas de colágeno de MAVU. El orden de mayor a menor fue MAVU>PPE>EP>PP>BP>BAT>EAT, observando diferencias estadísticamente significativas entre MAVU y PP, EP, BP, EAT y BAT, y a los 5 y 7 días con PP, EP, BP, PPE, EAT y BAT.
9. La cuantificación de osteopontina a los 3, 5 y 7 días de incubación fue mayor en las membranas de colágeno de MAVU. El orden de mayor a menor fue MAVU>PPE>EP>PP>BP>BAT>EAT, observando diferencias estadísticamente significativas entre MAVU y BP, EAT y BAT a los 3 días, a los 5 días con BP, EAT y BAT, y a los 7 días con EAT y BAT.
10. Los niveles de ALP a los 7 días de incubación fueron mayores en las membranas de colágeno de MAVU. El orden de mayor a menor fue MAVU>PPE>EP>PP>BP>BAT>EAT, aunque fue muy similar en MAVU, PPE, EP, PP y BP, observando diferencias estadísticamente significativas de estas 5 membranas con las de BAT y EAT.
11. La formación de depósitos de Ca a los 14 días de incubación fue mayor en las membranas de colágeno de MAVU. El orden de mayor a menor fue MAVU>PPE>EP>PP>BP>BAT>EAT, aunque fue muy similar en MAVU, PPE, EP, PP y BP, observando diferencias estadísticamente significativas de estas 5 membranas con las de BAT y EAT.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abdelaziz D, Hefnawy A, Al-Wakeel E, El-Fallal A, El-Sherbiny IM. New biodegradable nanoparticles-in-nanofibers based membranes for guided periodontal tissue and bone regeneration with enhanced antibacterial activity. *J Adv Res* 2020;28:51-62.

Abe GL, Sasaki JI, Tsuboi R, Kohno T, Kitagawa H, Imazato S. Poly(lactic acid/caprolactone) bilayer membrane achieves bone regeneration through a prolonged barrier function. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2024;112:e35365.

Abtahi S, Chen X, Shahabi S, Nasiri N. Resorbable Membranes for Guided Bone Regeneration: Critical Features, Potentials, and Limitations. *ACS Mater* 2023;3:394-417.

Adamiak K, Sionkowska A. Current methods of collagen cross-linking: Review. *Int J Biol Macromol* 2020;161:550-60.

Alotaibi FF, Rocchietta I, Buti J, D'Aiuto F. Comparative evidence of different surgical techniques for the management of vertical alveolar ridge defects in terms of complications and efficacy: A systematic review and network meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2023;50:1487-519.

Alpar B, Leyhausen G, Günay H, Geurtsen W. Compatibility of resorbable and nonresorbable guided tissue regeneration membranes in cultures of primary human periodontal ligament fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig* 2000;4:219-25.

An YZ, Kim YK, Lim SM, Heo YK, Kwon MK, Cha JK, Lee JS, Jung UW, Choi SH. Physiochemical properties and resorption progress of porcine skin-derived collagen membranes: *In vitro* and *in vivo* analysis. *Dent Mater J* 2018;37:332-40.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Aprile P, Letourneur D, Simon-Yarza T. Membranes for Guided Bone Regeneration: A Road from Bench to Bedside. *Adv Healthc Mater* 2020;9:e2000707.

Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol* 2005;32:212-8.

Avila-Ortiz G, Elangovan S, Kramer KW, Blanchette D, Dawson DV. Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res* 2014 ;93:950-8.

Bai L, Ji P, Li X, Gao H, Li L, Wang C. Mechanical Characterization of 3D-Printed Individualized Ti-Mesh (Membrane) for Alveolar Bone Defects. *J Healthc Eng* 2019;2019:4231872.

Baipai D, Rajasekar A. Recent advances in GTR scaffolds. *Bioinformation* 2022; 18:1181-5.

Balalaie A, Rezvani MB, Mohammadi Basir M. Dual function of proanthocyanidins as both MMP inhibitor and crosslinker in dentin biomodification: A literature review. *Dent Mater J* 2018;37:173-82.

Barbeck M, Lorenz J, Kubesch A, Böhm N, Booms P, Choukroun J, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. Porcine Dermis-Derived Collagen Membranes Induce Implantation Bed Vascularization Via Multinucleated Giant Cells: A Physiological Reaction? *J Oral Implantol* 2015;41:e238-51.

Bax DV, Davidenko N, Gullberg D, Hamaia SW, Farndale RW, Best SM, Cameron RE. Fundamental insight into the effect of carbodiimide crosslinking on cellular recognition of collagen-based scaffolds. *Acta Biomater* 2017;49:218-34.

Becker W, Dahlin C, Becker BE, Lekholm U, van Steenberghe D, Higuchi K, Kultje C. The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: a prospective multicenter study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9:31-40.

Benic GI, Hämmerle CH. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration. *Periodontol 2000* 2014;66:13-40.

Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:251-62.

Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:81-96.

Black BS, Gher ME, Sandifer JB, Fucini SE, Richardson AC. Comparative study of collagen and expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of human class II furcation defects. *J Periodontol* 1994;65:598-604.

Blumenthal N, Steinberg J. The use of collagen membrane barriers in conjunction with combined demineralized bone-collagen gel implants in human infrabony defects. *J Periodontol* 1990;61:319-27.

Bornert F, Herber V, Sandgren R, Witek L, Coelho PG, Pippenger BE, et al. Comparative barrier membrane degradation over time: Pericardium versus dermal membranes. *Clin Exp Dent Res* 2021;7:711-8.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Bosshardt DD, Sculean A. Does periodontal tissue regeneration really work? *Periodontol* 2000 2009;51:208-19.

Bottino MC, Thomas V. Membranes for Periodontal Regeneration--A Materials Perspective. *Front Oral Biol* 2015;17:90-100.

Boyan LA, Bhargava G, Nishimura F, Orman R, Price R, Terranova VP. Mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to the different isoforms of platelet-derived growth factor. *J Dent Res* 1994;73:1593-600.

Brown AL, Ringuette MJ, Prestwich GD, Bagli DJ, Woodhouse KA. Effects of hyaluronan and SPARC on fibroproliferative events assessed in an *in vitro* bladder acellular matrix model. *Biomaterials* 2006;27:3825-35.

Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials* 2009;30:1482-91.

Bunte K, Hensel A, Beikler T. Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: A systematic review of *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* studies. *Fitoterapia* 2019;132:30-39.

Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol* 2001;72:215-29.

Buser D, Sennerby L, De Bruyn H. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. *Periodontol* 2000 2017;73:7-21.

Buser D, Urban I, Monje A, Kunrath MF, Dahlin C. Guided bone regeneration in implant dentistry: Basic principle, progress over 35 years, and recent research activities. *Periodontol 2000* 2023;93:9-25.

Buurman DJM, Speksnijder CM, de Groot RJ, Kessler P, Rieger JM. Mastication in maxillectomy patients: A comparison between reconstructed maxillae and implant supported obturators: A cross-sectional study. *J Oral Rehabil* 2020;47:1171-7.

Caballé-Serrano J, Sawada K, Miron RJ, Bosshardt DD, Buser D, Gruber R. Collagen barrier membranes adsorb growth factors liberated from autogenous bone chips. *Clin Oral Implants Res* 2017;28:236-41.

Cairo F, Landi L, Gatti C, Rasperini G, Aimetti M; SIdP, the Italian Society of Periodontology and Implantology. Tooth Loss and Dental Implant Outcomes-Where is dentistry going? A Survey by SIdP, the Italian Society of Periodontology and Implantology. *Oral Dis* 2018;24:1379-81.

Calciolari E, Ravanetti F, Strange A, Mardas N, Bozec L, Cacchioli A, et al. Degradation pattern of a porcine collagen membrane in an *in vivo* model of guided bone. *J Periodontol Res* 2018;53:430-9.

Camacho-Alonso F, García-Carrillo N, Buendía AJ, Navarro JA, Peñarrocha-Oltra D, Peñarrocha-Diogo M, Lacal-Luján J. Regeneration of lingual musculature in rats using myoblasts over porcine bladder acellular matrix. *Oral Dis* 2021;27:1580-9.

Camacho-Alonso F, Salinas J, Sánchez-Siles M, Pato-Mourelo J, Cotrina-Veizaga BD, Ortega N. Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and chitosan on the titanium-adherent biofilms of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*: An *in vitro* study. *J Periodontol* 2022;93:e104-e15.

Camacho-Alonso F, Torralba-Ruiz MR, García-Carrillo N, Lacal-Luján J, Martínez-Díaz F, Sánchez-Siles M. Effects of topical applications of porcine acellular urinary bladder matrix and Centella asiatica extract on oral wound healing in a rat model. Clin Oral Investig 2019; 23:2083-95.

Castro AGB, Diba M, Kersten M, Jansen JA, van den Beucken JJJP, Yang F. Development of a PCL-silica nanoparticles composite membrane for Guided Bone Regeneration. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2018;85:154-61.

Caves JM, Cui W, Wen J, Kumar VA, Haller CA, Chaikof EL. Elastin-like protein matrix reinforced with collagen microfibers for soft tissue repair. Biomaterials 2011;32:5731-9.

Cawood JI, Howell RA. A classification of the edentulous jaws. Int J Oral Maxillofac Surg 1988;17:232-6.

Chau DY, Collighan RJ, Verderio EA, Addy VL, Griffin M. The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. Biomaterials. 2005 Nov;26(33):6518-29.

Chen BS, Xie H, Zhang SL, Geng HQ, Zhou JM, Pan J. Tissue engineering of bladder using vascular endothelial growth factor gene-modified endothelial progenitor cells. Int J Artif Organs 2011; 34:1137-46.

Chen P, Wu Z, Leung A, Chen X, Landao-Bassonga E, Gao J, Chen L, Zheng M, Yao F, Yang H, Lidgren L, Allan B, Liu Y, Wang T, Zheng M. Fabrication of a silver nanoparticle-coated collagen membrane with anti-bacterial and anti-inflammatory activities for guided bone regeneration. Biomed Mater 2018;13:065014.

Chen X, Zhou L, Xu H, Yamamoto M, Shinoda M, Kishimoto M, Tanaka T, Yamane H. Effect of the Application of a Dehydrothermal Treatment on the Structure and the Mechanical Properties of Collagen Film. Materials (Basel) 2020;13:377.

colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Chen YT, Wang HL, Lopatin DE, O'Neal R, MacNeil RL. Bacterial adherence to guided tissue regeneration barrier membranes exposed to the oral environment. J Periodontol. 1997;68:172-9.

Chiapasco M, Zaniboni M. Clinical outcomes of GBR procedures to correct peri-implant dehiscences and fenestrations: a systematic review. Clin Oral Implants Res 2009;20 Suppl 4:113-23.

Chou J, Komuro M, Hao J, Kuroda S, Hattori Y, Ben-Nissan B, Milthorpe B, Otsuka M. Bioresorbable zinc hydroxyapatite guided bone regeneration membrane for bone regeneration. Clin Oral Implants Res 2016;27:354-60.

Chu C, Deng J, Sun X, Qu Y, Man Y. Collagen Membrane and Immune Response in Guided Bone Regeneration: Recent Progress and Perspectives. Tissue Eng Part B Rev. 2017;23:421-35.

Chu, C.; Wang, Y.; Wang, Y.; Yang, R.; Liu, L.; Rung, S.; Xiang, L.; Wu, Y.; Du, S.; Man, Y.; et al. Evaluation of Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Modified Collagen in Guided Bone Regeneration (GBR) Surgery and Modulation of Macrophage Phenotype. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2019;99:73-82.

Chun SY, Lim GJ, Kwon TG, Kwak EK, Kim BW, Atala A, et al. Identification and characterization of bioactive factor in bladder submucosa matrix. Biomaterials 2007; 28:425-6.

Chung KM, Salkin LM, Stein MD, Freedman AL. Clinical evaluation of a biodegradable collagen membrane in guided tissue regeneration. J Periodontol. 1990 Dec;61(12):732-6.

Ciardelli G, Gentile P, Chiono V, Mattioli-Belmonte M, Vozzi G, Barbani N, Giusti P. Enzymatically crosslinked porous composite matrices for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2010;92:137-51.

Couso-Queiruga E, Stuhr S, Tattan M, Chambrone L, Avila-Ortiz G. Post-extraction dimensional changes: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 2021;48:126-144.

Cucchi A, Ghensi P. Vertical Guided Bone Regeneration using Titanium-reinforced d-PTFE Membrane and Prehydrated Corticocancellous Bone Graft. *Open Dent J* 2014 14;8:194-200.

Cucchi A, Vignudelli E, Fiorino A, Pellegrino G, Corinaldesi G. Vertical ridge augmentation (VRA) with Ti-reinforced d-PTFE membranes or Ti meshes and collagen membranes: 1-year results of a randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2021;32:1-14.

Cucchi A, Vignudelli E, Franceschi D, Randellini E, Lizio G, Fiorino A, Corinaldesi G. Vertical and horizontal ridge augmentation using customized CAD/CAM titanium mesh with versus without resorbable membranes. A randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2021;32:1411-24.

Cucchi A, Vignudelli E, Napolitano A, Marchetti C, Corinaldesi G. Evaluation of complication rates and vertical bone gain after guided bone regeneration with non-resorbable membranes versus titanium meshes and resorbable membranes. A randomized clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res* 2017;19:821-32.

Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988; 81:672-6.

de Azambuja Carvalho PH, Dos Santos Trento G, Moura LB, cunha G, Cabrielli MAC, Pereira-Filho VA. Horizontal ridge augmentation using xenogenous bone graft-systematic review. *Oral Maxillofac Surg* 2019; 23:271-9.

De Santis R, Russo A, Gloria A, D'Amora U, Russo T, Panseri S, Sandri M, Tampieri A, Marcacci M, Dediu VA, Wilde CJ, Ambrosio L. Towards the Design of 3D Fiber-Deposited Poly(ϵ -caprolactone)/Iron-Doped Hydroxyapatite Nanocomposite Magnetic Scaffolds for Bone Regeneration. *J Biomed Nanotechnol*. 2015 Jul;11:1236-46.

Deas DE, Moritz AJ, Sagun RS Jr, Gruwell SF, Powell CA. Scaling and root planing vs. conservative surgery in the treatment of chronic periodontitis. *Periodontol* 2000 2016;71:128-39.

Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med* 2012;10:81.

Draenert FG, Huetzen D, Neff A, Mueller WE. Vertical bone augmentation procedures: basics and techniques in dental implantology. *J Biomed Mater Res A* 2014;102:1605-13.

Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci* 2017;125:315-37.

Elgali I, Turri A, Xia W, Norlindh B, Johansson A, Dahlin C, Thomsen P, Omar O. Guided bone regeneration using resorbable membrane and different bone substitutes: Early histological and molecular events. *Acta Biomater* 2016;29:409-23.

Elkhatat EI, Elkhatat AE, Azzeghaiby SN, Tarakji B, Beshr K, Mossa H. Clinical and radiographic evaluation of periodontal intrabony defects by open flap surgery alone or in combination with Biocollagen[®] membrane: A randomized clinical trial. *J Int Soc Prev Community Dent* 2015;5:190-8.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Farhat WA, Chen J, Haig J, Antoon R, Litman J, Sherman C, et al. Porcine bladder acellular matrix (ACM): protein expression, mechanical properties. Biomed Mater 2008;3:025015.

Farhat WA, Chen J, Sherman C, Cartwright L, Bahoric A, Yeger H. Impact of fibrin glue and urinary bladder cell spraying on the *in-vivo* acellular matrix cellularization: a porcine pilot study. Can J Urol 2006; 13:3000-8.

Felice P, D'Amico E, Pierfelice TV, Petrini M, Barausee C, Karaban M, et al. Osteoblasts and Fibroblasts Interaction with a Porcine Acellular Dermal Matrix Membrane. Int J Mol Sci 2023; 24:34649.

Fortunati D, Chau DY, Wang Z, Collighan RJ, Griffin M. Cross-linking of collagen I by tissue transglutaminase provides a promising biomaterial for promoting bone healing. Amino Acids 2014;46:1751-61.

Frisch, E., Wild, V., Ratka-Krüger, P., Vach, K., Sennhenn-Kirchner, S., 2020. Long-term results of implants and implant-supported prostheses under systemic supportive implant therapy: A retrospective 25-year study. Clin. Implant. Dent. Relat. Res 22, 689-96.

Fujioka-Kobayashi M, Marjanowski SD, Kono M, Hino S, Saulacic N, Schaller B. Osteoinductive potential of recombinant BMP-9 in bone defects of mice treated with antiresorptive agents. Int J Oral Maxillofac Surg 2022;51:566-75.

Galindo-Moreno P, Lopez-Chaichio L, Padial-Molina M, Avila-Ortiz G, O'Valle F, Ravida A, Catena A. The impact of tooth loss on cognitive function. Clin Oral Investig 2022;26:3493-500.

Gao Y, Wang S, Shi B, Wang Y, Chen Y, Wang X, Lee ES, Jiang HB. Advances in Modification Methods Based on Biodegradable Membranes in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers (Basel)* 2022;23;14:871.

Garcia J, Dodge A, Luepke P, Wang HL, Kapila Y, Lin GH. Effect of membrane exposure on guided bone regeneration: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res* 2018;29:328-38.

Garriboli M, Deguchi K, Totonelli G, Georgiades F, Urbani L, Ghionzoli M, et al. Development of a porcine acellular bladder matrix for tissue-engineered bladder reconstruction. *Pediatr Surg Int* 2022;38:665-77.

Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciardelli G. Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnol J* 2011;6:1187-97.

Ghanaati S, Schlee M, Webber MJ, Willershausen I, Barbeck M, Balic E, Görlach C, Stupp SI, Sader RA, Kirkpatrick CJ. Evaluation of the tissue reaction to a new bilayered collagen matrix *in vivo* and its translation to the clinic. *Biomed Mater* 2011;6:015010.

Ghensi P, Stablum W, Bettio E, Soldini MC, Tripi TR, Soldini C. Management of the exposure of a dense PTFE (d-PTFE) membrane in guided bone regeneration (GBR): a case report. *Oral Implantol (Rome)* 2017;10:335-42.

Ghodbane SA, Dunn MG. Physical and mechanical properties of cross-linked type I collagen scaffolds derived from bovine, porcine, and ovine tendons. *J Biomed Mater Res A* 2016;104:2685-92.

Glenske K, Donkiewicz P, Köwitsch A, Milosevic-Oljaca N, Rider P, Rofall S, Franke J, Jung O, Smeets R, Schnettler R, Wenisch S, Barbeck M. Applications of Metals for Bone Regeneration. *Int J Mol Sci* 2018;19:826.

colágeno de matriz acelar de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Gorham SD, Light ND, Diamond AM, Willins MJ, Bailey AJ, Wess TJ, Leslie NJ. Effect of chemical modifications on the susceptibility of collagen to proteolysis. II. Dehydrothermal crosslinking. *Int J Biol Macromol* 1992;14:129-38.

Gotfredsen K, Nimb L, Buser D, Hjørting-Hansen E. Evaluation of guided bone generation around implants placed into fresh extraction sockets: an experimental study in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993;51:879-84; discussion 885-6.

Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984; 11:494-503.

Gou M, Huang YZ, Hu JG, Jiang YL, Zhang XZ, Su NC, Lei Y, Zhang H, Wang H, Xie HQ. Epigallocatechin-3-gallate Cross-Linked Small Intestinal Submucosa for Guided Bone Regeneration. *ACS Biomater Sci Eng* 2019;5:5024-35.

Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol 2000* 2017;75:152-88.

Green B, Yao X, Ganguly A, Xu C, Dusevich V, Walker MP, Wang Y. Grape seed proanthocyanidins increase collagen biodegradation resistance in the dentin/adhesive interface when included in an adhesive. *J Dent* 2010;38:908-15.

Gu L, Shan T, Ma YX, Tay FR, Niu L. Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen. *Trends Biotechnol* 2019;37:464-91.

Gueldenpfennig T, Houshmand A, Najman S, Stojanovic S, Korzinskas T, Smeets R, Gosau M, Pissarek J, Emmert S, Jung O, Barbeck M. The Condensation of Collagen Leads to an Extended Standing Time and a Decreased Pro-inflammatory Tissue Response

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

to a Newly Developed Pericardium-based Barrier Membrane for Guided Bone Regeneration. *In Vivo* 2020;34:985-1000.

Guo Y, Su L, Chen C, Liu Y, Li J. Clinical Efficacy and Safety of Different Dental Prosthetic Membranes in Guided Bone Regeneration during Dental Implants: A Meta-Analysis. *Comput Intell Neurosci* 2022;2022:3245014.

Halder M, Singh A, Negi S, Singh Y. Investigating the Role of Amino Acids in Short Peptides for Hydroxyapatite Binding and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells to Aid Bone Regeneration. *Biomacromolecules* 2024;25:2286-301.

Hasegawa H, Kaneko T, Endo M, Kanno C, Yamazaki M, Yaginuma S, Igarashi H, Honma H, Masui S, Suto M, Sakisaka Y, Ishihata H. Comparing the Efficacy of a Microperforated Titanium Membrane for Guided Bone Regeneration with an Existing Mesh Retainer in Dog Mandibles. *Materials (Basel)* 2021;14:3358.

He Y, Tian Y, Zhang W, Wang X, Yang X, Li B, Ge L, Bai D, Li D. Fabrication of oxidized sodium alginate-collagen heterogeneous bilayer barrier membrane with osteogenesis-promoting ability. *Int J Biol Macromol* 2022;202:55-67. Erratum in: *Int J Biol Macromol*. 2023 Oct 14;:126676. Erratum in: *Int J Biol Macromol*. 2024;254:127359.

Herten M, Jung RE, Ferrari D, Rothamel D, Golubovic V, Molenberg A, Hämmerle CH, Becker J, Schwarz F. Biodegradation of different synthetic hydrogels made of polyethylene glycol hydrogel/RGD-peptide modifications: an immunohistochemical study in rats. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:116-25.

Hidalgo Pitaluga L, Trevelin Souza M, Dutra Zanotto E, Santocildes Romero ME, Hatton PV. Electrospun F18 Bioactive Glass/PCL-Poly (ϵ -caprolactone)-Membrane for Guided Tissue Regeneration. *Materials (Basel)* 2018;11:400.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Ho MH, Claudia JC, Tai WC, Huang KY, Lai CH, Chang CH, Chang YC, Wu YC, Kuo MY, Chang PC. The treatment response of barrier membrane with amoxicillin-loaded nanofibers in experimental periodontitis. *J Periodontol* 2021;92:886-95.

Homsí G, Karlsson A, Almotaíry N, Trulsson M, Kumar G, Griogoriadis A. Subjective and objective evaluation of masticatory function in patients with bimaxillary implant-supported prostheses. *J Oral Rehabil* 2023;50:140-9.

Hua N, Ti VL, Xu Y. Biodegradable effect of PLGA membrane in alveolar bone regeneration on beagle dog. *Cell Biochem Biophys* 2014;70:1051-5.

Huebsch N, Lippens E, Lee K, Metha M, Koshy ST, Darnell MC, et al. Matrix elasticity of void-forming hydrogels controls transplanted-stem-cell-mediated bone formation. *Nat Mater* 2015;14:1269-77.

Hugoson A, Ravald N, Fornell J, Johard G, Teiwik A, Gottlow J. Treatment of class II furcation involvements in humans with bioresorbable and nonresorbable guided tissue regeneration barriers. A randomized multi-center study. *J Periodontol* 1995;66:624-34.

Hürzeler MB, Kohal RJ, Naghshbandi J, Mota LF, Conradt J, Hutmacher D, Caffesse RG. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998;27:315-20.

Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;21:2529-43.

Iasella JM, Greenwell H, Miller RL, Hill M, Drisko C, Bohra AA, Scheetz JP. Ridge preservation with freeze-dried bone allograft and a collagen membrane compared to extraction alone for implant site development: a clinical and histologic study in humans. *J Periodontol* 2003;74:990-9.

Jenabian N, Haghanifar S, Maboudi A, Bijani A. Clinical and radiographic evaluation of Bio-Gen with biocollagen compared with Bio-Gen with connective tissue in the treatment of class II furcation defects: a randomized clinical trial. *J Appl Oral Sci* 2013;21:422-9.

Ji X, Chen D, Xu C, Harris SE, Mundy GR, Yoneda T. Patterns of gene expression associated with BMP-2-induced osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal progenitor cell 3T3-F442A. *J Bone Miner Metab* 2000;18:132-9.

Jiang, Y.-H.; Lou, Y.-Y.; Li, T.-H.; Liu, B.-Z.; Chen, K.; Zhang, D.; Li, T. Cross-Linking Methods of Type I Collagen-Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Am. J. Transl. Res* 2022;14:1146–59.

Joshi AA, Padhye AM, Gupta HS. Platelet derived growth factor-BB levels in gingival crevicular fluid of localized intrabony defect sites treated with platelet rich fibrin membrane or collagen membrane containing recombinant human platelet derived growth factor-BB: A randomized clinical and biochemical study. *J Periodontol* 2019;90:701-708.

Jung O, Hesse B, Stojanovic S, Seim C, Weitkamp T, Batinic M, Goerke O, Kačarević ŽP, Rider P, Najman S, Barbeck M. Biocompatibility Analyses of HF-Passivated Magnesium Screws for Guided Bone Regeneration (GBR). *Int J Mol Sci* 2021;22:12567.

Jung RE, Hälg GA, Thoma DS, Hämmerle CH. A randomized, controlled clinical trial to evaluate a new membrane for guided bone regeneration around dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:162-8.

Jung RE, Kokovic V, Jurisic M, Yaman D, Subramani K, Weber FE. Guided bone regeneration with a synthetic biodegradable membrane: a comparative study in dogs. Clin Oral Implants Res 2011;22:802-7.

Juodzbaly G, Wang HL. Soft and hard tissue assessment of immediate implant placement: a case series. Clin Oral Implants Res 2007;18:237-43.

Kao RT, Nares S, Reynolds MA. Periodontal regeneration - intrabony defects: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. J Periodontol 2015;86:77-104.

Kapogianni E, Alkildani S, Radenkovic M, Xiong X, Krastev R, Stöwe I, Bielenstein J, Jung O, Najman S, Barbeck M, Rothamel D. The Early Fragmentation of a Bovine Dermis-Derived Collagen Barrier Membrane Contributes to Transmembraneous Vascularization-A Possible Paradigm Shift for Guided Bone Regeneration. Membranes (Basel) 2021;11:185.

Karfeld-Sulzer LS, Ghayor C, Siegenthaler B, Gjoksi B, Pohjonen TH, Weber FE. Comparative study of NMP-preloaded and dip-loaded membranes for guided bone regeneration of rabbit cranial defects. J Tissue Eng Regen Med 2017;11:425-33.

Korzinskas T, Jung O, Smeets R, Stojanovic S, Najman S, Glenske K, Hahn M, Wenisch S, Schnettler R, Barbeck M. *In Vivo* Analysis of the Biocompatibility and Macrophage Response of a Non-Resorbable PTFE Membrane for Guided Bone Regeneration. Int J Mol Sci 2018;19:2952.

Krithikadatta J, Gopikrishna V, Datta M. CRIS Guidelines (Checklist for Reporting *In-vitro* Studies): A concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting *in-vitro* studies in experimental dental research. J Conserv Dent 2014;17:301-4.

Kudsi Z, Fenlon MR, Baysan A. Do Tooth Loss and Dentures Cause Body Image Disturbance? *Int J Prosthodont* 2022;35:609–615.

Larsson L, Decker AM, Nibali L, Pilipchuk SP, Berglundh T, Gioannobile WV. Regenerative Medicine for Periodontal and Peri-implant Diseases. *J Dent Res* 2016;95:255-66.

Lee DH, Kim KT, Park JI, Park KS, Cho DC, Sung JK. Repair of Inaccessible Ventral Dural Defect in Thoracic Spine: Double Layered Duraplasty. *Korean J Spine* 2016;13:87-90.

Lee DJ, Saponaro PC. Management of Edentulous Patients. *Dent Clin North Am* 2019;63:249-61.

Lee J, Byun H, Madhurakkat Perikamana SK, Lee S, Shin H. Current Advances in Immunomodulatory Biomaterials for Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater* 2019;8:e1801106.

Li F, Yu F, Xu X, Li C, Huang D, Zhou X, Ye L, Zheng L. Evaluation of Recombinant Human FGF-2 and PDGF-BB in Periodontal Regeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep* 2017;6;7:65.

Li S, Liu WC, Chang YH, Liu X, Chang CL, Lin C, Chung RJ. Preparation and *in vivo* investigation of oligomeric proanthocyanidins cross-linked collagen serving as synthesized tissue regeneration membrane. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019;101:640-9.

Li S, Zhao J, Xie Y, Tian T, Zhang T, Cai X. Hard tissue stability after guided bone regeneration: a comparison between digital titanium mesh and resorbable membrane. *Int J Oral Sci* 2021;13:37.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz celular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Li Z, Zhang Y, Ye Q, Wang L, Chen H, Xu C, et al. Endowing improved osteogenic activities with collagen membrane by incorporating biocompatible iron oxide nanoparticles. *Frng Bioeng Biotechnol* 2023;11:1259904.

Lian M, Han Y, Sun B, Xu L, Wang X, Ni B, et al. A multifunctional electrowritten bi-layered scaffold for guided bone regeneration. *Acta Biomater* 2020; 118:83-99.

Lindner C, Alkildani S, Stojanovic S, Najman S, Jung O, Barbeck M. *In Vivo* Biocompatibility Analysis of a Novel Barrier Membrane Based on Bovine Dermis-Derived Collagen for Guided Bone Regeneration (GBR). *Membranes (Basel)* 2022;12:378.

Liu W, Li J, Cheng M, Wang Q, Yeung KWK, Chu PK, Zhang X. Zinc-Modified Sulfonated Polyetheretherketone Surface with Immunomodulatory Function for Guiding Cell Fate and Bone Regeneration. *Adv Sci (Weinh)* 2018;5:1800749.

Liu Z, Wei P, Cui Q, Mu Y, Zhao Y, Deng J, Zhi M, Wu Y, Jing W, Liu X, Zhao J, Zhao B. Guided bone regeneration with extracellular matrix scaffold of small intestinal submucosa membrane. *J Biomater Appl* 2022;37:805-13.

Lundgren D, Sennerby L, Falk H, Friberg B, Nyman S. The use of a new bioresorbable barrier for guided bone regeneration in connection with implant installation. Case reports. *Clin Oral Implants Res* 1994;5:177-84.

Machingal MA, Corona BT, Walters TJ, Kesireddy V, Koval CN, Dannahower A, et al. A tissue-engineered muscle repair construct for functional restoration of an irrecoverable muscle. *Tissue Eng Part A* 2011;17:2291-303.

Machtei EE, Mayer Y, Horwitz J, Zigdon-Giladi H. Prospective randomized controlled clinical trial to compare hard tissue changes following socket preservation using alloplasts, xenografts vs no grafting: Clinical and histological findings. *Clin Implant Dent Relat Res* 2019;21:14-20.

Makvandi P, Gu JT, Zare EN, Ashtari B, Moeini A, Tay FR, et al. Polymeric and inorganic nanoscopic antimicrobial filters in dentistry. *Acta Biomater* 2020; 101:69-101.

Marques D, Teixeira LN, Elias CN, Lemos AB, Martínez EF. Surface topography of resorbable porcine collagen membranes, and their effect of early osteogenesis: An *in vitro* study. *J Stomatol Oral Maxillofac Sug* 2023; 124:101607.

Marr N, Hopkinson M, Hibbert AP, Pitsillides AA, Thorpe CT. Biomodal Whole-Mount Imaging of Tendon Using Confocal Microscopy and X-ray Micro-Computed Tomography. *Biol Proced Online* 2020;22:13. *Mater. Sci. Eng. C* 2019; 99:73–82.

Matinong AME, Chisti Y, Pickering KL, Haverkamp RG. Collagen Extraction from Animal Skin. *Biology (Basel)* 2022;11:905.

Mattson JS, Gallagher SJ, Jabro MH. The use of 2 bioabsorbable barrier membranes in the treatment of interproximal intrabony periodontal defects. *J Periodontol* 1999;70:510-7.

McAllister BS, Haghighat K. Bone augmentation techniques. *J Periodontol* 2007;78:377-96.

Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976; 256-70.

Meyer B, Schoenfeld L, Schwarz K, Meyer T. Erfolgreiche biokompatible Therapie von Zwerchfelldefekten im Rattenmodell [Successful Biocompatible Treatment of Diaphragmatic Hernia in a Rat Model]. Zentralbl Chir 2020;145:75-81.

Meyer M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. Biomed Eng Online. 2019;18:24.

Meyer T, Meyer B, Schwarz K, Höcht B. Immune response to xenogeneic matrix grafts used in pediatric surgery. Eur J Pediatr Surg 2007;17:420-5.

Mizraji G, Davidzohn A, Gursoy M, Gursoy U, Shapira L, Wilensky A. Membrane barriers for guided bone regeneration: An overview of available materials. Periodontol 2000 2023;93:56-76.

Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- $\alpha_2\beta_1$ integrin interaction. J Cell Physiol 2000;184:207-13.

Moon du G, Christ G, Stitzel JD, Alata A, Yoo JJ. Cyclic mechanical preconditioning improves engineered muscle contraction. Tissue Eng Part A 2008;14:473-82.

Moraschini V, Poubel LA, Ferreira VF, Barboza Edos S. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg 2015;44:377-88.

Münchow EA, Albuquerque MT, Zero B, Kamocki K, Piva E, Gregory RL, Bottino MC. Development and characterization of novel ZnO-loaded electrospun membranes for periodontal regeneration. Dent Mater 2015;31:1038-51.

Murphy KG, Gunsolley JC. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8:266-302.

Murphy KG. Postoperative healing complications associated with Gore-Tex Periodontal Material. Part I. Incidence and characterization. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1995;15:363-75.

Nair M, Johal RK, Hamaia SW, Best SM, Cameron RE. Tunable bioactivity and mechanics of collagen-based tissue engineering constructs: A comparison of EDC-NHS, genipin and TG2 crosslinkers. *Biomaterials*. 2020;254:120109.

Nakada A, Shigeno K, Sato T, Kobayashi T, Wakatsuki M, Uji M, Nakamura T. Manufacture of a weakly denatured collagen fiber scaffold with excellent biocompatibility and space maintenance ability. *Biomed Mater* 2013;8:045010.

Nakada, A.; Shigeno, K.; Sato, T.; Hatayama, T.; Wakatsuki, M.; Nakamura, T. Optimal Dehydrothermal Processing Conditions to Improve Biocompatibility and Durability of a Weakly Denatured Collagen Scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater* 2017; 105:2301–7.

Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol*. 2003;74:1282-92.

Novaes AB Jr, Gutierrez FG, Francischetto IF, Novaes AB. Bacterial colonization of the external and internal sulci and of cellulose membranes at time of retrieval. *J Periodontol* 1995; 86:4-9.

Novaes AB Jr, Novaes AB. Immediate implants placed into infected sites: a clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10:609-13.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J Clin Periodontol 1982; 290-6.

Oh TJ, Meraw SJ, Lee EJ, Giannobile WV, Wang HL. Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. Clin Oral Implants Res 2003;14:80-90.

Omar O, Elgali I, Dahlin C, Thomsen P. Barrier membranes: More than the barrier effect? J Clin Periodontol 2019;46:103-123.

Oryan A, Kamali A, Moshiri A, Baharvand H, Daemi H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. Int J Biol Macromol 2018;107:678-88.

Palkovics, D., Solyom, E., Somodi, K., Pinter, C., Windisch, P., Bartha, F., Molnar, B., 2023. Three-dimensional volumetric assessment of hard tissue alterations following horizontal guided bone regeneration using a split-thickness flat design: A case series. BMC. Oral. Health 23; 118.

Pandini FE, Kubo FMM, Plepis AMG, Martins VDCA, da Cunha MR, Silva VR, et al. *In Vivo* Study of Nasal Reconstruction with Collagen, Elastin and Chitosan Membranes in Abstainer and Alcoholic Rats. Polymers (Basel) 2022;14:188.

Parekh A, Mantle B, Banks J, Swarts JD, Badylak SF, Dohar JE, et al. Repair of the tympanic membrane with urinary bladder matrix. Laryngoscope 2009;119:1206-13.

Parodi R, Carusi G, Santarelli G, Nanni F. Implant placement in large edentulous ridges expanded by GBR using a bioresorbable collagen membrane. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18:266-75.

Parodi R, Santarelli G, Carusi G. Application of slow-resorbing collagen membrane to periodontal and peri-implant guided tissue regeneration. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1996;16:174-85.

Patino MG, Neiders MR, Andreana S, Noble B, Cohen RE. Collagen: an overview. *Implant Dent* 2002;11:280-5.

Paul BF, Mellonig JT, Towle HJ 3rd, Gray JL. Use of a collagen barrier to enhance healing in human periodontal furcation defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1992;12:123-31.

Peña A, Sánchez NS, Calahorra M. Effects of chitosan on *Candida albicans*: conditions for its antifungal activity. *Biomed Res Int* 2013;2013:527549.

Peter TG, Tadepalli A, Parthasarathy H, Ponnaiyan D, Ramachandran I, Cholan P. Comparison of the Clinical Efficacy of Bioresorbable Xenogenic Peritoneal Membrane vs Connective Tissue Graft in the Management of Gingival Recession Defects: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2023;24:244-54.

Pierfelice TV, D'Amico E, Lezzi G, Petrini M, Schiavone V, Santalucia M, et al. Effect of a 5-aminolevulinic acid gel and 660 nm red LED light on human oral osteoblasts: a preliminary *in vitro* study. *Lasers Med Sci* 2022; 37:3671-9.

Pokrywczynska M, Gubanska I, Drewa G, Drewa T. Application of bladder acellular matrix in urinary bladder regeneration: the state of the art and future directions. *Biomed Res Int* 2015;2015:613429.

Pokrywczynska M, Jundzill A, Toworkiewicz J, Buhl M, Balcerczyk D, Adamowicz J, et al. Urinary bladder augmentation with acellular biologic scaffold-A preclinical study in a large animal model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2022;110:438-49.

PRICHARD J. Regeneration of bone following periodontal therapy; report of cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1957 Mar;10(3):247-52.

Procacci P, Trevisiol L, Nocini PF, Favero V, D'Agostino A. Modified technique for endoscopic endonasal reduction of medial orbital wall fracture using an absorbable packing. *Oral Maxillofac Surg* 2017;21:91-8.

Qi Y, Ye Z, Fok A, Holmes BN, Español M, Ginebra MP, et al. Effects of Molecular Weight and Concentration of Poly(Acrylic Acid) on Biomimetic Mineralization of Collagen. *ACS Biomater Sci Eng* 2018;4:2758-66.

Querido W, Rossi AL, Farina M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. *Micron* 2016;80:122-34.

Radenković M, Alkildani S, Stoewe I, Bielenstein J, Sundag B, Bellmann O, Jung O, Najman S, Stojanović S, Barbeck M. Comparative *In Vivo* Analysis of the Integration Behavior and Immune Response of Collagen-Based Dental Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration (GBR). *Membranes (Basel)* 2021;11:712.

Ramos EU, Leandro MNC, Criaes JOC, Buitron MRO, Verástegui ES, Carbajal WM, Adrianzén RCS, Grijalva AEE, Baylon AAB, Bassi APF. Evaluation of Porcine Collagen Membranes Used with Guided Bone Regeneration for Critical Defects: A Histological, **Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino**

Histomorphometric, Immunohistochemical, and Inflammatory Profile Analysis. Eur J Dent 2024;18:898-906.

Rasia-dal Polo M, Poli PP, Rancitelli D, Beretta M, Maiorana C. Alveolar ridge reconstruction with titanium meshes: a systematic review of the literature. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2014;19:639-46.

Raz P, Brosh T, Ronen G, Tal H. Tensile Properties of Three Selected Collagen Membranes. Biomed Res Int 2019;2019:5163603.

Ren Y, Fan L, Alkildani S, Liu L, Emmert S, Najman S, Rimashevskiy D, Schnettler R, Jung O, Xiong X, Barbeck M. Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration (GBR): A Focus on Recent Advances in Collagen Membranes. Int J Mol Sci 2022;23:14987.

Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. Clin Oral Implants Res 2010;21:567-76.

Rezvanian M, Ahmad N, Mohd Amin MC, Ng SF. Optimization, characterization, and *in vitro* assessment of alginate-pectin ionic cross-linked hydrogel film for wound dressing applications. Int J Biol Macromol 2017; 97:131-40.

Ricard-Blum S. The collagen family. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;3:004978.

Rocuzzo A, Imber JC, Lempert J, Hosseini M, Jensen SS. Narrow diameter implants to replace congenital missing maxillary lateral incisors: A 1-year prospective, controlled, clinical study. Clin Oral Implants Res 2022;33:844-57.

Rodrigues ICP, Pereira KD, Woigt LF, Jardim AL, Luchessi AD, Loés ÉSN, et al. A novel technique to produce tubular scaffolds based on collagen and elastin. *Artif Organs* 2021;45:113-22.

Ronda M, Rebaudi A, Torelli L, Stacchi C. Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene membranes in vertical ridge augmentation around dental implants: a prospective randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2014;25:859-66.

Roohafza H, Afghari P, Keshteli AH, Vali A, Shirani M, Adibi P, Afshar H. The relationship between tooth loss and psychological factors. *Community Dent Health* 2015;32:16-9.

Rothamel D, Schwarz F, Fienitz T, Smeets R, Dreisidler T, Ritter L, et al. Biocompatibility and biodegradation of a native porcine pericardium membrane: results of *in vitro* and *in vivo* examinations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2012;27:146-54.

Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Hertel M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *J Clin Oral Implants Res* 2004;15:443-9.

Rung S, Zhao X, Chu C, Yang R, Qu Y, Man Y. Application of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Modified 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropylcarbodiimide hydrochloride/N-hydroxy-succinimide (EDC/NHS) Cross-Linked Collagen Membrane to Promote Macrophage Adhesion. *Materials (Basel)* 2021;14:4660.

Sagheb K, Schiegnitz E, Moergel M, Walter C, Al-Nawas B, Wagner W. Clinical outcome of alveolar ridge augmentation with individualized CAD-CAM-produced titanium mesh. *Int J Implant Dent* 2017;3:36.

Sam G, Pillai BR. Evolution of Barrier Membranes in Periodontal Regeneration-"Are the third Generation Membranes really here?". J Clin Diagn Res 2014;8:14-7.

Sanz M, Sahlin C, Apatzidou D, Artzin Z, Bozic D, Calciolari E, et al. Biomaterials and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region: Consensus report of group 2 of the 15th European Wokrshop on Periodontology on Bone Regeneration. J Clin Periodontol 2019; 46:82-91.

Sasaki JI, Abe GL, Li A, Thongthai P, Tsuboi R, Kohno T, Imazato S. Barrier membranes for tissue regeneration in dentistry. Biomater Investig Dent 2021;8:54-63.

Say S, Suzuki M, Hashimoto Y, Kimura T, Kishida A. Effect of multi arm-PEG-NHS (polyethylene glycol n-hydroxysuccimide) branching on cell adhesion to modified decellularized bovine and porcine pericardium. J Mater Chem B 2024;12:1244-56.

Sbricoli L, Guazzo R, Annunziata M, Gobbato L, Bressan E, Nastri L. Selection of Collagen Membranes for Bone Regeneration: A Literature Review. Materials (Basel) 2020;13:786.

Scantlebury T, Ambruster J. The development of guided regeneration: making the impossible possible and the unpredictable predictable. J Evid Based Dent Pract 2012;12:101-17.

Schieber R, Lasserre F, Hans M, Fernández-Yagüe M, Díaz-Ricart M, Escolar G, et al. Direct Laser Interference Patterning of CoCr Alloy Surfaces to Control Endothelial Cell and Platelet Response for Cardiovascular Applications. Adv Healthc Mater 2017;6.

Schröger SV, Blatt S, Sagheb K, Al-Nawas B, Kämmerer PW, Sagheb K. Platelet-rich fibrin for rehydration and pre-vascularization of an acellular, collagen membrane of porcine origin. Clin Oral Investig 2024;28:99.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Sevor JJ, Meffert R. Placement of implants into fresh extraction sites using a resorbable collagen membrane: case reports. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1992;4:35-41.

Shan Y, Chen G, Shi Q, Huang J, Mi Y, Zhang W, et al. Heparin/Collagen-REDV Modification of Expanded Polytetrafluorethylene Improves Regional Anti-thrombosis and Reduces Foreign Body Reactions in Local Tissues. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10:916931.

Shanaman RH. A retrospective study of 237 sites treated consecutively with guided tissue regeneration. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994;14:292-301.

Shanmugasundaram S, Logan-Mauney S, Burgos K, Nurminskaya M. Tissue transglutaminase regulates chondrogenesis in mesenchymal stem cells on collagen type XI matrices. *Amino Acids* 2012;42:1045-53.

Shavandi A, Bekhit AEA, Saeedi P, Izadifar Z, Bekhit AA, Khademhosseini A. Polyphenol uses in biomaterials engineering. *Biomaterials* 2018;167:91-106.

Sheikh Z, Qureshi J, Alshahrani AM, Nassar H, Ikeda Y, Glogauer M, Ganss B. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. *Odontology* 2017;105:1-12.

Sheikh Z, Sima C, Glogauer M. Bone replacement materials and techniques used for achieving vertical alveolar bone augmentation. *Materials* 2015;8:2953–93.

Shi R, Ye J, Li W, Zhang J, Li J, Wu C, Xue J, Zhang L. Infection-responsive electrospun nanofiber mat for antibacterial guided tissue regeneration membrane. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019;100:523-34.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Shi X, Li X, Tian Y, Qu X, Zhai S, Liu Y, et al. Physical, mechanical, and biological properties of collagen membranes for guided bone regeneration: a comparative *in vitro* study. BMC Oral Health 2023; 23:510.

Shin SY, Park HN, Kim KH, Lee MH, Choi YS, Park YJ, et al. Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration. J Periodontol 2005;76:1778-84.

Simion M, Scarano A, Gionso L, Piattelli A. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. Int J Oral Maxillofac Implants 1996;11:735-42.

Soldatos NK, Stylianou P, Koidou VP, Angelov N, Yukna R, Romanos GE. Limitations and options using resorbable versus nonresorbable membranes for successful guided bone regeneration. Quintessence Int 2017;48:131-147.

Soltani Dehnavi S, Mehdikhani M, Rafienia M, Bonakdar S. Preparation and *in vitro* evaluation of polycaprolactone/PEG/bioactive glass nanopowders nanocomposite membranes for GTR/GBR applications. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2018;90:236-47.

Song L, Murphy SV, Yang B, Xu Y, Zhang Y, Atala A, et al. Bladder acellular matrix and its application in bladder augmentation. Tissue Eng Part B Rev 2014;20:163-72.

Strong SE, Eaves JD. The Dynamics of Water in Porous Two-Dimensional Crystals. J Phys Chem B 2017;121:189-207.

Su H, Fujiwara T, Bumgardner JD. A Study of Combining Elastin in the Chitosan Electrospinning to Increase the Mechanical Strength and Bioactivity. Mar Drugs 2021;19:169.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Sun F, Chen J, Jin S, Wang J, Man Y, Li J, Zou Q, Li Y, Zuo Y. Development of biomimetic trilayer fibrous membranes for guided bone regeneration. *J Mater Chem B* 2019;7:665-75.

Sun YK, Cha JK, Thoma DS, Yoon SR, Lee JS, Choi SH, Jung UW. Bone Regeneration of Peri-Implant Defects Using a Collagen Membrane as a Carrier for Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *Biomed Res Int* 2018;2018:5437361.

Tamburaci S, Tihminlioglu F. Development of Si doped nano hydroxyapatite reinforced bilayer chitosan nanocomposite barrier membranes for guided bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;128:112298.

Tan X, Rodrigue D. A Review on Porous Polymeric Membrane Preparation. Part II: Production Techniques with Polyethylene, Polydimethylsiloxane, Polypropylene, Polyimide, and Polytetrafluoroethylene. *Polymers (Basel)* 2019;11:1310.

Tanaskovic N, Trajkovski B, Perić Kačarević Ž, Rider PM, Houshmand A, Xiong X, Jung O, Barbeck M. Periorbital Reconstruction by "Periorbital Patch" Technique Using a Pericardium-Based Collagen Membrane and Titanium Mesh. *Materials (Basel)* 2019;12:2343.

Tang, Y., Yu, H., Wang, J., Qiu, L. Implant Survival and Complication Prevalence in Complete-Arch Implant-Supported Fixed Dental Prostheses: A Retrospective Study with Mean Follow-up of 5 Years. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2023;38, 84-93.

Tatakis DN, Promsudthi A, Wikesjö UM. Devices for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000 1999;19:59-73.

Terzi A, Gallo N, Bettini S, Sibillano T, Altamura D, Madaghiele M, De Caro L, Valli L, Salvatore L, Sannino A, Giannini C. Sub- and Supramolecular X-Ray Characterization of Engineered Tissues from Equine Tendon, Bovine Dermis, and Fish Skin Type-I Collagen. *Macromol Biosci* 2020;20:e2000017.

Thoma DS, Halg GA, Dard MM, Seibl R, Hammerle CH, Jung RE. Evaluation of a new biodegradable membrane to prevent gingival ingrowth into mandibular bone defects in minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:7-16.

Tinti C, Parma-Benfenati S, Polizzi G. Vertical ridge augmentation: what is the limit? *Int J Periodontics Restorative Dent* 1996;16:220-9.

Toledano M, Asady S, Toledano-Osorio M, García-Godoy F, Serrera-Figallo MA, Benítez-García JA, Osorio R. Differential Biodegradation Kinetics of Collagen Membranes for Bone Regeneration. *Polymers (Basel)* 2020;12:1290.

Toledano-Osorio M, Manzano-Moreno FJ, Toledano M, Osorio R, Medina-Castillo AL, Costela-Ruiz VJ, et al. Doxycycline-doped membranes induced osteogenic gene expression on osteoblastic cells. *J Dent* 2021;109:103676.

Trobos M, Juhlin A, Shah FA, Hoffman M, Sahlin H, Dahlin C. *In vitro* evaluation of barrier function against oral bacteria of dense and expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes for guided bone regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res* 2018;20:738-48.

Turri A, Čirgić E, Shah FA, Hoffman M, Omar O, Dahlin C, Trobos M. Early plaque formation on PTFE membranes with expanded or dense surface structures applied in the oral cavity of human volunteers. *Clin Exp Dent Res* 2021;7:137-46.

Turri A, Elgali I, Vazirisani F, Johansson A, Emanuelsson L, Dahlin C, Thomsen P, Omar O. Guided bone regeneration is promoted by the molecular events in the membrane compartment. *Biomaterials* 2016;84:167-83.

Uehara S, Kurita H, Shimane T, Sakai H, Kamata T, Teramoto Y, Yamada S. Predictability of staged localized alveolar ridge augmentation using a micro titanium mesh. *Oral Maxillofac Surg* 2015;19:411-6.

Ulm C, Strbac GD, Stavropoulos A, Esfandeyari A, Dobsak T, Bertl K. Improved access to the bone marrow space by multiple perforations of the alveolar bundle bone after tooth extraction-A case report. *Clin Exp Dent Res* 2022;8:3-8.

Urban IA, Montero E, Amerio E, Palombo D, Monje A. Techniques on vertical ridge augmentation: Indications and effectiveness. *Periodontol 2000* 2023;93:153-82.

Vallecillo-Rivas M, Toledano-Osorio M, Vallecillo C, Toledano M, Osorio R. The Collagen Origin Influences the Degradation Kinetics of Guided Bone Regeneration Membranes. *Polymers (Basel)* 2021;13:3007.

Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol* 2008;79:1601-8.

van Leeuwen AC, Huddleston Slater JJ, Gielkens PF, de Jong JR, Grijpma DW, Bos RR. Guided bone regeneration in rat mandibular defects using resorbable poly(trimethylene carbonate) barrier membranes. *Acta Biomater* 2012;8:1422-9.

Van Swol RL, Ellinger R, Pfeifer J, Barton NE, Blumenthal N. Collagen membrane barrier therapy to guide regeneration in Class II furcations in humans. *J Periodontol* 1993;64:622-9.

Vijayanathan R, Anil Kumar S, Datana S, Kosala M. Immediate Non-functional Loading of Single Tooth Uniti™ Implants into Avulsed Tooth Sockets Following Ridge Augmentation in the Anterior Maxilla: A Case Series. J Maxillofac Oral Surg 2013;12:203-9.

von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. Clin Oral Implants Res 2006;17:359-66.

Vrankovic D, Mrcela T, Mursic B, Splavski B, Dmitrovic B, Mrcela M, Blagus G. Physical and histologic properties of substitutes used for the anterior fossa region dural repair. Skull Base Surg 1999;9:9-13

Vroom MG, Gründemann LJ, Gallo P. Clinical Classification of Healing Complications and Management in Guided Bone Regeneration Procedures with a Nonresorbable d-PTFE Membrane. Int J Periodontics Restorative Dent 2022;42:419-27.

Wadhawan A, Gowda TM, Mehta DS. Gore-tex® versus resolut adapt® GTR membranes with perioglas® in periodontal regeneration. Contemp Clin Dent 2012;3:406-11.

Wang HL, Carroll MJ. Guided bone regeneration using bone grafts and collagen membranes. Quintessence Int 2001;32:504-15.

Wang J, Wang L, Zhou Z, Lai H, Xu P, Liao L, Wei J. Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. Polymers (Basel) 2016;8:115.

Wang X, Ao J, Lu H, Zhao Q, Ma Y, Zhang J, Ren H, Zhang Y. Osteoimmune Modulation and Guided Osteogenesis Promoted by Barrier Membranes Incorporated with S-Nitrosoglutathione (GSNO) and Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. Int J Nanomedicine 2020;15:3483-96.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Wessing B, Lettner S, Zechner W. Guided Bone Regeneration with Collagen Membranes and Particulate Graft Materials: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2018;33:87–100.

Winde F, Backhaus K, Zeitler JA, Schlegel N, Meyer T. Bladder Augmentation Using Lyoplast®: First Experimental Results in Rats. *Tissue Eng Regen Med* 2019;16:645-52.

Wu L, Morrow BR, Jefferson MM, Li F, Hong L. Antibacterial Collagen Composite Membranes Containing Minocycline. *J Pharm Sci* 2021;110:2177-84.

Wu Y, Chen S, Luo P, Deng S, Shan Z, Fang J, Liu X, Xie J, Liu R, Wu S, Wu X, Chen Z, Yeung KWK, Liu Q, Chen Z. Optimizing the bio-degradability and biocompatibility of a biogenic collagen membrane through cross-linking and zinc-doped hydroxyapatite. *Acta Biomater* 2022;143:159-72.

Wu Z, Wu J, Peng T, Li Y, Lin D, Xing B, et al. Preparation and Application of Starch/Polyvinyl/Alcohol/Citric Acid Ternary Blend Antimicrobial Functional Food Packaging Films. *Polymers (Basel)* 2017; 9:102.

Xie J, Wang W, Fan X, Li H, Wang H, Liao R, Hu Y, Zeng M. Masquelet technique: Effects of vancomycin concentration on quality of the induced membrane. *Injury* 2022;53:868-77.

Xie Y, Li S, Zhang T, Wang C, Cai X. Titanium mesh for bone augmentation in oral implantology: current application and progress. *Int J Oral Sci* 2020;12:37.

Xu M, Wei X, Fang J, Xiao L. Combination of SDF-1 and bFGF promotes bone marrow stem cell-mediated periodontal ligament regeneration. *Biosci Rep* 2019;39:BSR20190785.

Xue Y, Zhu Z, Zhang X, Chen J, Yang X, Gao X, Zhang S, Luo F, Wang J, Zhao W, Huang C, Pei X, Wan Q. Accelerated Bone Regeneration by MOF Modified Multifunctional Membranes through Enhancement of Osteogenic and Angiogenic Performance. *Adv Healthc Mater* 2021;10:e2001369.

Yang F, Xu L, Guo G, Wang Y. Visible light-induced cross-linking of porcine pericardium for the improvement of endothelialization, anti-tearing, and anticalcification properties. *J Biomed Mater Res A* 2022;110:31-42.

Yang G, Xiao Z, Long H, Ma K, Zhang J, Ren X, Zhang J. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. *Sci Rep* 2018;8:1616.

Yang H, Liu WC, Liu X, Li Y, Lin C, Lin YM, Wang AN, Nguyen TT, Lin YC, Chung RJ. Study on proanthocyanidins crosslinked collagen membrane for guided bone tissue regeneration. *J Appl Biomater Funct Mater* 2021;19:22808000211005379.

Yang Z, Wu C, Shi H, Luo X, Sun H, Wang Q, et al. Advances in Barrier Membranes for Guided Bone Regeneration Techniques. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10:921576.

Youssif M, Shiina H, Urakami S, Gleason C, Nunes L, Igawa M, et al. Effect of vascular endothelial growth factor on regeneration of bladder acellular matrix graft: histologic and functional evaluation. *Urology* 66:201-7.

Yukna CN, Yukna RA. Multi-center evaluation of bioabsorbable collagen membrane for guided tissue regeneration in human Class II furcations. J Periodontol 1996;67:650-7.

Zhang C, Du T, Mu G, Wang J, Gao X, Long F, Wang Q. Evaluation and ultrastructural changes of amniotic membrane fragility after UVA/riboflavin cross-linking and its effects on biodegradation. Medicine (Baltimore) 2020;99:e20091.

Zhang M, Zhou Z, Yun J, Liu R, Li J, Chen Y, Cai H, Jiang HB, Lee ES, Han J, Sun Y. Effect of Different Membranes on Vertical Bone Regeneration: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. Biomed Res Int 2022;2022:7742687

Zhao R, Xu Z, Li B, Chen T, Mei N, Wang C, et al. A comparative study on agarose acetate and PDLA scaffold for rabbit femur defect regeneration. Biomed Mater 2019;14:065007.

Zhou W, Bai T, Wang L, Cheng Y, Xia D, Yu S, Zheng Y. Biomimetic AgNPs@antimicrobial peptide/silk fibroin coating for infection-trigger antibacterial capability and enhanced osseointegration. Bioact Mater 2022;20:64-80.

Zhou Z, Yun J, Li J, Chen Y, Duan T, Wang L, Han J, Jiang HB, Niu G. Comparison of the efficacy of different biodegradable membranes in guided bone/tissue regeneration: a systematic review and network meta-analysis. Biomed Mater 2023;18.

Zhu M, Duan B, Hou K, Mao L, Wang X. A comparative *in vitro* and *in vivo* study of porcine- and bovine-derived non-cross-linked collagen. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2023;111:568-78.

Zhu WD, Xu YM, Feng C, Fu Q, Song LJ. Different bladder defects reconstructed with bladder acellular matrix grafts in a rabbit model. Urologie A 2011;50:1420-5.

Comparación de las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de una nueva membrana de colágeno de matriz acelular de vejiga urinaria de cerdo con otras seis membranas de colágeno de origen porcino, equino y bovino

Zitzmann NU, Naef R, Schärer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12:844-52.

Zitzmann NU, Schärer P, Marinello CP. Factors influencing the success of GBR. Smoking, timing of implant placement, implant location, bone quality and provisional restoration. *J Clin Periodontol* 1999;26:673-82.

ANEXOS

ANEXOS

UNIVERSIDAD
DE MURCIA

VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

INFORME DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Lucía Periago García, Jefa de Sección de Recursos Humanos de Investigación y del Plan Propio y Secretaria del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia.

CERTIFICA:

Que D. Fabio Camacho Alonso presentó la memoria de trabajo el Proyecto de Investigación titulado *"Uso de la matriz acelar de vejiga urinaria de cerdo como membrana de colágeno reabsorbible para regeneración ósea guiada"*, al Comité de Bioseguridad en Experimentación.

Que dicho Comité analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día siete de febrero de dos mil veinticuatro, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de la bioseguridad en la investigación.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno de la Presidente de la Comisión.

Vº Bº
LA PRESIDENTA DEL COMITÉ
DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN
DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: María Senena Corbalán García

ID: 594/2023

Comisión de Ética de Investigación
Vicerrectorado de Investigación
Edificio ESUM, 3ª planta
Campus de Espinardo
30071 — Murcia
ESPAÑA

comision.etica.investigacion@um.es
Tlf: 868 88 3614/9898/9899
www.um.es/web/vic-investigacion/



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Código seguro de verificación: RUXFMm0z-yhRWMdaK-XTXCVe29-iF+hUNP9

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>