



**Caracterización y potencial de viabilidad celular de la membrana de huevo  
estudio *in vitro*.**

**Norvy Johanna Bonilla Torres 13272129121**

**Jessica Alexandra Leguizamon Zarate 13272125912**

**John Steban Polindara Idrobo 13272126236**

**John Jaiber Sánchez Triana 13272127454**

**Universidad Antonio Nariño**

Programa Posgrado de Periodoncia

Facultad de Odontología

Bogotá, Colombia

2023



**Caracterización y potencial de viabilidad celular de la membrana de huevo**  
*estudio in vitro.*

**Norvy Johanna Bonilla Torres, Jessica Alexandra Leguizamon Zarate, John Steban  
Polindara Idrobo, John Jaiber Sánchez Triana**

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Especialista en Periodoncia**

Director (a):

Magister en odontología, Especialista en Periodoncia Asterlis Buitrago Osuna

Codirector (a):

Ph.D., Biomedicina con profundización en ingeniería tisular, Master en biomedicina  
regenerativa y Especialista en Endodoncia Camilo Alfonso Rodríguez

Línea de Investigación:

Ingeniería Tisular y medicina regenerativa.

Grupo de Investigación:

Membrana de Cáscara de Huevo Cara Interna

**Universidad Antonio Nariño**

Programa Posgrado de Periodoncia

Facultad de Odontología

Bogotá, Colombia

2023



## NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado  
Caracterización y potencial de viabilidad celular de la  
membrana de huevo *estudio in vitro.*,  
Cumple con los requisitos para optar  
Al título de Especialista en Periodoncia.

---

Firma del Tutor

---

Firma Jurado

---

Firma Jurado

## Contenido

	Pág.
Preliminares .....	XVI
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción .....	3
1. Planteamiento del problema .....	5
1.1 Pregunta de investigación.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2. Objetivos.....	9
3 Justificación.....	10
4. Marco Teórico.....	12
4.1 Ingeniería Tisular.....	12
4.2 Tratamiento Periodontal Regenerativo.....	15
4.2.1 <i>Materiales utilizados en Ingeniería Tisular</i> .....	16
4.3 Membrana de Cáscara de Huevo.....	17
4.3.1. <i>Estructura de la membrana de cáscara de huevo</i> .....	17
4.3.2. <i>Propiedades Físicas/Mecánicas de la MCH</i> .....	22
4.3.3 <i>Propiedades químicas de la MCH</i> .....	24
4.3.4. <i>Propiedades Biológicas de la MCH</i> .....	26
4.3.5 <i>Propiedades Antibacteriana de la MCH</i> .....	26

4.3.6. Propiedad de cicatrizacion de lesiones y uso Antinflamatorio de la MCH....	27
4.3.7. Propiedades Antioxidantes de la MCH.....	27
4.3.8. Propiedades de Biocompatibilidad.....	28
4.4 Técnicas de obtención de la membrana de cáscara de huevo.....	30
4.4.1. Separación Química por Disolución de la membrana de Cascara de huevo...30	
4.4.2. Separación por Tratamiento de Microondas de la MCH.....	31
4.4.3. Separación por hidrólisis alcalina de la MCH .....	31
4.5 Aplicación de la membrana de cáscara de huevo como material biológico.....	32
4.5.1. Uso de la Cáscara sin membrana.....	32
4.5.2. Aplicación de la MCH en el área de la nutrición.....	32
4.5.3. Aplicación de la MCH en la industria.....	33
4.5.4. Aplicación de la MCH en la medicina.....	34
4.5.5. Otros reportes del uso de la MCH.....	34
4.6 Fibroblastos.....	35
4.6.1. Función de los fibroblastos.....	36
4.6.1.1. Función de fobroblastos de ligamento periodontal.....	38
4.6.1.2 Función de fibroblastos gingivales.....	38
4.6.2. Medio de cultivo de fibroblastos gingivales.....	39
4.7 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	40
4.9 Prueba de viabilidad celular WST-1 .....	41
5 Diseño metodológico.....	43
6 Resultados.....	51
Discusión.....	55

Conclusiones .....	60
Anexos .....	61
Referencias Bibliográficas .....	63

## Lista de Figuras

	Pág.
<b>Figura 1:</b> Estructura externa e interna de un huevo [4.3.1].....;Error! Marcador no definido.	
<b>Figura 2:</b> Estructura del Fibroblasto [4.6].....;Error! Marcador no definido.	
<b>Figura 3:</b> Proceso de cicatrización de la herida [4.6.1].....;Error! Marcador no definido.	
<b>Figura 4:</b> Formación de la imagen por medio de SEM [4.7].....41;Error! Marcador no definido.	
<b>Figura 5:</b> Separación de la membrana de cascara de huevo y microscopio de Cryo SEM JEOL [5].. .....;Error! Marcador no definido.	
<b>Figura 6:</b> Toma de tejido gingival para cultivo de fibroblastos [5]. .....;Error! Marcador no definido.	
<b>Figura 7:</b> Toma de MCH para el cultivo de fibroblastos [5]. ...;Error! Marcador no definido.	
<b>Figura 8:</b> Topografía de la MCH a 500x y 3000x [6]. .....;Error! Marcador no definido.	
<b>Figura 9:</b> Topografía de la membrana colágena Men-Lock a 500x y 3000x [6]. ;Error! Marcador no definido.	
<b>Figura 10:</b> Resultados de la Sonda microscopio SEM de la MCH cara limitante. [6]. .. .....;Er ror! Marcador no definido.	

## Lista de tablas

**Pág.**

**Tabla 1:** Tabla de variables [5]..... **¡Error! Marcador no definido.**

## Lista de Símbolos y Abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
°C	Grados celsius	k	K -273.15 = °C
<i>h</i>	horas	s	3600s = 1h

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$\mu\text{m}$	Micra	$10^{-6}$	(0,000001m)

### Abreviaturas

#### Abreviatura Término

MCH	Membrana de cascara de huevo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
HCL	Ácido clorhídrico
N	Nitrógeno
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Fe	Hierro
Cr	Cromo
Cd	Cadmio
Cu	Cobre
C	Carbono
O	Oxigeno

**Abreviatura Término**

---

S	Azufre
SEM	Microscopia electrónica de barrido
UAN	Universidad Antonio Nariño
PBS	Buffer fosfato salino
H2O2	Peróxido de hidrogeno

**Preliminares**

*(Dedicatoria)*

*Dedicamos este logro profesional, a Dios padre, por habernos brindado la oportunidad de la vida y las fuerzas necesarias para culminar exitosamente un capítulo más de nuestra trayectoria académica.*

*A nuestros padres, quienes, con su apoyo, colaboración y esperanza puesta en nosotros, fue de gran motivación para alcanzar un peldaño más en nuestra carrera profesional.*

*A nuestros tutores y maestros, por su valiosa  
disposición, esmero y conocimiento  
compartido en pro del beneficio de nuestro  
desarrollo integral.*

## **Agradecimientos**

Los autores agradecen a los familiares, compañeros, profesores y tutores de la Universidad Antonio Nariño sede – Bogotá, por la oportuna colaboración en los resultados del presente estudio.



## Resumen

La membrana de cáscara de huevo por sus características morfológicas y químicas es actualmente un material biológico de gran interés para la comunidad científica.

**Objetivo:** Evaluar las características morfológicas, químicas y biológicas de la membrana de cáscara de huevo por su parte interna.

**Método:** Se evaluó la estructura tridimensional de la cara limitante mediante Microscopia de Cryo SEM, se evaluó la composición elemental y se evaluó la viabilidad de los fibroblastos gingivales por medio de la prueba WST-1, durante 1, 3, 5 y 7 días.

**Resultados:** la MCH presenta una red de fibras colágenas entrecruzadas con alta porosidad, por su parte la membrana Mem-Lock presentó una red irregular amorfa de colágeno. La composición elemental se basa en Carbono, Nitrógeno, Oxígeno y Azufre. Y el crecimiento de los fibroblastos gingivales mostró un crecimiento incremental el día 1 del 62.02% y en el día 7 se presentó un crecimiento de 87.2%.

**Conclusiones:** La MCH demuestra una propiedad característica de los materiales biológicos altamente organizados, siendo este adecuado para el crecimiento celular de fibroblastos gingivales, entre los principales componentes de la MCH cara interna se identificó C, N O y S.

**Palabras claves:** Membrana de cascara de huevo, ingeniería tisular, proliferación, viabilidad celular, fibroblastos periodontales.

## Abstract

The eggshell membrane due to its morphological and chemical characteristics  
It is currently a biological material of great interest to the scientific community.

**Objective:** To evaluate the morphological, chemical and biological characteristics  
of the eggshell membrane from its internal part.

**Method:** The three-dimensional structure of the limiting face was evaluated by  
Cryo SEM Microscopy, the elemental composition was evaluated and the viability of  
gingival fibroblasts was evaluated by means of the WST-1 test, for 1, 3, 5 and 7 days.

**Results:** the MCH presents a network of cross-linked collagen fibers with high  
porosity, while the Mem-Lock membrane presented an irregular amorphous collagen  
network. The elemental composition is based on Carbon, Nitrogen, Oxygen and Sulfur.  
And the growth of gingival fibroblasts showed an incremental growth on day 1 of 62.02%  
and on day 7 there was a growth of 87.2%.

**Conclusions:** The MCH demonstrates a characteristic property of highly organized  
biological materials, being suitable for the cell growth of gingival fibroblasts, among the  
main components of the MCH internal face, C, N O and S were identified.

**Keywords:** Eggshell membrane, tissue engineering, proliferation, cell viability,  
periodontal fibroblasts.

## Introducción

La regeneración hace referencia a la capacidad que tienen ciertos tejidos humanos para tratarse y curarse a sí mismos. Los tres grandes componentes de la medicina regenerativa son las células madre, los factores de crecimiento y la matriz extra celular. (regeneración). Debido a procesos patológicos, quirúrgicos y/o traumáticos, puede generarse la pérdida irreversible de tejidos a nivel general o en la cavidad oral, es allí donde la ciencia de los materiales y la medicina regenerativa interviene para generar alternativas para contribuir en el proceso de regeneración de tejidos desde el uso de materiales biológicos, el uso de biomateriales y el desarrollo de biomiméticos (Meyers Marc). Los materiales biológicos provienen de un origen natural y tienen características únicas que los diferencian de su contraparte, los materiales sintéticos. Presentan una composición y organización que dependiendo del material puede ser muy atractiva para su uso como andamio para el crecimiento celular. La membrana de la cáscara de huevo (MCH) es uno de estos materiales biológicos, se ha utilizado en diferentes campos de la medicina por su composición, estructura y alta disponibilidad.

Teniendo en mente la utilidad de este tipo de membrana, se ha propuesto realizar un estudio exploratorio in vitro para evaluarla de forma escalonada, iniciando con las características morfológicas y elementales y posteriormente la capacidad biológica en términos de viabilidad celular de la cara limitante de la misma, mediante el cultivo de fibroblastos gingivales. Este tipo de estudios permite conocer las propiedades de los materiales y de esta forma determinar el potencial real de ser utilizado en diversas

aplicaciones médicas. De manera que este trabajo es el primer paso para conocer objetivamente la membrana de la cáscara de huevo y eventualmente proponer una aplicación en odontología y especialmente en el área de la periodoncia.

Al ser este un material de fácil acceso y con propiedades funcionales similares a la matriz extra-celular, se considera como una estructura con gran potencial para la regeneración tisular. La principal propiedad es su composición orgánica que consta de colágeno, polipéptidos y aminoácidos que permite el soporte adecuado para la formación del óvulo contenido en la clara del huevo.

En el campo de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa, es de gran interés el trabajar sobre biomateriales y materiales biológicos que permitan ser usados como andamios para las células y de esta forma conseguir la regeneración genuina de los tejidos. Si bien, como se ha expresado anteriormente la MCH promete ser un material biológico apto para restablecer tejidos orales tanto duros como blandos. Por consiguiente, surge un interés académico en establecer una secuencia de estudios que permitan alcanzar respuestas tangibles sobre la MCH y sus posibles usos en la odontología regenerativa.

## 1. Planteamiento del problema

La membrana de cáscara de huevo (MCH) es un tejido fibroso de un grosor aproximado de 50-70 $\mu$ m, que separa el albumen del cascarón (Hincke et al., 2012). Se conforma por dos cubiertas una interna y una externa, ambas de componente orgánico. Se caracteriza por ser una barrera contra bacterias invasoras y servir como andamio para la calcificación del huevo. Su biología en la actualidad atrae la atención de la comunidad científica, al tener un comportamiento similar al de la matriz extracelular (Sah & Pramanik., 2014).

Se compone de tres capas, externa en contacto con la cáscara, interna y limitante en contacto con la clara. La capa externa es una plantilla para la mineralización de la cáscara. Es un material biológico que se ha utilizado en diferentes disciplinas como la medicina, la industria, la bioingeniería, entre otros. Debido a sus características, a su fácil obtención y disponibilidad (Jia et al., 2011). Su estructura tridimensional compuesta de colágeno y otras proteínas le permiten tener la capacidad de absorber iones de diversos tipos y mejorar la condición de los cartílagos (Wang et al., 2014).

Reportes de estudios actuales han demostrado la biocompatibilidad de esta estructura con el tejido humano pasando por investigaciones a nivel in vitro, pruebas en animales y finalmente en seres humanos (Sah & Pramanik., 2014). Desde el punto de vista de la medicina regenerativa, esta membrana se presenta como un material de alta disponibilidad, que ha sido descartado de manera masiva a nivel industrial y que por su composición tiene un alto potencial para ser utilizado en el área de la Odontología. A la fecha, se cuenta con diversos materiales que favorecen la

regeneración tisular como las membranas colágenas xenogénicas, diversos injertos óseos alogénicos y xenogénicos, que tienen un funcionamiento como andamio muy apropiado (Chen et al., 2010) pero que tienen como desventaja el alto costo para el paciente, así como una carencia en la capacidad de inducir regeneración, su capacidad se ha visto limitada a su función como andamio.

Aún no se ha esclarecido de manera definitiva el uso que se puede dar a la membrana, pero se piensa que puede ser usada en diversas aplicaciones tanto en la regeneración de tejido blando como duro. Para proponer un uso plausible es importante conocer su estructura, composición y el potencial para permitir el crecimiento de células y comportarse como un andamio, de manera que, es el objetivo de este trabajo realizar una caracterización escalonada de las propiedades estructurales, químicas y biológicas, con el fin de conocer su potencial real y de manera eventual proponer una aplicación en regeneración de tejidos orales.

Por tanto, el grupo de investigación determina la siguiente pregunta:

## **1.1 Pregunta de investigación**

¿Cuál es la morfología de superficie y composición elemental de la membrana de cáscara de huevo (MCH) y viabilidad de fibroblastos gingivales cultivados sobre la cara limitante de dicha membrana?

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Evaluar las características morfológicas, químicas y biológicas de la membrana de cáscara de huevo por su cara limitante.

### 2.2 Objetivos específicos.

Evaluar la morfología de superficie de la cara limitante de la membrana de cáscara de huevo.

Mencionar la composición elemental como característica química de la cara limitante de la membrana de cáscara de huevo.

Evaluar la viabilidad de los fibroblastos gingivales cultivados de manera in vitro sobre la cara limitante de la membrana de cáscara de huevo MHC, en intervalos de tiempos de 1 día, 3 días, 5 días y 7.

### 3. Justificación

Este proyecto se enmarca dentro de la línea investigación de ingeniería tisular y medicina regenerativa, del grupo de investigación en salud oral, que busca lograr el desarrollo de biomateriales y materiales biológicos para ser utilizados en regeneración de tejidos.

La MCH es considerada como un material biológico de uso multidisciplinario, que aporta en áreas del conocimiento como Medicina, la Industria Agropecuaria, eléctrica y con menos frecuencia en odontología (Wu et al., 1995). El interés en este material radica en sus propiedades físicas, función estructural y sus componentes orgánicos ricos en proteínas colágenas y no colágenas y su componente inorgánico como base para la biomineralización del cascarón del huevo, lo que permite en la actualidad ser considerada como un biomaterial único (Wang et al., 2014).

Entre los usos dados a la MCH se encuentra el cuidado de heridas, incorporación en los suplementos dietarios para el fortalecer las articulaciones y regular el tejido conectivo, en el tratamiento de la osteoartritis y en la odontología como matriz para la regeneración de cristales de sales de calcio o hidroxiapatita (Zadik 2007). El uso de la MCH en regeneración tisular guiada o regeneración ósea guiada en periodoncia ha sido poco explorado. A la fecha, las membranas colágenas xenogénicas se utilizan como Gold estándar en los ya mencionados procedimientos. Sin embargo, se contemplan aún limitaciones que se relacionan desde el costo, como también propiedades biomecánicas y de degradación.

La MCH se desecha diariamente en la industria alimentaria, de manera que es un material ampliamente disponible y de bajo costo, que podría convertirse en un material biológico de alta calidad para los pacientes de todos los estratos socioeconómicos. Es por esto, que el grupo de ingeniería tisular, se ha interesado en conocer la membrana y caracterizarla. Dentro de este proceso, es necesario conocer el comportamiento de células como fibroblastos gingivales en presencia de este biomaterial, dada la importancia de la biocompatibilidad para poder ser aplicado posteriormente en estudios in vivo, para evaluar si existen efectos adversos sobre las células o si por el contrario favorece su crecimiento y proliferación.

Es por este motivo, que se ha planteado realizar este trabajo como parte de la serie de estudios encaminados a la caracterización de este material biológico, de esta manera la finalidad del presente proyecto es evaluar la topografía su composición elemental y la viabilidad de fibroblastos gingivales al ser cultivados sobre la cara interna de la membrana de la cáscara de huevo.

## 4. Marco Teórico

### 4.1 Ingeniería Tisular

La Ingeniería tisular está basada en una serie de técnicas que se apoyan en el uso de elementos biológicos como sustitutos para la restauración, el mantenimiento o la mejora de la funcionalidad de un tejido (Langer & Vacanti 1993), sus principios se basan en la regulación molecular, la matriz extracelular y el andamiaje celular mediante el uso de células madre, en odontología, tejido gingival humano, lo cual ha hecho de esto una opción terapéutica muy interesante para llevar a cabo la regeneración periodontal, esta terapéutica requiere de un proceso que implica la regeneración de las fibras del ligamento periodontal y la inserción de estas fibras en el cemento recién formado de la superficie radicular que ha estado expuesta previamente a patógenos periodontales basándose en el principio de que las células sanas restantes y/o las células atraídas por el sitio de curación tienen el potencial de promover la regeneración (Karring et al., 1980).

La presencia de las células madre mesenquimales en el tejido conectivo gingival Humano fue descrita por primera vez en el año 2010 por un grupo de investigación donde tomaron muestras de tejido conectivo gingival y se cultivaron durante 3 a 4 semanas y se caracterizaron por medio de citometría de flujo donde se indujo y se evaluó la diferenciación de linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos mediante tinción histológica y ensayo de inmunorregulación (Mitrano et al., 2010).

La nueva inserción del epitelio de unión a la superficie del diente y de las fibras de tejido conectivo a la superficie de la raíz son componentes muy críticos de la verdadera regeneración periodontal, ya que su anatomía y composición son únicas y esto conlleva a que la cicatrización de heridas periodontales sea un proceso más complejo que la cicatrización general de los tejidos blandos, esto se debe a la necesidad de interacción entre los tejidos conectivos duros y blandos, así como el epitelio (Melcher, 1976).

Por lo tanto, la cicatrización de heridas periodontales es un proceso único y complejo que requiere la respuesta coordinada de cuatro tejidos blandos y duros como: tejido conectivo gingival, ligamento periodontal, cemento y hueso, siendo este un resultado clínicamente; el desarrollo de un tratamiento periodontal regenerativo se evalúa mediante parámetros clínicos (sondeo periodontal, radiografías y evaluaciones de reingreso). Sin embargo, vale aclarar que estos métodos son inapropiados para demostrar una verdadera ganancia de inserción. La histología sigue siendo el único método fiable para evaluar la eficacia de una terapia dirigida a conseguir la regeneración periodontal (Cobb, 2002).

Según el Taller Mundial de Periodoncia de la Academia Estadounidense de Periodoncia (1996), los requisitos para que un tratamiento periodontal se considere un procedimiento regenerativo son los siguientes: (I) histología humana que demuestre cemento nuevo, ligamento periodontal y hueso coronal a la base del defecto anterior; (II) ensayos clínicos controlados en humanos que demuestren una mejora en la unión del sondaje clínico y los niveles óseos; y (III) estudios histológicos animales controlados que revelaron cemento, ligamento periodontal y hueso nuevos (Cobb., 2002). Hay que tener en cuenta que estos procedimientos pueden considerarse generalmente como impredecibles,

debido que, se requiere una cuidadosa selección de casos y planificación del tratamiento, incluyendo la consideración del paciente, el diente, el sitio y los factores quirúrgicos, para optimizar los resultados del tratamiento (Ivanovski., 2009).

El fundamento de la regeneración tisular guiada es utilizar una barrera física (membrana de barrera o membrana simple) para guiar selectivamente la proliferación celular y la expansión tisular dentro de los compartimentos tisulares (Nyman et al., 1982).

La membrana de barrera promueve la repoblación selectiva del defecto periodontal por células derivadas del ligamento periodontal a expensas de la encía evitando la expansión del epitelio gingival y del tejido conjuntivo lo cual favorece la migración de células desde el ligamento periodontal y el hueso alveolar hacia el defecto periodontal. La base para el desarrollo del principio de regeneración tisular guiada es la comprensión de que el ligamento periodontal es de importancia central para los procesos regenerativos del aparato de inserción dental (Melcher., 1976).

#### **4.2 Tratamiento Periodontal Regenerativo.**

La enfermedad periodontal es una patología crónica inflamatoria que se da en los tejidos que soportan los dientes ( hueso y encía); al no ser tratada de manera oportuna resulta en una pérdida dental y/o disminución de estos tejidos circundantes exhibiendo una destrucción significativa del hueso alveolar, el ligamento periodontal y la encía y, como consecuencia, el cemento radicular puede contaminarse por la exposición al medio bucal, cabe recordar que una vez controlado el aspecto inflamatorio de la enfermedad, el objetivo final de la terapia periodontal es la regeneración de los tejidos destruidos que permita establecer una nueva inserción, debido a esto, es necesario recuperar dichos tejidos

mediante diversas técnicas quirúrgicas en las cuales se implementa injertos o sustitutos que permitan realizar la regeneración de los tejidos periodontales (Sanz et al., 2014).

La regeneración se define como la reproducción o reconstitución de una parte del cuerpo perdida o lesionada de tal manera que la arquitectura y la función de los tejidos perdidos o lesionados se restauran por completo. El objetivo de la terapia periodontal regenerativa es restaurar la estructura y función del periodonto (Bosshardt & Sculean, 2009). Para que se lleve a cabo la regeneración periodontal debe ocurrir una migración celular de las células progenitoras del ligamento periodontal, donde se produzca una proliferación, migración y maduración celular. Sin embargo, los procedimientos para realizar una regeneración actualmente presentan limitaciones, al ser un proceso que requiere una secuencia adecuada de las vías de señalización de las células progenitoras (Bosshardt & Sculean, 2009).

El fundamento de la regeneración tisular guiada es utilizar una barrera física (membrana de barrera o membrana simple) para guiar selectivamente la proliferación celular y la expansión tisular dentro de los compartimentos tisulares (Nyman et al., 1982). La membrana de barrera evita la expansión del epitelio gingival y del tejido conjuntivo y favorece la migración de células desde el ligamento periodontal y el hueso alveolar hacia el defecto periodontal. La base para el desarrollo del principio de regeneración tisular guiada se basa en la comprensión de que el ligamento periodontal es de importancia central para los procesos regenerativos del aparato de inserción dental (Nyman et al., 1982).

#### ***4.2.1 Materiales Utilizados en Ingeniería Tisular***

Es claro que los manejos de los defectos periodontales ocasionados por la enfermedad periodontal representan un desafío médico y socioeconómico; debido a esto se han realizado diversas investigaciones en ingeniería tisular la cual se basa en los principios de la ingeniería biológica, esto ha permitido emplear el uso de factores de crecimiento recombinantes para llevar a cabo la creación de materiales de injerto que actúan como matriz o andamio para la proliferación celular (Chen & Jin, 2010).

Sin embargo, el éxito de estos materiales depende de múltiples factores o variables del defecto periodontal tales como el tamaño y tipo; la edad y la educación del paciente, su genética y, las habilidades del operador (McClain & Schallhorn, 2000). Debido a esto se ha continuado creando alternativas biológicas que permitan crear la implantación permanente de materiales sintéticos para el tratamiento de los defectos periodontales (Chen & Jin, 2010). El ligamento periodontal combinado con el uso de biomateriales adecuados permite diseñar tejidos in vitro para su posterior trasplante en sitios defectuosos (Zhang et al., 2009).

Los biomateriales usados para la regeneración periodontal son modificados frecuentemente con el objetivo de mejorar sus propiedades biológicas en términos de biocompatibilidad, biodegradabilidad y permeabilidad (C.-S. Kim et al., 2005). Sus propiedades biodegradables se controlan cambiando el peso molecular y la composición de los copolímeros, también se usó un grupo de polímeros naturales como las proteínas (albumina, colágeno, fibrina) y un grupo de polisacáridos (ácido hialurónico y quitina) (Chen et al., 2009).

#### **4.3 Membrana de Cáscara de Huevo**

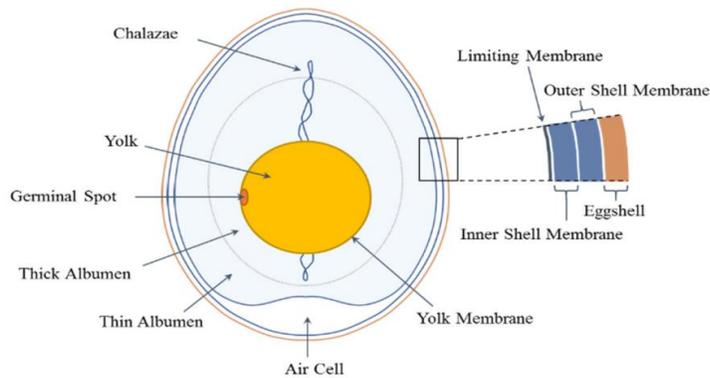
#### *4.3.1. Estructura de la membrana de cáscara de huevo*

Los animales de tipo vertebrado ovíparos, por ejemplo, la gallina, producen un cuerpo de estructura y forma redonda u ovalada denominada huevo, el cual se encarga de sustentar y proteger al embrión cuando este ha sido fecundado. Se compone por una estructura externa mineralizada llamada cascarón, en su interior se encuentran los siguientes elementos: una membrana denominada membrana de cáscara de huevo que divide la parte calcificada con la clara. A su vez, La clara alberga a la yema, la cual es recubierta por la membrana vitelina, otras partes a considerar son la cámara de aire, las chalazas, la capa mamilar y palizadas (Xiao et al., 2020).

Si bien, todas estas estructuras son fundamentales para la integridad del huevo (Figura 1), una de ellas en lo particular ha llamado la atención de la comunidad científica en las últimas décadas. La membrana de cáscara de huevo, se clasificó por un largo tiempo como material de desecho, y sin importancia, posteriormente se le dio una connotación más formal, describiéndola como una estructura de red fibrosa y biodegradable, que se encuentra ubicada exactamente entre el cascarón y el albumen. Robinson DS en 1963 publica el primer artículo sobre la importancia de la MCH con la biomineralización, proceso por el cual se calcifica la cáscara del huevo, este evento otorga una barrera de protección contra agentes patógenos al embrión de pollo (Robinson & King, 1963; Mahesh et al., 2016).

#### **Figura 1.**

*Estructura externa e interna de un huevo*



*Nota: imagen representativa de las estructuras que componen el huevo de una gallina, imagen tomada y adaptada de Shi, Y.; Zhou, K.; Li, D.; Guyonnet, V.; Hincke, M.T.; Mine, Y. Avian Eggshell Membrane as a Novel Biomaterial: A Review. Foods 2021, 10, 2178. <https://doi.org/10.3390/foods10092178>*

La literatura se evidencia un avance significativo con respecto al estudio de este material biológico, por su versatilidad y composición ha sido objeto de investigación por diferentes campos. Entre el 2011 y 2013 se reportaron un número considerable de artículos basados en la MCH, siendo esta información una prueba fehaciente de que se trata de un material biológico apto para el uso y aplicación en múltiples áreas de la ciencia (Baláž., 2014). En un principio los documentos abarcaban tanto la cáscara de huevo y la MCH como un todo, esta metodología se continuó hasta la década anterior, ejemplo de estos trabajos son los publicados por King'ori en 2011 y por Guru y Dash en 2014. Sin embargo, vale resaltar que en el año de 1995 el artículo del Wu et al, es considerado como el primer trabajo que discute el potencial de la MCH para su aplicación, en comparación con los artículos reportados que lo anteceden, los cuales tratan en su gran mayoría solo las características de su composición. Se puede considerar que una de las razones que

contribuyó al orientar los trabajos de investigación a solo la MCH, fueron las propiedades y bondades que presenta estructuralmente (Baláž., 2014).

Hoy por hoy, se conoce que la MCH está conformada principalmente por un 80-85% de proteínas, donde el 10% son tres tipos de colágeno (I, V y X), un 70-75% corresponde a otras proteínas y glicoproteínas que contienen enlaces cruzados derivados de la lisina. 33, 3% de lípidos, y 2% de carbohidratos (Sah., & Rath, 2016). La parte de carbohidratos de MCH incluye básicamente glicosaminoglicanos donde es en su gran mayoría está formado por ácido hialurónico que tiene características importantes como la biocompatibilidad, viscoelasticidad, entre otras, motivo por el cual tiene potencial en aplicaciones médicas como en tratamiento de osteoartritis, quemaduras, cirugías plásticas, y de antienvjecimiento (Park et al., 2016).

Como se expresó anteriormente, la MCH es aquella estructura de consistencia fibrosa que separa la cáscara de huevo con la parte interna, es decir la clara. Su morfología está constituida por una red fibrosa biopolimérica, la cual permite un andamiaje no mineralizado para la calcificación externa del huevo lo que da como resultado la formación de la ya mencionada cáscara de huevo. De igual forma, mantiene el interior sin que se produzca o sufra una mineralización (Arias & Nys., 2004)

A su vez la membrana se divide en tres membranas, estas son expuestas de la siguiente manera de afuera hacia adentro comenzando así con la MCH externa, seguida por la MCH interna y la membrana limitante. De la membrana externa se conoce que, es la estructura que se ubica por debajo del cascarón, cada fibra tiene un grosor entre 1 $\mu$ m a 7 $\mu$ m, extendiéndose hasta las protuberancias mamilares de la concha, la sumatoria de

todas estas fibras da un grosor total de la MCH exterior de 50-70 $\mu$ m (Bellairs & Boyde, Wong Liong, 1997).

La MCH interna se encuentra separada de la anterior por un conjunto de celdas de aire, sus fibras tienen un diámetro menor que las de la MCH exterior (Bellairs & Boyde, 1969), Oscilando entre 0,1 a 3 $\mu$ m y la sumatoria de estas le dan un grosor total a la MCH interna de 15-26  $\mu$ m, se considera que, las dos membranas se encuentran entrelazadas por sus fibras (Wong Liong et al., 1997).

La membrana limitante es una estructura mucho más delgada que las anteriores y es la superficie más interna de la MCH, esta se ubica alrededor del albumen (Hincke et al., 2010) Fue descrita por Lion et al. Como aquellas partículas que llenaban los espacios entre las fibras de la membrana interna y la clara, después de haber realizado una tinción con isotiocianato de fluoresceína (Wong Liong et al., 1997).

Se determina que, las fibras de la MCH se sitúan paralelamente a la superficie del huevo, y que las capas en particular pueden ser inapreciables por la posición, orientación y tamaño de las mismas fibras que son susceptibles a cambios, Por otra parte, no existe una relación con respecto a la posición de las protuberancias mamilares y el patrón de la MCH, pero sí se refleja el patrón de células secretoras del tracto genital de la gallina con esta estructura. Existen fibras individuales que se orientan de forma al azar extendiéndose aproximadamente distancias de 25 $\mu$ m, Torres et al habla de la posibilidad que estas fibras se encuentran conformadas por varias fibrillas, una característica importante de estas es que poseen un núcleo con alta densidad de electrones y un manto externo menos denso en electrones, y se encuentran separadas por espacios extra fibrosos (Torres & Li 2011).

El autor Zhou et al. ha logrado describir en su estudio la impresionante morfología de la membrana de cáscara de huevo al igual que la cáscara de huevo, un dato relevante es la formación de botones dados por la unión de fibras ubicadas en el exterior, también, describe a la parte interna como una superficie suave y más compacta que la externa, es importante tener en cuenta estos aspectos morfológicos debido que, Torres et al. concuerda que estos están netamente asociados a las propiedades mecánicas de la membrana de cáscara de huevo.

#### *4.3.2. Propiedades Físicas/Mecánicas de la MCH*

La membrana de cáscara de huevo se encuentra principalmente formada por una serie de proteínas que logran constituirse y dar origen a varias clases de fibras, es importante tener en cuenta esta característica debida que, sus propiedades físico mecánicas estarían directamente relacionadas con esta situación. Al evaluar la estabilidad térmica de la MCH es evidente establecer que su naturalidad no es alta, es decir, que puede iniciar con una descomposición térmica al encontrarse expuesta a temperaturas de 55°C donde el colágeno llega a desnaturalizarse (Torres et al., 2013). Y logra finalizar así esta primera etapa al aumentar la temperatura a 120°C, como consecuencia se da la degradación total del colágeno, posteriormente, este evento da lugar a una segunda etapa si las temperaturas alcanzan un rango de 250°C a 450°C, por tanto, si la membrana es expuesta a unas temperaturas más elevadas hay una lenta disminución de masa (Torres et al., 2010).

La MCH ha sido comparada con materiales poliméricos como las moléculas de ADN, colágeno y tendones, estos estudios comparativos concluyeron que estas cuatro estructuras tienen unas similitudes en el comportamiento mecánico. Un ejemplo de ello es

la elasticidad no lineal, que está dada por los aportes entrópicos y entálpicos de las moléculas que se encuentran en estas estructuras; si a la MCH se le aplica mayores niveles de tensión, esta reaccionara como las redes de sólidos y fibras celulares, generando un mecanismo de transformación como resultado de la deformación de las moléculas de colágeno (Torres et al., 2010).

Si bien, es un hecho que las condiciones del ambiente interfieren en las propiedades mecánicas de la MCH. El agua logra tener interacción con la molécula de polímero actuando como agente plastificante. El módulo de Young de la membrana de cáscara de huevo logra disminuir en presencia de altas temperaturas, y entre más agua presente en el material es mayor la temperatura pico de desnaturalización de las proteínas. Esto se debe a la capacidad que tienen las moléculas de agua para formar entre la MCH y ella enlaces de hidrógeno con los grupos amida (Torres et al., 2013).

Por otra parte, se han realizado estudios que miden la resistencia a la penetración tanto de la cáscara de huevo como la de la membrana de cáscara de huevo, los resultados obtenidos demuestran como la membrana exterior se comporta como un agente de adhesión entre la membrana de cáscara de huevo interna y la cáscara de huevo, otro resultado es como actúa la energía de penetración sobre la MCH exterior siendo ésta mayor que la MCH interna lo que genera un desprendimiento de la MCH de la parte interna de la cáscara de huevo (Baláž., 2014).

#### *4.3.3. Propiedades Químicas de la MCH*

Los datos obtenidos a lo largo de las diferentes investigaciones realizadas a la MCH han demostrado que químicamente se trata de una estructura compuesta de fibras a base de proteínas entre un 80 a 85%, se destaca que el 10% pertenece a tipos de colágeno I, V y X y el porcentaje restante pertenece a proteínas y glicoproteínas con enlaces cruzados derivados de la lisina, actualmente se consideran que son más de 62 clases de proteínas ubicadas en la membrana de cáscara de huevo (Arias et al., 1997) (Kaweewong et al., 2013) (Xie et al., 2020). Entre las que se pueden mencionar están las lisozimas, ovotransferrina, ovoalbúmina, ovocalyxin-36, isodesmozina, desmozina, osteopontina, sialoproteína, queratina entre otras (M. Hincke T., 2012).

Con pruebas de inmunoquímicas a la MCH se pudo establecer y confirmar la existencia de colágeno (Arias, Nakamura, et al., 1997), se ha estimado que existe una relación de 100:1 entre el colágeno tipo I y V. en la membrana interna de la MCH en su núcleo se encuentra principalmente colágeno tipo I y V, diferenciándose a los núcleos de la membrana externa que solo contienen colágeno tipo I (Carrino et al., 1996). Por otra parte, en un porcentaje menor en el núcleo de ambas membranas, externa e interna, se encuentra colágeno tipo X, algunos autores atribuyen al colágeno tipo X la hipótesis sobre la inhibición de la mineralización de la MCH, pero por su localización en el núcleo de las fibras no se respalda muy bien dicha hipótesis (Nys et al., 2004).

El estudio de Nakano y colaboradores describe la composición de aminoácidos tanto de la parte externa como interna de la membrana de cáscara de huevo, estos aminoácidos son: prolina, ácido glutámico, glicina, siendo estos tres con una presencia mayor en la membrana aproximadamente de 10%, seguido de la cisteína e hidroxilisina en un 5,27% y 0.19%, otros aminoácidos serían la serina, hidroxiprolina, ácido aspártico,

valina, treonina, arginina, leucina, alanina, histidina, lisina, isoleucina, metionina, tirosina y fenilalanina (Nakano et al., 2003). por otra parte, la literatura también referencia la presencia de elementos no proteicos como el ácido siálico, el urónico y pequeña cantidad de sacáridos (Nakano et al., 2003) (Nys et al., 2001).

#### *4.3.4. Propiedades Biológicas de la MCH*

Como se ha mencionado anteriormente el colágeno que compone a la MCH es una proteína que mantiene la estructura y la integridad biológica de la matriz extracelular de dicha membrana (Subhan et al., 2020). Esta proteína la podemos encontrar también en la piel y huesos de animales, estudios reportados en el 2011 demostraron que el colágeno de la MCH presentó una baja reacción alérgica y una alta bioseguridad independientemente de su porcentaje de matriz orgánica (Kingori, 2011). Teniendo en cuenta lo anterior, se puede inferir que la membrana de cáscara de huevo es una buena alternativa para la obtención de colágeno.

De las proteínas que componen a la MCH se pueden identificar las siguientes funciones como solubilidad, formación de espuma, gelificación y propiedades emulsionantes. Por otra parte, una actividad biológica fundamental de la MCH es la actividad antibacteriana, está ayuda a la cicatrización de lesiones, funciona como antiinflamatorio y antioxidante.

#### *4.3.5. Propiedades Antibacteriana de la MCH*

Se ha identificado que la MCH tiene como principio el proteger del deterioro al huevo, evitando que agentes externos como polvo y microorganismos dañen el interior de

ella, este mecanismo de defensa está atribuida a las defensinas, ovotransferrina y péptidos de queratina (Moreno et. al, 2020).

Estudios en el 2003 de Mina Oberle y Kassaify demostraron cómo la MCH destruye la membrana bacteriana y como su tamaño y concentración determina en gran medida su actividad antimicrobiana contra bacterias tan Gram positivas como Gram negativas (Mine et al., 2002) (X. Li et al., 2019).

#### ***4.3.6. Propiedad de Cicatrización de Lesiones y uso Antiinflamatorio de la MCH***

La MCH tiene la capacidad de activar las metaloproteinasas-2 (MMP2) y MMP9 en una etapa temprana y generó un aumento de queratinocitos (Vuong et al., 2018). Las proteínas como los fosfolípidos, los péptidos y los aminoácidos están relacionados con la capacidad de tratar la inflamación, Shi y colaboradores demostraron que los hidrolizados de la MCH pueden reducir la liberación de citoquinas proinflamatorias in vitro y en ratones con colitis (Shi et al., 2014), en otros estudios el polvo de MCH redujo los triglicéridos séricos y el colesterol total hepático en modelo animal, demostrando su actividad biológica en la microbiota intestinal (Ramli et al., 2020).

Por último, estudios en el 2018 y 2020 lograron demostrar también en un modelo animal la mejora de la inflamación articular y la formación de nuevo cartílago, disminuyendo la sintomatología, los estudios concluyen con la recomendación en profundizar más sobre los mecanismos más específicos de la MCH con relación a la inflamación (Ruff et al., 2018) (Ruff et al., 2020).

#### ***4.3.7. Propiedades Antioxidantes de la MCH***

Ante un estímulo de agravantes el cuerpo puede manifestar un estrés oxidativo, lo que puede empeorar el estado de enfermedades sistémicas, como la fibrosis hepática y la colitis (Jia et al., 2013). ante esta situación el cuerpo humano es capaz de aliviar el estrés oxidativo por medio de reacciones antioxidantes tanto endógenas como exógenas, los alimentos se convierten en una fuente fundamental para adquirir proteínas y péptidos que cumplen funciones antioxidantes (Wen et al., 2020), de la MCH se puede hidrolizar sus proteínas con ácido 3-mercaptopropiónico o por multienzimáticas, generando la capacidad de eliminar los radicales libres. (Huang et al., 2010 & Shi, Kovacs-Nolan, et al., 2014).

Se lograron hacer comparaciones entre los distintos hidrolizados con diferentes pesos molecular, estos estudios permitieron establecer que los hidrolizados de bajo peso molecular tienen mayor actividad antioxidante que los de alto peso molecular, una de las razones por las cuales ocurre lo anteriormente descrito es porque los péptidos de bajo peso molecular tienen la capacidad de mejorar la actividad y expresión de enzimas antioxidantes y de glutatión (Shi, Kovacs-Nolan, et al., 2014 & Katayama, Mine., 2007), de igual forma, se ha logrado identificar que los aminoácidos específicos como la prolina, histidina, valina y leucina o tirosina generan un impacto relevante, potenciando la actividad antioxidante (Shahidi & Zhong, 2010). Los estudios in vivo comprobaron que la MCH es un material biológico preventivo, al evitar la fibrosis hepática por medio de la regulación negativa-parcial de las vías de señalización de c-jun y c-fos (Jia et al., 2013b).

#### *4.3.8. Propiedades de Biocompatibilidad*

La MCH al ser un material biológico único y de diversas aplicaciones aún se considera limitada para su uso en estado natural, siendo aplicada con mayor frecuencia en

este estado en ciertos procedimientos de regeneración de tejidos, su limitación se basa en su biodisponibilidad y procedibilidad hacia distintas formas. se considera que para sobrepasar estas limitaciones la MCH puede ser modificada por medio de procedimientos que permitan controlar características como el tamaño de los poros, la densidad de las fibras entre otros (Hsieh et al., 2013). Una forma como se describe en la literatura para la modificación de poro es cuando se trata la MCH con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), cuando la membrana es expuesta por 24 horas al ( $H_2O_2$ ), se consigue un tamaño único de 1-5  $\mu m$  en comparación con el tamaño en estado natural que es de 3-10  $\mu m$  (Hsieh et al., 2013), las MCH después de ser tratadas presentan fibras estrechamente agregadas y relativamente unidas y manifestando una superficie plana. la superficie al conservar su rugosidad conserva de igual forma su ángulo de contacto de aproximadamente de  $180^\circ$ , se describe en la literatura que las MCH tratadas son excelentes materiales biológicos para lugares de menor permeabilidad y con mayo área de superficie (Hsieh et al., 2013), en puntos anteriores se logró describir su actividad antimicrobiana al presentar alguna actividad enzimática de  $\beta$ -A-acetilglucosaminidasa ( $\beta$ -NAGasa), lisozima y ovotransferrina (Ahlborn & Sheldon, 2006).

Estudios como los de Ahlborn y Sheldon generan una mejor comprensión de la metodología para la modificación de la MCH, claro está, sin ir a generar algún daño u obstaculizar que inhiba las actividades biológicas y enzimáticas en términos de valor D (valor de reducción decimal referido al tiempo requerido para matar el 90% de los microbios expuestos en temperatura determinada). la MCH cuando es tratada con tripsina, pierde toda la actividad biológica (los valores D a  $54^\circ C$  fueron 5,12 y 5,38 min para la tripsina inmovilizada y solubilizada, respectivamente) por otra parte, no presenta

modificación en la actividad de  $\beta$ -NAGasa, lisozima y ovotransferrina. Sin embargo, el estudio demostró que la MCH tratada con lipasa conservó sus actividades biológicas y enzimáticas. Cuando la MCH es desnaturalizada térmicamente si presenta una disminución significativa de la actividad biológica (valores D de 3,99 a 80 °C y 4. Por lo tanto, la selección de enzimas y temperatura para procesar la MCH ayuda a preservar las actividades biológicas y antibacterianas de ella misma (Ahlborn & Sheldon, 2006).

#### **4.4 Técnicas de Obtención de la Membrana de Cáscara de Huevo**

##### ***4.4.1. Separación Química por Disolución de la Cáscara de Huevo***

La separación de las membranas internas y la cáscara, esta se puede lograr utilizando diferentes concentraciones de ácidos de HCL las cuales van entre 0,15 N y 1,68 N, a 20 °C, a un tiempo máximo de 90 min. (Benítez et al., 2000).

Este monitoreo de la cantidad de cáscara disuelta fue realizado mediante titulación de calcio con soluciones valoradas de EDTA (ácido etilendiaminotetracético). El mayor porcentaje de calcio disuelto fue presentado en una concentración de 0,36 N de ácido clorhídrico y tiempo de 45 min, dando un resultado contrario ya que se esperaba a mayor concentración de HCL y menor tiempo una mayor cantidad de disolución de la cáscara (Benítez et al., 2000).

##### ***4.4.2. Separación por Tratamiento de Microondas de la MCH***

La separación de la cáscara de huevo y la membrana mediante la separación por tratamiento de microondas se basó en una hipótesis dada por Hussain (2009) y una

investigación de la misma basada en que la membrana tiene un mayor contenido de humedad que la cáscara, y esto daría lugar a una mayor absorción de las ondas electromagnéticas producidas en el microondas por parte de las membranas. Esta diferencia en el contenido de humedad daría como resultado que las membranas tuvieran una expansión, lo cual resultaría un desprendimiento entre la cáscara y las membranas y esto haría más fácil su separación. (Hussain, 2009).

El tratamiento con microondas, primero se busca el extremo que contiene la cámara de aire a este sitio se realiza un pequeño agujero, segundo se coloca dentro de un horno microondas convencional y se deja el tiempo necesario para alcanzar la temperatura deseada. tercero se mide la temperatura introduciendo un termopar por el agujero. por último, se retiran la albúmina y la yema y se corta la membrana de cáscara de huevo a las medidas y dimensiones deseadas para luego está ser analizada su resistencia. (Hussain, 2009).

#### *4.4.3. Separación por Hidrólisis Alcalina de la MCH*

Se utilizan diferentes soluciones básicas para el proceso de hidrólisis. Los más comúnmente empleadas son hidróxido de potasio, sodio y calcio. Las concentraciones de solución básica están entre 5,00 % y 12,00 % en peso. El uso de concentraciones menores a 5,00 % reduce la cantidad de cenizas en el producto final. La temperatura para esta reacción se da entre 30,0 °C y 65,0 °C; donde la temperatura ideal para el proceso es aproximadamente 50,0 °C. El tiempo para que el proceso sea el adecuado puede variar entre 3h y 24 h, y depende de la cantidad de soluciones y la concentración de las mismas, así como de su temperatura. (Strohbehn et al., 2012,).

## 4.5 Aplicación de la Membrana de Cáscara de Huevo como Material Biológico

### 4.5.1. Usos de la Cáscara sin Membranas

Durante mucho tiempo se ha venido utilizando la cáscara de huevo como materia prima para distintos beneficios para la salud y consumo humano, dentro de los cuales podemos mencionar suplementos de calcio, ayudando a la reducción de la pérdida ósea. en mujeres y en personas con osteoporosis mostraron que la ingesta de calcio en polvo extraído de la cáscara de huevo se asocia con una densidad aumentada de mineral óseo en pacientes con daños en la cadera y la columna vertebral. (Cordeiro y Hincke, 2011).

### 4.5.2. Aplicación de la MCH en el Área de la Nutrición

A nivel de nutrición se ha venido utilizando el calcio presente en la cáscara de huevo, el cual, mediante distintos procesos para su obtención con calentamiento para crear polvo a partir de este proceso, el cual puede ser utilizado como suplemento alimenticio, así como mediante el proceso de sumergir en vinagre y luego filtrar para ser agregado a ensaladas. han sido algunos de los usos que este material como suplemento alimenticio (Cordeiro y Hincke, 2011 & Campos, 2010.)

### 4.5.3. Aplicación de la MCH en la Industria

En la industria se ha venido utilizando en bajas cantidades a nivel de fertilizantes y obteniendo un impacto positivo en los procesos, también se ha utilizado para generar unas mejoras en productos como tiza en el cual genera que no se presenten grietas en este

material, dando un mejor soporte y estructura, este material al ser agregado al papel mejora el brillo y densidad óptica de las tintas lo cual genera una mejor calidad de impresión.

El carbonato de calcio presente en la cáscara, podría intervenir en el proceso de generación de combustible a base de hidrógeno, ya que constituye uno de los materiales más absorbentes de la naturaleza y puede retener el dióxido de carbono para generar hidrógeno puro (Cordeiro y Hincke, 2011) (Yoo, Hsieh, Zou y Kokoszka, 2009) (Campos, 2010).

También podemos encontrar que la cáscara de huevo pulverizada puede ser utilizada para absorber los metales pesados del agua como iones de FE (III) así como también los colorantes aniónicos de soluciones acuosas. Además, en suelos contaminados con Cr, Cd y Cu esta mezcla ayuda a reducir la concentración para mejoramiento de la calidad de los suelos (Cordeiro y Hincke, 2011.)

En la industria cosmética la cáscara de huevo a manera de micropartículas ha sido utilizada como producto cosmético, a manera de un agente de limpieza facial (Cordeiro y Hincke, 2011).

#### *4.5.4. Aplicación de la MCH en la Medicina*

En las aplicaciones médicas odontológicas podemos tener la estimulación de osteoblastos a partir de la extracción química de polipéptidos de la cáscara de huevo, lo cual sugiere que se podría generar un posible medicamento oral para el tratamiento de trastornos óseos. La hidroxiapatita producida a partir de la cáscara de huevo presenta características similares al tejido óseo (Cordeiro y Hincke, 2011).

#### *4.5.5. Otros Reportes del Usos de la MCH*

Las membranas de cáscara de huevo es una fuente de componentes bioactivos, estos se encuentran en cantidades significativas comparadas con otras fuentes. Dentro de sus aplicaciones encontramos en campos biomédico, de alimentos y cosméticos estos mostraron una baja respuesta inmune y baja reacciones alérgicas lo cual genera una buena confianza al uso de esta (Cordeiro & Hincke, 2011).

La ingestión de membrana de cáscara de huevo ha sido utilizada como suplemento dietético, esto gracias a los glucosaminoglicanos y proteínas presentes en ella. Se ha demostrado en estudios clínicos en pacientes con osteoartritis de rodilla, encontrando una reducción en el dolor y rigidez. (DeVore & Franklin, 2007).

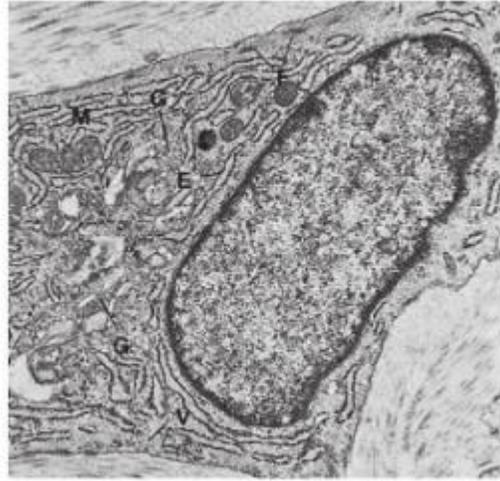
A nivel médico se ha desarrollado un apósito biológico el cual ayuda a promover la curación de heridas sirviendo como ayudante de separación gracias a la capacidad de transporte de nutrientes, la penetración de bacterias y su estructura porosa interconectada. (Torres, & Hajar, 2010).

#### **4.6. Fibroblastos**

Son células mononucleares que hacen parte de la formación del tejido conectivo en un 65% (Figura 2), considerándose las más numerosas del organismo, son de origen mesenquimático derivadas de la cresta neural, tienen gran capacidad de detectar señales ambientales y comunicarse entre sí para transmitir respuestas acertadas para eliminar y restablecer el equilibrio homeostático, participan en fenómenos importantes como la embriogénesis, organogénesis, es la encargada de producir diferentes tipos de fibras y también de la síntesis de la matriz. (Haniffa & Alfonso G 2020).

#### **Figura 2.**

### *Estructura del Fibroblasto*



*Nota:* A través de la microfotografía electrónica se observa de forma estrellada con un núcleo ovalado que a su vez contiene uno o más nucleolos, el citoplasma con un retículo endoplasmático bien constituido con ribosomas (Lindhe et al., 2005).

#### **4.6.1. Funciones del Fibroblasto**

Cumplen con una amplitud de funciones esenciales para el organismo, elasticidad a las células formadoras de la piel, y de todos los órganos y al proceso funcional predecible de los pulmones, actúan como progenitoras para todas las diferentes células especializadas, y la producción de nueva matriz extracelular en tejidos afectados (Plikus et al., 2021).

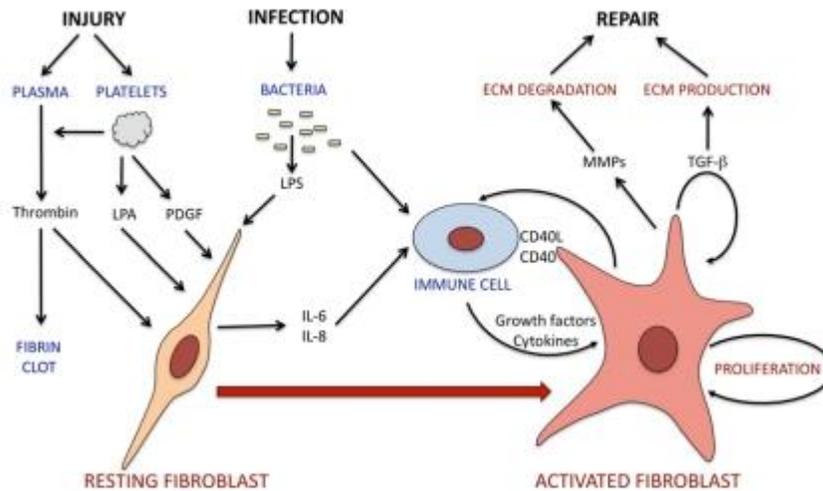
El fibroblasto actúa como células importantes en el proceso de cierre de heridas formando tejido de granulación hasta formar el nuevo tejido de cicatrización (Figura 3). (Cajal, 2017). El proceso metabólico de los fibroblastos está determinado por la contribución de oxígeno a los tejidos, durante la formación del tejido de granulación, van proliferando los miofibroblastos, las cuales tienen capacidad de contraerse y su activa síntesis de colágeno (H.-J. Park et al., 2017).

Aspectos importantes ocurren en este proceso como son la proliferación, y la renovación autónoma hasta su formación y diferenciación en miofibroblastos en donde están se encuentran limitados por vías de señalización autocrina, paracrina y endocrina que pueden perturbar el objetivo final de estas células y lograr una fibrosis (Xie et al., 2020). Es importante tener en cuenta que los tejidos conectivos sanos se encuentran formados por fibroblastos y que estos necesitan de un estímulo para ser activado y formar esa nueva matriz extracelular respondiendo a señales externas. (Chiquet et al., 2015). Las fibras del tejido conectivo son derivadas de los fibroblastos, como son reticulinas, colágenas, oxalano, y elásticas. Las colágenas son las que prevalecen en el tejido gingival y son su mayor composición. (Lindhe et al., 2005).

Estas estructuras colágenas son el componente esencial primordial de las fibras del ligamento periodontal encargadas principalmente del remodelado amplio de las fibras de inserción, el tejido conectivo gingival, es un tejido vascularizado e innervado constituyendo así la formación de las estructuras que protegen y tapizan la cavidad oral, también acompañado de células inmunitarias, pero sobre todo de fibroblastos gingivales. (Alfonso García et al., 2020).

### **Figura 3.**

*Proceso de cicatrización de la herida*



*Nota:* En el esquema anterior por Chiquet et al, describen brevemente la función de los fibroblastos orales en el proceso de la cicatrización de herida; ocurrida la lesión las plaquetas sanguíneas actúan produciendo la activación de trombina, el ácido lisofosfático y los demás factores importantes que se activan en este proceso, el cual se forma un proceso infeccioso y libera lipopolisacarido por bacterias (Chiquet et al., 2015).

Las células en reposo se encuentran estimuladas por receptores de especificidad celular como son los factores de crecimiento plaquetaria, la trombina y el ácido lisofosfático que proporcionan características importantes que inducen a la contracción motilidad y proliferación celular, debido a esto secretan quimiocinas como la interleucina-6 y 8 atrayendo células inmunitarias. Los receptores CD40 y el ligando CD40 ayudan a la interacción de los fibroblastos orales y las células inmunitarias activándose e iniciando la proliferación y secreción de metaloproteinasas de la matriz que consumen el tejido dañado liberando el factor de crecimiento produciendo su propia síntesis de nueva matriz extracelular de manera autocrina (Chiquet et al., 2015).

#### **4.6.1.1. Funciones de Fibroblastos del Ligamento Periodontal**

Los fibroblastos gingivales tienen funciones específicas como son: Promover la síntesis de colágeno siendo parte en los procesos de regeneración tisular, remodelado y proceso reparativo del hueso alveolar., por su ubicación son los encargados de mantener y remodelar el espacio del ligamento periodontal (Nomura et al., 2012).

#### **4.6.1.2. Funciones del Fibroblasto Gingivales**

Son las células que hacen parte en su mayor proporción al tejido conjuntivo gingival hacen parte fundamental del proceso regenerativo de la matriz extracelular y entre sus funciones está participar en la remodelación, permitiendo guiar la interacción celular ligando-receptor y factores de crecimiento permitiendo así la síntesis de colágeno, glicoproteínas, fibras, entre otra proteína para cumplir con las características fenotípicas del tejido gingival (H.-J. Park et al., 2017).

#### **4.6.2. Medio de cultivo de Fibroblastos Gingivales**

Debido a la importancia de sus funciones y características regenerativas en el tejido gingival, los fibroblastos han sido objeto de estudio, Diaz Rojas y col. en el año 2019 reportaron la importancia de analizar las posibles perturbaciones en el proceso de homeostasis que pueden conducir a alteraciones como hipertrofia gingival, la cual está relacionada con diferentes factores como desequilibrios hormonales, ingesta prolongada de medicamentos inmunosupresores, antiepilépticos y bloqueadores de calcio (Simancas-Escorcía et al., 2019) (Vidal et al., 2018).

En un estudio realizado por Kim y col. en el año 2015 concluyeron que debido a que los fibroblastos gingivales son células en estado de quiescencia en ciertos casos no proliferan, pero durante su metabolismo son muy activas y existe una relación junto a la

matriz extracelular con células vecinas. favoreciendo la homeostasis tisular (D.-H. Kim et al., 2009).

Los medios de cultivo han sido un factor importante en cuanto a la caracterización celular, simulación in vitro de innumerables problemas en ciencias de la salud, estudios realizados utilizando los fibroblastos gingivales para la investigación de identificación con el fin de analizar la interrelación con otras enfermedades sistémicas (Novaes Júnior, 2010).

Otros estudios han desarrollado modelos in vitro con fibroblastos humanos con el fin de evaluar el comportamiento, proliferación y supervivencia, como lo describen Simancas y col. en el año 2.018, donde realizaron un medio de cultivo celular utilizando una concentración de Suero Fetal Bovino al 0%, 0.5%, y 10% por 3 semanas, los resultados encontrados fueron una efectividad en la concentración 0,5% SFB de 0,5% más alta en cuanto a la concentración de 10% la inmunodetección de la actina, fibronectina y ivermectina fue más notable en los fibroblastos en la misma concentración, presentando una mejor supervivencia desarrollo y proliferación celular.(V. H. Simancas-Escorcía et al., 2020).

#### **4.7. Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)**

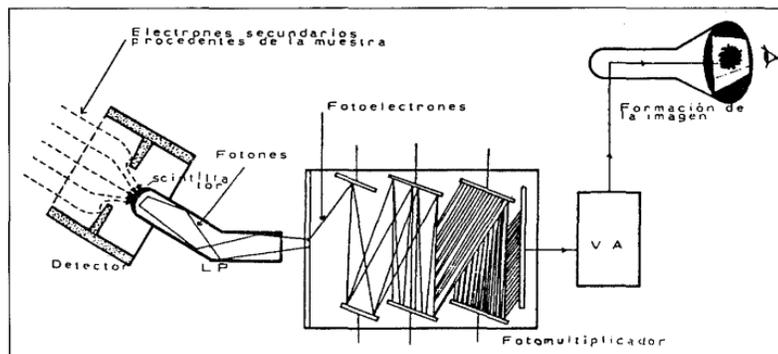
Con la introducción del microscopio electrónico de scanning (SEM) o de barrido en 1965, ha sido posible el estudio de muestras compuestas tanto orgánicas como inorgánicas en sus tres dimensiones. Esto es posible gracias al fundamento teórico de la técnica, la cual esta basada en: la necesidad de alto vacío, uso de haz electrónico móvil y puntual, muestras integras, uso de electrones secundarios, no requiere de lente proyectora, uso de pantalla en tubo Brown, de esta forma genera la imagen tridimensional con una

resolución de 10nm la cual alcanza aumentos hasta de 140.000 si requerir ningún tipo de contraste químico (Autrata, R & Henja,j 1991).

El SEM se caracteriza por la emisión de electrones dada por un cátodo de tungsteno, los cuales viajan por medio de una columna que se encuentra a un vacío de  $10^{-7}$  Torr. Las lentes electromagnéticas concentran al haz inicial desde 25.000 a 10nm, en otras palabras, existe una disminución del diámetro siendo este mas puntual. Posteriormente el haz se desplaza realizando un tipo de barrido sobre la superficie de la muestra, este proceso genera a su vez una multiplicación de fotones y una creciente de  $e^-$  secundarios, esta amplificación de la información pasará por un tubo similar al osciloscopio de rayos catódicos donde se generará la imagen (figura 4.) (Renau-Piqueras & Faura 1994).

#### Figura 4.

#### Formación de la imagen por medio de SEM



*Nota: Esquema de la formación de la imagen de una muestra por medio de SEM imagen del documento de (Renau-Piqueras & Faura 1994).*

#### 4.9 Prueba de viabilidad celular WST-1.

Los métodos MTT y WST-1 nos permiten determinar la viabilidad celular, estos métodos requieren procedimientos y materiales específicos que no son comunes, son ensayos toxicológicos que evalúan la citotoxicidad de un compuesto, su mecanismo se

basa en la reducción de sales de tetrazolio a formazán por deshidrogenasas, dando lugar a un complejo coloreado, cuya cantidad puede medirse con equipos espectrofotométricos y es proporcional al número de células viables (Lopez et.al., 2020). La reducción del reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) tiene lugar en el interior de la mitocondria formando cristales de formazán en cambio, en el ensayo con el reactivo 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio (WST-1), estas moléculas se reducen dentro y fuera de la mitocondria debido a sus características fisicoquímicas, que permiten su solubilidad en el medio de crecimiento (Mosman, 1983).

Estos ensayos permiten determinar la viabilidad celular basándose en su actividad metabólica, principalmente en base a la evaluación de la actividad enzimática, esto demuestra que solo una célula viable reaccionara con el compuesto de forma que si la célula no es capaz de realizar este proceso es porque la célula está muerta, ya que la actividad enzimática solo puede ser realizada por células vivas (Takhar & Mahant, 2011).

## 5. Diseño Metodológico

Tipo de estudio: Experimental in vitro

Objeto de estudio: fibroblastos gingivales y membrana de la cáscara de huevo

MCH

**Tabla 1.**

**Tabla de variables**

Nombre de variable	Definición de la variable	Tipo de la variable	Fuente y medición
Topografía	estado estructural de una superficie	cualitativa	Microscopia Cryo SEM JEOL, por medio de congelación a -18°C se puede mantener la estructura intacta de una muestra y por medio de un haz electrónico se genera una imagen detallada de la estructura de un material
Composición elemental	Es la identidad química, disposición y proporción de los elementos de un material	Cuantitativa	Sonda Microscopia SEM Excitación del elemento a través de un haz electrónico que permite identificar a que elemento corresponde dicha estimulación
Viabilidad celular	Proceso de crecimiento y división celular que da origen a dos células hijas.	Cualitativa/cuantitativa	Prueba WST-1/MTT-1 El tinte de formazán producido por las células viables se puede cuantificar mediante un lector de microplacas midiendo la absorbancia de la solución de tinte a 440 nm.
Tiempo	Dimensión física que representa la sucesión de estados por los que pasa la materia.	Cuantitativa continua	1 día 3 días 5 días 7 días

Nota: lista de variables que permiten cumplir con los objetivos planteados en el presente documento.

Descripción del procedimiento: (Extracción de la Membrana de Cáscara de Huevo)

En el laboratorio de la Universidad Antonio Nariño sede circunvalar Bogotá, bajo un protocolo de desinfección del área (asepsia y antisepsia) se lleva a cabo la extracción, técnica manual, de la MCH. Se utilizó un huevo Gallus Gallus sin fertilizar, sobre un campo estéril el profesional encargado, genera una fractura de la cáscara en la porción donde se encuentra ubicada la cámara de aire del huevo.

Posteriormente, con un periostótomo de Buser previamente esterilizado, se desprende cuidadosamente la cáscara separando de forma completa la membrana de la parte mineralizada. Sobre una loseta de vidrio estéril se coloca una porción de MCH de 10mmX10mm; se lava con agua destilada para eliminar restos de albumen (Figura 5). Se es almacenada la membrana por un tiempo no mayor a 24 horas a una temperatura de 4°C en su correspondiente contenedor. En el laboratorio Micro Core de la Universidad de los Andes se realizó la prueba de Microscopia de Cryo SEM JEOL. Fig. La porción de MCH y la membrana de colágeno de marca Mem-Lock 15mmX 20mm, se someten a un congelamiento a -18°C, con el objetivo de mantener las estructuras de dichas muestras, obteniendo así la fiel topografía de las muestras. Se realiza una lectura a 500x y 3000x.

**Figura 5.**

*Separación de la membrana de cascara de huevo y microscopio de Cryo SEM  
JEOL*



Image of own  
authorship

a



[Microcore | Universidad de los Andes - Inicio \(uniandes.edu.co\)](http://Microcore | Universidad de los Andes - Inicio (uniandes.edu.co))

b

***Nota:** En la Figura 5.a se evidencia tanto los elementos utilizados como las porciones de la MCH obtenidas por la técnica de extracción manual. Figura 5b corresponde al Microscopio de Cryo SEM JEOL de la Universidad de los Andes. Imágenes propias*

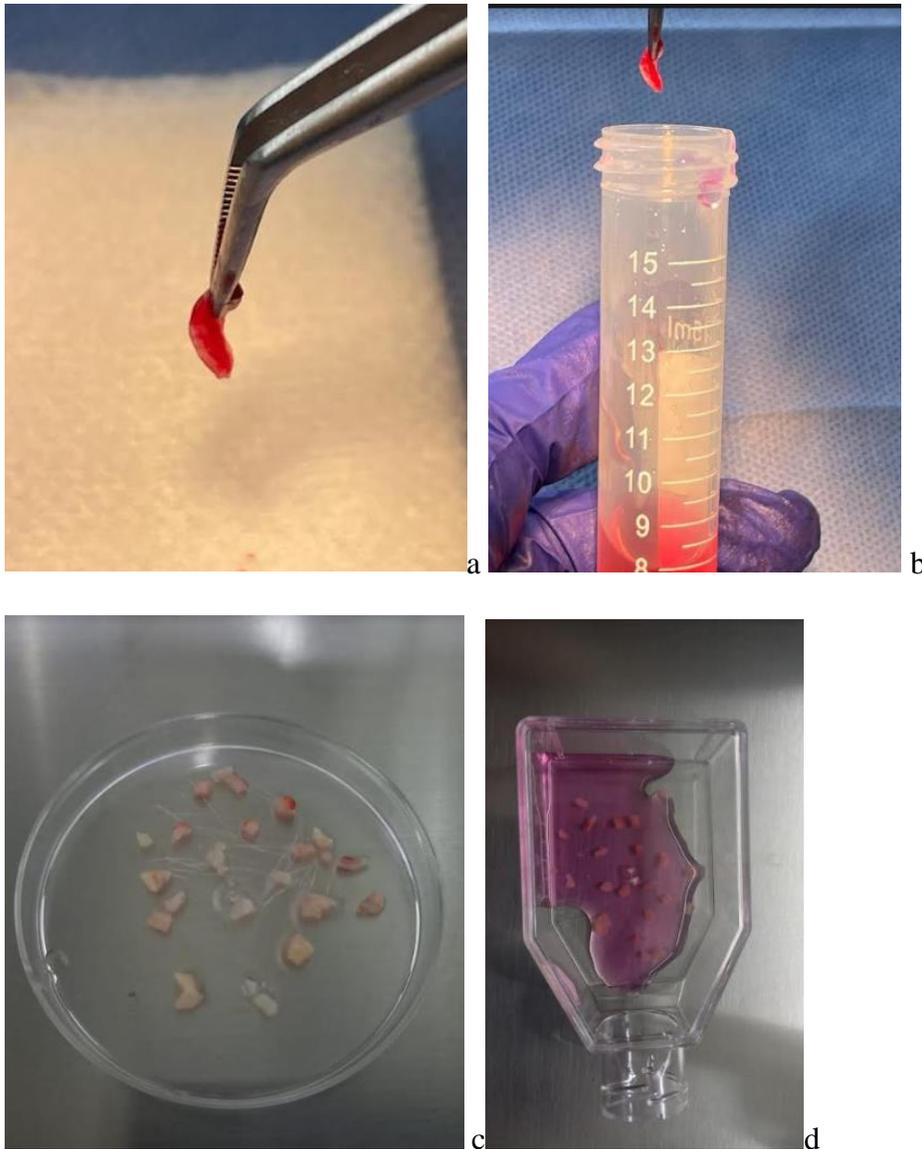
El estudio elemental de la MCH se realizó de igual manera en la Universidad de los Andes por medio de la Sonda de Microscopio Sem. De esta forma se pudo procesar y determinar la composición química de la capa limitante de la MCH.

Descripción del procedimiento: (Toma de la muestra de tejido oral y su Procesamiento)

Obtención de los fibroblastos gingivales y cultivo celular: obtención de una porción de tejido gingival de un paciente sistémicamente sano que asistió a la UAN para procedimiento quirúrgico periodontal de extracción de tejido blando con previo consentimiento informado. Posteriormente, se realizó el cultivo celular según protocolo establecido por la línea de ingeniería tisular y medicina regenerativa de la UAN. Para ello, se usó la incubadora (BIOBASE) la cual almaceno el cultivo celular y mantuvo los reactivos a una temperatura adecuada 37°C. El funcionamiento de la incubadora consta en crear un ambiente húmedo en un contenedor herméticamente sellado, con un 5% de CO<sub>2</sub>. (Figura 6).

**Figura 6.**

*Toma de tejido gingival para cultivo de fibroblastos.*



*Nota: En la Figura 6.a Toma de tejido gingival. Figura 6b embalaje de tejido gingival en medio de cultivo. Figura 6c en caja de Petri. Figura 6d en medio de cultivo. Imágenes propias*

Del cultivo primario se desarrollaron 4 pases de forma exponencial. En cada pase se realiza una prueba de control de calidad óptico identificando la estabilidad de las células. Se observa el color del medio de cultivo, que no exista presencia de hongos, cero turbidez ni residuos o partículas dentro de las cajas de poliestireno, luego en el

microscopio invertido se verifican las células, revisando caja por caja. Luego son llevadas a la cabina de flujo laminar, se realiza el cambio del medio de cultivo, depositando dicho reactivo en un recipiente, cada caja es vaciada.

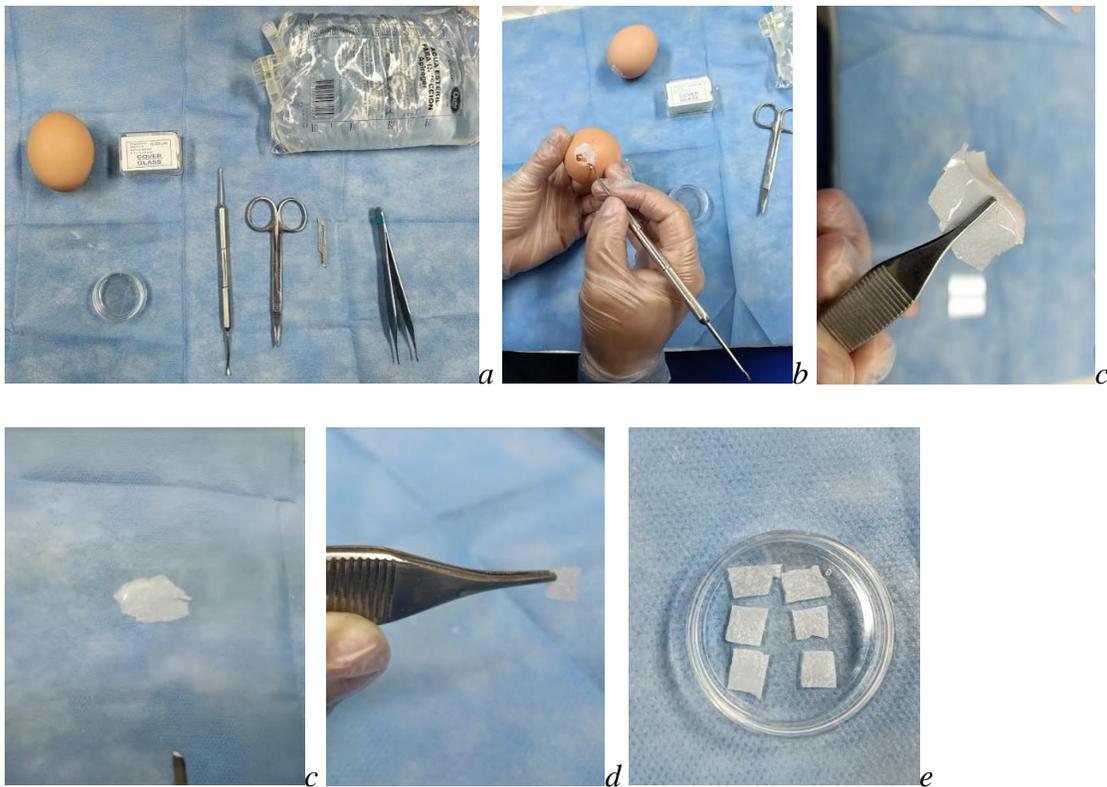
A continuación, se le es aplica una enzima (trioxina) y se es llevada a la incubadora por 5 minutos, pasado este tiempo las cajas son llevadas nuevamente a la cabina de flujo laminar, se neutraliza la trioxina con un medio de cultivo que en su componente tenga suero bovino fetal. El procedimiento anteriormente descrito permite el desprendimiento de las células que se encontraban adheridas a la superficie de la caja de poliestireno, teniendo como resultado a las células suspendidas sobre el líquido dentro de dichas cajas.

En los tubos fueron recolectadas las células y posteriormente se llevaron a centrifugación, con el fin de tener en el fondo las células y de esta forma hacer una correcta expansión. Vale aclarar, que entre cada pase se realizo el mismo procedimiento con la diferencia que, las cajas fueron lavadas en su momento con un buffer fosfato salino (PBS), cada caja se le adiciono 2 mm de PBS por medio de pipetas conectadas al pipeteador Pipetus. Las cajas fueron agitadas de forma mecedora para garantizar la eliminación completa el medio de cultivo residual. Este residuo fue depositado nuevamente en el recipiente de recolección de medio anteriormente mencionado.

Para el cultivo sobre la MCH fue necesario extraer de nuevo la membrana con la técnica manual anterior mente descrita, con la diferencia que en este caso la membrana se dividio en seis partes iguales (Figura 7), estas fueron colocadas en una caja, y llevas al laboratorio de cultivo celular.

### **Figura 7.**

*Toma de MCH para el cultivo de fibroblastos*



*Nota: En la Figura 7.a Materiales, instrumental y huevo Gallus Gallus sobre campo estéril, Laboratorio de la Universidad Antonio Nariño. Figura 7b embalaje de tejido gingival en medio de cultivo. Figura 7c en caja de Petri. Figura 7d en medio de cultivo. Figura 7e Imágenes propias*

Grupos de estudio: Se cultivaron 500.000 células en un área de 1x1 cm de membrana de cáscara de huevo

Grupo 1 control positivo: células cultivadas en caja de cultivo de 25 ml

Grupo 2 control negativo: células cultivadas en cajas de cultivo con inducción de apoptosis celular.

Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo WST-1

Se cultivaron 500.000 células en 1x1 cm de MCH cara limitante y se adicionó el reactivo WST-1 según indicaciones de la casa comercial y se incubaron en oscuridad durante 4 horas se analizó la cantidad de colorante de formazán producido midiendo la

absorbancia a una longitud de onda establecida por la casa comercial. Se realizó la lectura en un espectrofotómetro incluyendo los controles positivos y negativos en los tiempos descritos anteriormente.

**Análisis de los datos:** Los datos obtenidos fueron organizados y procesados en el software estadístico SPSS definiendo las pruebas estadísticas de comparación según los datos encontrados.

**Aspectos Éticos de la Investigación:** La investigación se rige con la resolución 8430 de 1993 siendo una Investigación sin riesgo: Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: revisión de historias clínicas, entrevistas, cuestionarios y otros en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta. Como vamos a realizar toma de muestras realizaremos consentimiento informado con base en el ARTÍCULO 15 de la misma resolución.

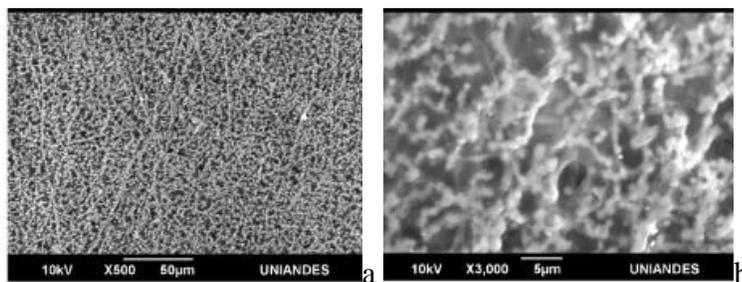
## 6. Resultados

### Evaluación topográfica de la MCH por su cara interna y la membrana xenogénica de la casa comercial Mem-Lock.

La caracterización morfológica de la MCH por medio de microscopía Cryo SEM JEOL, revelo una estructura de tipo enmallado de poros uniformes compatibles con una distribución organizada de las fibras de colágeno a una óptica de 500x (Figura 8a), al exponer la MCH a 3000x se percibe mucho mejor la composición proteica al visualizarse unas formas esféricas aglomeradas sobre las perfectas fibras colágenas (Figura 8b). Por otro lado, la membrana Men-Lock presento en una vista de 500x una estructura irregular de fibras colágenas entrelazadas sin una organización definida y una porosidad poco visible (Figura 9a). Al compararla con la MCH a una óptica de 3000x no se aprecia ningún componente proteico más que las fibras de colágeno pobremente organizadas (Figura 9b)

### Figura 8

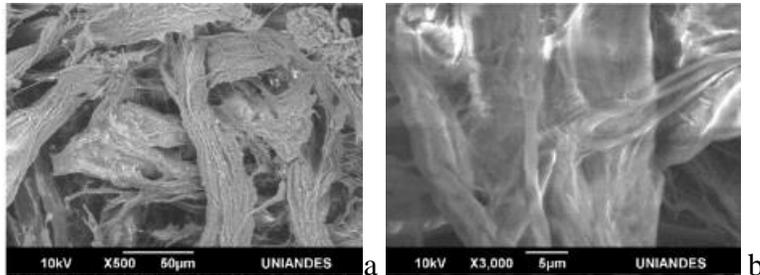
*Topografía de la MCH a 500x y 3000x*



*Nota: En la Figura 8.a Imagen de la MCH cara limitante a 500X con microscopía Cryo SEM JEOL. Figura 8b Imagen de la MCH cara limitante a 3000X con microscopía Cryo SEM JEOL. Imágenes propias*

## Figura 9

*Topografía de la membrana colágena Men-Lock a 500x y 3000x*



*Nota: En la Figura 9.a Imagen de membrana Men-Lock a 500X con microscopia Cryo SEM JEOL.*

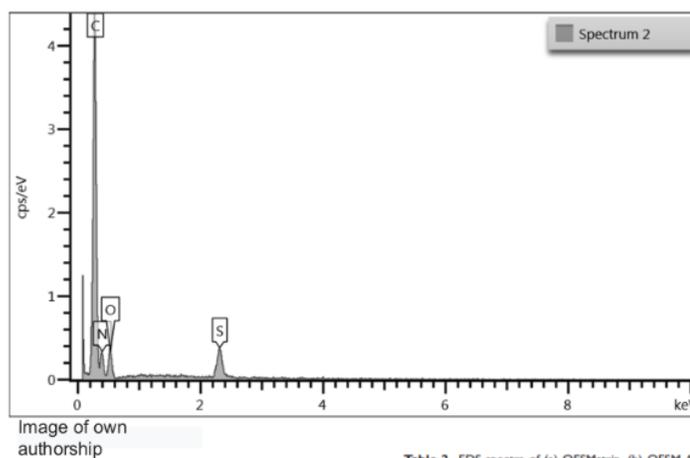
*Figura 9b Imagen de membrana Men-Lock a 3000X con microscopia Cryo SEM JEOL. Imágenes propias*

### **Evaluación elemental de la MCH por su cara limitante.**

El estudio de la presencia de elementos químicos de la MCH se realizó mediante la Sonda microscopio SEM, de la cual se pudo determinar que la cara interna de la MCH se encuentra compuesta por Carbono, Nitrógeno, Oxígeno y Azufre, no se evidencio calcio en su composición (Figura 10).

## Figura 10.

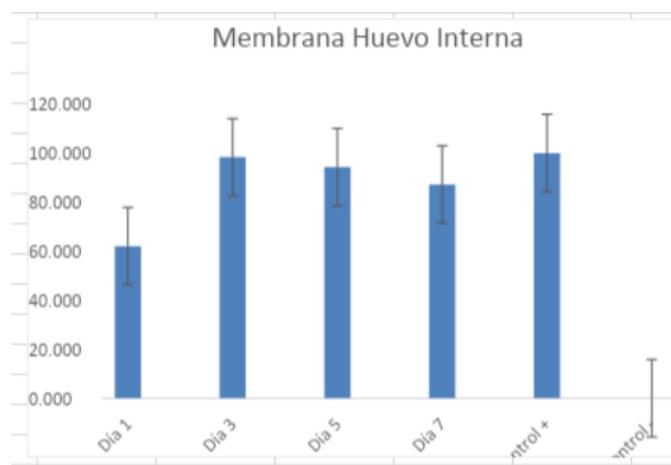
*Resultados de la Sonda microscopio SEM de la MCH cara limitante.*



*Nota: En la Figura 10 Resultado de sonda microscopio SEM de la cara limitante de la MCH, se evidencia presencia de carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. Imágenes propias*

### **Evaluación del comportamiento de los fibroblastos gingivales en termino de viabilidad sembrados en la cara limitante de la MCH**

La evaluación de la supervivencia de fibroblastos cultivados sobre la cara interna de la MCH se desarrollo por medio de la prueba WST-1, de la cual se obtuvieron los siguientes datos recopilados en la tabla 1, en los intervalos de tiempo de 1 día, 3 días, 5 días y 7 días, con un control negativo y un control positivo. Los rangos de onda fueron tabulados y de los cuales se saco la media de cada día evaluado. Los resultados fueron graficados en porcentaje de viabilidad celular siendo el 100% la mayor cantidad de células vivas y el 0% la manifestación de muerte celular por completo. Los porcentajes del crecimiento de los fibroblastos gingivales sobre la cara interna de la MCH se manifestó de la siguiente manera en el día 1 fue del 62.02%, en el día 3 las células crecieron hasta llegar a un 98.2%, en el día 5 descendió el crecimiento a un 94.2% y en el día 7 se presentó un crecimiento de 87.2%.



## Discusión

En el presente trabajo se desarrollaron tres objetivos, el primero relacionado con la evaluación estructural de la membrana de cáscara de huevo cara limitante. Como segundo objetivo se logro describir los elementos químicos que conforman la cara limitante de la MCH y por último se evaluó la viabilidad de los fibroblastos gingivales sembrados sobre la cara limitante de la MCH. Por consiguiente, este trabajo permitió a su vez tener en cuenta los siguientes aspectos reportados en otros estudios de caracterización de la membrana de cáscara de huevo.

En primer lugar, varios autores han definido a la membrana de cáscara de huevo como una red de biopolímeros, la cual esta conformada por diversas fibras sin una orientación definida, uno de estos autores es Torres et al. Quien en el 2010 evaluó por medio de microscopio óptico de luz, SEM y microscopia de fuerza atómica a la MCH. En su trabajo la MCH mostro una topografía con cambios en su estructura en los diferentes instrumentos usados. Por un lado, la MCH al ser observada por medio de la electroscopia de barrido, debió ser sometida al vacío utilizado.

Por otro lado, la imagen obtenida con un estudio de microscopia de fuerza atómica determino una estructura fibrilar organizada debido a la composición individual de cada fibra, que al parecer esta compuesta por múltiples fibrillas.

El anterior estudio mencionado del 2010, se debate la influencia de la hidratación de la membrana de cáscara de huevo a la hora de ser evaluada, debido que, con cada estudio se presentó una diferencia topográfica en cada imagen obtenida. Los autores afirman que la metodología de cada estudio requería de un estado específico de la

membrana, es decir que para una observación en microscopia óptica de luz la membrana se encuentra totalmente hidratada, lo que no ocurre con la microscopia electrónica de barrido, en la cual se requiere de una MCH totalmente deshidratada al llevar la muestra al vacío, y con respecto a la microscopia de fuerza atómica, esta fue secada al aire lo que permitió conservar una estructura más precisa y jerárquica de las fibras.

Dentro de nuestro estudio de la membrana de cáscara de huevo, se utilizó la microscopia de Cryo SEM JEOL. Debido que, la literatura indica que la microscopia de Cryo SEM JEOL genera una observación natural, sin cambios dimensionales ni alteración del espécimen, al no usar agentes de fijación biológica que podrían ser tóxicos para el material de interés. Este tipo de técnica son usadas esencialmente en aquellos especímenes que contienen un grado de humedad o que son sensibles al haz de electrones. Por consiguiente, este tipo de instrumento se basa en el uso de un haz de electrones que al contacto con el material sea orgánico o inorgánico, formara una imagen de gran detalle, caracterizando morfológicamente así la superficie.

Si bien, en el estudio presentado se evidencio imágenes con una mayor precisión y fidelidad de la superficie de la cara limitante de la MCH. De forma cualitativa se describe una topografía de fibras bien organizadas a una expresión de 500x, y una conformidad proteica esférica de las fibras a una observación de 3000x. se recomienda a estudios futuros realizar una medición del diámetro de las fibras para ser evaluadas con reportes ya existentes como los mencionados en el trabajo de Torres et al. Este tipo de comparación podría esclarecer cual es el cambio del diámetro entre una fibra en su estado natural y otra en un estado de deshidratación.

Otro estudio como el de Mensah et al., En el 2021 describen la morfología de la MCH tanto la cara externa como la cara limitante por medio de microscopia electrónica de barrido de emisión de campo, determinan que morfológicamente presentan diferencia significativa entre cada cara de la membrana, siendo mas rugosa y porosa la parte externa en relación con la membrana limitante quien se destaca por presentar una estructura densa continua de fibras muy delgadas, estos resultados fueron similares a informes previos por otras investigaciones. A pesar que, tanto la microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) y la microscopia de Cryo SEM JEOL (SEM), funcionan en principio por un barrido de electrones sobre la superficie de la muestra, emitiendo una visualización de la estructura en un monitor. Su principal diferencia radica en el sistema de generación de electrones, el FESEM proporciona haces de electrones de alta y baja energía muy focalizados, mejorando la resolución de la imagen.

En comparación de los resultados de nuestro estudio con el de Mensah y et al. La imagen otorgada por el instrumento de microscopia de Cryo SEM JEOL, aparenta ser más detallado con la morfología de la cara limitante. Se recomienda realizar estudios sobre la cara externa y realizar las correspondientes comparaciones topográficas con los dos instrumentos mencionados, con el fin de establecer cual de los dos nos brinda un mejor detalle en relación a la morfología de la MCH.

En segundo lugar, para determinar la composición química de la MCH se encontró que en el estudio de Mensah y et al. En el 2021 se realizó por medio de la espectroscopia de energía dispersiva (EDS), la cual consta en una excitación de la muestra con una fuente de energía en este caso los haz de electrones de un microscopio electrónico, este proceso genera una liberación de energía en forma de rayos X el cual tendrá un espectro

característico establecido en su átomo de origen, de esta manera se obtiene el análisis compositivo de un volumen del objeto de estudio, es válido aclarar que la posición de los picos en el espectro definen el elemento y la intensidad de la señal identifica la concentración del elemento.

Este tipo de estudio logro demostrar que el uso de EDTA para la obtención de la MCH, no genero ningún tipo de residuo contaminante que alterara los resultados, por consiguiente, reportaron que la MCH está compuesta por los siguientes elementos: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. Estos resultados coinciden con la información descrita por Tsai et al. Quienes afirmaron que en el estado natural de la MCH los elementos a encontrar son los ya mencionados. En comparación con nuestro estudio el cual determino la extracción manual de la membrana con el fin de evitar algún tipo de alteración contaminante, el resultado otorgado por la sonda de Microscopia SEM corrobora la presencia de los elementos Carbono, Nitrógeno, Oxígeno y Azufre en la cara limitante.

A pesar que no existió contaminación por parte del EDTA para la obtención de la MCH, si se reporta que la parte externa pudo haber sido afectada por dicha técnica, al no presentar el resultado del estudio la presencia de calcio, por consiguiente, se hace la anotación para las futuras investigaciones, realizar la caracterización de la cara externa teniendo en cuenta que para su extracción se lleve a cabo la técnica manual, con el fin de establecer si en dicha cara existe la presencia de calcio.

En tercer lugar, se encontró que en el estudio de Chato et al. 2018, registraron el comportamiento de los fibroblastos orales al ser sembrados en una MCH durante un tiempo de 7 días, por medio de una lectura microscopia, fijando la muestra con formalina

al 10% y teñidas con hematoxilina y eosina, pricosirius, azul alción y orceina, de esta forma, se verifico la adhesión de las células sobre la superficie de la membrana, observándose unas estructuras basófilas unidas a las dos caras de la MCH, los autores por medio de esta prueba establecen que si existe viabilidad celular sobre la membrana y recomiendan hacer mas estudios que permitan recopilar más información para establecer el potencial en la regeneración de tejidos que tiene la membrana de cáscara de huevo.

El anterior estudio pudo establecer de forma cualitativa la viabilidad celular sobre la superficie de la MCH, sin embargo este tipo de estudio no determina en forma porcentual el comportamiento de las células sobre la membrana, se sabe que existen estructuras adheridas pero se desconoce la cantidad porcentual de estas, por tanto nosotros consideramos que se requieren de estudios de viabilidad celular como las pruebas de WST-1 para determinar el comportamiento de sobrevivencia de las células cultivadas sobre la superficie de la MCH. En nuestros resultados se identifico que se inicia con un porcentaje de células vivas sobre la MCH cara limitante, aproximadamente de un 62,02% en el primer día, posteriormente a los 3 días existe un crecimiento de células llegando aun 98.2%, pero a partir del 5 dia al 7 se ve un porcentaje que va en descenso. Confirmamos con nuestros resultados que las células pueden mantenerse sobre la MCH en u periodo de 7 días, muy similar a lo reportado por Chato et al.

Es indispensable seguir realizando estudios que procuren determinar la supervivencia de las células en intervalos de tiempo mucho mas longevos con el fin de dar un mejor veredicto y considerar a la MCH como futuro andamio para el crecimiento de células en una regeneración. Se recomiendan estudios que evalúen el estado apoptótico de las células cultivadas sobre la MCH, debido que, uno de nuestros limitantes fue no saber si

las células cultivadas se encontraban en estado de proliferación o en un estado de muerte celular. Como grupo de investigación reconocemos que estamos en el inicio de lo que promete ser un material biológico apto para el uso en cavidad oral, con una versatilidad para diferentes terapéuticas y motivamos a seguir estudiando este peculiar material biológico.

## Conclusiones

A raíz de la caracterización morfológica de la MCH se logro establecer la importancia de desarrollar y proponer instrumentos que permitan obtener imágenes topográficas fielmente detalladas. De igual manera se pudo identificar la organización jerárquica de las fibras colágenas de la membrana de cáscara de huevo cara limitante y como se diferencia de la distribución colágena de una membrana comercial.

El estudio de sonda microscopia SEM permitió corroborar que la composición en general de la MCH y su cara limitante está basada en los elementos como Carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, y para evitar posibles alteraciones en los resultados por contaminación física o química, la técnica de extracción manual nos promete mantener intacta la muestra.

En términos de viabilidad celular sobre la membrana de cáscara de huevo cara limitante, se concluye que los fibroblastos gingivales se comportan de una manera positiva dando resultados compatibles con su supervivencia sobre dicha estructura. De igual manera invitamos a los futuros estudios establecer pruebas que evalúen el estado apoptótico de las células cultivadas sobre la MCH, y contemplar rangos de tiempo mayores a 7 días.

**Anexos**

## Referencias Bibliográficas

- Ahlborn, G., & Sheldon, B. W. (2006). Identifying the components in eggshell membrane responsible for reducing the heat resistance of bacterial pathogens. *Journal of Food Protection*, 69(4), 729–738. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.4.729>
- Alfonso García, S. L., Parada-Sanchez, M. T., & Arboleda Toro, D. (2020). The phenotype of gingival fibroblasts and their potential use in advanced therapies. *European Journal of Cell Biology*, 99(7), 151123. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151123>
- Arias, J. L., Cataldo, M., Fernandez, M. S., & Kessi, E. (1997). Effect of beta-aminopropionitrile on eggshell formation. *British Poultry Science*, 38(4), 349–354. <https://doi.org/10.1080/00071669708418001>
- Arias, J. L., Fink, D. J., Xiao, S.-Q., Heuer, A. H., & Caplan, A. I. (1993). Biomineralization and eggshells: Cell-Mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. In *International Review of Cytology Volume 145* (pp. 217–250). Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60428-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60428-3)
- Arias, J. L., Nakamura, O., Fernández, M. S., Wu, J.-J., Knigge, P., Eyre, D. R., & Caplan, A. I. (1997). Role of type X collagen on experimental mineralization of eggshell membranes. *Connective Tissue Research*, 36(1), 21–33. <https://doi.org/10.3109/03008209709160211>
- Autrata, R & Henja, J. (1991). Detectors for low voltage SEM. *Scanning*. 13: 275-288

- Baláž, M. (2014). Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. *Acta Biomaterialia*, 10(9), 3827–3843.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.020>
- Bedoya-Salazar, A., & Valencia-González, M. P. (2020). Usos potenciales de la cáscara de huevo de gallina (*Gallus gallus domesticus*): Una revisión sistemática. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 12(2), e776.  
<https://doi.org/10.24188/recia.v12.n2.2020.776>
- Bellaïrs, R., & Boyde, A. (1969). Scanning electron microscopy of the shell membranes of the hen's egg. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 96(2), 237–249. <https://doi.org/10.1007/bf00338771>
- Bosshardt, D. D., & Sculean, A. (2009). Does periodontal tissue regeneration really work? *Periodontology 2000*, 51(1), 208–219. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00317.x>
- Cajal, R. Y. (2017). *Manual de Anatomía Patológica General: Seguida de un Resumen de Microscopia Aplicada a la Histología y Bacteriología Patológicas (Classic Reprint)*. Forgotten Books.
- Carrino, D. A., Dennis, J. E., Wu, T.-M., Arias, J. L., Fernandez, M. S., Rodriguez, J. P., Fink, D. J., Heuer, A. H., & Caplan, A. I. (1996). The avian eggshell extracellular matrix as a model for biomineralization. *Connective Tissue Research*, 35(1–4), 325–328. <https://doi.org/10.3109/03008209609029207>
- Chato-Astrain, I., Rodríguez-Pozo, J.-Á., Stoykova, S., Chato-Astrain, J., Campos, F., & Carriel, V. (2019). Human fibroblast behavior cultured in the eggshell

- membranes for tissue engineering applications. *ACTUALIDAD MEDICA*, 103(805), 126–129. <https://doi.org/10.15568/am.2018.805.or02>
- Chen, F.-M., & Jin, Y. (2010). Periodontal tissue engineering and regeneration: Current approaches and expanding opportunities. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(2), 219–255. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0562>
- Chen, F.-M., Shelton, R. M., Jin, Y., & Chapple, I. L. C. (2009). ChemInform abstract: Localized delivery of growth factors for periodontal tissue regeneration: Role, strategies, and perspectives. *ChemInform*, 40(25). <https://doi.org/10.1002/chin.200925267>
- Cheung, J. W. C., Jain, D., McCulloch, C. A. G., & Santerre, J. P. (2015). Pro-Angiogenic character of endothelial cells and gingival fibroblasts cocultures in perfused degradable polyurethane scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, 21(9–10), 1587–1599. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0548>
- Chiquet, M., Katsaros, C., & Kleetsas, D. (2015). Multiple functions of gingival and mucoperiosteal fibroblasts in oral wound healing and repair. *Periodontology 2000*, 68(1), 21–40. <https://doi.org/10.1111/prd.12076>
- Ciucci Pardo, A. (n.d.). Contribución del co-transportador Na<sup>+</sup>- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y de la anhidrasa carbónica a las alteraciones por isquemia y reperfusión: Rol de la mitocondria [Universidad Nacional de La Plata]. Retrieved November 1, 2022, from <http://dx.doi.org/10.35537/10915/72902>
- Cobb, C. M. (2002). Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: An evidence-based perspective of scaling and root planing. *Journal of Clinical Periodontology*, 29, 22–32. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.29.s2.4.x>

- Cordeiro, C. M., & Hincke, M. T. (2011). Recent patents on eggshell: shell and membrane applications. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 3(1), 1–8. <https://doi.org/10.2174/2212798411103010001>
- Freedman, B. R., & Mooney, D. J. (2019). Biomaterials to mimic and heal connective tissues. *Advanced Materials*, 31(19), 1806695. <https://doi.org/10.1002/adma.201806695>
- Haniffa, M. A., Collin, M. P., Buckley, C. D., & Dazzi, F. (2008). Mesenchymal stem cells: The fibroblasts' new clothes? *Haematologica*, 94(2), 258–263. <https://doi.org/10.3324/haematol.13699>
- Hincke, M., T. (2012). The eggshell: Structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience*, 17(1), 1266. <https://doi.org/10.2741/3985>
- Hincke, M. T., Nys, Y., & Gautron, J. (2010). The role of matrix proteins in eggshell formation. *The Journal of Poultry Science*, 47(3), 208–219. <https://doi.org/10.2141/jpsa.009122>
- Hsieh, S., Chou, H.-H., Hsieh, C.-W., Wu, D.-C., Kuo, C.-H., & Lin, F.-H. (2013). Hydrogen peroxide treatment of eggshell membrane to control porosity. *Food Chemistry*, 141(3), 2117–2121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.115>
- Huang, X., Zhou, Y., Ma, M., Cai, Z., & Li, T. (2010). Chemiluminescence evaluation of antioxidant activity and prevention of DNA damage effect of peptides isolated from soluble eggshell membrane protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12137–12142. <https://doi.org/10.1021/jf101728d>

Ivanovski, S. (2009). Periodontal regeneration. *Australian Dental Journal*, 54, S118–S128.

<https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01150.x>

Jia, H., Saito, K., Aw, W., Takahashi, S., Hanate, M., Hasebe, Y., & Kato, H. (2013).

Transcriptional profiling in rats and an ex vivo analysis implicate novel beneficial function of egg shell membrane in liver fibrosis. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1611–1619. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.003>

Karring, T., Nyman, S., & Lindhe, J. (1980). Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *Journal of Clinical Periodontology*,

7(2), 96–105. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1980.tb01952.x>

Katayama, S., & Mine, Y. (2007). Antioxidative activity of amino acids on tissue oxidative stress in human intestinal epithelial cell model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8458–8464. <https://doi.org/10.1021/jf070866p>

Kaweewong, K., Garnjanagoonchorn, W., Jirapakkul, W., & Roytrakul, S. (2013).

Solubilization and identification of hen eggshell membrane proteins during different times of chicken embryo development using the proteomic approach. *The Protein Journal*, 32(4), 297–308. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9487-0>

Kim, C.-S., Choi, S.-H., Cho, K.-S., Chai, J.-K., Wikesjo, U. M. E., & Kim, C.-K.

(2005). Periodontal healing in one-wall intra-bony defects in dogs following implantation of autogenous bone or a coral-derived biomaterial. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(6), 583–589. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.2005.00729.x>

Kim, D., Gwon, Y., Park, S., Kim, W., Yun, K., & Kim, J. (2021). Eggshell

membrane as a bioactive agent in polymeric nanotopographic scaffolds for

- enhanced bone regeneration. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(5), 1862–1875. <https://doi.org/10.1002/bit.27702>
- Kim, D.-H., Han, K., Gupta, K., Kwon, K. W., Suh, K.-Y., & Levchenko, A. (2009). Mechanosensitivity of fibroblast cell shape and movement to anisotropic substratum topography gradients. *Biomaterials*, 30(29), 5433–5444. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.042>
- Kim, S. S., Wen, W., Prowse, P., & Hamilton, D. W. (2015). Regulation of matrix remodelling phenotype in gingival fibroblasts by substratum topography. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(6), 1183–1196. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12451>
- King`ori, A. M. (2011). A review of the uses of poultry eggshells and shell membranes. *International Journal of Poultry Science*, 10(11), 908–912. <https://doi.org/10.3923/ijps.2011.908.912>
- Kribs, G. D., Martin, A., & Roy, T. S. (2009). Squark flavor violation at the LHC. *Journal of High Energy Physics*, 2009(06), 042–042. <https://doi.org/10.1088/1126-6708/2009/06/042>
- Lamster, I. B. (2003). CLINICAL PERIODONTOLOGY AND IMPLANT DENTISTRY, FOURTH EDITION. *Journal of Dental Research*, 82(11), 933–933. <https://doi.org/10.1177/154405910308201117>
- Li, N., Niu, L., Qi, Y., Yiu, C. K. Y., Ryou, H., Arola, D. D., Chen, J., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2011). Subtleties of biomineralisation revealed by manipulation of the eggshell membrane. *Biomaterials*, 32(34), 8743–8752. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.007>

- Li, X., Cai, Z., Ahn, D. U., & Huang, X. (2019). Development of an antibacterial nanobiomaterial for wound-care based on the absorption of AgNPs on the eggshell membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 183, 110449. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110449>
- Lindhe, J., Karring, T., & Lang, N. P. (2009). *Periodontologia clinica e implantologia odontologica / Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Ed. Médica Panamericana.
- Lindhe, J., Lang, N. P., & Karring, T. (2005). *Periodontología clínica e implantología odontológica*.
- McClain, P. K., & Schallhorn, R. G. (2000). Focus on furcation defects - Guided tissue regeneration in combination with bone grafting. *Periodontology 2000*, 22(1), 190–212. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2220112.x>
- Melcher, A. H. (1976). On the repair potential of periodontal tissues. *Journal of Periodontology*, 47(5), 256–260. <https://doi.org/10.1902/jop.1976.47.5.256>
- Mine, Y., Oberle, C., & Kassaify, Z. (2002). Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 249–253. <https://doi.org/10.1021/jf020597x>
- Mitrano, T. I., Grob, M. S., Carrión, F., Nova-Lamperti, E., Luz, P. A., Fierro, F. S., Quintero, A., Chaparro, A., & Sanz, A. (2010). Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *Journal of Periodontology*, 81(6), 917–925. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.090566>
- Monteagudo Arrieta, C. A., Marín González, M. G., Enriquez Habib, F., Penilla Acasuso, I., Krötzsch, E., & Cano Colín, S. (2009). Caracterización clínica de injertos

autólogos a partir de fibroblastos gingivales crecidos sobre una matriz biológica para el tratamiento de recesiones gingivales: Reporte de un caso clínico. *Revista Odontológica Mexicana*, 13(2).

<https://doi.org/10.22201/fo.1870199xp.2009.13.2.15610>

Moreno-Fernández, S., Garcés-Rimón, M., & Miguel, M. (2020). Egg-derived peptides and hydrolysates: A new bioactive treasure for cardiometabolic diseases. *Trends in Food Science & Technology*, 104, 208–218.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.002>

Nakano, T., Ikawa, N., & Ozimek, L. (2003). Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poultry Science*, 82(3), 510–514.

<https://doi.org/10.1093/ps/82.3.510>

Novaes Júnior, A. B. (2010). Avaliação in vitro do cultivo de fibroblastos gengivais humanos em matriz dérmica acelular. *Brazilian Dental Journal*, 21(3).

<https://doi.org/10.1590/s0103-64402010010600001>

Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T., & Lindhe, J. (1982). The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *Journal of Clinical Periodontology*, 9(3), 257–265. [https://doi.org/10.1111/j.1600-](https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1982.tb02065.x)

[051x.1982.tb02065.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1982.tb02065.x)

Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J. M., & Hincke, M. T. (2004). Avian eggshell mineralization: Biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Palevol*, 3(6–7), 549–562.

<https://doi.org/10.1016/j.crpv.2004.08.002>

- Nys, Y., Gautron, J., McKee, M. D., Garcia-Ruiz, J. M., & Hincke, M. T. (2001). Biochemical and functional characterisation of eggshell matrix proteins in hens. *World's Poultry Science Journal*, 57(4), 401–413. <https://doi.org/10.1079/wps20010029>
- Park, H.-J., Salem, M., Semlali, A., Leung, K. P., & Rouabhia, M. (2017). Antimicrobial peptide KSL-W promotes gingival fibroblast healing properties in vitro. *Peptides*, 93, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.05.003>
- Park, S., Choi, K. S., Lee, D., Kim, D., Lim, K. T., Lee, K.-H., Seonwoo, H., & Kim, J. (2016). Eggshell membrane: Review and impact on engineering. *Biosystems Engineering*, 151, 446–463. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.10.014>
- PARTES DEL HUEVO. (n.d.). Retrieved November 1, 2022, from [https://weblab.deusto.es/olarex/cd/UD/Incubator\\_ES\\_final/partes\\_del\\_huevo.html](https://weblab.deusto.es/olarex/cd/UD/Incubator_ES_final/partes_del_huevo.html)
- Plikus, M. V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S. M., Herzog, E. L., Driskell, R. R., Rosenthal, N., Biernaskie, J., & Horsley, V. (2021). Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*, 184(15), 3852–3872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.024>
- Ramli, N. S., Jia, H., Sekine, A., Lyu, W., Furukawa, K., Saito, K., Hasebe, Y., & Kato, H. (2020). Eggshell membrane powder lowers plasma triglyceride and liver total cholesterol by modulating gut microbiota and accelerating lipid metabolism in high-fat diet-fed mice. *Food Science &amp; Nutrition*, 8(5), 2512–2523. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1545>
- Robinson, D. S., & King, N. R. (1963). Carbonic anhydrase and formation of the hen's egg shell. *Nature*, 199(4892), 497–498. <https://doi.org/10.1038/199497a0>

- Renau-Piqueras, J., & Faura, M. (2010). Principios básicos del Microscopio Electronico de Barrido. Seccion de microscopía electronica, Centro de investigación. Hospital. Avda Campanar 21.
- Ruff, K. J., Morrison, D., Duncan, S. A., Back, M., Aydogan, C., & Theodosakis, J. (2018). Beneficial effects of natural eggshell membrane versus placebo in exercise-induced joint pain, stiffness, and cartilage turnover in healthy, postmenopausal women. *Clinical Interventions in Aging*, Volume 13, 285–295.  
<https://doi.org/10.2147/cia.s153782>
- Sah, M. K., & Rath, S. N. (2016). Soluble eggshell membrane: A natural protein to improve the properties of biomaterials used for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 67, 807–821.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.005>
- Sanz, A. R., Carrión, F. S., & Chaparro, A. P. (2014). Mesenchymal stem cells from the oral cavity and their potential value in tissue engineering. *Periodontology 2000*, 67(1), 251–267. <https://doi.org/10.1111/prd.12070>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9), 930–940. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000044>
- Shi, Y., Kovacs-Nolan, J., Jiang, B., Tsao, R., & Mine, Y. (2014). Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from eggshell membrane proteins and its protective capacity in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods*, 10, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.004>

- Shi, Y., Rupa, P., Jiang, B., & Mine, Y. (2014). Hydrolysate from eggshell membrane ameliorates intestinal inflammation in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22728–22742. <https://doi.org/10.3390/ijms151222728>
- Simancas-Escorcia, V., Berdal, A., & Díaz-Caballero, A. (2019). Caracterización fenotípica del síndrome amelogenesis imperfecta–nefrocalcinosis: Una revisión. *Duazary*, 16(1), 129. <https://doi.org/10.21676/2389783x.2531>
- Simancas-Escorcia, V. H., Martínez-Martínez, A., & Díaz-Caballero, A. (2020). Cultivo de células epiteliales dentales: Impacto del suero fetal bovino. *Revista MVZ Córdoba*, 25(2), e1639. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1639>
- Torres, F. G., Troncoso, O. P., & Montes, M. R. (2013). The effect of temperature on the mechanical properties of a protein-based biopolymer network. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 111(3), 1921–1925. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2915-0>
- Torres, F. G., Troncoso, O. P., Piaggio, F., & Híjar, A. (2010). Structure–property relationships of a biopolymer network: The eggshell membrane. *Acta Biomaterialia*, 6(9), 3687–3693. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.014>
- Vidal, F., de Souza, R. C., Ferreira, D. C., Fischer, R. G., & Gonçalves, L. S. (2018). Influence of 3 calcium channel blockers on gingival overgrowth in a population of severe refractory hypertensive patients. *Journal of Periodontal Research*, 53(5), 721–726. <https://doi.org/10.1111/jre.12556>
- Vuong, T. T., Rønning, S. B., Ahmed, T. A. E., Brathagen, K., Høst, V., Hincke, M. T., Suso, H.-P., & Pedersen, M. E. (2018). Processed eggshell membrane powder regulates cellular functions and increase MMP-activity important in early wound

healing processes. PLOS ONE, 13(8), e0201975.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201975>

Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 308–322. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.019>

Wong Liong, J. W., Frank, J. F., & Bailey, S. (1997). Visualization of Eggshell Membranes and Their Interaction with *Salmonella enteritidis* Using Confocal Scanning Laser Microscopy. *Journal of Food Protection*, 60(9), 1022–1028. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-60.9.1022>

Xiao, N., Zhao, Y., Yao, Y., Wu, N., Xu, M., Du, H., & Tu, Y. (2020). Biological activities of egg yolk lipids: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(7), 1948–1957. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06616>

Xie, Y., Su, N., Yang, J., Tan, Q., Huang, S., Jin, M., Ni, Z., Zhang, B., Zhang, D., Luo, F., Chen, H., Sun, X., Feng, J. Q., Qi, H., & Chen, L. (2020). FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00222-7>

Zhang, W., Abukawa, H., Troulis, M. J., Kaban, L. B., Vacanti, J. P., & Yelick, P. C. (2009). Tissue engineered hybrid tooth–bone constructs. *Methods*, 47(2), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.09.004>

Zhao, Y.-H., & Chi, Y.-J. (2009). Characterization of collagen from eggshell membrane. *Biotechnology(Faisalabad)*, 8(2), 254–258. <https://doi.org/10.3923/biotech.2009.254.258>