



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“EVALUACIÓN DE UNA MATRIZ
EXPERIMENTAL DE RELLENO ÓSEO A
BASE DE NANOHIPOFOSFATO DE
OBTENIDA DE CÁSCARA DE HUEVO
DE GALLINA Y NANOPARTICULAS DE
PLATA”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN ESTOMATOLOGÍA

VANESSA SOFÍA BERMÚDEZ GARCÍA

LIMA – PERÚ
2021

ASESOR

Dra. Mg. Lidia Yileng Tay Chu Jon

JURADO DE TESIS

Dr. Freddie Eduardo Williams Díaz

PRESIDENTE

Dr. Abraham Meneses López

VOCAL

Dra. Sonia Julia Sacsquispe Contreras

VOCAL

Dr. Ebingen Villavicencio Caparo

SECRETARIO

DEDICATORIA

A mi madre C.D. Martha Elena García Munive, quien me apoyó e incentivó en
realizar este post grado. Gracias por toda tu fuerza.

A mi amado esposo Moisés, quien estuvo a mi lado siempre.

A mis hijas Catalina y Letizia.

AGRADECIMIENTO

A todos los profesionales que me orientaron y guiaron en esta hermosa aventura:

Ph.D. CD. Lidia Yileng Tay Chu Jon

Ph.D. CD. John Alexis Domínguez

Ph.D. CD. Angie Quispe Salcedo

Mg. CD. Carlos Espinoza Montes

Físico Ph. D.(c). José Alberto Castañeda Vía

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Fondo de apoyo a la investigación UPCH: Premio “Fernando Porturas Plaza”

2018

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Marco Teórico	4
II. HIPÓTESIS	14
III. OBJETIVOS	15
III.1. Objetivo general.....	15
III.2. Objetivos específicos	15
IV. METODOLOGÍA	16
IV.1 Diseño de estudio.....	16
IV.2 Objeto de estudio.....	16
IV.3 Variables.....	36
IV.4 Consideraciones éticas	37
IV.5 Plan de análisis	39
V. Resultados.....	41
VI. Discusión	56
VII. Conclusiones	67
VIII. Recomendaciones.....	68
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
X. Anexos	

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Parámetros cristalográficos obtenidos del refinamiento Rietveld a las muestras de hidroxiapatita, nanopartículas de plata y GenPhos HA-TCP	51
Tabla 2.	Resultados de la prueba de susceptibilidad antibiótica in vitro de las 05 muestras experimentales con la cepa <i>Streptococco gordonii</i>	54
Tabla 3.	Resultados de la prueba de susceptibilidad antibiótica in vitro de las 05 muestras experimentales con la cepa <i>Fusobacterium nucleatum</i>	55
Tabla 4.	Resultados de la prueba de susceptibilidad antibiótica in vitro de las 05 muestras experimentales con la cepa <i>Porphyromonas gingivalis</i>	56
Tabla 5.	Resultados de la MIC y la MCB en la sustancia de nanopartículas de plata más nanopartículas de hidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo en la cepa: <i>Fusobacterium nucleatum</i>	57
Tabla 6.	Comparación de neoformación ósea entre grupos experimentales y grupos controles a los 30 días	58
Tabla 7.	Comparación de neoformación ósea entre los tres grupos experimentales a los 30 días de evaluación	60

Tabla 8.	Análisis cualitativo de las matrices experimentales evaluadas para la variable neoformación ósea	62
-----------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Distribución de los grupos de estudio y grupos controles experimentales en modelos animales	30
Figura 2.	Difractograma de nanohidroxiapatita a base de cáscara de huevo de gallina	48
Figura 3.	Difractograma de nanopartículas de plata	49
Figura 4.	Difractograma de GenPhos HA-TCP	50
Figura 5.	Gráfico de citotoxicidad	51
Figura 6.	Comparación del porcentaje de la neoformación ósea de los grupos experimentales y sus debidos controles a los 30 días	60

ÍNDICE DE GRÁFICOS

		Página
Gráfico 1	Gráfico de citotoxicidad	52
Gráfico 2	Comparación del porcentaje de la neoformación ósea de los grupos experimentales y sus debidos controles a los 30 días	61

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

NHAP	:	Nanohidroxiapatita
HAP	:	Hidroxiapatita
Sp	:	Especies
UPCH	:	Universidad Peruana Cayetano Heredia
CITBM	:	Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales
CaCO₃	:	Cáscara de huevo de gallina
CaO	:	Óxido de calcio
Ca(OH)₂	:	Hidróxido de calcio
H₃PO₄	:	Ácido fosfórico
NH₄OH	:	Hidróxido de amonio
MDCK	:	Madin Darby Canine Kidney
ATCC	:	American Type Culture Collection

BHI	:	Brain Heart Infusion
BHA	:	Brain Heart Agar
MIC	:	Mínima Concentración Inhibitoria
MCB	:	Mínima Concentración Bactericida
S. gordonii	:	<i>Streptococcus gordonii</i>
F. nucleatum	:	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
P. gingivalis	:	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
AVMA	:	Asociación Americana de Médicos Veterinarios
UNMSM	:	Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

Introducción: La hidroxiapatita es el principal componente mineral del tejido óseo en los seres humanos. Existe en la literatura múltiples estudios de obtención de hidroxiapatita a partir de residuos naturales de origen animal, acuático, coralino y de cáscara de huevo.

Objetivo: Desarrollar una matriz experimental de relleno óseo a base de nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina con nanopartículas de plata. Evaluar la densidad ósea neoformada en alveolos tratados con esta matriz de relleno óseo experimental utilizando la histomorfometría ósea en un modelo animal.

Material y métodos: Se sintetizó nanohidroxiapatita a partir de cáscaras de huevo de gallina bajo el método sol-gel y nanopartículas mediante el método de coprecipitación química. La caracterización de esta matriz experimental se dio mediante la técnica de difracción de rayos X. Se evaluó la citotoxicidad mediante la prueba CC50 en líneas celulares Madin Darby Canine Kidney y susceptibilidad antibiótica contra *Streptococco gordonii*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*. Para evaluar neoformación ósea, se evaluaron 15 ratas albinas Holtzman. Se realizó la extracción de las primeras molares superiores derecha e izquierda. Se clasificaron los modelos animales en 3 grupos de estudio: G1: se injertó la Hidroxiapatita sintética comercial GenPhos HA TCP-Baumer, Sao Paulo, Brasil; G2: se injertó la matriz de relleno óseo experimental a base de nanohidroxiapatita tomada de cáscara de huevo de gallina sola y G3: se injertó la matriz de relleno óseo experimental a base de nanohidroxiapatita tomada de cáscara de huevo de gallina más nanopartículas de plata. Para la determinación de la

neoformación ósea se realizó un análisis histomorfométrico mediante imágenes del tejido óseo del alveolo a los 30 días, las cuales fueron delimitadas y procesadas en el programa IMAGE J.

Resultados: Se sintetizó nanohidroxiapatita a partir de cáscara de huevo de gallina y nanopartículas de plata identificando fases cristalinas con una estructura ordenada y periódica. La prueba de citotoxicidad mostró que la matriz experimental de nanohidroxiapatita más nanopartículas de plata alcanza su cc50 a los 93mg/ml, lo que demuestra que no son tóxicas para las células. La prueba de susceptibilidad antibiótica evidenció que la matriz experimental tiene efecto antibacteriano sobre las cepas de *Streptococco gordonii* y *Fusobacterium nucleatum*.

Finalmente, la matriz experimental demostró tener una mayor neoformación ósea a los 30 días de injertado en comparación con una matriz sintética comercial ($p = 0.031$).

Conclusión: El relleno experimental de nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina más nanopartículas de plata demostró no ser tóxica, presentó efecto antimicrobiano frente las cepas *S. gordonii* y *F. nucleatum* y promovió mayor neoformación ósea.

Palabras clave: durapatita, hidroxiapatita, cáscara de huevo de gallina, plata, densidad ósea. (DECS)

ABSTRACT

Introduction: Hydroxyapatite is the main mineral component of bone tissue in humans. There are multiple studies in the literature on obtaining hydroxyapatite from natural residues of animal, aquatic, coral and eggshell origin.

Objective: To develop an experimental bone filler matrix based on nanohydroxyapatite obtained from chicken eggshell with silver nanoparticles. To assess newly formed bone density in alveoli treated with this experimental bone filler matrix using bone histomorphometry in an animal model.

Material and Methods: Nanohydroxyapatite was synthesized from chicken eggshells under the sol-gel method and nanoparticles by the chemical coprecipitation method. The characterization of this experimental matrix was given by the X-ray diffraction technique. Cytotoxicity was assessed by the CC50 test in Madin Darby Canine Kidney cell lines and antibiotic susceptibility against *Streptococco gordonii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. To evaluate new bone formation, 15 Holtzman albino rats were assessed. The upper right and left first molars were extracted. The animal models were classified into 3 study groups: G1: commercial synthetic Hydroxyapatite GenPhos HA TCP-Baumer, Sao Paulo, Brazil; G2: the experimental bone filler matrix based on nanohydroxyapatite taken from eggshell of hen alone; and G3: the experimental bone filler matrix based on nanohydroxyapatite taken from chicken eggshell plus silver nanoparticles was grafted. To determine bone neoformation, a histomorphometric analysis was performed using images of the bone tissue of the alveolus at 30 days, which were delimited and processed in the IMAGE J program.

Results: Nanohydroxyapatite was synthesized from chicken eggshell and silver nanoparticles, crystalline phases were identified with an ordered and periodic structure. The cytotoxicity test shows that the experimental matrix of nanohydroxyapatite plus silver nanoparticles reaches its cc50 at 93mg / ml, proving not to be toxic to cells. The antibiotic susceptibility test showed that the experimental matrix has an antibacterial effect on the *Streptococco gordonii* and *fusobacterium nucleatum* strains.

Finally, the experimental matrix showed greater new bone formation 30 days after grafting compared to a commercial synthetic matrix ($p = 0.031$).

Conclusion: The experimental filler of nanohydroxyapatite obtained from chicken eggshell plus silver nanoparticles proved to be non-toxic, exhibited an antimicrobial effect against *S. gordonii* and *F. nucleatum* strains, and promoted greater new bone formation.

KEYWORDS : durapatite, hydroxyapatites, egg shell, silver, bone density.
(MeSH)

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los escenarios clínicos más comunes luego de una extracción dental es la reabsorción ósea alveolar (1). Esta se indica cuando un diente no puede ser restaurado o mantener su función a largo plazo. La pérdida de un diente impacta directamente en la calidad de vida: afecta la capacidad masticatoria, la capacidad del habla y, en algunos casos, la sociabilización y la autoestima. (2) La ausencia de un diente en su alveolo desencadena una cascada de eventos biológicos como la pérdida irreversible del volumen de la cresta alveolar (3,4).

La preservación de la cresta alveolar, luego de la extracción dentaria, es de suma importancia para la posrehabilitación. Así, los estudios demuestran que el uso de rellenos óseos es efectivo para prevenir la pérdida ósea fisiológica tanto en ancho bucolingual o bucopalatal como en altura, en comparación con una extracción sin relleno (1).

Tradicionalmente, estos problemas se han resuelto con el uso de injertos o sustitutos óseos. En Estados Unidos de América, los procedimientos quirúrgicos de rellenos óseos posextracción dentaria ascienden a 500 000 intervenciones anuales y dos millones de intervenciones a nivel mundial (5,6).

Los injertos pueden clasificarse según su procedencia en injertos biológicos o injertos sintéticos.

Entre los *injertos biológicos* tenemos los injertos autólogos o autoinjertos, tomados del mismo paciente; los xenoinjertos, tomados de otras especies, como el hueso de procedencia bovina o porcina; la hidroxiapatita (HAP), cristales hexagonales que forman parte de la familia de las apatitas, que actualmente se obtiene de residuos

naturales como espinas de pescado, conchas de ostras, caracoles de jardín, conchas marinas, concha de mejillón, concha de almeja y de la cáscara de huevo de gallina (7, 8, 9, 10, 11, 12).

Entre los *injertos sintéticos* se encuentran los denominados cerámicos o aloplásticos, como el sulfato de calcio, el fosfato de calcio, el fosfato B tricálcico y la hidroxiapatita sintética.

Diferentes estudios confirman que la hidroxiapatita de origen natural posee las siguientes características: propiedades de biocompatibilidad; ausencia de respuesta inflamatoria; propiedades osteoinductivas (13,14); una lenta reabsorción (3 años), que permite un lento progreso de crecimiento óseo y colonización celular; altas propiedades mecánicas de resistencia (hasta 160Mpa) (5); cicatrizante y con propiedades regenerativas, lo cual garantiza una osteointegración exitosa y una neoformación ósea acelerada (15, 16, 17, 18).

Uno de los objetivos del presente estudio es sintetizar hidroxiapatita natural a partir de cáscaras de huevo de gallina. Se eligió la cáscara de huevo de gallina debido a que dentro de su composición cuenta con 94 % de carbonato de calcio, 1 % de fosfato de calcio y 4 % de materia orgánica (19). Estos componentes son precursores del calcio, los cuales al pasar por un proceso químico se van a transformar en cristales de hidroxiapatita. Es importante recordar que la hidroxiapatita se encuentra en un 96 % en el esmalte dental y representa un 70 % del peso de los huesos (20).

En el Perú se produce 1.2 toneladas de cáscara de huevo al año. Por ello, si se logra desarrollar una matriz de relleno óseo experimental a base de HAP obtenida de cáscaras de huevo, podríamos ayudar a reutilizar un material de residuo biológico

de alto consumo diario. En el Perú, el consumo per cápita de huevo es de 167 unidades anuales. (21)

Contar con una matriz de relleno óseo a base de nanohidroxiapatita, obtenida a partir de un residuo biológico orgánico como la cáscara de huevo de gallina, sería una alternativa económica e innovadora, ya que en el mercado peruano el gramo de injerto óseo tiene un costo entre 90 a 150 dólares americanos.

Al desarrollar una matriz de relleno óseo a base de un desecho biodegradable, como la cáscara de huevo, se crea un hito importante en la ciencia y un cambio de paradigma en el tratamiento de residuos orgánicos, porque no solo serviría para el reciclaje (transformación o reutilización de basura), sino también tendría implicancia sobre los biomateriales utilizados actualmente.

Adicionalmente, a esta matriz experimental, se le va a adicionar nanopartículas de plata como agente antibacteriano. Algunos estudios confirman que la incorporación de nanopartículas de plata a la hidroxiapatita inhibe exitosamente el crecimiento bacteriano de *Streptococcus species* (Sp). La incorporación del elemento plata a la hidroxiapatita crea una superficie con propiedades antibióticas sin comprometer la biocompatibilidad requerida para una oseointegración exitosa (22,23,24).

Por lo expuesto anteriormente, la presente investigación busca responder la siguiente interrogante:

¿Una matriz experimental de relleno óseo a base de nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina y nanopartículas de plata poseerá actividad antibacteriana, baja citotoxicidad y capacidad de neoformación ósea?

I.1 Marco Teórico

En 1981, Branemark realiza una publicación, producto de nueve años de investigación clínica exitosa en oseointegración de implantes dentales. Esta le permitió proporcionar resultados óptimos (25) y abrió una nueva línea de investigación que aún sigue vigente. Los injertos óseos son procedimientos quirúrgicos mediante los cuales se reemplaza el hueso faltante con el objetivo de incrementar volumen óseo en el área afectada. (26)

Para elegir entre un injerto y otro hay que tener conocimiento de las características histológicas del área a injertar y las propiedades de estos biomateriales.

Los injertos óseos se encuentran clasificados de la siguiente manera:

A. Injertos autólogos o autógenos

Es el hueso que se obtiene del propio paciente. Este puede ser un hueso esponjoso o cortical. Las zonas dadoras son el mentón, la tuberosidad del maxilar, la rama ascendente de la mandíbula, la cresta iliaca, la tibia o calota. La obtención de los autoinjertos requiere un procedimiento quirúrgico adicional, que puede generar un riesgo de infección posquirúrgica, hemorragia, dolor muscular o neurológico de la zona donante (27).

B. Injertos homólogos, alogénicos o aloinjertos

Son aquellos que proceden de individuos de la misma especie, pero genéticamente diferentes. Según su procesamiento se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Aloinjertos congelados
- Aloinjertos iofilizados

- Aloinjertos iofilizados y desmineralizados
- Hueso irradiado

Este grupo presenta ventajas: una rápida disponibilidad en el mercado en diferentes cantidades y no requiere una cirugía adicional para el paciente. Sin embargo, la desventaja es que la regeneración del tejido no siempre es previsible y por sí sola no tiene capacidad antibacteriana (27).

C. Injertos heterólogos o xenoinjertos

Estos son derivados de origen natural, animal o mineral.

- Origen natural: los derivados del coral, conchas u ostras
- Origen animal: el hueso bovino o el porcino
- Origen mineral: como las hidroxiapatitas sintéticas (27)

La revisión de esta clasificación es importante debido a que se va a obtener hidroxiapatita a partir de cáscaras de huevo de gallina, la cual estaría clasificada como un *xenoinjerto de origen natural*.

La hidroxiapatita es considerada un biocristal, debido a que está formada por fosfato de calcio cristalino, el cual se deriva del mineral llamado apatita (CAOH) y está formado por átomos de calcio, fósforo, e hidrógeno. Su fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{HO})_2$ (28).

El principal componente mineral del tejido óseo en los seres humanos es la hidroxiapatita. En efecto, el esmalte dental contiene 96 % y, en nuestro organismo, representa un depósito del 99 % del calcio corporal y el 80 % del fósforo total (16).

La hidroxiapatita se puede obtener de dos fuentes: de origen natural o de origen sintético:

A. De origen Natural. Se obtiene a partir de la transformación hidrotermal del carbonato cálcico que se encuentra en diferentes corales como ostras, mejillones, conchas marinas, almejas; pero también del hueso bovino, porcino, espinas de pescado y, finalmente, de las cáscaras de huevo (8,14).

B. De origen sintético. Este puede ser de origen sintético cerámica o de origen sintético no cerámica.

- **Cerámica**

Se obtiene por calentamiento de los fosfatos cálcicos. Sin embargo, dependiendo del medio utilizado y el grado de temperatura aplicada, se determinará la estructura cristalina, porosidad y solubilidad del producto resultante (29).

- **No cerámica**

Se obtiene por precipitación química al añadir una solución rica en fosfatos a otra con iones de calcio en condiciones controladas (19,30).

La obtención de hidroxiapatita se denomina síntesis y esta se puede realizar a través de dos métodos:

1. El método de precipitación

Este consiste en la mezcla de fuentes de iones de calcio y fosfato en un medio acuoso. El resultado del producto consta de compuestos tanto cristalinos como nanoscópicos, según la vía que se utilice. En este grupo tenemos dos vías:

- **Vía hidrotérmica**

Se forma hidroxiapatita a partir de soluciones acuosas sometidas a altas temperaturas (140-500 °C). El resultado final será una hidroxiapatita de

obtención pura, con pocos defectos en la red cristalina y con cristales prismáticos de caras bien desarrolladas (10,31).

- **Vía sol-gel**

Es la ruta química por la cual se obtiene hidroxiapatita por medio de dos compuestos acuosos que se juntan sin necesidad de aplicar temperatura, en contraste con el anterior que sí lo requiere. En esta vía se aplican la hidrólisis y la condensación (31).

2. Por el método de sinterización

El sinterizado tiene como objetivo la unión de partículas mediante la combinación de presión y temperatura.

En este proceso, las partículas se funden por difusión atómica a un estado sólido a muy altas temperaturas, pero por debajo del punto de fusión del compuesto. Al final del proceso tenemos las partículas químicamente unidas por difusión atómica (9, 11).

Luego del proceso químico-físico de obtención de la hidroxiapatita se evalúa su obtención y pureza a través de diferentes métodos como los siguientes:

- Espectrometría de absorción atómica
- Espectroscopía UV-Visible
- Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
- Difracción de rayos X
- Microscopía electrónica de barrido
- Espectroscopía por dispersión de energía de rayos

Propiedades de la hidroxiapatita

Se considera que la hidroxiapatita tiene la propiedad de **biocompatibilidad**, debido a que posee gran similitud físico-química con el tejido óseo. Pero, a su vez, se comporta como una **estructura osteoconductiva** que permite ser invadida por tejido conectivo proveniente del hueso circundante para posteriormente pasar a osificarse.

También tiene la propiedad de establecer intercambios químicos y formar enlaces con el tejido vivo, de manera que favorece el crecimiento del mismo y aumenta la proliferación celular de colágeno tipo I y secreción de osteopontina, lo que conlleva a eventos tempranos de osteointegración.

Posee propiedades de **remineralización**, el esmalte dental contiene cristales de hidroxiapatita compuestos por iones de calcio, fosfato e hidroxilo.

La hidroxiapatita ayuda directamente al proceso de remineralización mediante un proceso físico-químico que incluye la sobresaturación de iones en la solución con respecto al esmalte, la formación de núcleos y el crecimiento de cristales. Esto último obedece a la ganancia neta de material calcificado en la estructura dental, que reemplaza el que previamente se había perdido por desmineralización (17).

Posee propiedades **mecánicas** como rigidez y dureza. Además, su resistencia a la compresión oscila entre 20-500 MPa, y con la hidroxiapatita puede aumentar entre 400-500 MPa, lo que permite que los implantes dentales posean mejores propiedades mecánicas. Los componentes químicos de la hidroxiapatita, cuando es obtenida de forma natural, son el calcio y el fosfato, los cuales responden principalmente a la función remodeladora del hueso.

Los estudios han demostrado que la hidroxiapatita mejora la resistencia a la corrosión cuando esta es añadida a la aleación de magnesio, zinc e itrio. Esto se evaluó mediante pruebas electroquímicas e inmersión sin afectar sus propiedades mecánicas, las cuales fueron medidas por pruebas de tracción. La resistencia a la corrosión de esta aleación se debe a la formación de una capa superficial de calcio y fósforo y a una disminución de la fracción volumétrica de la fase LPSO (*long period stacking ordered*). Ambas son el resultado de la adición de hidroxiapatita (32).

Así mismo, se ha encontrado que el ion de selenita incorporado a la hidroxiapatita puede tener propiedades antibacterianas, osteoconductoras y anticancerígenas. Esto se debe a su potencia proteica y a la similitud en tamaño y forma al ion natural de hidroxiapatita. En este estudio se evaluó su actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Estafilococo aureus*, moderadamente alta contra *Salmonella enteritidis* e ineficaz contra *Pseudomonas aeruginosa* (33).

Recientemente se está investigando sobre un recubrimiento **antibacteriano y antiincrustante** en las superficies con hidroxiapatita con el fin de inhibir la adhesión bacteriana y la actividad a largo plazo (18).

Y como última propiedad, se le puede atribuir la **proliferación celular**, debido a que al agregar elementos como zinc, sílice y metal, estos permiten la inmovilización de su estructura, ya que actúan como “andamio” para esta proliferación celular (28).

A la matriz experimental de relleno óseo de esta investigación, se le va a agregar nanopartículas de plata. Al respecto, diferentes estudios indican que, al añadir el compuesto plata a la hidroxiapatita, aumenta su efecto bactericida, es decir, su actividad antibacteriana (16).

En el 2017, el estudio de Besinis, Hadi, Le, Tredwin y Handy confirma que la incorporación de nanocapas de plata, dióxido de titanio e hidroxiapatita inhibe exitosamente el crecimiento bacteriano de *Streptococcus SP* y lactobacilos. La incorporación de esta doble capa de plata e hidroxiapatita a los implantes de titanio crea una superficie con propiedades antibióticas sin comprometer la biocompatibilidad requerida para una oseointegración exitosa y neoformación ósea acelerada (34).

Un estudio sobre la evaluación de la actividad antimicrobiana de diferentes antibióticos como la ciprofloxacina y la tetracilina demuestran que la adición de plata e hidroxiapatita incrementa su potencial antibacteriano ante *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (33).

En esta investigación, es fundamental describir el rol de la cáscara del huevo para comprender su importancia. Al analizar la estructura de la cáscara del huevo debemos recordar su principal función: resguardar el desarrollo extrauterino de un embrión. En este sentido, los cristales de su interior deben ser pequeños para poder suministrar el calcio que requiere el embrión y la parte externa debe ser fuerte para soportar los golpes del medioambiente, por ende, los cristales externos son mayores. El embrión debe respirar, por lo que la estructura tiene poros a través de los cuales se comunica con el exterior; sin embargo, no pueden ser muy grandes para evitar la contaminación bacteriana. Además, la cáscara del huevo es fundamental, ya que contiene las proteínas internas; por ello, su integridad es vital. Así, una rotura resulta mortal para el embrión y elimina la posibilidad de consumo humano (35).

Composición de la cáscara de huevo

El 94 % de la composición de la cáscara de huevo de gallina es carbonato de calcio, el 1 % es fosfato de calcio y el 4 % constituye materia orgánica (35).

La resistencia de la cáscara del huevo depende del metabolismo mineral de la gallina, su genética, su alimentación y la temperatura ambiente donde se cría dicha ave (35).

Según la Organización Mundial de la Salud, el huevo es el elemento proteico de elección para la infancia. Además, la OMS señala que cada europeo consume 210 huevos al año y anualmente se producen 80 000 millones de huevos (35).

En el Perú, las cifras del Ministerio de Agricultura y Riego indicaron que el consumo per cápita de huevo es de 167 unidades anuales (21).

Según una revisión sistemática, publicada el 2017 en el *Journal of Periodontology*, (36) revela que la utilización de injertos óseos con una membrana reabsorbible disminuye la tasa de reabsorción horizontal reborde alveolar en un -2,19 mm con un intervalo de confianza del 95 % y la reabsorción vertical en un -1,72 mm con un intervalo de confianza del 95 %.

Otro estudio clínico e histomorfométrico, publicado en el *Journal of Periodontology*, (37) comparó los resultados de preservación del reborde óseo después de una extracción dental con injerto óseo y sin injerto óseo. Luego de 7 meses de seguimiento se observó que la reabsorción horizontal fue mayor en los rebordes que no recibieron injertos (4,3 mm) en comparación a los rebordes que sí recibieron injertos (2-5 mm). La altura de la creta alveolar vestibular disminuyó entre 3-6 +/-1,5 mm en la zona de extracción mientras que la altura en la zona con

injerto óseo disminuyó en 0,7 +/- 1,4 mm. La altura en la cresta alveolar lingual disminuyó en 0,4 mm para el grupo con injerto y disminuyó en 3 mm para el grupo de extracción.

Se realizaron 40 biopsias de los sitios experimentales 7 meses después del tratamiento, tanto del grupo con injerto como el grupo control. Las biopsias revelaron que en los sitios injertados había hueso trabecular altamente mineralizado y bien estructurado, mientras que en el grupo de extracción se evidenciaba mayor cantidad de tejido conectivo (37).

En dicho estudio se concluye que la conservación de cresta alveolar, a través del uso de xenoinjertos en combinación con una membrana de colágeno, limita significativamente la reabsorción ósea luego de la extracción dental en comparación a una extracción.

En el artículo titulado “Alveolar Bone Repair with Strontium Containing Nanostructured Carbonated Hydroxyapatite” 2018 (38) injertaron relleno de hidroxiapatita carbonatada nanoestructurada con sodio y estroncio al 5 %, como sustituto óseo, a 20 ratas Wistar machos, luego de la extracción del incisivo central superior derecho, que fueron separadas en dos grupos. Uno de ellos fue sacrificado a la primera semana y, el otro, a la sexta semana. Realizaron la evaluación mediante histomorfometría, Los resultados mostraron neoformación ósea en ambos grupos. A partir de esto se concluye que el biomaterial formado por hidroxiapatita, sodio y estroncio tiene propiedades biocompatibles, osteoconductores y bioabsorbibles, lo que indica su gran potencial para el uso clínico como sustituto óseo.

En el artículo titulado “Cytocompatibility and Biocompatibility of Nanostructured Carbonated Hydroxyapatite Spheres for Bone Repair” (39), publicado el 2015, tiene

como objetivo investigar *in vitro* e *in vivo* la respuesta de reparación ósea de una matriz a base de nanohidroxiapatita carbonatada y calcio. Para ello, utilizaron una muestra de 45 ratas Wistar, a las cuales se les extrajo los dos incisivos centrales superiores, un alveolo para el injerto y el alveolo contrario como grupo control. De esta muestra, 15 animales fueron distribuidos en tres grupos experimentales de n = 5 y sacrificadas en tres periodos: a los 7 días, a los 21 y a los 42 días. Se realizó el análisis histológico e histomorfométrico, el cual mostró un aumento significativo de neoformación ósea después de los 21 y 42 días. Al finalizar el estudio se concluyó que las esferas de hidroxiapatita inducen la osteoconductividad, son citocompatibles, e incitan a un aumento en la reabsorción y liberación de nanopartículas involucradas en la activación de la remodelación ósea, propiedades que debe presentar todo material de relleno.

II. HIPÓTESIS

La matriz experimental de relleno óseo a base de nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina más nanopartículas de plata presenta actividad antibacteriana, baja citotoxicidad y capacidad de neoformación ósea.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Evaluar una matriz experimental de relleno óseo a base de nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina y nanopartículas de plata.

III.2 Objetivos específicos

- Desarrollar una matriz experimental de relleno óseo a base de nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina y nanopartículas de plata.
- Determinar el efecto citotóxico (cc50) de la matriz experimental a base de nanohidroxiapatita obtenida de cáscaras de huevo de gallina con nanopartículas de plata frente a la línea celular MDCK.
- Determinar el efecto antibacteriano de la matriz experimental a base de nanohidroxiapatita más nanopartículas de plata sobre las cepas de: *Streptococcus goordonii*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*.
- Determinar y comparar la densidad ósea neoformada en alveolos tratados con una matriz de relleno óseo experimental a base de nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina y nanopartículas de plata utilizando la histomorfometría ósea en un modelo animal.

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Diseño de estudio

In vitro, Prospectivo, Longitudinal, Comparativo

IV.2 Objeto de Estudio

Esta parte ha sido dividida en 04 fases según los objetivos de la investigación:

- Fase 1: Desarrollo de una matriz experimental a base de nanohidroxiapatita a partir de cáscaras de huevo de gallina más nano partículas de plata.
- Fase 2: Evaluación de la citotoxicidad de la matriz experimental desarrollada utilizando un modelo *in vitro*.
- Fase 3: Prueba de susceptibilidad antibiótica *in vitro* y determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MCB) sobre bacterias orales *in vitro*.
- Fase 4: Determinación de la densidad ósea neo formada a través de la histomorfometría en un modelo animal.

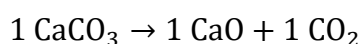
Fase 1: Desarrollo de una matriz experimental a base de nanohidroxiapatita a partir de cáscaras de huevo de gallina más nanopartículas de plata

Esta fase se realizó en el Laboratorio de Síntesis y Caracterización de Materiales del Centro de Investigaciones, Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM), de la Facultad de Ciencias Físicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

Síntesis de hidroxiapatita

La hidroxiapatita se sintetizó bajo el método sol-gel, descrito en el artículo de Ansari y colaboradores (2011) “Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite-Calcium Hydroxide for Dental Composites” (40).

La materia prima utilizada fue 6.476 gramos de cáscara de huevo de gallina (CaCO_3) lavada previamente con hipoclorito de sodio, la cual pasó por un proceso de calcinación a 850 °C por 3 horas en un horno tubular (Lenton, Hope Valley, Reino Unido), donde se obtuvieron 3.628 gramos de óxido de calcio (CaO) según la siguiente reacción:



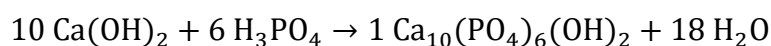
Esta, al ser suspendida en 1.166 mL de agua destilada en agitación magnética por 1 hora a 40 °C, se transformó en 4.794 gramos de hidróxido de calcio (Ca(OH)_2), según la siguiente relación molar:

$$m\{\text{CaO}\} = \frac{\overline{\text{PM}}.\{\text{CaO}\}}{\overline{\text{PM}}.\{\text{Ca}(\text{OH})_2\}} * m\{\text{Ca}(\text{OH})_2\}$$

Para llevar el hidróxido de calcio a una solución a 0.5 M, se agregó en el mismo paso anterior 129.403 mL de agua destilada adicional.

En paralelo se preparó otra suspensión de ácido fosfórico (H₃PO₄) a 0.3 M (Merck), colocando 2.677 mL del concentrado en 126.726 mL de agua destilada.

Una vez se tienen los dos precursores en solución, para la preparación de hidroxiapatita se siguió la siguiente reacción química:



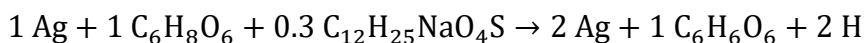
En una pera de decantación se colocó la solución de ácido fosfórico y se dejó caer gota a gota sobre la solución de hidróxido de calcio, la cual se mantuvo en agitación magnética a 200 rpm. Se utilizó hidróxido de amonio (NH₄OH) para regular el pH de la mezcla, el cual se ajustó desde un valor de 3.08 a 10.5 inmediatamente. La mezcla, que se transformó en gel, se mantuvo en agitación durante 2 horas. Luego, se dejó reposar/envejecer durante 24 horas a temperatura ambiente para finalmente filtrarse con agua destilada usando papel filtro Whatman grado 40.

El precipitado obtenido se secó en un horno eléctrico convencional a 120 °C durante 2 horas. Con el fin de propiciar la cristalización de los granos, la muestra fue sometida a un tratamiento térmico a 600 °C por 3 horas en un horno tubular (Lenton, Hope Valley, Reino Unido). Después se pulverizó manualmente haciendo uso de un mortero de ágata y luego se tamizó con una malla metálica de 325 *mesh* para obtener partículas menores a 40 μm. La cantidad de hidroxiapatita obtenida fue de 6.5 gramos aproximadamente.

Síntesis de plata

Las nanopartículas de plata se prepararon por el método de coprecipitación química. Para ello, se tuvo como base el artículo de Miranda y colaboradores (2010) “Silver-Hydroxyapatite Nanocomposites as Bactericidal and Fungicidal Materials” (41), pero con algunas variaciones.

Se utilizó 1000 gramos de cristales de nitrato de plata (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) para preparar una solución a 1 M a la que se añadió 5.887 mL de agua destilada. Aparte se disolvió en 50 mL de agua destilada 1.037 gramos de ácido ascórbico en polvo (HiMedia Laboratories, Mumbai, India), y 0.509 gramos de lauril sulfato de sodio (HiMedia Laboratories, Mumbai, India), como medio reductor y medio dispersante, respectivamente. La ecuación de reacción química fue la siguiente:



En una pera de decantación se colocó la solución de nitrato de plata y se dejó que goteara sobre el medio reductor que se mantuvo en agitación magnética a 200 rpm durante 1 hora.

El precipitado que se obtuvo se filtró con agua destilada usando papel filtro Whatman grado 40 y, posteriormente, se secó en un desecador al vacío durante 2 horas. La cantidad de nanopartículas de plata obtenida mediante este proceso fue de aproximadamente 0.5 gramos.

La mezcla de las nanopartículas de plata con la hidroxiapatita, obtenida anteriormente, se hizo con una proporción de 0.02 gr de plata más 0.03 gr de hidroxiapatita.

Fase 2: Evaluación de la citotoxicidad de la matriz experimental desarrollada utilizando un modelo *in vitro*

La citotoxicidad de la matriz de relleno óseo experimental de hidroxiapatita obtenida de la cáscara de huevo de gallina se realizó mediante la prueba cc50, que se caracteriza por la concentración de una sustancia que disminuye la viabilidad de sus células a un 50 % y fue determinada utilizando la prueba colorimétrica basada en la reducción de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT) por las enzimas mitocondriales.

Esta prueba *in vitro* fue realizada en el Instituto de Investigación Nutricional para evaluar los efectos tóxicos del compuesto sintetizado (nanohidroxiapatita y nanopartículas de plata). Para ello, se utilizaron como modelos experimentales líneas celulares de mamíferos, como la Madin Darby Canine Kidney (MDCK), las cuales son respaldadas por la American Type Culture Collection (ATCC).

La prueba fue realizada en una microplaca para cultivo celular de 96 pocillos estéril (8 mm de diámetro; Falcon Plastics, Oxnard, CA).

En cada pocillo se cultivaron 1×10^4 células/pocillo en 200 μ L de medio. Las muestras fueron incubadas a una temperatura de 37 °C en una atmosfera húmeda al 5 % de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente, se procede a adicionar el compuesto de nanohidroxiapatita sola, nanohidroxiapatita con nanopartículas de plata y nanopartículas de plata sola a diferentes concentraciones, las cuales oscilan en un rango de 10 a 800 μ g/mL.

Adicionalmente, se tuvo un ensayo control positivo de viabilidad celular (medio de cultivo, pero sin ningún tipo de compuesto). Posteriormente, el cultivo fue incubado a 37 °C durante seis días.

Transcurrido el tiempo se procedió a adicionar 20µL de solución de MTT (3mg/mL en PBS 1X) a cada pocillo. Las muestras fueron incubadas por tres horas a 37 °C. El medio fue cuidadosamente removido y se obtuvieron los cristales que fueron disueltos con 200µL DMSO (dimetilsulfóxido).

Fase 3: Prueba de susceptibilidad antibiótica *in vitro* y determinación de la mínima concentración inhibitoria (MIC) y mínima concentración bactericida (MCB) sobre bacterias orales *in vitro*.

Prueba de susceptibilidad antibiótica *in vitro*

Para esta prueba se aplicó el método Kirby-Bauer (disco difusión en agar).

Las cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

- *Streptococcus gordonii* ATCC 51656
- *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953
- *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

Se contó con dos medios de cultivo:

Medio sólido

- Agar infusión cerebro corazón (BHA)
- Agar infusión cerebro corazón (BHA) suplementado con sangre de caballo (5 %), hemina (5 mg/L) y menadiona (1 mg/L)
- Agar infusión cerebro corazón (BHA) suplementado con sangre de carnero (5 %), hemina (5 mg/L) y menadiona (1 mg/L)

Medio líquido

- Caldo/infusión cerebro corazón (BHI)

La incubación fue en anaerobiosis (10 % H₂, 10 % de CO₂ y N₂ en equilibrio) a una temperatura de 37°.

PROCEDIMIENTO

- Se procedió a pesar 0.06 gramos de nanopartículas de hidroxapatita y 0.04 gramos de nanopartículas de plata, los cuales estaban debidamente esterilizados por rayos UV para su aplicación.
- **Preparación de las placas.** Se prepararon placas con agar cerebro corazón (BHA) para las cepas *Streptococcus gordonii*, placas de BHA suplementadas con sangre de carnero para *Fusobacterium nucleatum* y un tercer grupo de placas con BHA con sangre de caballo para *Porphyromonas gingivalis*, las cuales fueron controladas por veinticuatro horas para comprobar la esterilidad.
- **Preparación del inóculo.** Las tres bacterias fueron cultivadas a partir de una colonia en 7 mL de caldo cerebro corazón infusión (BHI). Así, *S. gordonii* y *F. nucleatum* se cultivaron por veinticuatro horas y *P. gingivalis*, por 15 días de incubación a 37 °C en condiciones de anaerobiosis. Luego, se calibró la turbidez (crecimiento bacteriano) con caldo BHI estéril a cada cepa a una escala de Mac Farland de 0.5.
- **Enfrentamiento.** Se realizó embebiendo un hisopo con el inóculo anteriormente preparado. Después se procedió a sembrar en la superficie del agar cuatro veces. Se dejó reposar por cinco minutos para luego colocar

material de hidroxiapatita y controles sobre el agar sembrado. Este procedimiento fue repetido por seis veces en dos fechas distintas.

- **Incubación.** *S.gordonii* y *F. nucleatum* se incubaron por 48 horas y *P. gingivalis*, por 15 días en condiciones de anaerobiosis a 37 °C.
- **Distribución de los compuestos.** Los compuestos fueron clasificados de la siguiente manera:
 - Grupo 1: matriz experimental de hidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina
 - Grupo 2: nanopartículas de plata
 - Grupo 3: nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina con nanopartículas de plata
 - Grupo 4: hidroxiapatita comercial (marca GenPhos HA TCP - Baumer, Sao Paulo, Brasil).
 - Grupo 5: grupo control con clorhexidina al 0.12 %

Determinación de la mínima concentración inhibitoria (MIC) y mínima concentración bactericida (MCB) sobre bacterias orales *in vitro*.

Definida como la concentración más baja de una sustancia que puede prevenir el crecimiento de un organismo o llegar a matarlo (61). El medio de cultivo elegido fue el de infusión cerebro corazón (BHI), el cual se tuvo en incubación por anaerobiosis (10 % H₂, 10 % de CO₂ y N₂ en equilibrio) a una temperatura 37 °C.

La cepa fue proporcionada por el Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia: *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953.

Procedimiento

- **Preparación de placas.** Se utilizó la técnica de la *dilución en agar* donde se prepararon tubos con la concentración definida de antibiótico (nanopartículas de plata, hidroxiapatita) y se le agregó a cada tubo 20 ml de agar BHA. Este tubo se homogenizó y se vertió su contenido en una placa Petri vacía estéril. Luego, se dejó solidificar a temperatura ambiente con lo que obtuvo una placa de BHA con las nanopartículas diluidas a partir de concentraciones obtenidas por diluciones dobles desde 128 ug/ml (64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.06, 0.03 ug).
- **Inóculo.** Se empleó un inóculo de *F. nucleatum*, que se cultivó a partir de una colonia en un tubo de 7 ml de caldo BHI, el cual fue incubado por 24 horas a 37 °C en condiciones de anaerobiosis. Luego, se calibró a través de un medio estéril a una escala de McFarland 0.5 para posteriormente sembrar 100 ul de este cultivo en cada placa de agar BHA y el antimicrobiano a modo de prueba (nanopartículas de plata e hidroxiapatita) con ayuda del asa de digralsky.
- **Incubación.** Todas las placas se incubaron en la estufa a 37 °C en condiciones de anaerobiosis por 48 horas.

Fase 4: Determinación de la densidad ósea neo formada a través de la histomorfometría en un modelo animal

Se trabajó una prueba preliminar con 15 ratas albinas machos de raza Holtzman de la misma camada, entre 2 y 3 meses de edad, con un peso vivo inicial aproximado

de 250-300 gramos. La adquisición se hizo en el bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, el cual se encuentra acreditado y otorga los certificados de sanidad de los modelos animales.

Se utilizaron 30 alveolos dentales correspondientes a las primeras molares superiores. Asimismo, se determinó que la hemiarcada derecha sea el grupo experimental y la hemiarcada contralateral izquierda fuera el grupo control en un mismo modelo animal.

Unidad de muestra. Alveolos de primera molares superiores derecha e izquierda de ratas albinas machos de raza Holtzman.

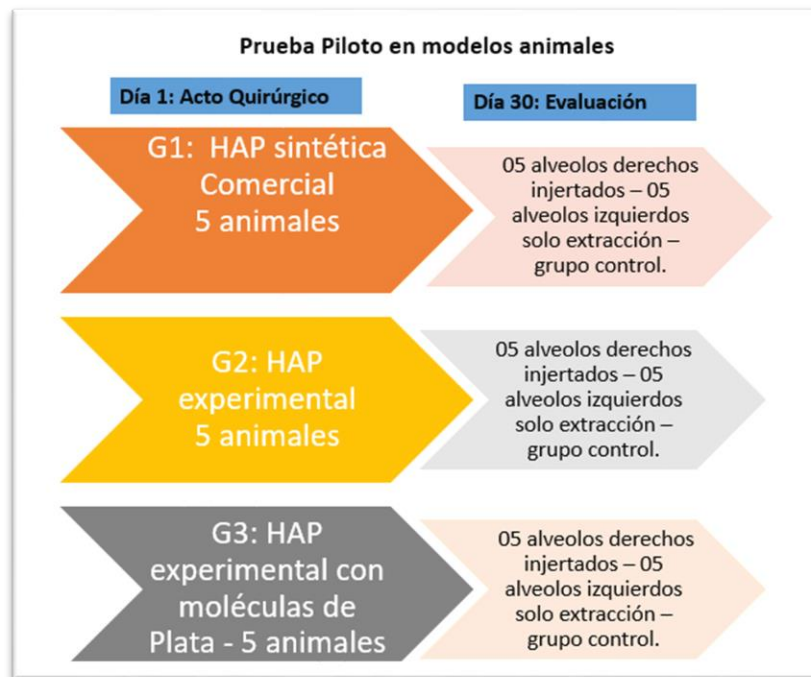
Unidad de análisis. Densidad ósea neoformada en tercio apical del alveolo injertado y el alveolo control a través de cortes histológicos.

Distribución de los grupos de estudio

La muestra se dividió en 3 grupos, con 5 animales por grupo:

- El primer grupo estuvo conformado por 5 modelos animales. A este grupo se le injertó la hidroxiapatita sintética comercial.
- Al segundo grupo se le injertó la matriz de relleno óseo experimental solo a base de nanohidroxiapatita extraída de la cáscara de huevo de gallina.
- Al tercer grupo se injertó la matriz de relleno óseo experimental a base de nanohidroxiapatita tomada de la cáscara de huevo de gallina más nanopartículas de plata.

Fig. 1 Distribución de los grupos de estudio y grupos controles experimentales en modelos animales



Tamaño de la muestra

El cálculo de muestra se basó en el principio de las tres R propia de la investigación en animales: remplazo, reducción y refinamiento de los animales de laboratorio, en concordancia con la National Center for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Reserch (42) y respetando las normas de la International Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care: reemplazar los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, reducir su número cuando sea necesario utilizarlos y refinar las técnicas para aminorar su sufrimiento.

Se revisaron diferentes artículos para determinar el tamaño de la muestra. En el artículo base “Cytocompatibility and Biocompatibility of Nanostructured Carbonated Hydroxyapatite Spheres for Bone Repair” (39) se usaron 45 modelos

animales. En “Alveolar Bone Repair with Strontium Containing Nanostructured Carbonated Hydroxyapatite” (38) se usaron 20 animales. En “Effect of Doxycycline-Treated Hydroxyapatite Surface on Bone Apposition: A Histomophometric study in murine maxillae” (43) se usaron 20 animales. En “A Doxycycline-treated Hydroxyapatite Implant Surface Attenuates the Progression of Peri-Implantitis: A Radiographic and Histological Study in Mice” (44) se usaron 20 animales. En “Microspheres of Alginate Encapsulated Minocycline-loaded Nanocrystalline Carbonated Hydroxyapatite: therapeutic potential and effects on bone regeneration” se usaron 20 animales (45).

En los artículos antes mencionados se utiliza un número mínimo entre 20 y 45 modelos animales. En primer lugar, para esta investigación, se solicitó al Comité de Ética Animal de la UPCH una muestra de 45 modelos animales, pero dicha solicitud fue denegada y recomendaron realizar estudios previos *in vitro*. En segundo lugar se envió el levantamiento de observaciones al Comité de Ética Animal de la UPCH, con lo cual se obtuvo el permiso para trabajar con 5 animales por grupo de trabajo, que conformaron un total de 15 animales.

Al ser una investigación experimental pura, de tipo no probabilístico, el tamaño de la muestra ha sido determinado de manera intencional. Para ello, se ha hecho uso de una prueba preliminar de 15 unidades con 30 alveolos, que cumple las recomendaciones de buenas prácticas en el diseño y análisis de estudios preliminares, tomada del artículo “Design and Analysis of Pilot Studies: Recommendations for Good Practice”(46). En este se señala que los estudios experimentales nuevos deben presentar las siguientes características: contar con estudios preliminares, cuyo objetivo principal es brindar un rigor metodológico a la

investigación; determinar los datos iniciales para obtener resultados primarios con el fin de orientar o guiar la metodología; conocer los instrumentos y calcular un tamaño de muestra significativo para luego poder replicarlo en un estudio mayor. De estos 15 modelos animales, todos los alveolos de las molares del lado derecho fueron injertados con una matriz de relleno óseo, y todos los alveolos izquierdos fueron tomados como grupo control, de manera que solo se realizó la extracción sin injerto.

Criterios de inclusión

Para modelos animales

- Ratas albinas machos de raza Holtzman con buen estado de salud
- Ratas albinas machos de raza Holtzman de la misma camada
- Contar con los primeros molares superiores íntegros
- Edad: 2-3 meses
- Peso vivo inicial aproximado: 250-300 gramos

Para especímenes de cortes histológicos

- Cortes que estén ubicados en el tercio apical del alveolo injertado y el alveolo control
- Secciones histológicas de 4 micras

Para especímenes de cortes histológicos

- Cortes que no estén ubicados en el tercio apical del alveolo injertado y alveolo control
- Secciones histológicas de más de 4 micras

Luego de obtener el permiso correspondiente del Comité Institucional de Ética para el uso de animales de la UPCH, se realizó un estudio preliminar para determinar la viabilidad del análisis histomorfométrico y medir la densidad ósea neoformada.

Se adquirieron 15 ratas macho Holtzman de la misma camada de 2 a 3 meses aproximadamente con 250-300 gramos de peso vivo.

Se utilizó como artículo base “Cytocompatibility and Biocompatibility of Nanostructured Carbonated Hydroxyapatite Spheres for Bone Repair” (39) publicado en el *Journal Applied Oral Science*, catalogada como una revista Q2.

Preoperatorio

Se hospedó a los modelos animales en el Bioterio UPCH, pero respetando su periodo de aclimatación de 15 días antes y manteniendo los estándares de calidad requeridos del medioambiente, la humedad estandarizada a un 40-70 %; temperatura a 22 °C; alimentación específica para ratas (Alimento Balanceado La Molina, adquirido en la Facultad de Zootecnia de la Universidad Agraria) y agua embotellada a demanda. Cada animal por separado estaba alojado en una jaula con bebedero individual. Los animales fueron retirados de su jaula casa y llevados al ambiente quirúrgico de forma habitual para disminuir la angustia.

Se realizó la codificación de cada modelo animal y se creó su ficha de identificación (Anexo 01), la cual fue debidamente llenada durante cada intervención quirúrgica.

Se tuvo en cuenta la preparación de los animales un día previo a la cirugía, y se les retiró el agua y la alimentación 12 horas antes de la intervención (47).

Manejo Quirúrgico

Se contó con un médico veterinario especialista en animales exóticos, quien controló a dichas especies desde el inicio de la cirugía hasta que estén totalmente recuperados.

Los animales fueron codificados y separados en 3 grupos experimentales:

- Grupo 1: grupo conformado por 5 animales, que recibieron la hidroxiapatita sintética comercial GenPhos HA TCP – Baumer (Sao Paulo, Brasil).
- Grupo 2: grupo conformado por 5 animales, que recibieron la matriz experimental a base de hidroxiapatita tomada de la cáscara de huevo de gallina.
- Grupo 3: grupo conformado por 5 animales, que recibieron la matriz experimental a base de hidroxiapatita tomada de la cáscara de huevo de gallina más nanopartículas de plata.

Primero se tomó el peso inicial de cada modelo animal y luego se indujo a sedación ligera con Xylacina mg/kg, luego se indujo al plano quirúrgico con Ketamina (Dormixil 2-5mg/kg y Keta A 100 a 40mg/kg respectivamente) vía intramuscular. Antes de iniciar el procedimiento se comprobó la efectividad del protocolo comprobando las constantes fisiológicas y la respuesta de los reflejos oculares y táctiles.

Acto quirúrgico

El equipo quirúrgico estuvo conformado por un médico veterinario especialista en animales exóticos, quien controló en todo momento a los animales, antes, durante y después del acto quirúrgico; un cirujano dentista especialista en periodoncia con experiencia en microcirugía; una Ph. D. cirujano dentista, especialista en Ciencias Odontológicas y manejo de modelos animales y la investigadora principal.

Se confeccionó una mesa quirúrgica con un ligero plano inclinado hacia el operador, con ligas de derecha a izquierda en la zona torácica para poder sostener e inmovilizar de forma adecuada al animal, y una liga en la zona superior de la cabeza del animal para sostener el maxilar y mantener la boca abierta para ayudar al operador.

Los 15 modelos animales fueron intervenidos el mismo día, y se consideró ese día como el día 1. Los pasos del acto quirúrgico fueron los siguientes:

- Se realizó una asepsia extraoral con yodo polividona al 10 % (Isodine).
- Se aplicó anestesia local infiltrativa con lidocaína 1.8 ml al 2 % con epinefrina 1:80,000 (Xilocaína) con cárpule y aguja corta.
- Se realizó la extracción de los primeros molares superiores derechos e izquierdos con instrumental quirúrgico periodontal. Para ello, se utilizó un cincel quirúrgico marca Ochsenbein de acero inoxidable de 16 cm de longitud indicado para extirpar hueso y modificar contornos óseos, y también se hizo uso de un explorador y un fórceps pediátrico.
- Se procedió a pesar 0.03 gramos de nanopartículas de hidroxiapatita y 0.02 gramos de nanopartículas de plata. Estos estaban debidamente esterilizados por rayos UV y se mezclaron en un vaso dappen previamente esterilizado. El vehículo fue suero fisiológico.
- Se injertaron todos los rellenos óseos en los alveolos derechos y fueron suturados con seda quirúrgica reabsorbible 7 ceros, indicada para cirugías oftálmicas.

- Todos los alveolos izquierdos fueron suturados de la misma manera y considerados en el grupo control.

Finalizado el procedimiento quirúrgico se procedió a colocar Yohimbina (dosis: 1mg/kg) vía intramuscular para revertir el efecto de la sedación. Durante todo el procedimiento se monitoreó la frecuencia cardiaca y la respiratoria de cada modelo animal.

Posoperatorio

Luego de la intervención se llevó a cada modelo animal a su jaula casa, la cual estaba debidamente codificada. Se procedió a moler la comida con un poco de agua y dejarlo tipo puré para su alimentación blanda por tres días. Asimismo, el agua se brindó según su demanda y luego de los tres días volvieron a comer los alimentos sólidos sin inconvenientes (47).

Los animales fueron debidamente cuidados y supervisados por personal calificado: el técnico en veterinaria, el médico veterinario y la investigadora. Se revisó el peso de los animales posteriormente a la intervención y se observó que este siempre fue en aumento.

Protocolo de sacrificio

A los modelos animales se les aplicó la eutanasia empleando un protocolo, el cual fue sugerido por la Asociación Americana de Médicos Veterinarios (AVMA), que se encuentra registrado en *The AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals* (2020) (48). Dicho protocolo sugiere una sedación profunda con barbitúricos como el pentobarbital (Halatal®) (50 mg/kg) vía intravenosa, que produce una rápida inconciencia. Luego de unos minutos y corroborando el estado de inconciencia del

animal se colocó el agente eutanásico T61® (2ml/animal) de aplicación intracardiaca, lo que provocó un paro cardiorrespiratorio a los pocos segundos.

Los grupos modelos fueron clasificados y codificados desde el inicio. Asimismo, la evaluación se realizó a los 30 días de injertado mediante estudios histomorfométricos óseos.

Disección Maxilar

Se corroboró la muerte de los animales y se procedió a realizar la disección completa del maxilar con una hoja de bisturí número 11 en mango n.º 3, tijeras de cirugía, pinzas rectas, pinzas curvas, equipo de disección. Primero, se procedió a decapitar al modelo, y luego se levantó la piel y se retiraron los músculos adyacentes, para lo cual se utilizaron hojas nuevas en cada modelo animal. Las muestras se codificaron y colocaron en formol al 10 %. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Patología Bucomaxilofacial de la UPCH para el debido procesamiento. Al respecto, en el Anexo 02, se puede ver el proceso del estudio preliminar en modelos animales.

Enmascaramiento

Se procedió a codificar las muestras. Para ello, solo el investigador principal contaba con la identificación de cada modelo animal, de tal manera que tanto el personal técnico de laboratorio como el asesor temático, el que apoyó en la lectura de las láminas, no conocían de qué alveolo era cada muestra con la finalidad de evitar sesgos en la lectura.

Estudio histomorfométrico

El procedimiento fue realizado por un técnico especialista con experiencia en el proceso de fijación, inclusión, corte, coloración y anclaje de muestras histológicas en el Laboratorio de Patología Bucomaxilofacial de la UPCH.

Para ello, se utilizó la técnica histológica básica (49). Los cortes de los dos alveolos intervenidos fueron en sentido vertical y se analizó el tercio apical de cada uno.

La fijación fue realizada con formaldehído al 10 % por 48 horas. Después pasó por el proceso de descalcificación en ácido nítrico por 16 horas. Luego, se realizó la inclusión deshidratando las muestras en alcohol al 70 %, 80 %, 90 % y alcohol absoluto por una hora. Las muestras fueron incluidas en bloques de parafina por proceso de infiltración por varias horas entre 45° y 60° de temperatura.

Los cortes fueron realizados de forma manual con un micrótopo en el laboratorio y las secciones histológicas fueron de 4 micras. Las muestras fueron coloreadas con hematoxilina eosina, lavadas en agua destilada, deshidratadas en soluciones crecientes de etanol, aclaradas en xileno y cubiertas con el cubreobjetos (49).

Para el análisis histomorfométrico, las secciones histológicas fueron observadas en un microscopio de luz multicabezal a 10X también en el Laboratorio de Patología Bucomaxilofacial de la UPCH. Dichas observaciones fueron realizadas por un histólogo experto en el área, el Mg. CD Carlos Espinoza Montes, especialista en patología y medicina oral y maxilofacial.

Se colocó en el lente ocular del microscopio un disco micrométrico con una gradilla de 100 por 100/10000 cuadrados, que permitió estimar el área de los componentes de la reparación por conteo diferencial de cruces. Se procedió a tomar fotografías del mismo ocular del microscopio.

Los modelos fueron debidamente codificados y se usó la estrategia del cegamiento tanto para el técnico como para el especialista en histología.

Análisis de densidad ósea

Las imágenes obtenidas fueron delimitadas y recortadas por el programa Paint y fueron introducidas al programa de procesamiento de imagen digital IMAGE J. Este es un programa de dominio público desarrollado en el National Institutes of Health (50).

Este software permite realizar análisis morfométricos y densitométricos de las imágenes capturadas a través de la densitometría óptica. Esta es una técnica que permite medir la cantidad de luz que absorbe un material. En histología permite determinar cuantitativamente la presencia o ausencia de células.

El primer paso es delimitar el área de la imagen a medir a través del programa Paint y se guarda la imagen con un nombre o código específico. Se abre el software Image J. y se elige la imagen a trabajar. Después, se selecciona la opción Analizar y luego la de Establecer medidas, con la cual se activa la medición de “área”. Automáticamente, el software arroja el área total en micras. Al obtener el área total elegimos de forma secuencial las opciones Imagen - Ajustar - Segmentación de color. Cuando se activa esta opción se abre una ventana donde podrás calibrar el tono, la saturación y el brillo de la imagen seleccionada. Una vez calibrada e identificada el área a medir, se selecciona y se obtiene el área de cobertura y se finaliza en el botón Analizar medida.

Luego de obtener la medición del área total y el área de cobertura, se procede a transpolar los datos a una tabla de Excel y se calculan los porcentajes de densidades. Al respecto, en el Anexo 03, se presenta un ejemplo de visualización del *software*.

IV.3 VARIABLES

Variables independientes

a) Matriz de relleno óseo

Definición conceptual: biomaterial utilizado para la regeneración ósea con funciones mecánicas y biológicas. **Definición Operacional:** matriz experimental a base de hidroxiapatita tomada de cáscara de huevo de gallina con nanopartículas de plata. **Indicador:** caracterización del producto. **Tipo:** cualitativo politómico.

Escala de medición: nominal. **Valores:** Se le va a dar la nominación de 1 = matriz experimental de relleno óseo a base de hidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo pura, 2 = matriz experimental de relleno óseo a base de hidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo con nanopartículas de plata y 3 = matriz de hidroxiapatita sintético comercial.

b) Citotoxicidad

Definición conceptual: evaluación de sustancias que son tóxicas para las células.

Definición operacional: capacidad de la hidroxiapatita obtenida de la cáscara de huevo de gallina para medir la viabilidad celular. **Indicador:** se va a utilizar el ensayo de viabilidad celular por reducción de compuestos MTT, mediante la turbidez del color de la reacción celular. **Tipo:** Cuantitativo. **Escala:** Razón continua. **Valores:** CC50 ug/ml.

Variable dependiente

a) Neoformación ósea

Definición conceptual: proceso natural de regeneración del tejido óseo, en donde intervienen diferentes células como osteoclastos, osteoblastos y osteocitos.

Definición Operacional: densidad, definida como el área total de nuevo hueso

formado. **Indicador:** mediante histomorfometría de las trabéculas óseas neoformadas en el tercio apical del alveolo. **Tipo:** cuantitativa continua. **Valores:** en porcentaje del 0 al 100 %.

b) Actividad antimicrobiana

Definición Conceptual: propiedad de eliminar microorganismos o inhibir su crecimiento, tales como bacterias, hongos o parásitos. **Definición operacional:**

propiedad de eliminar o inhibir el crecimiento de los microorganismos presentes, enfermedad periodontal y gingivitis, como *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus gordonii* y *Fusobacterium nucleatum*. **Indicador:** el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano. **Tipo:** cuantitativa continua. **Escala:** de razón. **Valores:** en milímetros.

En el Anexo 04 se encuentra el cuadro de Operacionalización de variables.

IV.4 Consideraciones éticas

La presente investigación fue realizada respetando todas las normas y protocolos establecidos para el uso de animales. Dichas reglas han sido establecidas en los siguientes documentos:

- Declaración Universal de los Derechos del Animal - UNESCO - ONU (51).
- Ley N.º 11.794-2008 del Estado brasilero que establece los procedimientos para el uso científico de animales (52).

- Manual del laboratorio universitario de uso de animales de la Universidad de California - USA, la cual se encuentra acreditada y mantiene los protocolos otorgados por la Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC), organización internacional que promueve el tratamiento humano de los animales en la ciencia (53).
- Revisión de la Legislación del Consejo Nacional de control de experimentación animal CONCEA - Brasil; el cual indica que cinco animales por cada grupo es el mínimo para realizar la prueba estadística de normalidad sin perder la precisión del análisis estadístico (54).
- *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* - Octava edición. Washington, 2011 (55).

Este estudio fue presentado al Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Privada Cayetano Heredia y aprobado por el mismo comité con número de constancia 200-03-19. Finalmente, esta investigación ha sido registrada y aprobada por la Dirección de Postgrado Víctor Alzamora Porras de la UPCH.

IV.5 Plan de análisis

La viabilidad celular fue calculada como el porcentaje de la absorbancia obtenida en cada pocillo de células tratadas sobre el control de células no tratadas. La valoración de absorbancia fue medida en un lector de ELISA (570 nm) marca Biorad. El cc50 fue determinado utilizando un programa de computadora Pharm/PCS.

Los resultados se expresan como porcentaje (%) de viabilidad de las células vivas, según la siguiente relación:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{D. O. de las células tratadas} \times 100}{\text{D. O. de las células controles}}$$

Donde D. O.: densidad óptica

A partir de ello, se calcula la concentración que produce la reducción de la viabilidad celular en un 50 %.

El análisis de la prueba de susceptibilidad antibiótica se dio mediante la Prueba de Kruskal Wallis y Posttest de Dunn para comparar los grupos experimentales e identificar las diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados histomorfométricos de la neoformación ósea y su comparación entre los tres injertos propuestos en este estudio con su respectivo control fueron analizados estadísticamente con el programa SPSS® versión 16.0 para Windows

Se determinaron las estimaciones con un intervalo de confianza del 95 % y una significancia estadística de 0.05.

Con respecto a la estadística descriptiva, la variable *neoformación ósea*, variable cuantitativa, fue obtenida por el análisis histomorfométrico con el software Image J. Asimismo, la exploración y descripción de estos datos para efectos comparativos se obtuvieron a partir de medidas estadísticas de tendencia central como media, mediana, límites de intervalo al 95 % y medidas de dispersión como desviación estándar, varianza, valores máximos y mínimos.

Para la comprobación de supuestos estadísticos como normalidad, se procedió a realizar la prueba Shapiro Wilk, la cual fue corroborada a partir de histogramas que mostraron la distribución de los datos. Al contar con un tamaño de muestra limitado por grupo, se asumió que no existe una distribución normal, lo cual se evidencio en los histogramas.

En el presente estudio se realizó un **análisis cuantitativo** para la comparación de la variable *neoformación ósea*. Según los grupos de estudio se utilizó la Prueba de Kruskal Wallis y, asimismo, se realizó la comparación de neoformación ósea de cada uno de los grupos experimentales con su propio control a través de la prueba U de Mann Whitney.

A su vez se realizó un **análisis cualitativo** con una tabla de contingencia a través de la cual se trabajó con las frecuencias. Tomando en cuenta que la muestra fue limitada, no se pudo aplicar el supuesto estadístico de Chi cuadrado (χ^2), ya que las frecuencias esperadas eran menores a 5; por lo tanto, se procedió a aplicar la prueba exacta de Fisher.

V. Resultados

Los resultados de esta investigación se han obtenido en cuatro fases y han sido desarrolladas al interior de diferentes laboratorios: Laboratorio de Síntesis y Caracterización de Materiales de la UNMSM, laboratorios de microbiología, Laboratorio de Investigación y Desarrollo UPCH, y Bioterio de la UPCH.

- **Fase 1: Síntesis y caracterización de la matriz experimental ósea**

Se logró sintetizar nanohidroxiapatita a partir de cáscara de huevo de gallina y se logró sintetizar nanopartículas de plata en el laboratorio.

Mediante la técnica de difracción de rayos X se pudo identificar el patrón de cada uno de los compuestos obtenidos en el laboratorio. Esta técnica permite la identificación de fases cristalinas siempre que tengan una estructura ordenada y periódica.

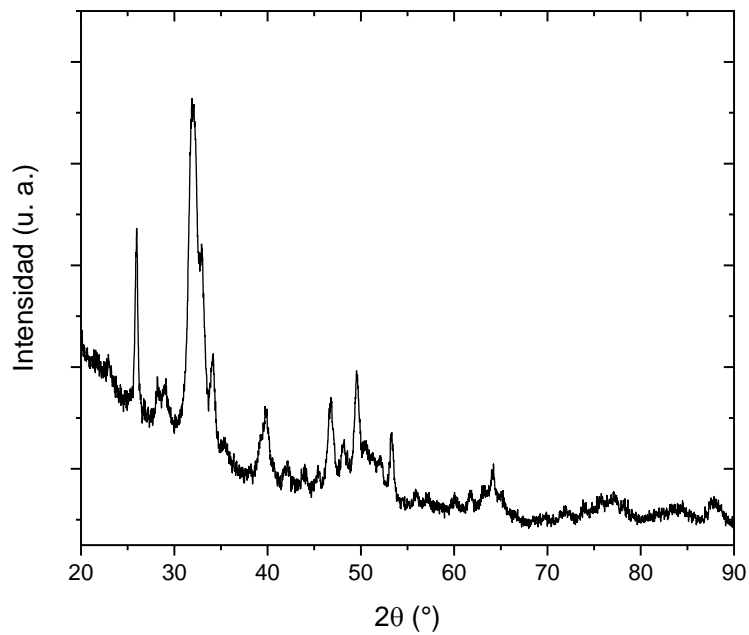
Esta prueba se realizó en el mismo laboratorio del CITBM con un difractómetro de rayos X D8 Focus (Bruker GmbH, Karlsruhe, Alemania), en un rango angular de 20° a 90° y un tubo de rayos X de cobre ($\lambda_{K\alpha 1}=1.5406 \text{ \AA}$).

Los resultados de las lecturas fueron los siguientes:

Al realizar la comparación del difractograma de la Figura 2 con la base de datos ICDD-2003 (51), se pudo determinar que el patrón arrojado tiene todos sus picos correspondientes a la hidroxiapatita (ficha JCPDS-PDF N.º 009-0432). También se

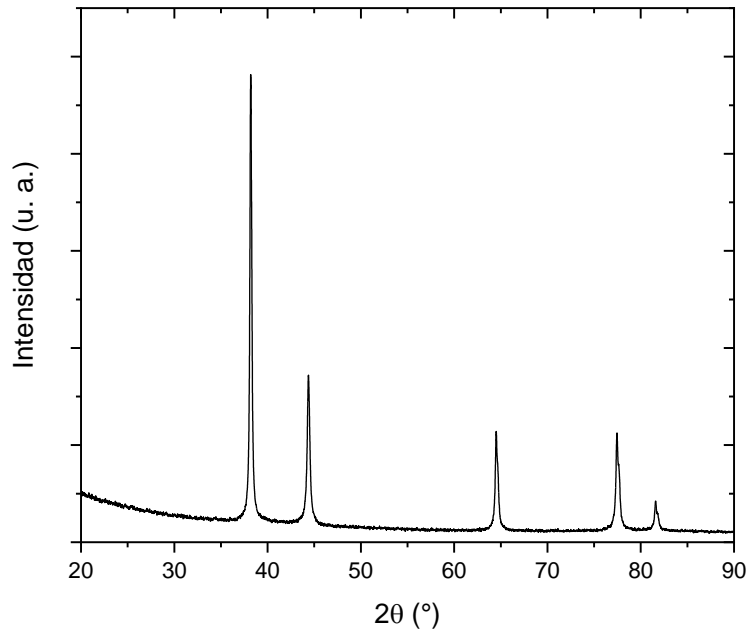
puede observar que el ancho de los picos es considerable, lo que nos demuestra que el tamaño de grano de la hidroxiapatita es nanométrico.

Fig. 2. Difractograma de nanohidroxiapatita a base de cáscara de huevo de gallina.



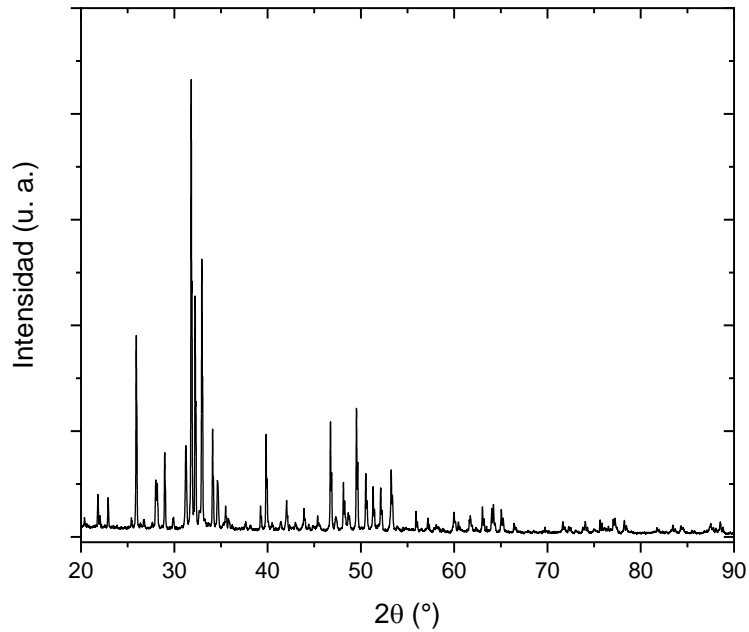
Por otro lado, las nanopartículas de plata arrojaron un difractograma con picos bien definidos (Figura 3), los cuales corresponden un compuesto de plata metálica pura. La ficha patrón JCPDS-PDF es la N.º 004-0783 de la base de datos ICDD-2003 (56).

Fig. 3. Difractograma de nanopartículas de plata



Para esta investigación se adquirió una hidroxiapatita sintética comercial de la marca GenPhos HA TCP (Baumer, Sao Paulo, Brasil) compuesta por 70 % de hidroxiapatita y 30 % de fosfato tricálcico, en un rango de tamaño de partículas de 0.5 mm a 0.75 mm, según el fabricante. El difractograma de este material se muestra en la Figura 4.

Fig. 4. Difractograma de GenPhos HA-TCP



Al realizar el análisis con la base de datos ICDD-2003 (51) se identificaron dos fases cristalinas en este material: hidroxiapatita (ficha JCPDS-PDF N° 009-0432) y whitlockita (ficha JCPDS-PDF N° 009-0169). Cabe resaltar que los picos de ambos compuestos son muy finos, lo que nos hace pensar que se trata de fases bien cristalizadas.

Con el fin de tener más información de los compuestos estudiados, con los difractogramas obtenidos, se realizó un procedimiento conocido como refinamiento Rietveld (52), con el cual se simula un difractograma teórico en base a la información cristalográfica de los compuestos identificados y se ajusta al difractograma experimental. Se realizó este procedimiento para obtener el tamaño de grano y el porcentaje de fases en cada material evaluado. El resultado obtenido evidenció que las partículas de la hidroxiapatita experimental son realmente

nanométricas ($\langle D \rangle$ 30nm) en comparación con el diámetro de partículas de hidroxiapatita comercial ($\langle D \rangle$ 245nm). Los resultados se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros cristalográficos obtenidos del refinamiento Rietveld a las muestras de hidroxiapatita, nanopartículas de plata y GenPhos HA-TCP

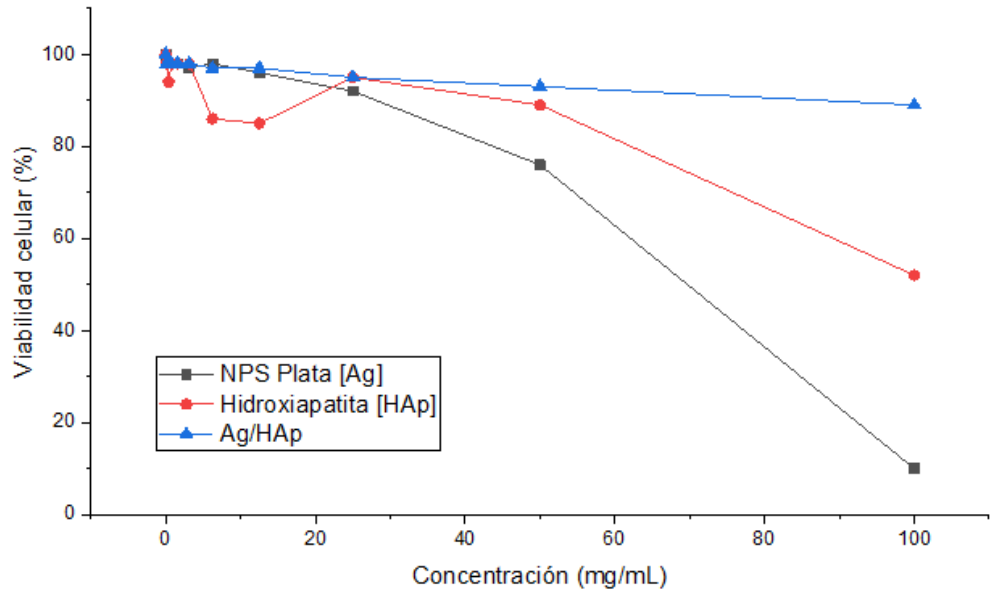
	% fases	$\langle D \rangle$
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – 100 %	30 nm
Nanopartículas de plata	Ag – 100 %	108 nm
GenPhos HA-TCP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – 75 %	245 nm
	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – 25 %	117 nm

- **Sobre efecto citotóxico (cc50)**

El gráfico de citotoxicidad (Gráfico 01) muestra que la plata alcanza su cc50 a 78 mg/ml; la hidroxiapatita sola, a 90 mg/ml, y la mezcla de ambas a 93 mg/ml.

Se concluye que la mezcla de la matriz experimental de hidroxiapatita, obtenida de cáscara de huevo de gallina, más nanopartículas de plata no son tóxicas para las células en una concentración menor a 100 mg/ml. Por lo tanto, sí las podemos utilizar en animales.

Gráfico 01: Gráfico de citotoxicidad



- **Fase 2: Sobre prueba de susceptibilidad antibiótica *in vitro* y determinación de la mínima concentración inhibitoria (MIC) y mínima concentración bactericida (MCB) sobre bacterias orales *in vitro***

Sobre prueba de susceptibilidad antibiótica *in vitro*

Luego de realizar los cultivos correspondientes a las cepas *Streptococco gordonii*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*, se pudo observar y analizar estadísticamente los halos de inhibición para cada muestra experimental, la cual estuvo conformada por cinco grupos experimentales:

1. Hidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina
2. Nanopartículas de plata
3. Nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina más nanopartículas de plata
4. Hidroxiapatita comercial

5. Clorhexidina al 0.12 %

En la Tabla 2 se observan los resultados para la cepa *Streptococco gordonii*. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los 5 grupos, pero quien presenta el mayor halo es el grupo control de clorhexidina al 0.12 % con 14.12, seguido por las nanopartículas de plata con 7.37 y estadísticamente iguales los grupos de la matriz experimental de hidroxiapatita más nanopartículas de plata junto con la hidroxiapatita sintética comercial.

Tabla 2. Resultados de la prueba de susceptibilidad antibiótica *in vitro* de las 05 muestras experimentales con la cepa *Streptococco gordonii*

Grupos	Media	D.E.	Mediana	p
Hidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina	0	0	0a	
Nanopartículas de plata	7.37	0.39	7.30b	
Nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina más nanopartículas de plata	7.15	0.28	7.15c	0.0001 [†]
Hidroxiapatita comercial	6.85	0.33	6.75c	
Clorhexidina al 0.12 %	14.12	0.19	14.16d	

[†] Prueba de Kruskal Wallis.

a,b,c,d: Prueba post-hoc de Dunn. Las letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas

En la tabla 3 se observan los resultados para la cepa *Fusobacterium nucleatum*, donde se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los 5 grupos. El primer lugar, el mayor halo lo tiene el grupo control de clorhexidina al 0.12 % con 12.98. En segundo lugar, el grupo de la matriz experimental de hidroxiapatita más nanopartículas de plata con 9.59. En tercer lugar, el grupo de las nanopartículas

de plata con 7.77 y el grupo de la hidroxiapatita sintética comercial no mostró resultados antibióticos para esta cepa.

Tabla 3. Resultados de la prueba de susceptibilidad antibiótica *in vitro* de las 5 muestras experimentales con la cepa *Fusobacterium nucleatum*

Grupos	Media	D.E.	Mediana	p
Hidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina	0	0	0a	
Nanopartículas de plata	7.77	0.46	7.65b	
Nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina más nanopartículas de plata	9.59	0.29	9.60c	0.0001f
Hidroxiapatita comercial	0	0	0d	
Clorhexidina al 0.12%	12.98	0.51	13.2e	

∫ Prueba de Kruskal Wallis.

a,b,c,d,e: Prueba post-hoc de Dunn. Las letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas

En la Tabla 4, se observan los resultados para la cepa *Porphyromonas gingivalis*, donde se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los 5 grupos. Así, el mayor halo lo presenta el grupo control de clorhexidina al 0.12 % con 15.4. Luego, está el grupo de hidroxiapatita sintética comercial con 8.38. Finalmente, los grupos experimentales de hidroxiapatita de cáscara de huevo, nanopartículas de plata y la mezcla de ambas no mostraron resultados antibióticos para esta cepa.

Tabla 4. Resultados de la prueba de susceptibilidad antibiótica *in vitro* de las 5 muestras experimentales con la cepa *Porphyromonas gingivalis*

Grupos	Media	D.E.	Mediana	P
Hidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina	0	0	0a	
Nanopartículas de plata	0	0	0a	
Nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina más nanopartículas de plata	0	0	0a	0.0001 []]
Hidroxiapatita comercial	8.38	0.51	8.55b	
Clorhexidina al 0.12%	15.4	0.48	15.5c	

[]] Prueba de Kruskal Wallis.

a,b,c: Prueba post-hoc de Dunn. Las letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas

La matriz experimental de hidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina adicionada con nanopartículas de plata presentó el mayor efecto antimicrobiano estadísticamente significativo para las cepas *S. gordonii* y *F. nucleatum*, pero no presentó efecto antimicrobiano en la cepa *P. gingivalis*.

La matriz comercial de hidroxiapatita sintética GenPhos HA TCP - Baumer (Sao Paulo, Brasil) no mostró efectos antimicrobianos para la cepa de *F. nucleatum*. Pero sí evidenció ser estadísticamente más bajo para la cepa de *S. gordonii* en comparación a la matriz experimental evaluada en esta investigación. Asimismo, sí evidenció poseer la más alta propiedad antimicrobiana para la cepa de *P. gingivalis*.

- **Sobre la determinación de la mínima concentración inhibitoria (MIC) y mínima concentración bactericida (MCB) en bacterias orales *in vitro***

Se evaluó la MIC y la MCB de la matriz experimental de nanohidroxiapatita y nanopartículas de plata en la cepa *F. nucleatum*. En esta se determinó que la concentración mínima inhibitoria es de 8 mg/ml y la concentración mínima bactericida es de 16 mg/ml. Los resultados se pueden observar en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la MIC y la MCB en la sustancia de nanopartículas de plata más nanopartículas de hidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo en la cepa *Fusobacterium nucleatum*

Sustancias	<i>F. nucleatum</i>	
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
NPS-Ag/Nhap	8.0	16.0

Elaboración propia

En el Anexo 5 se puede revisar la muestra de trabajo de la prueba de susceptibilidad antibiótica *in vitro*, preparación de agares y caldos.

- **Fase 4: Sobre densidad ósea neoformada**

Se comparó la densidad ósea neoformada entre los tres grupos experimentales injertados en alveolos de ratas macho a los 30 días, mediante histomorfometría ósea.

Grupos experimentales:

1. Matriz de relleno ósea sintético comercial (GenPhos HA TCP - Baumer, [Sao Paulo, Brasil])
2. Matriz de relleno óseo experimental a base de nanohidroxiapatita
3. Matriz de relleno óseo experimental a base de nanohidroxiapatita más nano partículas de plata

Primero se evaluó la neoformación ósea entre el grupo experimental y su grupo control. Así, se pudo observar que el porcentaje de neoformación ósea en los alveolos tratados con hidroxiapatita sintética comercial fue de 43.25 % a los 30 días de evaluación; mientras que en su grupo control obtuvo un porcentaje de 53.20 % sin diferencia estadística significativa.

Para el relleno óseo experimental de nanohidroxiapatita, tomada de cáscara de huevo de gallina, el porcentaje de neoformación ósea en los alveolos injertados fue de 60.75 % a los 30 días de evaluación; mientras que en su grupo control obtuvo un porcentaje de 53 % con una diferencia estadísticamente significativa de $P = 0.036$.

Finalmente, para el tercer grupo de relleno óseo experimental de nanohidroxiapatita tomada de cáscara de huevo de gallina más partículas de plata, el porcentaje de neoformación ósea en los alveolos injertados fue de 58 % a los 30 días de evaluación; mientras que en su grupo control obtuvo un porcentaje de 55.5 % sin diferencia estadística significativa. Estos resultados se pueden observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación de neoformación ósea entre grupos experimentales y grupos controles a los 30 días

Grupos	Media	D.E.	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
Hidroxiapatita sintética comercial HSC	43.25	4.79	43	38	49	0.140
Control HSC	53.20	3.34	52	51	59	
Relleno óseo experimental HAP	60.75	3.59	61.5	56	64	0.036
Control HPA	53	2.9	53.5	49	56	
Relleno óseo experimental HAP+AG	58	6.48	56.5	52	67	0.805
Control HAP+AG	55.5	4.0	56.5	50	59	

*Prueba U de Mann Whitney

Nivel de significancia estadística ($p < 0.05$)

En la Tabla 7 se realiza la comparación de neoformación ósea entre los tres grupos experimentales, a los 30 días de ser injertados. Al aplicar la prueba post-hoc (test de Dunn) se observa que la mayor neoformación ósea se encuentra en los grupos

del relleno óseo experimental de nanohidroxiapatita sola y el grupo de nanohidroxiapatita más nanopartículas de plata. Esto evidenció una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.031$) en comparación con el grupo de hidroxiapatita sintética comercial.

Tabla 7. Comparación de neoformación ósea entre los tres grupos experimentales a los 30 días de evaluación

Grupos	Media	D.E.	Mediana	P
Hidroxiapatita sintética comercial HSC	43.25	4.79	43a	
Relleno óseo experimental HAP	60.75	3.59	61.5b	0.031 []]
Relleno óseo experimental HAP+AG	58	6.48	56.5b	

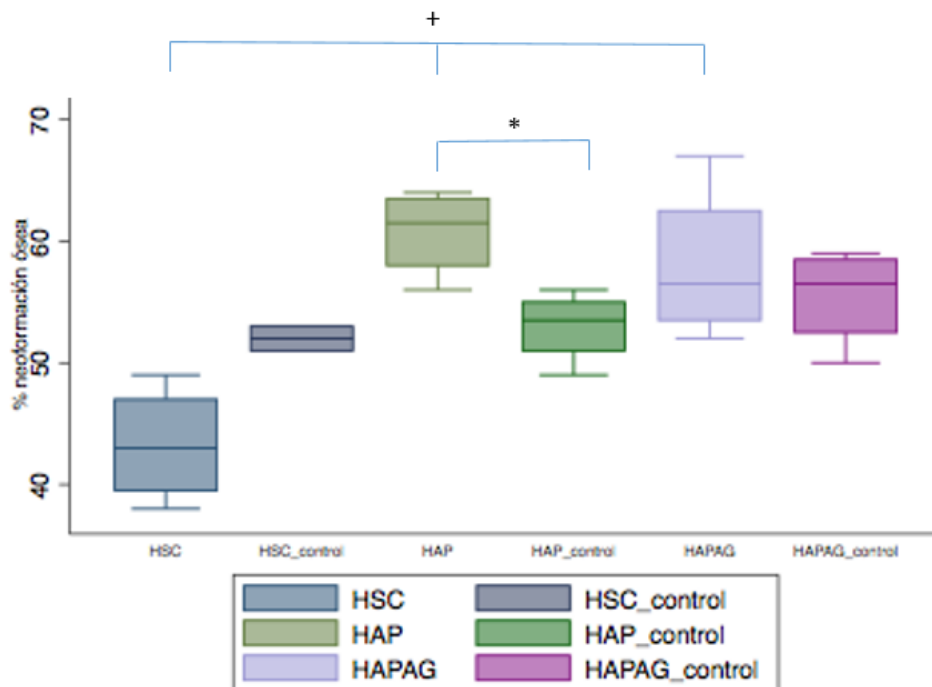
[]] Prueba de Kruskal Wallis.

a,b Prueba post-hoc de Dunn. Las letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas

La matriz experimental de relleno óseo a base de nanohidroxiapatita tomada de cáscara de huevo produce mayor porcentaje de neoformación ósea a los 30 días en comparación a una extracción.

El relleno óseo experimental a base de nanohidroxiapatita tomada de cáscara de huevo sola o la matriz experimental de nanohidroxiapatita más nanopartículas de plata induce a un mayor porcentaje de neoformación ósea a los 30 días en comparación con un relleno óseo sintético comercial (Gráfico 2).

Gráfico 2: Comparación del porcentaje de la neoformación ósea de los grupos experimentales y sus debidos controles a los 30 días



Elaboración propia

Donde:

HSC: Hidroxiapatita Sintética Comercial – HSC_control: equivalente a su grupo control.
 HAP: Hidroxiapatita experimental – HAP control: equivalente a su grupo control.
 HAPAG: Hidroxiapatita experimental más nanopartículas de plata – HAPAG_ control: equivalente a su grupo control.
 *El relleno óseo experimental de HAP presentó diferencia significativa de $P < 0.036$ en comparación con su grupo control.
 + El relleno óseo experimental de HAP sola y el relleno óseo experimental con nanopartículas de plata presentaron diferencia significativa de $P < 0.031$ en comparación al grupo de Hidroxiapatita sintética comercial.

Para el análisis cualitativo, la prueba exacta de Fisher arrojó un P valor de 0.201, por lo tanto, no se encontró asociación significativa entre matrices experimentales evaluadas, esto debido al número limitado de la muestra. Esto se puede evaluar en la Tabla 8.

Tabla 8: Análisis cualitativo de las matrices experimentales evaluadas para la variable neoformación ósea

Matrices Experimentales	% Neoformación ósea		Total
	0-49 %	50-100 %	
HP sintética comercial	4 80.00	1 20.00	5
HP experimental	1 20.00	4 80.00	5
HAP más plata	1 20.00	4 80.00	5
Total	6 40.00	9 60.00	15 100

Pearson $\chi^2 = 5.0000$ $P = 0.082$
 Fisher's Exacto $p = 0.201$

VI. Discusión

El presente estudio comprueba que la matriz de relleno óseo experimental de nano HAP más nanopartículas de plata tiene mejores resultados que una hidroxiapatita sintética comercial (60.75 % vs. 43.25 %), y la matriz de nanohidroxiapatita sola presenta mejores resultados que una extracción sin injerto (60.75 % vs. 53 % del grupo control). Esto podría deberse a su origen orgánico (cáscara de huevo) por las propiedades de biocompatibilidad. En el estudio de Katimani, titulado Hidroxiapatita derivada de cáscara de huevo. Una nueva era en la regeneración ósea se injerta hidroxiapatita derivada de cáscara de huevo como sustituto óseo en la reparación de defectos óseos maxilares en humanos. El estudio se llevó a cabo en 8 pacientes adultos con un grupo control cuyo injerto fue hidroxiapatita sintética comercial. Se realizó el seguimiento radiográfico semanal y se demostró que a las

8 semanas del posinjerto había una regeneración ósea significativa con un alto grado de densidad en la imagen radiográfica. El seguimiento fue de 3 meses, pero a los 2 meses se evidenció la regeneración ósea completa y con estudios celulares in vitro se evidenció la biocompatibilidad del compuesto. Este estudio concluye que la hidroxiapatita derivada de cáscara de huevo de gallina es superior en regeneración ósea en comparación con la hidroxiapatita sintética comercial (68).

Es altamente probable que el proceso de síntesis también intervenga en el éxito de esta matriz experimental, ya que la síntesis fue realizada a través de la técnica sol-gel. Esta cuenta con los parámetros de velocidad de agitación, velocidad de goteo y temperatura de tratamiento térmico, que permiten controlar la pureza y cristalinidad de la hidroxiapatita. Así se puede obtener diferentes variantes de hidroxiapatita de manera controlada y a grandes escalas, pero sobre todo asegurar un tamaño de grano en el rango nanométrico (menor a 100 nm). En este estudio se demostró que el diámetro de la hidroxiapatita era de 30 nm, en cambio, el de la hidroxiapatita comercial era de 247 nm. Se puede añadir que la técnica sol-gel es económica y ecoamigable. Sin embargo, existen otras técnicas laboratoriales como la calcinación, que consiste en mezclar los reactivos e introducirlos al horno, pero con esta técnica el proceso no es tan exacto y esto puede ocasionar que parte de los reactivos no se mezclen bien y, por ende, no llegan a transformarse en hidroxiapatita. Otro método más sofisticado es el hidrotermal, que consiste en generar una reacción química en un tubo especial cerrado con una solución acuosa y sometido a temperatura. Con esta última técnica se logra controlar el tamaño y hasta la forma de las partículas de hidroxiapatita, pero se requiere equipos más delicados, es más costosa y no es escalable a grandes cantidades.

Se determinó el efecto citotóxico (cc50) *in vitro* mediante la prueba MTT sobre las líneas celulares de mamíferos: Madin Darby Canine Kidney (MDCK). Estas líneas celulares se caracterizan por su población celular heterogénea, crecimiento inmunológico y propiedades citogenéticas (69), y también cabe destacar que son respaldadas por la American Type Culture Collection (ATCC).

Sobre las pruebas antimicrobianas se pudo observar que la matriz experimental de nano HAP con nanopartículas de plata sí presenta propiedades antibacterianas ante las cepas *S. gordonii* y *F. nucleatum*. Estas bacterias se eligieron por ser iniciadoras de la enfermedad periodontal (*S. gordonii*) y presentes en gingivitis y a su vez la cepa *F. nucleatum* es un colonizador secundario de la enfermedad periodontal. En el estudio de Vargas Segura, en el 2015, se hace una revisión sobre la etiología y microbiología de la enfermedad periodontal, en donde expone la teoría de los complejos bacterianos colonizadores durante la enfermedad periodontal (57). En esta revisión indican que la porphyromona gingivalis es una bacteria principal mayor y antes que ella se presente debe estar activo un grupo complejo de bacterias entre ellas la Veillonella párvula, la *Actinomyces odontolyticus* y la cepa *F. nucleatum*, presente en este estudio. Por lo antes expuesto, la matriz de relleno óseo experimental de nano HAP y moléculas de plata inhibe la formación de *F. nucleatum* lo que impediría la formación de *P. gingivalis* en el futuro.

Por otro lado, nuestra matriz no tuvo efecto antibacteriano para la *P. gingivalis* en comparación con la matriz sintética comercial que sí tuvo un efecto antibacteriano de 8.38 mm. Es posible que las trazas de hierro de la beta fosfato tricálcico de esta matriz sean las responsables de su efecto antibacteriano, como lo menciona el estudio de Uskoković en el 2018 (58), el cual indica que la mezcla en cementos de

HAP con fosfato tricálcico mejora su citocompatibilidad y podría ser letal para diferentes microorganismos gramnegativos como *S. enteritidis*, *P. aeruginosa* y grampositivos como *S. aureus*, *E. coli* y, en general, para patógenos oportunistas (58).

De igual manera, el estudio de Xue Zhao, en el 2020 (59), que habla sobre las estrategias antibacterianas contra la enfermedad periodontal, realiza un estudio sobre la efectividad del cobre con magnesio contra las mismas cepas utilizadas en nuestro estudio: *S. gordonii*, *F. nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*, las cuales representan a los colonizadores bacterianos en un estadio de la enfermedad temprana, media y tardía de la enfermedad periodontal. Los resultados de este estudio fueron muy buenos para el complejo cobre magnesio, pero también se demostró dentro de su grupo control que la beta fosfato tricálcico inhibe la formación de porfiromonas gingivalis (59).

La matriz experimental de nano HAP ha demostrado tener mayor capacidad de neoformación ósea en comparación con una extracción sin colocación de relleno. Esta diferencia ha sido significativamente estadística ($p = 0.031$). Estos resultados coinciden con el estudio de Do Carmo (38), el cual injerta nanohidroxiapatita con estroncio en alveolos de 20 ratas macho para favorecer la reparación ósea alveolar. Así, por medio de histomorfometría, utilizando el *software* Image pro-plus, encuentra que el proceso de neoformación ósea reemplazó el contenido celular inflamatorio en contacto con el relleno de hidroxiapatita más estroncio. Este resultado fue estadísticamente significativo en comparación a su grupo control que consideraba la extracción sin relleno.

El estudio de Park (60) evalúa las propiedades de la hidroxiapatita derivada de cáscara de huevo de gallina entre ellos la propiedad de neoformación ósea en defectos óseos creados en calotas de 30 ratas. Su evaluación histomorfométrica a las 4 y 8 semanas demuestra sus propiedades osteoconductoras, con aumento significativo en la neoformación ósea y un alto grado de cicatrización ósea. Los resultados de este estudio muestran 48 % de formación ósea en los defectos injertados con hidroxiapatita derivada de huevo de gallina y 40 % en el grupo control (trepanaciones sin relleno). Esto es similar a lo encontrado en nuestra investigación, lo cual arroja 60.75 % de neoformación ósea en los alveolos injertados con este relleno óseo experimental de HAP obtenida de cáscara de huevo de gallina y 53.8 % en el grupo control de alveolos solo con extracción dental sin relleno.

Estos resultados sugieren que, a más tiempo de regeneración, mayor es el aumento de hueso nuevo mineralizado. El tiempo de estudio de Park fue de 4 a 8 semanas, debido al comportamiento biodegradable del compuesto hidroxiapatita. Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica a un ritmo de 2-3 $\mu\text{m}/\text{día}$ y expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina, que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 $\mu\text{m}/\text{día}$ (61).

Los sustitutos óseos ideales deben de reabsorberse con el tiempo y reemplazarse por hueso neoformado. Por lo tanto, la propiedad de osteoconductoridad de la HAP derivada de cáscara de huevo de gallina favorece al proceso de curación ósea en términos de reabsorción controlada de sustitutos óseos (61, 62, 63).

Por otro lado, el relleno óseo a base de hidroxiapatita sintética comercial (GenPhos HA TCP - Baumer, Sao Paulo, Brasil) no tuvo diferencia estadísticamente significativa al compararse con su grupo control ($p > 0.05$). El estudio evidenció que los alveolos injertados con este relleno tuvieron un 43.25 % de neoformación ósea, mientras que, los alveolos controles (grupo que no recibió ningún relleno) tuvo un 53.20 %; sin embargo, los resultados del relleno óseo experimental a base de HAP obtenida de cáscara de huevo de gallina fue de 60.75 % más alto que el relleno sintético comercial. En este punto es importante recalcar que el relleno óseo comercial está compuesto por hidroxiapatita y fosfato tricálcico, el cual tiene diversas propiedades, como permitir estabilizar el coágulo de sangre y dar soporte a la osteogénesis durante las primeras fases de la regeneración. El fosfato tricálcico es un material biocompatible, bio absorbible y con propiedades similares a la fase inorgánica del hueso; además, es osteoconductor, ya que permite el flujo sanguíneo, de manera que aumenta la migración celular acelerada para lograr una cicatrización mejorada (5, 64). Su estructura porosa juega un rol importante, ya que sus poros interconectados pueden acelerar la remodelación ósea, lo que aumenta la vascularización y facilita la colonización de células osteogénicas y brindar nutrientes al hueso a través de la capilaridad, ya que se reabsorbe gradualmente, aproximadamente entre 13 y 20 semanas luego de la implantación; esta propiedad también la tiene la hidroxiapatita sola, con la diferencia que puede demorar en reabsorberse hasta 3 años después de la implantación. Hay que recordar que, durante los 2 primeros años, luego de una extracción dental, la disminución del reborde alveolar es de 40 a 60 % en su dimensión vertical y horizontal (64).

Los cristales de nanohidroxiapatita por su disposición de red de colágeno proporciona soporte para la estabilidad, dureza y función estructural del tejido, ya que su propiedad de resistencia a la compresión (100 a 160 MPa) es su principal diferenciador (5, 64).

Finalmente, la incorporación de fosfato tricálcico ayuda a disminuir el riesgo de infección (58). Por ello, a nuestra matriz experimental de nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo se le agregó partículas de plata para tener un efecto antibacteriano.

Los resultados de la neoformación ósea en los alveolos injertados con la matriz experimental de nanohidroxiapatita más partículas de plata fue de $58 \% \pm 6.48$ a los 30 días de evaluación; mientras que en su grupo control obtuvo un porcentaje de $55.5 \% \pm 4$. No se encontró diferencia significativa entre el grupo experimental y su grupo control, pero los resultados de esta combinación fueron más altos que los obtenidos con la hidroxiapatita sintética comercial (GenPhos HA TCP - Baumer, Sao Paulo, Brasil), ya que los alveolos injertados con este relleno sintético tuvo un 43.25% de neoformación ósea.

En el estudio de Zielak comparan la misma matriz comercial de Genphos HA TCP sola y la misma matriz modificada con HAP tomada de un residuo biológico marino, en este caso conchas de mejillones. En modelos animales injertaron la matriz experimental en hueso vertebral de ocho ovejas y realizaron la evaluación de la osteoinducción y la osteoconducción a los 3 y 6 meses. La matriz experimental de Genphos modificada con HAP tomada de conchas de mejillones tuvo resultados

superiores en mineralización y formación ósea en comparación con la matriz comercial de Genphos sola ($P = 0.0003$) (65).

Diversos estudios respaldan que la HAP orgánica es promotor del crecimiento óseo debido a su biocompatibilidad, baja propiedad antibacteriana y contiene factores de crecimiento, esto debido al compuesto nácar que tienen las conchas, el cual contiene carbonato de calcio, igual que la cáscara de huevo. En estudios de biomineralización de osteoblastos humanos *in vitro* se indica que el nácar es capaz de atraer y activar osteoblastos. Esto es altamente probable debido a que en esta propiedad natural la matriz experimental modificada con HAP orgánica tenga mayor mineralización que la matriz Genphos comercial sola (65).

La plata posee propiedades antibacterianas, por ello, algunos estudios confirman que la incorporación de nanopartículas de plata a la hidroxiapatita inhibe exitosamente el crecimiento bacteriano de *Streptococcus species*. La incorporación del elemento plata a la hidroxiapatita crea una superficie con propiedades antibióticas sin comprometer la biocompatibilidad requerida para una oseointegración exitosa (22, 23, 24, 67).

Según el estudio de Miranda y Fernández (66) “Silver-Hydroxyapatite Nanocomposites as Bactericide and Fungicide Materials” se comprueba la propiedad bactericida de la plata agregada a la nanohidroxiapatita, ya que elimina el 99.99 % de gérmenes grampositivos y gramnegativos, específicamente, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* y *Liquidambar orientalis* en 24 horas.

El estudio de Besinis, Hadi, Le, Tredwin y Handy, en el año 2017, confirma que la incorporación de nanocapas de plata, dióxido de titanio e hidroxiapatita inhibe

exitosamente el crecimiento bacteriano de *Streptococcus specie* y lactobacilos. La incorporación de esta doble capa de plata e hidroxiapatita a los implantes de titanio crea una superficie con propiedades antibióticas sin comprometer la biocompatibilidad requerida para una oseointegración exitosa y neoformación ósea acelerada (18).

Finalmente, el estudio de Predoi, en el 2016, sobre la evaluación de la actividad antimicrobiana de diferentes antibióticos, como la ciprofloxacina y la tetracilina, demuestran que la adición de plata e hidroxiapatita incrementa su potencial antibacteriano ante *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (33).

Se ha demostrado que la utilización de injertos óseos con una membrana reabsorbible disminuye la tasa de reabsorción horizontal reborde alveolar en un -2.19 mm y la reabsorción vertical en un -1.72 mm con un intervalo de confianza del 95 % (36). En otro estudio histomorfométrico de preservación de rebordes óseos (37) se muestra que luego de 7 meses la reabsorción horizontal fue mayor en los rebordes que no recibieron injertos (4.3 +/- 0.8 mm) en comparación a los rebordes que sí recibieron injertos (2.5 +/- 1.2 mm). La altura de la creta alveolar vestibular disminuyó en 3-6 +/-1.5 mm en la zona de extracción mientras que la altura en la zona con injerto óseo disminuyó en 0.7 +/- 1.4 mm. La altura en la creta alveolar lingual disminuyó en 0.4 mm para el grupo con injerto y disminuyó en 3 mm para el grupo de extracción.

Estos estudios confirman que siempre es mejor utilizar un relleno óseo para conservar la altura y el grosor del alveolo posextracción. El relleno óseo experimental de esta investigación ha demostrado que induce a la formación ósea a

los 30 días de injertado en comparación a una extracción sin relleno, lo cual favorecerá el soporte óseo para una rehabilitación futura.

De igual forma se realizó el análisis histomorfométrico para evaluar el hueso recién formado en un área estándar. Las imágenes histológicas se tomaron del microscopio de luz multicabezal a 10X y fueron evaluadas con el *software* Image J (programa de dominio público desarrollado en el National Institutes of Health). Este programa pudo evaluar el área total en micras de la imagen previamente delimitada y el área de cobertura, que es la que tenía las células neoformadas. Así, se pudo obtener las densidades por láminas histológicas. Este mismo proceso se vio en el estudio del artículo base de esta investigación titulado “Alveolar Bone Repair with Strontium Containing Nanostructured Carbonated Hydroxyapatite” (38), el cual para el análisis histomorfométrico utiliza el software Image-Pro Plus®, versión 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) con el objetivo de cuantificar el hueso recién formado en un área estándar.

Trabajar en estudios *in vivo*, como son los modelos animales, es muy productivo para el investigador, ya que se obtienen datos reales en tiempo real, y es importante mencionar que una limitación de este estudio fue el número mínimo de modelos animales con el cual se permitió trabajar el estudio preliminar. Ya se ha mencionado que existen múltiples investigaciones que trabajan con una muestra mínima de 45 animales (39), 20 animales (38, 43, 44, 45) por grupo y el tiempo de evaluación es más largo.

Finalmente, para elegir un material de relleno hay que considerar tres factores: que tenga capacidad de neoformación ósea, que posea propiedades antibacterianas y

que sea de un costo accesible al público. Esta matriz experimental contaría con los requisitos antes mencionados, con más estudios en esta línea, se evalúa la posibilidad de registrar una patente con la finalidad de que se pueda utilizar en estudios clínicos posteriores y pueda ser implementado como parte de los protocolos de toda extracción en la clínica docente asistencial de la UPCH.

VII. Conclusiones

1. El relleno experimental de nanohidroxiapatita obtenida de cáscara de huevo de gallina más nanopartículas de plata mostró no ser tóxica frente a la línea celular MDCK, tener un efecto antimicrobiano frente las cepas *S. gordonii* y *F. nucleatum* y los resultados de esta investigación sugieren que se podría tener una tendencia a la neoformación ósea.
2. Se sintetizó y caracterizó nanohidroxiapatita a partir de cáscara de huevo de gallina y nanopartículas de plata en el laboratorio, de manera que se identificaron fases cristalinas con estructuras ordenadas y periódicas mediante la técnica de difracción de rayos X.
3. La matriz experimental de nanohidroxiapatita, obtenida de cáscara de huevo de gallina, más nanopartículas de plata, no son tóxicas frente a las líneas celulares MDCK
4. La matriz experimental de nanohidroxiapatita, obtenida de cáscara de huevo de gallina, más nanopartículas de plata presenta efectos antimicrobianos ante las cepas *Streptococcus goordonii* y *Fusobacterium nucleatum*.

La matriz experimental de relleno óseo a base de nanohidroxiapatita tomada de cáscara de huevo podría inducir a una neoformación ósea mayor en comparación a un alveolo con extracción sin ningún tipo de material de relleno a los 30 días y podría ser superior en comparación a un relleno óseo sintético comercial.

VIII. Recomendaciones

1. Desarrollar otras matrices experimentales con diferentes proporciones de nanopartículas de plata e hidroxiapatita con el fin de evaluar el efecto antibacteriano. Asimismo, incorporar como vehículo la sangre del propio modelo animal.
2. Realizar más investigaciones con mayor número de modelos animales para poder validar los resultados del estudio preliminar. Una limitación del estudio fue el reducido número de modelos animales permitidos por el Comité Institucional de Ética para el uso de animales UPCH.
3. Realizar nuevas investigaciones de esta matriz de relleno óseo experimental evaluando no solo la densidad de neoformación ósea, sino también la longitud, el volumen y la reabsorción del biomaterial.
4. Realizar nuevas investigaciones de esta matriz de relleno óseo experimental utilizando otras técnicas de evaluación como análisis radiográficos o tomografía digital en diferentes periodos de tiempo.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Avila-Ortiz G, Elangovan S, Kramer KW, Blanchette D, Dawson DV. Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res.* 2014; 93(10):950-8.
- (2) Gerritsen AE, Allen PF, Witter DJ, Bronkhorst EM, Creugers NH. Tooth loss and oral health-related quality of life: a systematic review and meta-analysis. *Health Qual Life Outcomes.* 2010; 8:126.
- (3) Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2009; 36:1048-58.
- (4) Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003; 23:313-23.
- (5) Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset A, Benkirane-Jessel N, y col. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng.* 2018; 9.
- (6) Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G y col. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci: Mater Med.* 2014; 25:2445–61.
- (7) Mohammad A, Khamirul M, Norhazlin Z, Che A, Zarifah A, Nur B, y col. The usability of ark clam shell (*Anadara granosa*) as calcium precursor

- to produce hydroxyapatite nanoparticle via wet chemical precipitate method in various sintering temperature. Springer Plus. 2016; 5(1):1206.
- (8) Ferreira J, Louro L, Costa A, De Campos J, Prado da Silva M. Ostrich eggshell as calcium source for the synthesis of hydroxyapatite and hydroxyapatite partially substituted with zinc. *Cerâmica*. 2016; (62): 386-91.
- (9) Arboleda A, Franco M, Caicedo J, Tirado L, Goyes C. Síntesis y caracterización química y estructural de hidroxiapatita sintetizada a partir de cáscara de huevo y fosfato tricálcico. *Ingeniería y Competitividad*. 2016; 18(1): 71-8.
- (10) Shavandi A, Alaa El-Din A, Bekhit A, Azam A, Zhifa S. Synthesis of nanohydroxyapatite (nHA) from waste mussel shells using a rapid microwave method. *Materials Chemistry and Physics*. 2014; 149: 607-16.
- (11) Gomes C, Di Lello C, Campos J, Sampaio M. Synthesis and characterization of calcium phosphates produced from chicken eggshell. *Cerâmica*. 2012;(58): 448-52.
- (12) Meski S, Ziani S, Khireddine H. Removal of Lead Ions by Hydroxyapatite Prepared from the Egg Shell. *J Chem Eng*. 2010; (55): 3923-28.
- (13) Lukaszewska-Kuska M, Wirstlein P, Majchrowski R, Dorocka-Bobkowska B. Osteoblastic cell behaviour on modified titanium surfaces. *Micron*. 2018; 105: 55-63.
- (14) Seo DU, Kim SG, Oh JS, Lim SC. Comparative Study on Early Osseointegration of Implants According to Various Drilling Speeds in the Mandible of Dogs. *Implant Dent*. 2017; 26(6): 841-47.

- (15) Besinis A, Hadi S, Le H, Tredwin C, Handy R. Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings. *Nanotoxicology*. 2017; 11(3):327-38.
- (16) Paz A, Gonzáles J, López M, Becquer C, Parodi B. Obtención de nanopartículas de hidroxiapatita empleando disoluciones con elevado contenido de iones calcio y fosfato. *CENIC. Ciencias Químicas*. 2010; (41): 1-8.
- (17) Castellanos JE, Marín LM, Úsuga MV, Castiblanco GA, Martignon S. La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental. *Univ. Odontol*. 2013; 32(69): 49-59.
- (18) Xiao Y, Pei H, Haihuan W, Shuang C, Yixue L, Ziqin M. Antibacterial and anti-biofouling coating on hydroxyapatite surface based on peptide-modified tannic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017; (160): 136-43.
- (19) Sanosh KP, Min-Cheol C, Balakrishnan A, Kim T.N, Seong-Jai C. Utilization of biowaste eggshells to synthesize nanocrystalline hydroxyapatite powders. *Materials letters*. 2009; 63: 2100-02.
- (20) García Garduño M. Reyes Gasga J. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. 2006; 9(2): 90-95.
- (21) Salas J. Día Mundial del huevo: conoce todas sus bondades. [Internet]. Lima: EL Comercio;2013 [Consultado noviembre 2017]. Disponible en:

<http://archivo.elcomercio.pe/gastronomia/nutricion/dia-mundial-huevo-conoce-todas-sus-bondades-noticia-1643222>

- (22) Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(2): 449-96.
- (23) Qing Y, Cheng L, Li R, Liu G, Zhang Y, Tang X, Wang J, Liu H, Qin Y. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:3311-27.
- (24) Xie K, Zhou Z, Guo Y, Wang L, Li G, Zhao S, Liu X, Li J, Jiang W, Wu S, Hao Y. Long-Term Prevention of Bacterial Infection and Enhanced Osteoinductivity of a Hybrid Coating with Selective Silver Toxicity. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(5):e1801465.
- (25) Brånemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lundkvist S, Rockler B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials.* 1983;4(1):25-8.
- (26) Lindhe J, Niklaus P, Lang Thorkild Karring. *Clinical Periodontology and implant Dentistry.* 5ta Ed. Wiley; 2009.
- (27) Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. *Av Periodon ImplantoL.* 2012; 24(3): 133-38.
- (28) Sequeda L, Diaz, J Gutierrez S, Perdomo S. Obtención de hidroxapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2012; 41 (1), 50-66.

- (29) Kowalyszyn K, Silva A, Torres Q. La hidroxiapatita como biomaterial para la reconstrucción de rebordes alveolares. *Rev Venez Invest Odont.* 2013; 1(1): 62 – 71.
- (30) Rivera E, Araiza M, Witold V, Castaño A, Díaz-Estrada A, Hernández A, Rodríguez J. Synthesis of hydroxyapatite from eggshells. *Materials Letters.* 1999; 41: 128–34.
- (31) Kowalyszyn K, Silva A, Torres Q. La hidroxiapatita como biomaterial para la reconstrucción de rebordes alveolares. *Rev Venez Invest Odont.* 2013; 1(1): 62 – 71.
- (32) Chiu C, Lu CT, Chen SH, Ou KL. Effect of Hydroxyapatite on the Mechanical Properties and Corrosion Behavior of Mg-Zn-Y Alloy. *Materials.* 2017. 26;10(8):855.
- (33) Predoi D, Popa CL, Chapon P, Groza A, Iconaru SL. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antibiotics Enhanced with Silver-Doped Hydroxyapatite Thin Films. *Materials.* 2016;9(9): 778-96.
- (34) Besinis A, Hadi S, Le H, Tredwin C, Handy R. Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings. *Nanotoxicology.* 2017; 11(3):327-338.
- (35) Instituto de estudios del huevo. *El gran libro del huevo.* Madrid: Everest; 2009.
- (36) Troiano G, Zhurakivska K, Lo Muzio L, Laino L, Cicciù M, Lo Russo L. Combination of Bone Graft and Resorbable Membrane for Alveolar Ridge

- Preservation: a Systematic Review, Meta-analysis and Trial Sequential Analysis. *J Periodontol.* 2017; 12:1-17.
- (37) Barone A, Aldini NN, Fini M, Giardino R, Calvo Guirado JL, Covani U. Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study. *J Periodontol.* 2008; 79(8):1370-7.
- (38) Do Carmo AB, Sartoretto S, Neves Novellino A, Alves, Granjeiro JM, Borges Miguel F, Calasans-maia J y Calasans-maia MD. Alveolar bone repair with strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite. *Journal of Applied Oral Science.* 2018: e20170084.
- (39) Calasans-Maia MD, Melo BR, Alves AT, Resende RF, Louro RS, Sartoretto SC, Granjeiro JM, Alves GG. Cytocompatibility and biocompatibility of nanostructured carbonated hydroxyapatite spheres for bone repair. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(6):599-608.
- (40) Ansari M, Naghib Seyed M, Fathollah M, Salati A. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-calcium hydroxide for dental composites. *Ceramics-Silikaty.* 2011; 55(2):123-26.
- (41) Miranda M, Fernández A, Diaz-Muñoz M, Esteban-Tejada L, Lopez – Esteban S, Malpartida F. Silver-hydroxyapatite nanocomposites as bactericidal and fungicidal materials. *Int. J. Mat. Res.* 2010; 101(1): 122–27.
- (42) Kikenny C, Browne W, Cuthill I, Emerson M, Altman D. Refinement & Reduction of animals in research. National. National Centre for the Replacement, 3Rs The arrive guidelines. *Animal research: reporting of in vivo experiments.* *Br J Pharmacol.* 2010; 160(7): 1577–79.

- (43) Ding L, Zhang P, Wang X, Hao J, Aoki K, Kuroda S, Kasugai S. Effect of doxycycline-treated hydroxyapatite surface on bone apposition: A histomorphometric study in murine maxillae. *Dent Mater J*. 2018;37(1):130-38.
- (44) Ding L, Zhang P, Wang X, Kasugai S. A doxycycline-treated hydroxyapatite implant surface attenuates the progression of peri-implantitis: A radiographic and histological study in mice. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019 Feb;21(1):154-59.
- (45) Calasans-Maia MD, Barboza Junior CAB, Soriano-Souza CA, Alves ATNN, Uzeda MJP, Martinez-Zelaya VR, Mavropoulos E, Rocha Leão MH, de Santana RB, Granjeiro JM, Rossi AM. Microspheres of alginate encapsulated minocycline-loaded nanocrystalline carbonated hydroxyapatite: therapeutic potential and effects on bone regeneration. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:4559-71.
- (46) Lancaster GA, Dodd S, Williamson PR. Design and analysis of pilot studies: recommendations for good practice. *J Eval Clin Pract*. 2004;10(2):307-12.
- (47) Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía de manejo y cuidados de animales de laboratorio: ratón. Lima: Centro Nacional de Productos Biológica-Instituto Nacional de Salud; 2008.
- (48) Cia L, Johnson, Patterson-Kane E, Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, et al. the AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. American Veterinary Medical Association - AVMA. 2020.

- (49) Gomez de Ferraris M. Campos Muñoz A. Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. Capítulo 2. Métodos y técnicas de estudio en histología e ingeniería tisular bucodental. Ed. Médica Panamericana. 3ª Edición. 2009.
- (50) Lopez-Poveda E. Análisis de imágenes. Universidad de Salamanca. 2002. 1-52.
- (51) Fundación Affiniti. Declaración Universal de los derechos del animal – UNESCO – ONU.
- (52) Dittrich Nicole, Pires Gabriel Natan, Tufik Sergio, Andersen Monica Levy. Conocimiento sobre bioética y la Ley 11.794/2008 en el grado. Rev. Bioét. 2019; 27(3): 542-548.
- (53) Research Administration. Updated guide for the care and use of laboratory animals. UCLA – Los angeles 2020.
- (54) Guimarães Mariana Vasconcelos, Freire José Ednésio da Cruz, Menezes Lea Maria Bezerra de. Utilización de animales en la investigación: breve revisión de la legislación en Brasil. Rev. Bioét. [Internet]. 2016; 24(2): 217-224.
- (55) National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
- (56) International Centre for Diffraction Data. Database licenced 2003.

- (57) Vargas Segura A, Ilyina A, Segura Ceniceros E, Silva Belmares Y, Méndez González L. Etiology and microbiology of periodontal diseases: A review. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2015; 9(48):2300-06.
- (58) Uskoković V, Graziani V, Wu V, Fadeeva I, Fomin A, Presniakov I y col. Gold is for the Mistress, Silver for the Maid: Enhanced Mechanical Properties, Osteoinduction and Antibacterial Activity due to Iron Doping of Tricalcium Phosphate Bone Cements. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019; 94: 798–810.
- (59) Zhao X, Wan P, Wang H, Zhang S, Liu J, Chang C, Yang K, Pan Y. An Antibacterial Strategy of Mg-Cu Bone Grafting in Infection- Mediated Periodontics. *BioMed Research International.* 2020; (2020):1-9.
- (60) Park G, Bae J, Suh S, Lee J, Kim D, Kim SH, Lee C. Evaluation of bone healing with eggshell-derived bone graft substitutes in rat calvaria: a pilot study. *Journal of biomedical materials research.* 2008;87(1), 203-14.
- (61) Fernández-Tresguerres J, Hernández-Gil I, Alobera Gracia M, Canto Pingarrón M, Blanco J. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Med. oral patol. oral cir.bucal.* 2006; 11(1): 47-51.
- (62) Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14:195-200.
- (63) Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratio of HA/b-TCP in periodontal osseous defects. *J Periodontol* 1992; 63:729-735.

- (64) Goh BT, Chanchareonsook N, Tideman H, Teoh SH, Chow JK, Jansen JA. The use of a polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffold for bone regeneration of tooth socket facial wall defects and simultaneous immediate dental implant placement in *Macaca fascicularis*. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102:1379-88.
- (65) Zielak j , Vendramini I, Cotait de Lucas Corso P ,Muller L , Crivellaro V, Khajotia S y col. The Role of Marine Organic Extract in Bone Regeneration: A Pilot Study. *BioMed Research International*. 2020; (2020): 1-7.
- (66) Miranda M, Fernández A, Díaz M, EstebanTejeda L, López-Esteban S, Malpartida F y col. Silver-hydroxyapatite nanocomposites as bactericide and fungicide materials. *Int. J. Mater. Res.*2010.101(1): 122-27.
- (67) Jun Sung K, Eunye K, Kyeong N, Jong-Ho K, Sung J, Hu J, So H, Young K y col. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*. 2007; 1: 95-101.
- (68) Kattimani V, Prasad Lingamaneni K, Srinivas Chakravarthi P, Kumar S, Siddharthan A. Eggshell-Derived Hydroxyapatite: A New Era in Bone Regeneration. *J Craniofac Surg*. 2016; 27: 112–17.
- (69) Lugovtsev V, Melnyk D, Weir JP. Heterogeneity of the MDCK Cell Line and Its Applicability for Influenza Virus Research. *Plos one*. 2013; 8(9): e75014.

X. Anexos

Anexo 01: Ficha de identificación de modelo animal

Código modelo Animal: Peso Inicial	Fecha de Intervención in	Equipo de intervención presente:
Grupo : Injerto Comercial Sintetico Injerto de HAP Injerto de HAP con Plata	Extracción simple sin injerto considerado control fue en el lado:	Injerto fue en lado:
Observaciones:		
Fecha de intervención a los 30 Días:	Equipo de intervención presente:	
Resultados / Observaciones:		

Anexo 02 – Estudio Preliminar en Modelos animales



**Ambiente de trabajo virtual
Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID)
UPCH**



Mesa de Laboratorio



Instrumental quirúrgico utilizado



Control de peso inicial, signos vitales, sedación y anestesia del modelo animal



Modelo listo para trabajar. Se inicia con la anestesia dental local infiltrativa



Extracción de primera molar superior derecha de rata



Calibración de balanza con opción de TARA



**Comida molida para alimentación
poscirugía por tres días**



Jaula casa con bebedero individual

Dissección Maxilar



**Fractura de mandíbula
Se expone el maxilar**

Dissección de maxilar



**Muestras en formol al 10 % para Laboratorio de Patología Bucomaxilofacial
de la UPCH**

Anexo 03: Un ejemplo de la medición digital a través del software Image J.

Imagen 1: Barra de herramientas del software Image J

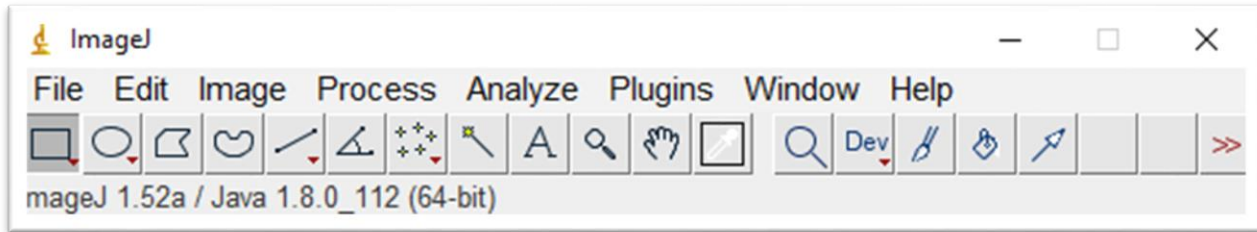
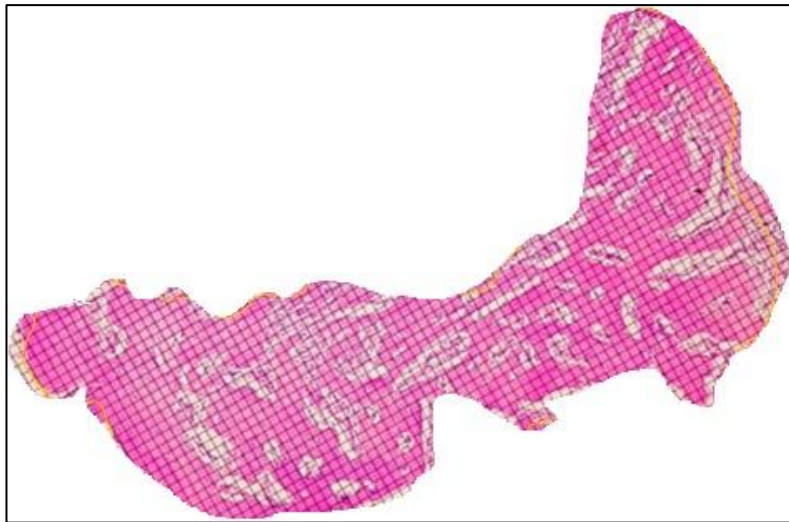


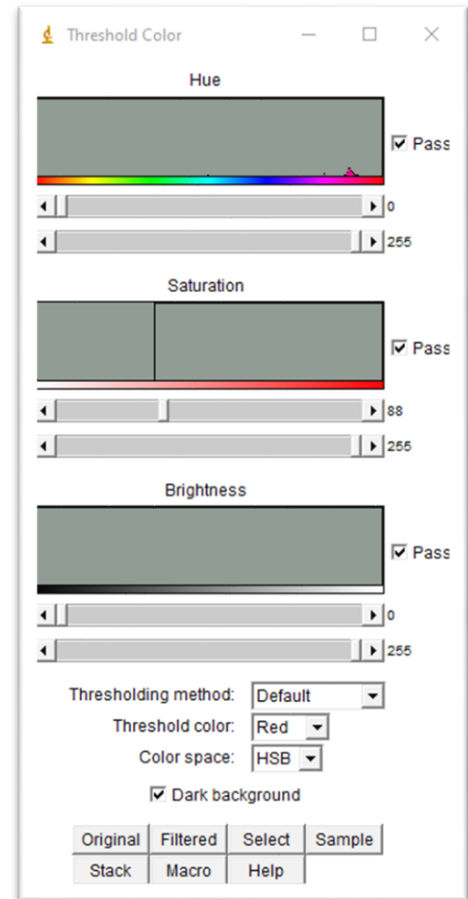
Imagen 2: Fotografía de la muestra histológica, ya delimitada y recortada.



Elaboración propia

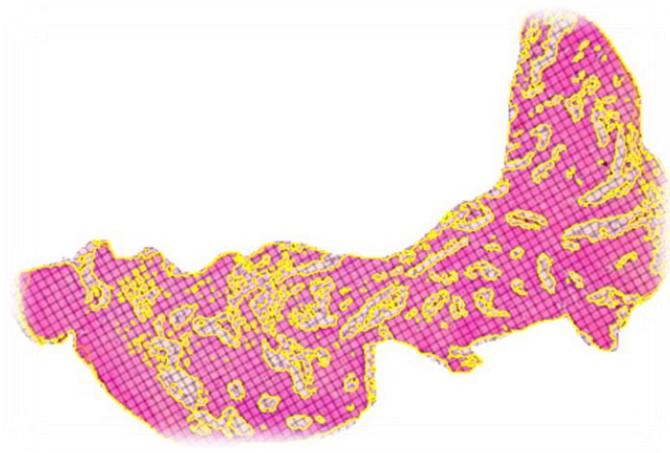
Imagen 3: a la derecha la barra de trabajo de segmentación de color.

A la izquierda la imagen seleccionada



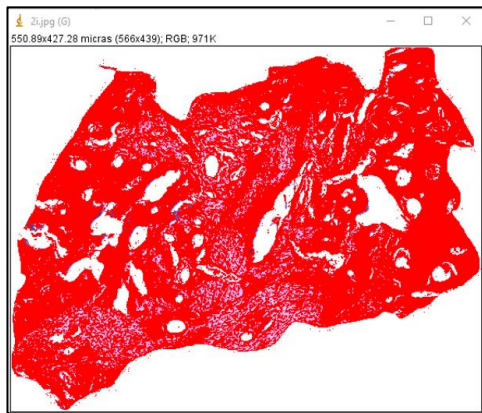
Elaboración propia

Imagen 4: Área delimitada



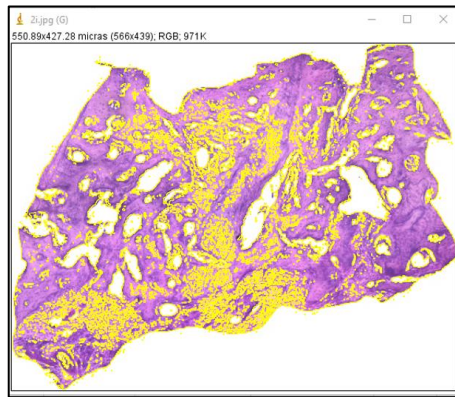
Elaboración propia

Imagen 5: Otro ejemplo de corte histológico, esta es la imagen ya seleccionada.



Elaboración propia

Imagen 6: Imagen delimitada automáticamente por el software Image J.



Elaboración propia

Una vez obtenida la medición de área total y área de cobertura, se procedió a transcribir los datos a una tabla de Excel y se calcularon los porcentajes de densidades.

Anexo 04: Cuadro de Operacionalización de Variables

Variable Independiente

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo de Variable	Escala de Medición	Valores
Matriz de Relleno óseo	Biomaterial utilizado para la regeneración ósea con funciones mecánicas y biológicas.	Matriz experimental a base de hidroxapatita tomada de cáscara de huevo de gallina con nanopartículas de plata.	caracterización del producto	Cualitativo Politómico	nominal	- 1= Matriz de hidroxapatita obtenida de cáscara de huevo pura. - 2 = Matriz de hidroxipatita obtenida de cáscara de huevo con nanopartículas de plata. - 3 = Matriz de hidroxapatita sintético comercial.

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo	Escala	Valores
Citotoxicidad	Evaluación de sustancias que son tóxicas para las células.	Capacidad de la hidroxiapatita obtenida de la cáscara de huevo de gallina para medir la viabilidad celular.	Ensayo MTT	Cuantitativo	Razón continua	CC50 ug/ml

Variable Dependiente

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo	Escala	Valores
Neoformación ósea	Proceso natural de regeneración del tejido óseo, en donde intervienen diferentes células como osteoclastos, osteoblastos y osteocitos.	Densidad: área total del nuevo hueso formado.	Histomorfometría de las Trabéculas óseas neo formadas en el tercio apical del alveolo.	cuantitativa continua	De razón	en porcentaje de 0 a 100%

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo	Escala	Valores
Actividad Antimicrobiana	Propiedad de eliminar microorganismos o inhibir su crecimiento, tales como bacterias, hongos o parásitos.	Propiedad de eliminar o inhibir el crecimiento de los siguientes microorganismos: - Porphyromonas gingivalis - Streptococcus gordonii - Fusobacterium nucleatum	diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano	Cuantitativa continua	De Razón	En milímetros

Anexo 05: Muestra de trabajo de la prueba de susceptibilidad antibiótica *in vitro*, preparación de agares y caldos - Laboratorio de Microbiología UPCH

