



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 776**

51 Int. Cl.:

A61F 2/30 (2006.01)

A61C 8/00 (2006.01)

A61K 6/04 (2006.01)

A61L 27/04 (2006.01)

A61L 27/06 (2006.01)

A61L 27/30 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

C23F 1/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08774897 .6**

96 Fecha de presentación : **08.07.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2178466**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2010**

54

Título: **Nanosuperficie.**

30

Prioridad: **09.07.2007 EP 07112076**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.05.2011

73

Titular/es: **ASTRA TECH AB.**
Aminogatan 1
431 21 Mölndal, SE

72

Inventor/es: **Petersson, Ingela y**
Fredriksson, Anette

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 776 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Campo de aplicación del invento

El presente invento se refiere a un componente biocompatible que tiene propiedades perfeccionadas para su implantación en el tejido óseo.

5 Antecedentes técnicos

Para implantar implantes ortopédicos o dentales, en general implantes metálicos, en la actualidad se usa con frecuencia u procedimiento de una etapa.

10 En el procedimiento de una etapa, una primera pieza del implante, tal como un portapieza dental, se coloca en general quirúrgicamente en el tejido óseo, y un tapón de cicatrización o pieza secundaria del implante, tal como un apoyo, se fija luego a la primera pieza del implante directamente después de la intervención quirúrgica. Luego se deja que el tejido blando cicatrice alrededor del tapón de cicatrización o pieza secundaria del implante. Cuando se ha usado el tapón de cicatrización, se retira después de unas pocas semanas o meses sin ninguna intervención quirúrgica y las piezas secundarias del implante, tales como un apoyo y una corona provisional, se fijan a la primera pieza del implante.

15 El procedimiento en dos etapas, que en algunos casos dentales todavía es preferible, implica generalmente en una primera etapa colocar quirúrgicamente una primera pieza de implante, tal como un portapieza dental, en el tejido óseo, donde se le deja que descanse sin carga e inmóvil durante un período de cicatrización, a menudo de tres meses o más, con el fin de permitir que el tejido óseo crezca sobre la superficie del implante para dejar que el implante se fije bien al tejido óseo, . dejando que el tejido blando que cubre la zona del implante cicatrice sobre el implante. En una segunda etapa, el tejido blando que cubre el implante se abre y las piezas secundarias del implante, tales como un apoyo dental o un diente de restitución, se fijan a la primera pieza del implante tal como dicho portapieza, formando la estructura final del implante. Este procedimiento ha sido descrito,, por ejemplo, por Branemark y colaboradores en la publicación titulada "Implantes óseo-integrados en el tratamiento de una mandíbula desdentada, Experiencia de un período de 10 años, Almqvist & Wiksell International, Estocolmo, Suecia.

25 Sin embargo, el hecho de que el implante no deba someterse a carga durante el período de cicatrización, significa que las piezas secundarias del implante no podrían fijarse a la primera pieza del implante o usarse durante el período de cicatrización. A la vista de la incomodidad en relación de asociación con este hecho, es conveniente minimizar el período de tiempo necesario para la primera etapa anteriormente mencionada, o incluso realizar todo el procedimiento de implantación en una sola operación, es decir, usar el procedimiento de una sola etapa.

30 Para algunos pacientes, se podría considerar mejor la solución de esperar como mínimo tres meses antes de cargar funcionalmente el implante, para ambos procedimientos de una y dos etapas. Sin embargo, una alternativa que utiliza el procedimiento de una sola etapa consiste en poner en funcionamiento el implante directamente después de la implantación (carga inmediata) o unas pocas semanas después de la implantación (carga temprana). Estos procedimientos, por ejemplo, han sido descritos por D. M. Esposito, páginas 836-837 de la publicación titulada "El titanio en medicina, Ciencia de los materiales, Ciencias de las superficies, Ingeniería, Respuestas biológicas y Aplicación médica", Springer-Verlag (2001).

35 Es esencial que el implante establezca una estabilidad y una ligazón entre el implante y el tejido óseo que sean suficientes para permitir la carga inmediata o la carga temprana del implante anteriormente mencionadas. Hay que hacer notar también que una carga inmediata o una carga temprana del implante podrían ser beneficiosas para la formación del hueso.

40 Algunos de los metales o aleaciones, como el titanio, el zirconio, el hafnio, el niobio, o sus aleaciones, que se usan para implantes en huesos, son capaces de formar una ligazón relativamente fuerte con el tejido óseo, una ligazón que podría ser tan fuerte como el tejido óseo por se y a veces aún más fuerte. El ejemplo más notable de esta clase de material metálico para implante es el titanio y sus aleaciones, cuyas propiedades a este respecto se han conocido desde aproximadamente 1950. La ligazón entre el metal y el tejido óseo se ha denominado "óseo-integración" (Albrektsson T, Branemark P.I., Hansson H A, Lindström J., "Implantes de titanio óseo-integrados. Requisitos para asegurar un anclaje directo en el hueso de larga duración

En el hombre", Hacia Orthop Scand, 52: 155-170 (1981).

45 Habría que hacer notar que, en contacto con el oxígeno, el titanio, el zirconio, el hafnio, el tántalo, el niobio y sus aleaciones se cubren instantáneamente de un óxido natural. Este óxido natural, sobre los implantes de titanio, podría consistir en titanio (IV), dióxido de titanio (TiO₂) con cantidades poco importantes de Ti₂O₃, TiO y Ti₃O₄.

Aunque la ligazón entre el metal (oxidado), por ejemplo el titanio, podría ser comparativamente fuerte, es conveniente intensificar esta ligazón.

Existen hasta la fecha varios métodos para tratar implantes metálicos con el fin de obtener una fijación

mejor del implante, y por tanto una óseo-integración perfeccionada. Algunos de ellos implican alterar la morfología del implante, por ejemplo mediante la creación de irregularidades en la superficie del implante para aumentar la rugosidad de la superficie en comparación con una superficie sin tratar. Se cree que un aumento en la rugosidad de la superficie, que proporciona un contacto y una zona de fijación más amplios entre el implante y el tejido óseo, aporta una retención mecánica y una resistencia mecánica mejores entre el implante y el hueso. Es bien conocido en la técnica que se puede proveer una rugosidad de superficie, por ejemplo, por pulverización con plasma, aplicación de chorro abrasivo, o ataque por vía ácida.

Además, es sabido que los osteoblastos, es decir, las células que forman los huesos, detectan y reaccionan a múltiples propiedades físicas y químicas de la superficie subyacente. La formación del hueso en la superficie de un implante requiere la diferenciación de las células madre en osteoblastos secretores para producir una matriz extracelular desmineralizada (en adelante ECM), y la calcificación subsiguiente de esta matriz, según ha descrito, por ejemplo, Anselme K, en la publicación titulada "Adherencia de osteoblastos en biomateriales", *Biomaterials* 21, 667-681 (2000).

La alteración de las propiedades químicas de la superficie del implante se ha usado frecuentemente para conseguir una fijación mejor del implante al tejido óseo. Varios métodos implican la aplicación de un estrato de material cerámico, tal como hidroxiapatito, en la superficie del implante, con el fin de mejorar la ligazón del implante al hueso, dado que el hidroxiapatito está relacionado químicamente con el hueso. El documento US (7.169.317 (Beaty) describe un método para preparar la superficie de un implante de hueso que comprende la retirada del óxido natural de la superficie del implante, atacar al ácido o tratar de otro modo la superficie del implante resultante para producir una rugosidad superficial sustancialmente uniforme, y depositar sobre la misma partículas discretas de un material que incrementa el crecimiento del hueso tal como hidroxiapatito, minerales de hueso y proteínas morfógenéticas. Las etapas de ataque al ácido y deposición se realizan preferiblemente en ausencia de oxígeno no reaccionado mediante el uso de una atmósfera inerte.

Sin embargo, un inconveniente común con los revestimientos que comprenden hidroxiapatito es que podrían ser frágiles o formar escamas o desprenderse de la superficie del implante debido a que entre el hueso y el revestimiento se forme una ligazón, más resistente que entre el revestimiento y el implante, lo que podría dar lugar a un fallo definitivo del implante. En relación con el uso de revestimientos con proteínas existen varios aspectos a considerar. Dada la naturaleza química de las proteínas, una superficie que tenga un revestimiento de proteína podría requerir unas condiciones específicas de esterilización y almacenamiento para mantener su actividad biológica. Además, la respuesta del tejido anfitrión (por ejemplo, la respuesta inmunológica) a las biomoléculas como las proteínas podría ser imprevisible. Otro inconveniente del método del documento US 7.169.317 es el requerimiento de una superficie libre de óxido, considerando que trabajar en una atmósfera inerte es incómodo y requiere un equipo especializado.

El documento US 2007/01100890 y las solicitudes relacionadas US 2007/0112353 y WO 2007/050938 (Bercksmans III y colaboradores) intentan solucionar el problema de la deficiente adherencia de un revestimiento cerámico al implante y describen un método de depositar nanopartículas discretas en una superficie áspera de implante mediante un proceso de exponer a la superficie del implante a una solución que comprenda un disolvente de 2-metoxietanol y nanocristales de hidroxiapatito (en adelante HA), por ejemplo en la forma de un coloide. Los nanocristales de HA se depositan para formar una nanoestructura que está destinada a promover la óseointegración del implante. Sin embargo, un aspecto negativo del método es la formulación de la composición que contenga nanocristales que requiere disolventes orgánicos, lo cual podría no ser conveniente debido al riesgo de contaminación orgánica de la superficie, y varias etapas del proceso que requieren equipo avanzado. La deposición se realiza a temperatura ambiente, requiriendo unos tiempos de incubación de 1 a 4 horas.

Se ha demostrado que la rugosidad de la superficie de un implante afecta a la proliferación de células y también a la producción local de factores de crecimiento por parte de las células alrededor de un implante. Los estudios in vitro de osteoblastos humanos han demostrado que las superficies de rugosidad aumentada por microincrustaciones resultaron en un número reducido de células, una menor proliferación de las células y un aumento en la producción de matrices, comparadas con superficies más lisas (Martín JY y colaboradores, Proliferación, diferenciación, y síntesis de proteínas de células humanas parecidas a osteoblastos (MG 63) cultivadas en superficies de titanio utilizadas anteriormente., *Investigación clínica sobre implantes orales*, Marzo 7 (1), 27-37, 1996). Todavía otros estudios han demostrado que la rugosidad superficial aumenta la diferenciación de células, al mismo tiempo que reduce su proliferación (Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert T W, Cochran DL, Simpson J, Dean DD, Boyan BD, "La rugosidad superficial modula la producción local de factores de crecimiento y de citoquinas por células MG-63 parecidas a osteoblastos", *Investigación de materiales biomédicos*, Sep, 32 (1), 55-63, 1996). El aumento de la diferenciación de las células implica una tasa potencialmente mejorada de formación de huesos.

Recientemente, la modulación de las capacidades adhesivas de las células ha avanzado desde las técnicas de micro a nano-miniaturización de patrones. Se cree que la función de las células se podría regular mediante señales físicas nano-estructurales por estimulación de adherencia focal mediada por integrinas y la señalización intracelular en una función de célula dependiente del anclaje (Bershadsky A, Kozlov M, y Geiger B., "Mecanosensibilidad mediada por adherencia: un tiempo para experimentar, y un tiempo para teorizar", *Curr Opin*

Cell Biol.. 18 (5), 472-81, 2006).

5 El documento EP 1440669B1 y el documento relacionado con él US 2004/0153154 A1 (Dinkelacker) describe un implante de hueso que tiene una superficie que se ha reconfigurado para comprender una microestructura para anclar el implante en la zona de células. La microestructura, que se ha provisto en la forma de un estrato de cubierta aplicado sobre una superficie que previamente se ha hecho áspera, comprende una agrupación de domos redondeados densamente empaquetados y separados por lagunas redondeadas, siendo las dimensiones de la microestructura aproximadamente del mismo orden de magnitud que las dimensiones de las células. El estrato de cubierta microestructural se podría aplicar, por ejemplo, por pulverización catódica. Además, se ha provisto en la microestructura una nanoestructura, obtenida también por pulverización catódica, comprendida por domos redondeados separados por lagunas redondeadas, en la que las dimensiones de la nanoestructura son aproximadamente de un orden decimal de magnitud menor que las dimensiones correspondientes de la microestructura. Sin embargo, de nuevo se plantean problemas potenciales con la estabilidad del estrato de cubierta y la integridad de la fijación entre el estrato de cubierta y el cuerpo del implante. Otra técnica para crear una rugosidad superficial conveniente se describe en el documento EP 1 449 544 A1 (Wen y colaboradores) que provee un método para proporcionar un implante ortopédico metálico con una rugosidad superficial a escala micrométrica o nanométrica, al mismo tiempo que mantiene la integridad estructural del implante. En este método, un implante que tiene elementos metálicos adheridos a su superficie, que definen así una geometría de superficie porosa, se ataca para producir una rugosidad superficial a escala micrométrica o nanométrica. Por ejemplo, los elementos metálicos son unos talones metálicos que tienen un tamaño desde aproximadamente 40 µm hasta varios mm. Sin embargo, este método es más bien laborioso y requiere el uso de equipo con una técnica avanzada, porque los elementos metálicos se aplican por una técnica de revestimiento mediante la sinterización para fundir los elementos a la superficie del implante y entre sí. Por consiguiente, el método es también caro.

25 En resumen: aunque hoy existen muchas técnicas actuales para perfeccionar la óseointegración de un implante, estos métodos adolecen de inconvenientes con respecto a la capacidad de proceso, el rendimiento económico y el efecto biológico y la estabilidad tras la implantación. Por tanto, en la técnica existe la necesidad de un perfeccionamiento en la producción de implantes que tengan propiedades que promuevan todavía más la óseointegración.

Sumario del invento

30 Un objeto del invento es proveer un componente biocompatible que tiene una tasa prevista de fijación entre el tejido óseo y el componente tras la implantación de éste en el tejido óseo, y que forma una ligazón mecánicamente resistente con dicho tejido óseo.

Otro objeto del invento es proveer un método para producir dicho componente biocompatible.

35 El óxido de pasivación que normalmente cubre al titanio, zirconio, hafnio, tántalo, niobio y aleaciones de los mismos en gran parte provee la biocompatibilidad de estos metales mediante la prevención de cualquier interacción química entre el metal y el tejido vivo. Sin embargo, por causar pequeños defectos en la estructura del óxido, realmente se podría aumentar más la biocompatibilidad de los componentes metálicos. El solicitante ha averiguado que tratando por ácido oxálico un componente que tenga una superficie de óxido metálico, se obtiene una estructura de superficie modificada, que tiene propiedades mejoradas para su implantación en hueso vivo.

El presente invento se define en la reivindicación 1.

40 El componente obtenido por el método del invento tiene una topografía jerárquica de superficie que comprende una microestructura y una nanoestructura primaria superpuesta sobre dicha microestructura, lo cual se ha averiguado que aumenta la actividad de las células formadoras de hueso adheridas a la misma.

45 Como la estética se está convirtiendo en un aspecto crecientemente importante de la implantología, los implantes dentales convencionales de titanio presentan un obstáculo para una solución estética perfecta, porque el lustre de color gris metálico de una superficie convencional de óxido de titanio podría ser visible a través de la encía de un paciente. Ventajosamente, la superficie modificada de óxido obtenida por el método del invento tiene un color blanquecino, que es más claro y apagado que el color gris metálico de la superficie del componente antes del tratamiento de acuerdo con el invento. El color blanquecino es muy conveniente para un componente dental, porque se podría conseguir un implante con aspecto natural. El color blanquecino se ve mejor en un componente tratado al chorro abrasivo. El color alterado del componente se podría usar también como una indicación de que se ha completado la etapa b.

50 La concentración de ácido oxálico en la composición de la etapa b podría estar en el intervalo desde 0,01 hasta 5 molar, preferiblemente alrededor de 1 molar; y el tiempo de tratamiento de la etapa b está en el intervalo de 10 a 60 minutos, preferiblemente en el intervalo de 20 a 40 minutos, y con más preferencia aproximadamente 30 minutos. La temperatura de la composición de la etapa b está típicamente en el intervalo desde alrededor de 20° C hasta aproximadamente 100° C, preferiblemente en el intervalo de 60° C a 90° C, y con más preferencia alrededor de 80° C.

5 La etapa c debería realizarse antes de que se forme un óxido de pasivación sobre dicho óxido metálico modificado. Mediante la realización de la etapa c antes de que el óxido modificado obtenido en la etapa b sea cubierto por un óxido de pasivación, se podría obtener una superficie que tuviese una nanoestructura secundaria uniformemente distribuida, lo cual promueve la óseointegración del componente. De ese modo, cuando el
 10 componente se mantiene a una temperatura superior a 0° C, por ejemplo, a la temperatura ambiente, a la presión atmosférica normal y en una atmósfera que contiene oxígeno, el intervalo entre la etapa b y la etapa c es preferiblemente lo más corto que sea posible, para evitar la formación de óxido de pasivación en la superficie del componente. En tales condiciones, la etapa c se podría realizar dentro de las 180 horas o menos después de la terminación de la etapa b, por ejemplo 72 horas, 36 horas, 24 horas o 1 hora después de la etapa b. Preferiblemente, la etapa c se realiza dentro de los 30 minutos o menos después de la terminación de la etapa b, y con más preferencia dentro de los 10 minutos o menos después de la terminación de la etapa b.

15 La segunda composición acuosa podría tener un pH en el intervalo desde 0,5 a 5, preferiblemente desde 1 a 3, y con más preferencia alrededor de 2; y la concentración de fluor o cloro ionizados podría estar en el intervalo desde aproximadamente 0,05 hasta 0,5 molar, preferiblemente alrededor de 0,1 molar. El tiempo de tratamiento activo de la etapa c está en el intervalo desde 10 segundos hasta 60 minutos, preferiblemente en el intervalo desde 10 segundos hasta 3 minutos, y con más preferencia en el intervalo desde 10 segundos hasta 50 segundos. La temperatura de la composición de la etapa c está típicamente en el intervalo desde 15 a 25° C, y preferiblemente en el intervalo desde 18 hasta 23° C.

20 El método del invento usa soluciones acuosas solamente, evitando así los problemas relacionados con los disolventes orgánicos, tales como los residuos orgánicos que permanecen en la superficie del componente. La solución acuosa que se usa en la etapa c comprende preferiblemente ácido fluorhídrico.

El método usa también equipos sencillos, se realiza fácilmente y es robusto. Por tanto, el método de acuerdo con el invento es rentable y adecuado para su aplicabilidad industrial. Además, el tiempo de tratamiento es ventajosamente corto.

25 Adicionalmente, la óseointegración del componente se podía incrementar mediante la inclusión de un material que intensifique el crecimiento del hueso en la superficie del componente. Esta superficie se podría obtener, por ejemplo, incluyendo iones metálicos o sus sales, cuyos iones metálicos se podrían seleccionar del grupo consistente en iones de titanio, iones de magnesio, iones de calcio, iones de litio, iones de estroncio o cualquier combinación de los mismos, en las composiciones acuosas de la etapa b o de la etapa c. En particular, se ha
 30 averiguado que los iones de litio o de estroncio administrados localmente en tejido óseo tienen un efecto local sobre la formación del hueso y de la masa ósea contenida en dicho tejido óseo. Se ha averiguado además que un implante que comprenda un óxido de superficie que contenga o libere litio o estroncio ionizados proporciona una tasa mejorada de formación de hueso en comparación con un implante que comprenda un estrato de óxido superficial que contenga, por ejemplo, calcio o magnesio ionizados. Por tanto, la composición de la etapa b o la composición de la etapa c podrían comprender litio o estroncio o una sal de los mismos. Con el fin de proveer un sustrato favorable para la óseointegración, el componente biocompatible preferiblemente al menos en parte consiste en titanio o una aleación de titanio. De acuerdo con ello, dicho óxido metálico preferiblemente comprende óxido de titanio. El óxido metálico podría consistir esencialmente en un óxido de titanio o en una combinación de óxidos de titanio. El óxido metálico podría ser un óxido de titanio de pasivación.

40 Con el fin de dotar al componente de una rugosidad superficial inicial que sea conveniente o de unas características químicas convenientes, el componente biocompatible se podría someter a un tratamiento de superficie mecánico o químico antes de la etapa b. Un tratamiento químico podría comprender, por ejemplo, un proceso de limpieza para eliminar sustancias indeseables que podrían afectar negativamente al resultado del método del invento o a la biocompatibilidad del componente. Un tratamiento de comunicación de rugosidad tal como
 45 un tratamiento por chorro, podría aumentar adicionalmente la óseointegración del componente y mejorar las propiedades biomecánicas del mismo.

Se ha averiguado que una superficie que tenga una topografía jerárquica de superficie que comprende una microestructura y una nanoestructura primaria superpuesta sobre dicha microestructura provee una superficie de implante que se ha mejorado con respecto a la óseointegración y a la interacción biomecánica con el tejido óseo. Por tanto, se podría obtener un componente biocompatible que comprendiese un sustrato que tenga una superficie que comprenda:

- a) una microestructura que comprenda microfositas separadas por mesetas o nervios; y
- b) una nanoestructura primaria que se superpone sobre dicha microestructura, cuya nanoestructura comprende unas depresiones dispuestas en formación ondulatoria.

55 Se ha averiguado que la superficie antes citada promueve la diferenciación de osteoblastos y la secreción de material precursor de huesos. La microestructura provee una microrrugosidad subyacente que comprende fositas con aspecto de poros, que parecen placas para cultivo de células, que estimulan la proliferación y diferenciación de las células. Posiblemente, la topografía de la superficie que comprende la microestructura y la nanoestructura

primaria se parece a la topología de una zona de hueso vivo donde se ha producido osteoclasia. Se cree que la topografía de la superficie del componente del invento se ajusta a las expectativas de las células pre-osteoblastos presentes alrededor de una zona de implante, y mediante la imitación de la superficie del hueso natural preparada por osteoclastos para la remodelación del hueso, se puede inducir rápida e intensamente la actividad de los osteoblastos mediante un componente de acuerdo con el invento. La microestructura podría tener un diámetro de fositas en el intervalo de 0,5 a 15 μm , y preferiblemente de 1 a 10 μm ; y una profundidad en el intervalo desde 0,1 hasta 2,5 μm , y preferiblemente desde 0,1 hasta 1 μm . La distancia entre microfosis adyacentes podría ser de hasta 10 μm . Las depresiones de la nanoestructura primaria tienen un diámetro en el intervalo desde 10 nm hasta 1 μm , preferiblemente en el intervalo desde 10 nm hasta 600 nm, y con más preferencia en el intervalo desde 10 nm hasta 500 nm. La profundidad podría estar en el intervalo desde 10 nm hasta 300 nm, y típicamente está en el intervalo desde 30 hasta 150 nm. Además, el diámetro de una depresión individual de la nanoestructura primaria típicamente excede a la profundidad de la misma depresión.

Según se ha mencionado anteriormente, la nanoestructura primaria se superpone sobre la microestructura primaria. Además, el diámetro y la profundidad, respectivamente, de una nanoestructura primaria son cada uno menores que la dimensión correspondiente de una fosita individual de la microestructura. Por tanto, una fosita individual de la microestructura típicamente comprende múltiples depresiones de la nanoestructura primaria. Adicionalmente, un límite de una depresión de la nanoestructura primaria típicamente constituye un límite de otra depresión de la nanoestructura primaria.

Además, la superficie anteriormente indicada podría comprender adicionalmente una nanoestructura secundaria que comprendiese nanoelementos discretos que se superpongan sobre dicha nanoestructura primaria en un patrón uniformemente distribuido y que tengan la forma de salientes redondeados. Se cree que los nanoelementos secundarios mejoran el anclaje de las células a la superficie subyacente y estimulan más la actividad de las células.

La nanoestructura secundaria del componente biocompatible del invento podría tener un diámetro de cresta en el intervalo desde 20 a 550 nm, preferiblemente desde 20 a 150 nm, y una altura de cresta media desde 5 a 200 nm, preferiblemente desde 5 a 100 nm. La distancia cresta a cresta está típicamente en el intervalo desde 10 a 450 nm, y preferiblemente desde 40 hasta 200 nm. La densidad de crestas está típicamente en el intervalo de 15 a 150 crestas/ μm^2 , y preferiblemente desde 50 a 130 crestas/ μm^2 .

En una interfaz de implante hueso-tejido, se forma en general un estrato de tejido que contiene una cantidad reducida de colágeno y minerales, y de ese modo tiene una resistencia mecánica menor comparada con la de un hueso sano normal. El espesor de este estrato de tejido determina la resistencia mecánica de la interfaz hueso-implante (Albrektsson, T y colaboradores, "Análisis ultraestructural de la zona de interfaz de implantes de titanio y de oro", Avances en biomateriales 4, 167-177, 1982; Albrektsson T, Hansson, H-A, "Una caracterización ultraestructural de la interfaz entre hueso y superficies de acero inoxidable o de titanio tratadas por pulverización catódica", Biomateriales 7, 201-205, 1986; Hansson, H-A y colaboradores, "Aspectos estructurales de la interfaz entre tejido e implantes de titanio", Revista de Odontología protésica 50, 108-113, 1983; Johansson, C y colaboradores, "Diferencias ultraestructurales de la zona de interfaz entre el hueso y Ti6Al4V o titanio comercialmente puro", Revista de Ingeniería Biomédica, 11, 3-8, 1989; Johansson, C. y colaboradores, "Estudio interfacial cualitativo entre hueso titanio, niobio o titanio comercialmente puro", Biomateriales 11, 277-280, 1990; Sennerby, L. y colaboradores, "Estructura de la interfaz hueso-titanio en implantes orales clínicos recuperados", Investigación de implantes clínicos orales, 2-103-111, 1991; Sennerby, L. y colaboradores, "Ultraestructura de la interfaz hueso-titanio en conejos" Revista de Ciencia de Materiales en Medicina 3, 262-271, 1992; Sennerby L. y colaboradores "Respuesta temprana del tejido a los implantes de titanio insertados en hueso cortical de conejo, Parte II, Observaciones ultraestructurales", Revista de Ciencia de Materiales: Material en Medicina 4, 494-502, 1993). La topografía jerárquica de superficies que comprende la microestructura y la nanoestructura primaria provee una interacción mecánica perfeccionada entre el componente y el tejido óseo formado subsiguientemente, lo que se cree que resulta en la formación de un estrato de tejido menos grueso de resistencia mecánica reducida. La nanoestructura secundaria mejora más la interacción mecánica entre el componente biocompatible y el tejido óseo circundante después de la implantación. De aquí que los componentes biocompatibles obtenidos por el método del invento proporcionan una interfaz tejido óseo-implante con mejores de resistencia al desgarramiento y a la tracción.

Además, con el fin de dotar al componente de la rugosidad inicial de superficie prevista o de las características químicas previstas, el sustrato se podría someter a un tratamiento de superficie mecánico o químico. Un tratamiento químico podría comprender, por ejemplo, un proceso de limpieza. Un tratamiento de comunicación de rugosidad, tal como un tratamiento al chorro abrasivo, podría proveer una estructura de superficie en la que los diámetros y las profundidades de la microestructura formada subsiguientemente y los diámetros de la nanoestructura primaria sean menos variables (es decir, que tengan valores más pequeños de desviaciones típicas). El aumento de homogeneidad de la superficie del componente del invento puede incrementar adicionalmente la óseointegración del componente y mejorar las propiedades biomecánicas del mismo.

El sustrato del componente biocompatible consiste típicamente, al menos en parte, en titanio o una aleación de titanio. Preferiblemente, el sustrato consiste en titanio. Además, la nanoestructura secundaria podría comprender un óxido metálico, preferiblemente un óxido de titanio. La homogeneidad de la superficie del componente, que

podría consistir en un óxido metálico solamente, es muy ventajosa con respecto a la estabilidad a largo plazo y a la integridad del componente tras la implantación. Además, la estructura de la superficie del componente es estable con respecto a los procedimientos de esterilización y al almacenamiento en envuelta.

5 La óseointegración del componente del invento se podría mejorar todavía más mediante la inclusión de un material intensificador del crecimiento del hueso, en la superficie del componente. Dicha superficie podría conseguirse, por ejemplo, incluyendo iones metálicos, por ejemplo los seleccionados del grupo consistente en iones de titanio, iones de magnesio, iones de calcio, iones de litio, iones de estroncio o cualquier combinación de los mismos en la superficie. En particular, se ha averiguado que los iones de litio o de estroncio administrados localmente en el tejido óseo podrían tener un efecto local sobre la formación del hueso y la masa del hueso en dicho tejido óseo. Por tanto, la superficie del componente del invento podría comprender litio o estroncio o una sal de los mismos.

10 El componente biocompatible del invento podría ser un componente dental, por ejemplo un implante, un portapieza, un apoyo, o una combinación de los mismos, tal como un implante de una sola pieza. El componente biocompatible podría ser también un componente ortopédico, tal como un componente de articulación coxofemoral destinado para su implantación en el cuello del fémur de un paciente.

15 Un componente biocompatible obtenido por el método del invento se podría implantar en un cuerpo humano o de un animal por un método que comprende las etapas de:

- i) proveer un componente biocompatible de acuerdo con la descripción anterior, y
- ii) implantar dicho componente biocompatible en el cuerpo de un ser humano o de un animal.

20 Por ejemplo, el componente se podría implantar en una zona periodontal del cuerpo de un ser humano o de un animal.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 es una ilustración esquemática que define los parámetros usados con respecto a la microestructura.

La Figura 2 es una ilustración esquemática que define los parámetros usados con respecto a la nanoestructura primaria.

La Figura 3 es una ilustración esquemática que define los parámetros usados con respecto a la nanoestructura secundaria.

30 La Figura 4 es una ilustración esquemática que define los ángulos usados con respecto a la microestructura y a la nanoestructura primaria, respectivamente.

La Figura 5a es una imagen con microscopio electrónico de barrido de una muestra de titanio de acuerdo con el invento.

La Figura 5b es una imagen con microscopio electrónico de barrido de una muestra de titanio de acuerdo con el invento, en la que están marcados los diámetros de la microestructura.

35 La Figura 6a es una imagen con microscopio electrónico de barrido de una muestra de titanio de acuerdo con el invento, en la que se han marcado las depresiones de la nanoestructura primaria.

La Figura 6b es una imagen con microscopio electrónico de barrido de una muestra de titanio de acuerdo con el invento, en la que se han marcado los diámetros de la nanoestructura primaria.

40 La Figura 7 es una imagen con microscopio electrónico de barrido de una muestra de titanio sometida a una técnica convencional de tratamiento por chorro abrasivo.

La Figura 8 es una imagen con microscopio electrónico de barrido de una muestra de titanio tratada al chorro abrasivo de acuerdo con el invento.

La Figura 9 es una imagen con microscopio electrónico de barrido de una muestra de titanio de acuerdo con el invento.

45 La Figura 10 es una imagen en tres dimensiones con microscopio de fuerza atómica de una muestra de titanio de acuerdo con el invento.

La Figura 11 es una imagen con microscopio electrónico de barrido de una muestra de titanio tratada al chorro abrasivo de acuerdo con el invento, en la que se han marcado elementos de la microestructura.

Las Figuras 12a y 12b son imágenes con microscopio electrónico de barrido de una muestra de titanio de

referencia tratada en una mezcla de ácido fluorhídrico y ácido oxálico..

La Figura 12c es una imagen con microscopio electrónico de barrido de una muestra de titanio tratada en ácido fluorhídrico y subsiguientemente en ácido oxálico.

5 Las Figuras 13a hasta 13c son gráficos que muestran la distribución de la microestructura: diámetro de fositas, profundidad y distancia entre fositas adyacentes, respectivamente, en una muestra de titanio de acuerdo con el invento.

Las Figuras 14a hasta 14c son gráficos que muestran la distribución de la microestructura: diámetro de fositas, profundidad y distancia entre fositas adyacentes, respectivamente, en una muestra de titanio tratada al chorro abrasivo de acuerdo con el invento.

10 Las Figuras 15a y 15b son gráficos que muestran la distribución de los diámetros y profundidades de las depresiones de la nanoestructura primaria;: respectivamente, en una muestra de titanio de acuerdo con el invento.

15 Las Figuras 16a y 16b son gráficos que muestran la distribución de los diámetros y profundidades de las depresiones de la nanoestructura primaria;: respectivamente, en una muestra de titanio tratada al chorro abrasivo de acuerdo con el invento.

Las Figuras 17a hasta 17c son gráficos que muestran la distribución en la nanoestructura secundaria del diámetro de cresta, altura y distancia cresta a cresta, respectivamente, en una muestra de titanio de acuerdo con el invento.

20 La Figura 18 es un gráfico que muestra la proliferación de células que han crecido durante 7 días sobre una superficie de implante de titanio comercial y sobre superficies que responden al invento, respectivamente.

La Figura 19 es un gráfico que muestra la producción de fosfatasa alcalina después de 7 días de cultivo de células sobre una superficie de implante de titanio comercial y sobre superficies de acuerdo con el invento, respectivamente.

25 La Figura 20a es una imagen con microscopio electrónico de barrido de células que han crecido durante 36 horas centralmente sobre una superficie de implante comercial.

La Figura 20b es una imagen con microscopio electrónico de barrido de células que han crecido durante 36 horas sobre una superficie de un componente de acuerdo con el invento.

La Figura 20c es una imagen con microscopio electrónico de barrido de células que han crecido durante 36 horas sobre una superficie de un componente de acuerdo con el invento.

30 La Figura 21 es un gráfico que muestra la producción de prostaglandina E2 tras 7 días y 14 días de cultivo de células sobre una superficie de implante de titanio comercial y sobre superficies de acuerdo con el invento, respectivamente.

La Figura 22 es un gráfico que muestra los resultados de los ensayos de par de desinserción para implantes de acuerdo con el invento y para un implante de titanio comercial en un modelo para conejo.

35 Las Figuras 23a y 23b son imágenes de secciones histológicas de un implante de acuerdo con el invento y de un implante de titanio comercial, respectivamente, en un modelo para conejo, seis semanas después de la implantación.

40 Las Figuras 24a y 24b son imágenes de secciones histológicas de un implante de acuerdo con el invento y de un implante de titanio comercial, respectivamente, en un modelo para conejo, seis semanas después de la implantación.

La Figura 25a es una imagen con microscopio electrónico de barrido de una muestra de referencia de titanio que representa la superficie de un implante de titanio comercial.

La Figura 25b es una imagen con microscopio electrónico de barrido de la muestra presentada en la Figura 25a después de la inmersión en fluido corporal simulado (en adelante SBF).

45 La Figura 26a es una imagen con microscopio electrónico de barrido de una muestra de titanio tratada de acuerdo con la etapa b del invento.

La Figura 26b es una imagen con microscopio electrónico de barrido de la muestra presentada en la figura 26a después de su inmersión en fluido corporal simulado (SBF).

50 La Figura 27a es una imagen con microscopio electrónico de barrido de una muestra de titanio tratada de acuerdo con las etapas b y c del invento.

La Figura 27b es una imagen con microscopio electrónico de barrido de la muestra presentada en la Figura 26a después de su inmersión en fluido corporal simulado (SBF).

5 La Figura 28 es un gráfico que muestra la señal de titanio residual después de la formación de apatito de una muestra de referencia y de muestras tratadas de acuerdo con el invento medidas por espectroscopio de dispersión de energía.

La Figura 29 es un gráfico que presenta las relaciones calculadas de Ca/P después de la formación de apatito de una muestra de referencia y de muestras tratadas de acuerdo con el invento.

Descripción detallada del invento

10 Tal como se usa en la presente memoria, el término “componente biocompatible” incluye dentro de su alcance cualquier componente que esté destinado para un contacto a largo plazo o a corto plazo con tejido vivo y que, tras dicho contacto, no evoque una reacción biológica adversa significativa del tejido. Un ejemplo de un componente biocompatible es un implante, tal como un implante dental.

15 Tal como se usa en la presente memoria, el término “implante” incluye dentro de su alcance cualquier dispositivo del que al menos una parte esté destinada a implantarse en el cuerpo de un animal vertebrado, en particular un mamífero, tal como un ser humano. Los implantes se podrían usar para reemplazar la anatomía o restablecer cualquier función del cuerpo.

20 En general, un implante se compone de una o varias piezas de implante. Por ejemplo, un implante dental comprende usualmente un portapieza dental acoplado a piezas secundarias de implante, tales como un apoyo o un diente de restitución. Sin embargo, a cualquier dispositivo, tal como un portapieza dental, destinado para su implantación se podría hacer referencia a él solo como un implante, incluso si se van a unir otras piezas al mismo.

25 Tal como se usa en la presente memoria, el término “óxido (metálico) de pasivación” se refiere a un óxido formado por vía natural, al que también se hace referencia como óxido natural, que es estable, no crece sustancialmente más grueso a lo largo del tiempo, y que impide cualquier reacción química sustancial del sustrato subyacente con un agente externo. El óxido de titanio de pasivación formado sobre titanio en contacto con el oxígeno atmosférico en general tiene un espesor de 2 a 5 nm.

30 Tal como se usa en la presente memoria, el término “material intensificador de crecimiento del hueso” incluye dentro de su alcance cualquier sustancia que es capaz de promover la formación del hueso, (por ejemplo, promoviendo la adherencia, la proliferación y diferenciación de osteoblastos o de pre-osteoblastos; promoviendo la producción de componentes de matriz ósea, la secreción de componentes de matriz ósea, la mineralización de matriz ósea; y la inhibición de la actividad de osteoclastos), ya sea sola o en combinación con otras sustancias.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “microestructura” se refiere a una estructura física de dimensiones que generalmente abarcan desde 0,5 μm hasta 100 μm , y el término “nanoestructura” se refiere a una estructura física de dimensiones que generalmente abarcan desde 0,1 nm hasta 500 nm.

35 El componente biocompatible del invento podría ser un componente dental, por ejemplo un implante, un portapieza, un apoyo, o combinaciones de los mismos, tales como un implante de una sola pieza. El componente biocompatible podría ser también un componente ortopédico, tal como un componente de articulación coxofemoral para su implantación en el cuello del fémur de un paciente.

40 El componente biocompatible del invento podría consistir en cualquier material adecuado tal como un metal, por ejemplo titanio o una aleación del mismo, zirconio o una aleación del mismo, hafnio o una aleación del mismo, niobio o una aleación del mismo, tántalo o una aleación del mismo, una aleación de cromo-vanadio o cualquier combinación de estos materiales, o un elemento no metálico. El componente biocompatible se podría dotar de un estrato metálico, por ejemplo un estrato superficial metálico aplicado que cubra un cuerpo no metálico o un cuerpo que consista parcialmente en un material no metálico. Ejemplos de materiales no metálicos comprenden un material cerámico, un material de plástico o un material compuesto.

45 El óxido metálico podría ser un óxido formado naturalmente al aire, o se podría formar en cualquier clase de tratamiento antes de realizar el método de acuerdo con el invento. .

50 El componente biocompatible se podría someter a cualquier clase de tratamiento previo con el fin de crear una superficie de sustrato prevista para su modificación posterior de acuerdo con el método del invento. Por ejemplo, el componente se podría pre-tratar mediante un tratamiento mecánico, químico o térmico, o cualquiera de sus combinaciones, para obtener una composición o una rugosidad de superficie inicial prevista. Un tratamiento mecánico podría comprender, por ejemplo, un tratamiento por chorro abrasivo. Un tratamiento químico podría comprender, por ejemplo, un proceso de limpieza o de desengrase.

En un aspecto, el presente invento se refiere a un método para modificación de un componente biocompatible.

De acuerdo con el método del invento, al menos una parte del componente biocompatible se somete a un tratamiento con una composición acuosa que comprende ácido oxálico, por el cual se obtiene un óxido metálico modificado (al que se hace referencia como "etapa b".) En este tratamiento, el óxido metálico modificado se disuelve y el sustrato subyacente se ataca al ácido mientras se forma un nuevo óxido sobre el componente biocompatible. Los procesos de disolución y reoxidación de óxido ocurren simultáneamente.

La parte del componente biocompatible que se va a tratar se cubre al menos parcialmente por dicho óxido metálico. La etapa se realiza introduciendo al componente en una solución acuosa de ácido oxálico a una temperatura elevada bajo una vigorosa agitación durante un período de tiempo. Alternativamente, sólo una parte del componente se podría introducir en la composición, por ejemplo por inmersión. Una parte del componente que no esté destinada a tratarse se podría enmascarar durante el tratamiento.

El pH de la composición de la etapa b debería ser ácido, tal como un pH de 5 o inferior, un pH de 2 o inferior, o un pH de 0,7 o inferior. Preferiblemente, el pH será lo más bajo que sea posible a la vista de la conveniencia del procesamiento.

La composición acuosa que comprende ácido oxálico podría ser una solución acuosa que comprendiese ácido oxálico en una concentración en el intervalo desde aproximadamente 0,001 hasta alrededor de 5 molar, por ejemplo, una solución de ácido oxálico en una concentración dentro de dicho intervalo. Preferiblemente, la concentración de ácido oxálico de la composición está en el intervalo de 0,01 a 2 molar con más preferencia en el intervalo de 0,1 a 2 molar y con la máxima preferencia aproximadamente 1 molar.

Para el fin de la etapa b, al menos una parte del componente biocompatible se podría sumergir en la composición que comprende ácido oxálico durante un período de tiempo en el intervalo desde aproximadamente 5 hasta alrededor de 60 minutos, por ejemplo de 20 a 40 minutos. Típicamente, la duración del tratamiento de la etapa b es aproximadamente de 25 minutos o alrededor de 30 minutos. Se considera que el tratamiento de la etapa b se ha completado en el momento en que el componente se retire de la composición acuosa que comprende ácido oxálico.

La temperatura de la composición acuosa podría estar en el intervalo desde aproximadamente 20° C hasta alrededor de 100° C. Típicamente, la temperatura de la composición acuosa que comprende ácido oxálico podría estar en el intervalo desde 60° C hasta 90° C, por ejemplo aproximadamente 80° C.

A título de ejemplo, el tratamiento de la etapa b se podría realizar usando una concentración de ácido oxálico de aproximadamente 1 molar a una temperatura de 80° C durante 30 minutos.

Cuando se use un componente de titanio, el óxido modificado obtenido en la etapa b es más reactivo que el óxido de titanio de pasivación formado en el aire, y tiene un porcentaje de agua mayor que el óxido de titanio de pasivación formado en el aire. Posiblemente, el óxido de titanio modificado del invento es más amorfo que el óxido de titanio de pasivación formado en el aire o formado en un pre-tratamiento químico de limpieza. La estructura de la superficie del óxido modificado obtenido en la etapa b comprende una microestructura y una nanoestructura primaria de las que se han mostrado ejemplos en las Figuras 5 y 6, y que se describen con detalle más adelante.

La superficie del componente biocompatible obtenido en la etapa b tiene un color que es más claro y más apagado que el color gris metálico de la superficie del componente antes de tratamiento de acuerdo con el método del invento. Sin embargo, hay una diferencia de color entre un componente de acuerdo con el invento que se trató previamente por chorro abrasivo, y un componente de acuerdo con el invento que simplemente se haya mecanizado, teniendo el componente tratado con chorro abrasivo un color más blanco que el componente mecanizado. El color alterado se podría usar como una indicación de que la etapa b se ha completado. Sin embargo, el color alterado se ve con más claridad después de 2 minutos de lavado en un baño por ultrasonidos.

A continuación de la etapa b, al menos una parte del óxido modificado se somete a tratamiento con una segunda composición acuosa que comprenda como mínimo un material seleccionado del grupo que consiste en fluor ionizado y cloro ionizado, y al menos un ácido (a lo que se hace referencia como "etapa c"): Mediante la etapa c, parte del óxido metálico modificado formado en la etapa b se disuelve y subsiguientemente precipita para formar una nanoestructura secundaria que comprende unos salientes redondeados uniformemente distribuidos de óxido metálico que se superponen sobre dichas microestructura y nanoestructura secundaria. En principio, se podría usar cualquier compuesto que forme un complejo con el metal del óxido metálico que se disuelve. El fluor y el cloro son agentes conocidos para la formación de complejos.

Cuando el componente se ha mantenido a una temperatura de como mínimo 0° C a la presión atmosférica normal y en una atmósfera que contenga oxígeno tal como el aire, la etapa c se debería realizar dentro de un período relativamente corto de tiempo después de la terminación de la etapa b. La etapa b se considera terminada tan pronto como el componente se haya extraído de la composición acuosa de la etapa b. Más particularmente, la etapa c debería realizarse antes de que el óxido metálico modificado, obtenido en la etapa b, se cubra por el óxido de pasivación formado sobre el mismo. Se considera que el óxido de pasivación se ha formado cuando impide cualquier reacción química sustancial del material subyacente con un agente externo. La reactividad del óxido modificado obtenido en la etapa b es vital para conseguir una distribución uniforme de las crestas redondeadas de la

nanoestructura secundaria. Se cree que, durante el tratamiento de la etapa c, el ácido ataca al óxido modificado en una multitud de zonas activas para disolver el óxido. El gas hidrógeno generado en este proceso aumenta el pH localmente en cada zona activa, El pH aumentado localmente causa que el óxido metálico precipite en la zona activa, siempre que la composición acuosa tenga una concentración suficientemente alta de material metálico. La disolución del óxido de titanio modificado obtenido en la etapa b podría proveer una concentración de titanio suficientemente alta para que precipitase el óxido de titanio. Como se forma gradualmente en el tiempo un óxido de pasivación en presencia del oxígeno, un intervalo de tiempo más corto entre la etapa b y la etapa c mejorará el resultado final de la etapa c cuando el componente se mantenga a una temperatura de como mínimo 0° C, por ejemplo, a temperatura ambiente (15° a 25° C), a presión atmosférica normal y en una atmósfera que contenga oxígeno. Por tanto, en tales condiciones, el intervalo entre la etapa b y la etapa c se mantiene preferiblemente lo más corto que sea posible. La etapa c se podría realizar hasta dentro de las 180 horas después de la terminación de la etapa b, por ejemplo, dentro de las 72 horas, 36 horas, 24 horas o 1 hora después de la etapa b. Preferiblemente, la etapa c se realiza dentro de los 30 minutos o menos después de la terminación de la etapa b, más preferiblemente dentro de los 10 minutos o menos, y con la máxima preferencia dentro de los 3 minutos o menos después de la terminación de la etapa b. Sin embargo, si el componente se mantiene en una atmósfera inerte o a la que se le impide de otro modo formar una superficie de óxido de pasivación, el intervalo de tiempo entre la etapa b y la etapa c podría ser considerablemente más largo. Para evitar la formación de un óxido de pasivación, se podría usar cualquier atmósfera que tenga una cantidad reducida de oxígeno reactivo, comparada con el aire normal. Por ejemplo, a continuación de la etapa b, se podría colocar al componente en un gas inerte como nitrógeno, helio, neón, argón, criptón xenón y radón. Alternativamente, el componente se podría colocar en una atmósfera de presión reducida o en vacío. Como alternativa, el componente se podría enfriar o congelar. Se podría usar también cualquier combinación de las estrategias anteriormente indicadas para inhibir total o parcialmente la formación de un óxido de pasivación. Por ejemplo, el componente se podría someter a la etapa b y subsiguientemente congelarse o colocarse en un gas inerte durante un período prolongado de tiempo, y luego restablecerlo a las condiciones normales (una temperatura de al menos 0° C a la presión atmosférica normal) en una atmósfera que contenga oxígeno. En tales casos, el tiempo transcurrido entre la etapa b y la etapa c para el componente en dichas condiciones normales en una atmósfera que contenga oxígeno debería ser de 180 horas o menos, por ejemplo 72 horas o menos, 36 horas o menos, 24 horas o menos, 1 hora o menos, 30 minutos o menos, 10 minutos o menos, ó 3 minutos o menos.

Preferiblemente, la etapa c se realiza mediante la inmersión del componente en una solución acuosa de ácido fluorhídrico. Alternativamente, sólo una parte del componente se podría sumergir en la composición, por ejemplo, por inmersión. Una parte del componente que no esté destinada a tratarse se podría enmascarar durante el tratamiento.

La composición acuosa comprende al menos un material seleccionado del grupo que consiste en flúor ionizado y cloro ionizado, y al menos un ácido. La composición acuosa podría ser una solución acuosa que tenga un pH en el intervalo de 0,5 a 5, preferiblemente de 1 a 3 molar, y con más preferencia aproximadamente 2. La concentración de flúor ionizado o de cloro ionizado podría estar en el intervalo desde aproximadamente 0,05 hasta 0,5 molar. Por ejemplo, la composición podría ser una solución de ácido fluorhídrico (FH) que tuviese una concentración comprendida en dicho intervalo. Preferiblemente, se usa una concentración de ácido fluorhídrico en el intervalo desde aproximadamente 0,1 hasta 0,3 molar, y con más preferencia alrededor de 0,1 molar.

Se considera que el tratamiento de la etapa c está empezando cuando se pueda observar que el ácido actúa sobre la superficie del sustrato. Esta actividad se podría detectar por la formación de gas hidrógeno en la superficie del componente, lo cual tiene lugar usualmente a los 20-30 segundos a temperatura ambiente. De ese modo, por el término "tratamiento activo" se quiere decir un tratamiento que se realiza comenzando con la formación de la primera burbuja de gas hidrógeno. El tiempo de tratamiento activo de la etapa c está en el intervalo desde 10 segundos hasta 60 minutos, tal como desde 10 segundos hasta 3 minutos, desde 10 segundos hasta 2 minutos, desde 10 segundos hasta 60 segundos, desde 10 hasta 50 segundos, desde 10 hasta 40 segundos, y desde 10 hasta 30 segundos.

La etapa c se podría realizar a temperatura ambiente. Típicamente, la composición acuosa de la etapa c podría tener una temperatura en el intervalo desde 15° hasta 25° C, por ejemplo, una temperatura en el intervalo desde 18° hasta 25° C.

A título de ejemplo, el tratamiento de la etapa c se podría realizar usando ácido fluorhídrico a una concentración de aproximadamente 0,1 molar a temperatura ambiente para un tiempo de tratamiento activo de 40 segundos.

Se observará que el ajuste de uno cualquiera de los parámetros de tratamiento: tiempo, temperatura, pH y concentración podría requerir el ajuste apropiado de cualquier otro de dichos parámetros dentro de los intervalos antes mencionados con el fin de obtener un resultado aceptable.

Mediante la etapa c, la estructura jerárquica de superficies obtenida en la etapa b se mantiene, en general, aunque sus estructuras más finas podrían disolverse en parte. La estructura de superficies obtenida después de la etapa c se muestra en las Figuras 8 y 9, y se describirá con mayor detalle más adelante. En las realizaciones del invento, el óxido metálico que se origina a partir de la disolución de óxido metálico modificado obtenido en la etapa b

precipita para formar una estructura nanosecundaria que comprende unas crestas redondeadas uniformemente distribuidas en la parte superior de la microestructura, y la nanoestructura primaria. En las realizaciones de este invento, las crestas de la nanoestructura secundaria consisten de ese modo en un óxido metálico. Se podrían añadir también por separado compuestos metálicos solubles a la composición acuosa de la etapa c, con el fin de incrementar la concentración del metal de la composición de la etapa c.

Opcionalmente, las composiciones utilizadas en la etapa b y en la etapa c podrían comprender un material intensificador del crecimiento del hueso. Este material podría comprender iones metálicos, tales como iones de titanio, iones de magnesio, iones de calcio, iones de litio o iones de estroncio, o una sal de los mismos. Estos iones se podrían añadir por separado a la composición. Por ejemplo, la composición de la etapa b o la composición de la etapa c podrían comprender cualquiera de los iones antes mencionados. Alternativamente, ambas composiciones podrían comprender iones metálicos. Cuando ambas composiciones comprenden iones metálicos, podrían comprender las mismas especies o diferentes especies de iones metálicos. Mediante la incorporación de los iones metálicos antes indicados o de cualquier combinación de los mismos, se podría obtener una superficie modificada constituida por dichos iones o por una combinación de los mismos, que tenga propiedades químicas alteradas. Por tanto, se podría mejorar la biocompatibilidad del componente y se podría estimular la óseointegración del mismo.

En particular, se ha averiguado que los iones de litio o de estroncio administrados localmente en tejido óseo tienen un efecto local sobre la formación del hueso y la masa ósea en dicho tejido óseo. Además, se ha averiguado que un implante que comprenda una superficie que contenga o libere litio o estroncio ionizados provee un ritmo mejorado de formación del hueso, y por tanto un ritmo mejorado de fijación entre el tejido óseo y el implante en comparación con un implante que comprenda un óxido superficial constituido, por ejemplo, por calcio o magnesio ionizados. Por tanto, en las realizaciones del invento, ambas composiciones de las etapas b y c, o la composición de la etapa b solamente, comprenden litio o estroncio ionizados o una combinación de los mismos. Alternativamente, sólo la composición de la etapa c comprende litio o estroncio ionizados o una combinación de los mismos.

Como alternativa, se podría aplicar un material intensificador del crecimiento del hueso, tal como litio o estroncio ionizados, sobre la superficie del componente después de la realización de la etapa b o de la etapa c de acuerdo con el invento.

Un componente biocompatible se podría obtener por el método descrito anteriormente, el cual se podría implantar en el cuerpo de un ser humano o de un animal. Por ejemplo, el componente biocompatible se podría implantar en una zona periodontal del cuerpo de un ser humano o de un animal.

El componente biocompatible podría tener una estructura jerárquica de superficies que comprenda una microestructura, una nanoestructura primaria superpuesta sobre dicha microestructura, y opcionalmente una nanoestructura secundaria superpuesta sobre dicha nanoestructura primaria.

Los términos “profundidad” (h_1) “diámetro” (X_1) y “distancia” (D_1) con respecto al perfil de la microestructura se definen en la Figura 1. La profundidad (h_1) de una fosita se define como la distancia entre una línea imaginaria trazada entre dos crestas adyacentes y la superficie intermedia en su punto más bajo. Si no existen crestas bien definidas, la línea imaginaria se traza entre los puntos donde el perfil de la superficie comience a desviarse del perfil esencialmente plano (una meseta). El diámetro (x_1) de una fosita y la distancia (D_1) entre fositas adyacentes son las distancias entre dichos puntos adyacentes como se definen en la Figura 1. En la Figura 1, se ha provisto también esquemáticamente una nanoestructura primaria superpuesta sobre la microestructura. Los términos “profundidad” (h_2) y “diámetro” (x_2) con respecto a la nanoestructura primaria se han definido de forma correspondiente en la Figura 2.

Los términos “altura” (h_3), “diámetro” (x_3) y “distancia de cresta a cresta” con respecto a la nanoestructura secundaria se definen en la Figura 3. La altura de cresta se define como la distancia entre una línea imaginaria trazada entre dos crestas adyacente y la superficie intermedia en su punto más bajo. El diámetro de cresta (x_3) se mide entre los puntos de la cresta donde el perfil de la superficie comienza a desviarse de un perfil esencialmente plano.

En la Figura 4, se han definido el ángulo α con respecto a un perfil de la microestructura y el ángulo β con respecto a un perfil de la nanoestructura primaria. El ángulo α se define como el ángulo entre dos líneas imaginarias, una de las cuales representa la pendiente de una pared de una fosita de la microestructura en el punto en el que el perfil de la superficie comienza a desviarse de un perfil de superficie esencialmente plano (P_{1a}), y otra de las cuales representa la pendiente de una pared adyacente de una fosita adyacente de la microestructura en el punto donde el perfil de la superficie empieza a desviarse de un perfil de superficie esencialmente plano (P_{1b}). De ese modo, dichas fositas mutuamente adyacentes podrían estar separadas por una meseta. De acuerdo con ello, en el caso en que dos fositas adyacentes estén separadas por una cresta, las líneas imaginarias representan las inclinaciones de las paredes en dicha cresta. El ángulo β se define como el ángulo entre dos líneas imaginarias que representan la pendiente de una pared de una depresión de la nanoestructura primaria en su punto de inflexión (P_{2a}) y la pendiente de una pared adyacente de una depresión adyacente de la nanoestructura primaria en su punto de inflexión (P_{2b}), respectivamente. En el caso en que dos depresiones cóncavas estén separadas por una cresta, el punto de inflexión está localizado de ese modo en dicha cresta.

La microestructura y la nanoestructura primaria del componente del invento se obtienen esencialmente en la etapa b del método descrito anteriormente. Según se ha descrito, la etapa b provee una superficie modificada de óxido que se ha engrosado, es reactiva, y tiene un color blanco o blanquecino. La Figura 5a es una imagen con microscopio electrónico de barrido (en adelante imagen SEM) de un componente después de realizarse la etapa b del método del invento, mostrando dicha microestructura y dicha nanoestructura primaria. El componente se trató previamente por chorro abrasivo. Como se ve en esta imagen, la microestructura comprende unas depresiones o fositas parecidas a poros de diferentes tamaños. La Figura 5b es una imagen SEM de un componente después de la realización de la etapa b de acuerdo con el invento, en la que se han marcado los diámetros de algunas de las fositas de la microestructura.

Las Figuras 13 y 14 presentan las distribuciones de diámetros de fositas, profundidades de fositas y distancias entre fositas mutuamente adyacentes de la microestructura. Por ejemplo, una fosita de la microestructura podría tener un diámetro x_1 en el intervalo desde 0,5 a 15 μm , preferiblemente desde 1 a 10 μm , y con más preferencia desde 1 hasta 5 μm ; y una profundidad h_1 en el intervalo desde 0,1 hasta 2,5 μm , preferiblemente desde 0,1 hasta 1 μm , y con más preferencia desde 0,1 hasta 0,7 μm . Las fositas adyacentes típicamente están separadas por una meseta o un nervio, que podría tener un diámetro de hasta 10 μm , preferiblemente hasta 5 μm , y con más preferencia hasta 3 μm . Así, la distancia D_1 entre fositas adyacentes podría ser hasta 10 μm , hasta 5 μm , o hasta 3 μm . Sin embargo, como ocurre a menudo con un nervio de separación, se podría considerar que dos fositas adyacentes no están separadas por distancia alguna.

Como se ve en la Figura 5, la forma general de una fosita individual de la microestructura podría ser aproximadamente circular u ovalada, o podría ser irregular. La microestructura podría comprender también recortes. Además, una fosita de mayor diámetro podría comprender una o varias fositas de menor diámetro.

La microestructura podría tener un ángulo α según se ha definido anteriormente, y en la Figura 4 está en el intervalo desde 20° hasta 130°, preferiblemente desde 30° hasta 120°, con más preferencia desde 40° hasta 110°, y con la máxima preferencia desde 50° hasta 100°.

Sobre la microestructura descrita anteriormente, se provee una nanoestructura primaria superpuesta. La nanoestructura primaria se puede ver en la Figura 5, y se ha ilustrado además en la Figura 6, en la que se han marcado elementos de la nanoestructura primaria. La nanoestructura primaria se podría describir como una estructura continua con forma de onda. Dicha nanoestructura primaria comprende una multitud de depresiones de poco fondo practicadas en las paredes y en los fondos de las fositas de la microestructura, y en las mesetas o nervios que separan las fositas de la microestructura. El diámetro x_2 de las depresiones de la nanoestructura primaria podría estar en el intervalo desde 10 nm hasta 1 μm , preferiblemente desde 10 nm hasta 600 nm, y con más preferencia desde 10 nm hasta 500 nm; y la profundidad h_2 de las depresiones de la nanoestructura primaria podría estar en el intervalo desde 10 hasta 300 nm, preferiblemente desde 30 hasta 150 nm. Típicamente las depresiones son poco profundas, lo que significa que el diámetro de una depresión excede a su profundidad. Las depresiones de la nanoestructura primaria tienen una forma esencialmente circular u ovalada. Las Figuras 15 y 16 presentan las distribuciones de diámetros y profundidades de las depresiones de la nanoestructura primaria.

Las depresiones de la nanoestructura primaria podrían tener un límite o borde bien definidos. Sin embargo, una depresión de la nanoestructura primaria podría tener también una pared que suba desde el fondo de dicha depresión y luego pase suavemente al interior de la siguiente depresión sin formar un límite bien definido entre las mismas. En cualquiera de los dos casos anteriores, sin embargo, no existe una distancia definible que separe el límite de una depresión de la nanoestructura primaria del límite de otra depresión. Más bien, las depresiones se yuxtaponen para formar un patrón parecido a una onda que tiene un aspecto bastante regular. La nanoestructura primaria podría tener un ángulo β como se ha definido anteriormente y en la Figura 4 en el intervalo desde 80° hasta 160°; preferiblemente desde 90° hasta 150°, con más preferencia desde 100° hasta 140°, y con la máxima preferencia desde 110° hasta 130°.

Según se ha mencionado antes, la nanoestructura primaria se superpone sobre la microestructura primaria. Además, el diámetro y la profundidad, respectivamente, de una nanoestructura primaria son menores que la correspondiente dimensión de una fosita individual de la microestructura. Así, una fosita individual de la microestructura típicamente comprende múltiples depresiones de la nanoestructura primaria. Por ejemplo, una fosita de la microestructura podría comprender desde aproximadamente 5 hasta alrededor de 50 de dichas depresiones. Además, una parte de un límite de una depresión de la nanoestructura primaria constituye típicamente una parte de un límite de otra depresión de la nanoestructura primaria.

Las Figuras 8 y 9 son imágenes SEM de un componente modificado de acuerdo con el invento. En la Figura 8, la muestra se trató previamente por chorro abrasivo, mientras que en la Figura 9, la muestra simplemente se mecanizó. En estas figuras, se puede ver una nanoestructura secundaria que se ha superpuesto sobre la microestructura y la nanoestructura primaria antes mencionadas. La Figura 10 es una imagen tomada por microscopio de fuerza atómica que ilustra además la nanoestructura secundaria. Como puede verse en la Figura 10, la nanoestructura secundaria comprende unos elementos salientes discretos que tienen la forma de crestas redondeadas. Las nanocrestas están distribuidas densa y uniformemente sobre la estructura de la superficie subyacente. Por ejemplo, el número de crestas por unidad de superficie podría estar en el intervalo desde 15 hasta

150 crestas/ μm^2 , y preferiblemente desde 50 hasta 130 crestas/ μm^2 .

La Figura 17 presenta las distribuciones de diámetro de cresta, altura media de cresta y distancia cresta a cresta de la nanoestructura secundaria. Típicamente, la altura media de cresta h_3 de la nanoestructura secundaria está en el intervalo desde 5 hasta 200 nm, y preferiblemente desde 5 hasta 100 nm. El diámetro x_3 de una cresta individual de la nanoestructura secundaria está típicamente en el intervalo desde 20 hasta 550 nm, y preferiblemente desde 20 hasta 150 nm. La distancia de cresta a cresta D_3 de una cresta individual está típicamente en el intervalo desde 10 a 450 nm, y preferiblemente desde 40 hasta 200 nm. La Figura 11 presenta una imagen SEM de un componente que comprende la microestructura, la nanoestructura primaria y la nanoestructura secundaria, en la que se han marcado las fositas de la microestructura.

En los ejemplos, en los que se ha sometido a un componente a un tratamiento por chorro abrasivo antes del tratamiento con ácido oxálico, existe una estructura de superficie superior sobre la que se superpone la microestructura. La estructura de la superficie de un componente del invento pre-tratada por chorro abrasivo comprende típicamente amplias fositas que tienen una longitud en el intervalo desde 10 hasta 70 μm y una profundidad en el intervalo desde 3 hasta 20 μm . Típicamente, las fositas amplias tienen una forma generalmente ovalada. La distancia entre fositas adyacentes podría estar en el intervalo desde 1 hasta 20 μm . Superpuesta sobre esta estructura de fosita amplia se encuentra la microestructura anteriormente mencionada. De ese modo, los lados y los fondos de las fositas amplias y las superficies comprendidas entre las fositas amplias comprenden las fositas y las mesetas o nervios de separación de la microestructura anteriormente mencionada. En la Figura 7 se presenta una imagen SEM de una superficie convencional tratada con chorro abrasivo. Un pretratamiento al chorro abrasivo afecta a las dimensiones de la microestructura, de la nanoestructura primaria y de la nanoestructura secundaria opcional formadas subsiguientemente. En un componente que se sometió a un tratamiento por chorro abrasivo, la microestructura formada subsiguientemente tenía en general unas dimensiones un poco mayores que la microestructura de un componente de acuerdo con el invento que simplemente se había mecanizado, y la nanoestructura primaria formada subsiguientemente tenía en general unas dimensiones algo mayores que la nanoestructura primaria de un componente que simplemente se había mecanizado. Adicionalmente, los diámetros de la microestructura y de la nanoestructura primaria, y las profundidades de la microestructura, eran más uniformes en un componente tratado al chorro abrasivo, como se ha demostrado mediante los valores de desviación típica mostrados en la Tabla 1, que las correspondientes características de un componente mecanizado.

Un componente biocompatible obtenido por el método del invento se podría implantar en el cuerpo de un ser humano o de un animal por un método que comprenda las etapas de i) proveer un componente biocompatible según se ha descrito anteriormente, y ii) implantar el componente en el cuerpo del ser humano o del animal. Por ejemplo, el componente biocompatible se podría implantar en una zona periodontal de dicho cuerpo humano o de animal.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Modificación de superficies.

(i) Preparación de muestras

Unas muestras de titanio que tenían la forma de una moneda (mecanizada y tratada con chorro abrasivo, respectivamente), un portapieza (tratado con chorro abrasivo) y un apoyo (mecanizado) se limpiaron mediante un tratamiento químico convencional. Las muestras se sumergieron en una solución acuosa 1 molar de ácido oxálico y se dejaron a 80° C durante 30 minutos bajo una agitación vigorosa. Transcurridos los 30 minutos, se retiraron las muestras de la solución de ácido oxálico y se aclararon en agua seguido por otro aclarado en agua en un baño ultrasónico durante 2 minutos. Aproximadamente 10 minutos después del aclarado, las muestras se sumergieron en una solución acuosa 0,1 molar de ácido fluorhídrico (FH) a la temperatura ambiente y con agitación hasta el comienzo de la disolución activa, seguida por un tiempo de tratamiento activo adicional de 40 segundos. A continuación, se retiraron las muestras de la solución de FH y se aclararon en agua seguido por otro aclarado en agua en un baño ultrasónico durante 5 minutos. Se secaron las muestras a temperatura ambiente durante unos 50 minutos antes de su esterilización.

(ii) Medidas de topología de superficies

Se realizó una toma de imágenes con microscopio electrónico de barrido (SEM) usando el aparato ESEM XL 30 (FEI) en muestras después del aclarado siguiente a la etapa b y después del secado siguiente a la etapa c. Se tomaron imágenes estereó usando aumentos entre 500x y 15000x y se evaluaron mediante el programa MeX 5.0 (Alicona). No se usaron filtros. Se determinaron las profundidades y los diámetros de las fositas de la microestructura y de las depresiones de la nanoestructura primaria y las distancias entre fositas adyacentes de la microestructura. Los resultados se presentan en las Figuras 13a hasta 13c (muestra mecanizada) y Figuras 14a hasta 14c (muestra tratada al chorro abrasivo) para la microestructura primaria y en las Figuras 15a hasta 15b (muestra mecanizada) y Figuras 16 a hasta 16b (muestra tratada al chorro abrasivo) para la nanoestructura primaria. Las imágenes SEM tomadas después de la etapa b se presentan en las Figuras 5a y 5b, y las imágenes SEM tomadas después de la esterilización se presentan en las Figuras 8, 9 y 11.

5 Se realizó un ensayo con microscopio de fuerza atómica (AFM) en el modo de contacto intermitente (TappingMode™) usando un nanoscopio IIIa (de la casa Digital Instruments). Se analizaron las nanoestructuras secundarias de tres muestras de acuerdo con el invento (mecanizadas) en dos puntos por muestra, estando situado cada punto aproximadamente a 1 mm del borde de la muestra. El área del análisis era de 2 μm x 2 μm. Se determinaron las alturas de cresta, los diámetros de cresta, las distancia de cresta a cresta y el número de crestas por μm². Se midieron dichas dimensiones en mm y se convirtieron a nm usando la escala provista en los gráficos de perfiles obtenidos. Las distribuciones de las alturas de cresta, diámetros de cresta y distancias de cresta a cresta, respectivamente, se han presentado en las Figura 17 a hasta 17c.

10 La Tabla 1 resume los valores máximos, mínimos y medios de las dimensiones determinadas para la microestructura y la nanoestructura primaria para componentes tratados al chorro abrasivo y mecanizados, respectivamente, determinados mediante el SEM/MeX 5.0. Se presentan también los valores máximos, mínimos y medios determinados para la nanoestructura secundaria de un componente mecanizado mediante el AFM (microscopio de fuerza atómica).

15 Tabla 1. Dimensiones de estructuras de superficies para muestras tratada al chorro abrasivo y mecanizadas de acuerdo con el invento.

		Muestra tratada al chorro abrasivo		Muestra mecanizada
Microestructura				
Diámetro (x ₁) (μm)	Máximo	6,8		9,83
	Mínimo	0,9		3,74
	Medio	2,97		2,24
	Desviación típica	1,26		1,59
Profundidad (h ₁) (μm)	Máxima	2,1		1,27
	Mínima	0,1		0,01
	Media	0,55		0,34
	Desviación típica	0,45		0,25
Distancia (D ₁) (nm)	Máxima	3,3	7,99	
	Mínima	0,4	0,0	
	Media	1,60	1,54	
	Desviación típica	0,87	1,44	
Nanoestructura primaria				
Diámetro (x ₂) (nm)	Máximo	1130		890
	Mínimo	9		231
	Medio	353		506
	Desviación típica	256		186
Nanoestructura primaria				
Profundidad (h ₂) (nm)	Máxima	220		253,7
	Mínima	9		33
	Media	74		117
	Desviación típica	46		48

Nanoestructura secundaria			
Diámetro (x_3) (nm)	Máximo	No aplicable	253,7
	Mínimo	No aplicable	14,9
	Medio	No aplicable	32,4
	Desviación típica	No aplicable	22,9
Altura (h_3) (nm)	Máxima	No aplicable	129,4
	Mínima	No aplicable	3,0
	Media	No aplicable	32,4
	Desviación típica	No aplicable	22,9
Distancia cresta a cresta (D_3) (nm)	Máxima	No aplicable	388,1
	Mínima	No aplicable	29,9
	Media	No aplicable	128,4
	Desviación típica	No aplicable	54,9

Ejemplo comparativo 1a

5 Unas muestras de titanio tratadas con chorro abrasivo (de forma de moneda) se sumergieron en una solución acuosa que comprendía ácido fluorhídrico 0,1 molar y ácido oxálico 1 molar a temperatura ambiente y con agitación durante 5, 15, 30 y 42 minutos, respectivamente. Se retiraron las muestras de la solución y se les sometió a un aclarado en agua seguido de otro aclarado en agua en baño ultrasónico durante 2 minutos. Después de secar las muestras, se examinó la topografía de sus superficies con un microscopio electrónico de barrido (E SEM XL 30, FE).

10 Como resultado, a los 5 minutos del tratamiento anterior se obtuvieron muestras que tenían unas partes parcialmente atacadas al ácido y unos elementos salientes no distribuidos uniformemente. Las muestras tomadas a los 15 minutos presentaban una estructura de superficies atacada al ácido y relativamente plana, que comprendía elementos salientes de un modo poco denso. La superficie de las muestras tomadas a los 30 minutos tenía un aspecto exterior a rayas y comprendía unos pequeños elementos salientes y también algunas partículas no identificadas. En la Figura 12a se presenta una imagen obtenida con microscopio electrónico de barrido de una muestra seca tratada durante 5 minutos, y en la Figura 12b se presenta una imagen obtenida con microscopio electrónico de barrido de una muestra seca tratada durante 30 minutos

Ejemplo comparativo 1b

20 Se sumergieron unas muestras de titanio en una solución acuosa 0,1 molar de FH a temperatura ambiente y con agitación hasta el comienzo de la disolución activa, seguida por un tiempo de tratamiento adicional de 40 segundos. A continuación, se retiraron las muestras de la solución de FH y se les sometió a un aclarado en agua seguido por otro aclarado en agua en un baño ultrasónico durante 5 minutos. Aproximadamente 10 minutos después del aclarado, se sumergieron las muestras en una solución acuosa 1 molar de ácido oxálico y se dejaron a 80° C durante 30 minutos con una intensa agitación. A los 30 minutos se retiraron las muestras de la solución de ácido oxálico y se sometieron a un aclarado en agua seguido por otro aclarado en agua en un baño ultrasónico durante 2 minutos. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 hora.

25 Se tomó una imagen de una muestra seca con un microscopio electrónico de barrido (ESEM XL 30, FEI). El resultado se presenta en la Figura 12c.

Ejemplo 2 – Proliferación y actividad de las células

30 Se investigaron la proliferación de células y la producción de fosfatasa alcalina (en adelante ALP) y de prostaglandina E2 (en adelante PGE2), respectivamente, para células osteoblastos humanas in vitro sobre superficies de titanio de acuerdo con el invento, en comparación con células crecidas sobre una superficie de implante comercial (OsseoSpeed™, Asua Tech AB, Suecia)

(i) Cultivo de células

La MG-63 es una estirpe de células humanas que se usa convencionalmente para estudios in vitro de osteoblastos. En este estudio se desarrollaron células MG-63 (Mg-63, ATCC N° CRL-1427, EE.UU.) en matraces de 300 ml tipo Falcon de cultivo de células (BD, WWR, Suecia) en un medio mínimo esencial de Dulbecco (en adelante D-MEM) (Gibco, Reino Unido) que contenía un 5% de suero fetal de ternera (en adelante FCS) (Gibco, Reino Unido) y un 1% de penicilina-estreptomina (en adelante PEST) (Gibco, Reino Unido) del segundo paso de una ampolla de células congeladas. Cuando hubieron crecido células adherentes hasta la confluencia, se hicieron pasar usando un 0,05% de tripsina-ácido etileno-diamino-tetraacético (en adelante EDTA) (Gibco, Reino Unido) durante 3 pasos. La viabilidad de las células fue elevada (> 98%) contada usando un microscopio óptico

(ii) Morfología de las células (Microscopio electrónico de barrido, en adelante SEM)

Tres cajas de muestras de titanio β esterilizado con forma de moneda, una de las cuales se había sometido a la etapa b de acuerdo con el invento, otra de las cuales se había sometido a la etapa b y a la etapa c de acuerdo con el invento, y otra de las cuales tenía una superficie disponible comercialmente (OsseSpeed™; Asta Tech AB, Suecia) se colocaron cada una en una placa separada Falcon de 24 pocillos (BD, WWR, Suecia). A cada pocillo se añadió 1 ml de D-MEM (Gibco, Reino Unido) que contenía un 5% de FCS (Gibco, Reino Unido) y un 1% de PEST (Gibco, Reino Unido) que tenía una concentración de células de 20.000 células/ml. Las placas se incubaron a 37° C, 5% de CO₂ y 100% de humedad durante 36 horas. Se fijaron las muestras usando glutaraldehído a 4° C, seguido por una fijación con tetróxido de osmio, deshidratación y pulverización catódica con oro de acuerdo con un procedimiento de preparación convencional con muestras SEM. Se investigó la morfología de las células mediante imágenes con microscopio electrónico de barrido (ESEM XL 30, FEI). En la Figura 20a se muestran las imágenes de las células tomadas con un microscopio electrónico de barrido (células desarrolladas en una superficie convencional), en la Figura 20b las células desarrolladas en un componente tratado de acuerdo con la etapa b del invento, y en la Figura 20c las células desarrolladas en un componente tratado de acuerdo con la etapa b y la etapa c del invento.

(iii) Evaluación de la proliferación de células, actividad de ALP y actividad de PGE2

Tres conjuntos (n= 6) de cajas de muestras de titanio β esterilizado con forma de monedas, un conjunto que se había sometido a la etapa b de acuerdo con el invento ("superficie 1 del invento"), un conjunto que se había sometido a la etapa b y a la etapa c de acuerdo con el invento ("superficie 2 del invento"), y un conjunto que tenía una superficie disponible comercialmente (OsseoSpeed™; Asta Tech AB, Suecia), se colocaron cada uno en una placa separada de 24 pocillos (BD, WWR, Suecia). A cada pocillo se añadió 1 ml de D-MEM (Gibco, Reino Unido) que contenía un 5% de FCS (Gibco, Reino Unido) y un 1% de PEST (Gibco, Reino Unido) y que tenía una concentración de células MG-64 de 20.000 células/ml. Las placas se incubaron a 37° C, 5% de CO₂ y un 100% de humedad durante 14 días.

Después de 7 días de cultivo, se analizó una muestra (50 μ l) de cada pocillo para determinar la ALP exógena. Se analizaron las células adherentes para determinar la ALP endógena mediante escisión de células seguida por una centrifugación y una determinación del contenido de ALP sobrenadante e intracelular (ng/ml) usando un equipo colorimétrico de ensayos de fosfatasa alcalina Senzolye™ pNPP (BioSite, Suecia) de acuerdo con las instrucciones de fábrica. Después de 7 días, las muestras sometidas a ambas etapas b y c de acuerdo con el invento (superficie 2 del invento) habían inducido una producción notablemente mayor de ALP por célula que las muestras de referencia (OsseoSpeed™). Los resultados se presentan en la Figura 19.

Tras 7 y 14 días de cultivo, respectivamente, se determinó el número total de células por pocillo usando un Núcleo Contador Núcleo Casete (ChemoMetec A/S Dinamarca) de acuerdo con las instrucciones de fábrica. Los resultados se presentan en la Figura 18.

Tras 7 y 14 días de cultivo, respectivamente, se usaron 300 μ l de sobrenadante de cada pocillo para la determinación de PGE2 usando los sistemas R&D del equipo ELISA para inmunoanálisis de PGE2 (R&D Systems, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 7 días de cultivo, la producción de PGE2 era un poco menor en las muestras que respondían al invento en comparación con las muestras de referencia. Sin embargo, después de 14 días, ambos conjuntos de muestras de acuerdo con el invento habían inducido una producción de PGE2 por célula notablemente mayor que las muestras de referencia. Los resultados después de 7 y 14 días, respectivamente, se presentan en la Figura 21.

En resumen, se averiguó que las muestras que respondían al invento indujeron una menor densidad de células y un número menor de células adherentes en comparación con las superficies de referencia. Sin embargo, entre las células desarrolladas sobre las superficies que respondían al invento, un número mayor de células fue proliferativo en comparación con las células que habían crecido en las superficies de referencia. Las células desarrolladas en las superficies que respondían al invento eran menos apoptóticas, más alargadas y tenían muchos pequeños salientes que indicaban actividad, como se ve en las Figuras 20a hasta 20c.

Las células crecidas en ambas superficies que respondían al invento presentaron una producción de PGE2 significativamente incrementada después de 14 días de cultivo en comparación con las células crecidas en una

superficie convencional. Además, las células desarrolladas en una superficie que respondía al invento que comprendían una nanoestructura secundaria tenían una actividad de ALP notablemente mayor que las células crecidas en una superficie convencional. Un aumento en la actividad de ALP o de PGE2 está relacionado con un aumento de la actividad de osteoblastos, una disminución de la actividad de los osteoclastos y una mineralización acelerada de ECM. Por tanto, en conclusión, el invento provee un componente biocompatible que se ha mejorado con respecto a la tasa de formación del hueso y a la óseointegración.

Ejemplo 3 – Implantación

Se ensayó la integración de implantes que respondían al invento en un modelo para conejo. El objetivo era estudiar cualitativa y cuantitativamente la respuesta del tejido óseo *in vivo* a dos modificaciones de superficies de implante de acuerdo con el invento, en comparación con la respuesta a implantes de referencia disponibles en el comercio.

(i) Implantes para el estudio del par de desinserción

Se usaron portapiezas de par de titanio (diseño de par de desinserción de cabeza cuadrada, 3,5 x 8,2 mm) preparados por inmersión en ácido oxálico y subsiguientemente en FH según se describe en el Ejemplo 1 (es decir, incluyendo las etapas b y c) (a lo que se hace referencia como Implante del ensayo 2). Asimismo, se usaron portapiezas de par (3,5 x 8,2 mm) que se prepararon por inmersión en ácido oxálico de acuerdo con el Ejemplo 1 (es decir, se omitió la etapa c) (al que se hace referencia como implante del ensayo 1). Además, se usaron como portapiezas de referencia los portapiezas (3,5 x 8 mm) que representaban el implante oral disponible comercialmente OsseoSpeed™.

(ii) Implantes para estudio histológico e histomorfométrico

Se prepararon portapiezas de diseño humano de implantes orales (3,5 x 8 mm) según se ha descrito en el ejemplo 1 (implante del ensayo 2). Asimismo, se usaron portapiezas (3,5 x 8,2 mm) que se prepararon según se ha descrito en el Ejemplo 1, con la excepción de que se omitió el tratamiento con FH (es decir, el implante del ensayo 1). Además, se usaron como portapiezas de referencia los portapiezas (3,5 x 8 mm) que representaban el implante oral OsseoSpeed™ disponible comercialmente.

(iii) Inserción de implantes

Se programaron para cirugía doce conejos blancos de Nueva Zelanda machos y recién nacidos. Un conejo murió durante la anestesia inicial (Nº 8). La cirugía se realizó sin incidentes notables. Se realizó una perforación a baja velocidad (1500 rpm para perforar los agujeros y 20 rpm para la inserción del implante) con refrigeración continua con Na Cl.

Un implante (diseño humano de implante oral 3,5 x 8 mm) se insertó en cada región de cóndilo de fémur y 3 implantes (Diseño de extracción de par con cabeza cuadrada; 3,5 x 8,2 mm) se insertaron en cada tibia con tuberosidad. Los implantes de fémur se programaron para análisis histomorfométrico y los implantes de tibia para ensayos de par de desinserción.

(iv) Ensayos de par de desinserción

Después de seis semanas el estudio se terminó y se sacrificaron los conejos. Se analizaron los implantes y el tejido circundante. Los implantes de tibia fueron fáciles de localizar, y todos ellos mostraron signos de aumento en el crecimiento del tejido óseo perióstico. Se realizó el ensayo biomecánico de la interfaz implante-hueso con el ensayo de par de desinserción (en adelante RTQ). El instrumento para el RTQ (Detector AB, Goteborg, Suecia) es un equipo electrónico que implica un transductor de deformación usado para ensayar la estabilidad del implante (el par de aflojamiento de cresta en Ncm) en el lecho del hueso y por tanto se puede considerar como un ensayo tridimensional que refleja aproximadamente la resistencia al esfuerzo cortante interfacial entre el tejido óseo y el implante (Johansson C. B., Albrektsson, Investigación clínica sobre implantes orales 1991; 2: 24-9). Se aplicó un par lineal creciente en el mismo eje del implante hasta que se obtuvo un fallo de integración, y se anotó el valor de cresta. Los implantes insertados en el fémur con más frecuencia revelaron una "cobertura completa" de la cabeza del implante con el tejido óseo. Los implantes de fémur se sumergieron en una solución fijadora y se procesaron posteriormente para realizar investigaciones histológicas e histomorfométricas.

En la Figura 22 se presentan los valores medios de los implantes del ensayo 1, de los implantes del ensayo 2, y de los implantes de referencia para los ensayos de par de desinserción. Las comparaciones de los implantes del ensayo 1, implantes del ensayo 2 e implantes de referencia revelaron un 25% de mejora en los valores de par de desinserción para los implantes del ensayo 2 en comparación con los implantes de referencia. Esta diferencia era estadísticamente significativa ($p < 0,05$; Ensayo T de estudiantes). Además, los resultados sugirieron que los valores de par de desinserción de los implantes del ensayo 1 eran iguales o mayores que los de los implantes de referencia.

(v) Evaluación histológica

5 Transcurridas seis semanas, el estudio se terminó y se sacrificó a los conejos. Las muestras seleccionadas de la zona de implantes de fémur incluyendo tejido óseo y el implante de los conejos N° 1 y N° 5 se evaluaron por histomorfometría en cuanto al contacto entre hueso e implante (en adelante BIC) y al área de hueso dentro de los filetes interiores (área interior, ia) y en las imágenes especulares (mi) correspondientes en diversas regiones alrededor de los implantes recuperados del fémur.

En las Tablas 2 y 3 que se insertan a continuación aparecen los valores medios para el BIC y el área de hueso de diferentes regiones del implante, así como un valor medio total para el BIC y el área de hueso para cada implante. Se evaluaron las siguientes regiones de implante:

- 10 (a) Microfiletes;
 (b) Macrofiletes;
 (c) a lo largo de los lados apicales (sin filetes) en la cavidad medular ; y
 (d) en el fondo apical del implante (esta región se comunica solamente para el contacto entre implante y hueso)

15 Tabla 2. Valores medios para contacto entre hueso e implante (BIC) (% del contacto total)

Muestra	Microfiletes	Macrofiletes	Lados apicales	Valor medio	Fondo apical	Valor medio total incluido el fondo
Conejo n° 1. Implante del ensayo 2	14	30	15	20	30	22
Conejo n° 1. referencia	5	3	10	6	9	7
Conejo n° 5. Implante del ensayo 1	15	7,5	23	15	7	13
Conejo n° 5. referencia	14	19	15	16	21	17

Tabla 3. Valores medios de área de hueso (% del área total)

Muestra	Microfiletes (ia/mi)	Macrofiletes (ia/mi)	Lados apicales (ia/mi)	Valor medio (ia/mi)
Conejo N° 1. Implante del ensayo 2	29/35	29/31	69/43	42/36
Conejo N° n1. referencia	13/26	10/8	29/10	17/15
Conejo N° 5. Implante del ensayo 1	34/45	9/6	48/4	30/18
Conefo N° 5. Referencia	36/35	25/17	6/10	22/31

ia = área interior, mi = imagen especular

20 Para el conejo n° 5, implante de referencia, la sección se hizo accidentalmente a través del corte presente en todos los implantes. Para esta muestra, la distancia calculada de contacto del fondo se basó en una aproximación de la distancia total de la del conejo n° 3, Implante del ensayo 1 (Figura 24 a)

25 Como puede verse en las Tablas 2 y 3, el implante del ensayo 2 mostró un contacto mayor entre implante y hueso y un área de hueso mayor en los filetes, en comparación con la superficie de referencia. El implante del ensayo 1 mostró un contacto casi igual entre implante y hueso en comparación con la superficie de referencia. Asimismo, se observó un área interior de hueso mayor en los filetes en comparación con el implante de referencia (Tabla 2).

Las imágenes de las secciones histológicas que muestran cualitativamente formación de hueso se

presentan en las Figuras 23 y 24, en las que

La Figura 23a representa el implante del ensayo 2 del conejo nº 1;

La Figura 23b representa el implante de referencia del conejo nº 1;

La Figura 24 a representa el implante del ensayo nº 1; y

5 La Figura 24b representa el implante de referencia del conejo nº 5.

Casi todas las muestras revelaron un hueso formado más recientemente que un hueso antiguo en estrecha relación con el implante en la región superior microfileteada. El tejido óseo observado en los macrofiletes, en los lados no fileteados del implante en la cavidad medular y en el estrato apical de fondo estaba también recientemente formado.

10 En el conejo nº 1, se observó una gran cantidad de formación de hueso en marcha alrededor del implante del ensayo 2 en comparación con el implante de referencia. Se observaron frecuentemente costuras osteoides con rebordes de osteoblastos de diversas formas de los osteoblastos. (Figuras 23a, b)

15 En el conejo nº 5, se observó una gran cantidad de formación de hueso en marcha alrededor del implante del ensayo 1 en comparación con el implante de referencia. Se observaron frecuentemente osteoblastos, sin embargo no tan pronunciados como alrededor del implante del ensayo 2 del conejo nº 1 (Figuras 24a, b).

Las superficies de los implantes estaban en estrecha relación con las células grasas de la cavidad medular, con independencia de la superficie del implante, indicando un alto grado de biocompatibilidad de todas las superficies con las células sensitivas de la cavidad ósea.

Ejemplo 4- Formación de apatito in vitro

20 Un modelo in vitro convencional para estudiar la formación del hueso es la inmersión de biomateriales en fluidos corporales simulados (en adelante SBF). Los SBF son soluciones que tienen concentraciones iónicas aproximadamente iguales a las del plasma sanguíneo humano (Kokubo T., Kushitani H., Sakka S., Kitsugi T., Yamamuro T., J Biomed Mater Res 1990; 24:721-734; Oyane A., Kim H., K., Furuya T., Kokubo T., Miyazaki T., Nakamura T., J Biomed Mater Res 2003, 65ª, 188-195). Dependiendo de la capacidad de nucleación del biomaterial, los fosfatos de calcio parecidos a hueso precipitarán en su superficie. Se ha comunicado una correlación cuantitativa de la formación de apatito en SBF con la bioactividad de huesos in vivo (Kokubo T., Takadama H., Biomaterials 2006; 27: 2907-2915). Hoy el modelo in vitro de los SBF se usa frecuentemente y se describe mediante la norma internacional ISO 23317: 2007E.

(i) Inmersión de SBF

30 Se seleccionaron unos SBF revisados (Oyane y colaboradores, J Biomed Mater Res 2003; 65 A, 186-195) que tiene una concentración de electrolitos muy similar a la del plasma humano (Vander A. J., Sherman J. H., Luciano D. S., publicación titulada "Fisiología humana. Los mecanismos de la función corporal", 5ª edición, McGraw-Hill Publishing Company. New York, 1990; 349-400) El SBF se preparó disolviendo 10, 806 g de NaCl, 1.480 g de NaHC₃, 4,092 g de Na₂CO₃, 0,450 g de KCl, 0,460 g de K₂HPO₄ · 3H₂O, 0,622 g de Mg Cl₂ · 6H₂O, 23,856 g de 2-

35 (4- (2- hidroxietilo)- 1- piperazynil) ácido tetrasulfónico (HEPES), 0,776 g de Ca Cl₂, y 0,144 g de Na₂ SO₄ en 2.000 litros de agua desionizada. El HEPES se disolvió en 200 ml de agua desionizada antes de añadirlo a la solución. El pH final se ajustó a 7,40 a 37° C con NaOH 1 molar. Todos los productos químicos se adquirieron en Merck (Suecia), excepto el NaOH y el Na SO₄ que se adquirieron en Fluka (Suecia)

40 Tres conjuntos de muestras de titanio esterilizado β de forma de moneda, un conjunto que se había sometido a la etapa b que respondía al invento (al que se hará referencia como superficie 1 del invento), un conjunto que se había sometido a la etapa b y a la etapa c que respondían al invento (al que se hará referencia como superficie 2 del invento), y un conjunto de referencia que representaba una superficie comercialmente disponible (OsseoSpeed TM, Astra Tech AB, Suecia), se sumergieron en 37 ml de SBF en viales de poliestireno de 50 ml separados y herméticamente cerrados (VWR, Suecia) a 37° C. Las muestras se montaron suspendiéndolas en la

45 tapa de los viales, permitiendo que el lado de la moneda que se iba a analizar se orientase hacia abajo sin ser contactado por cualesquiera otros objetos. Después de tres días, se interrumpió la inmersión de SBF y las muestras se aclararon minuciosamente con agua desionizada para eliminar cualquier material de fosfato de calcio que estuviese fijado flojamente. Luego se secaron las muestras a temperatura ambiente en un banco de flujo laminar de aire. Tres muestras de cada conjunto no se sumergieron en SBF, sirviendo así como controles.

50 (ii) Morfología del apatito formado (SEM)

Los análisis de la posible formación de apatito se realizaron usando un microscopio ambiental electrónico de barrido (ESEM, XL 30, FT). Las imágenes con SEM de las estructuras de las superficies antes de la inmersión en SBF se presentan en la Figura 25a (referencia), 26a (superficie 1 del invento), y 27a (superficie 2 del invento). Cuando se hubieron estudiado las estructuras de las superficies después de su inmersión en SBF, se concluyó que

se había formado un fino estrato de fosfato de calcio en todos los conjuntos de muestras; referencia (Figura 25b), superficie 1 del invento (Figura 26b) y superficie 2 del invento (Figura 27b).

(iii) Evaluación química del apatito formado (por espectroscopio de dispersión de energía, en adelante EDS)

- 5 Se usó un espectroscopio de dispersión de energía (en adelante EDS), Apollo 40, EDAX) para el análisis químico de las muestras antes y después de la formación de apatito. Mediante el análisis de la señal de titanio, se podía establecer indirectamente el grado de cobertura de las muestras por fosfatos de calcio. La superficie 2 del invento mostró la mayor disminución en señal de titanio (Figura 28) tras la inmersión en SBF, indicando así la formación más extensa de apatito entre los conjuntos de muestras investigados.
- 10 Se usó también el EDS para el cálculo de la relación Ca/P con el fin de estimar la prevalencia relativa de fosfatos de calcio amorfos y cristalinos. Las relaciones Ca/P se presentan en la Figura 29. Las relaciones de Ca/P resultantes indican un mayor grado de cristalinidad del apatito formado sobre la superficie 1 del invento y sobre la superficie 2 del invento que sobre la superficie de referencia. Las relaciones estequiométricas atómicas Ca/P de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e hidroxiapatito ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) eran 1,5, y 1,67, respectivamente.
- 15 En resumen, se averiguó una formación temprana de apatito en todos los conjuntos de muestras, mostrando la superficie 3 del invento el grado más alto de cobertura de apatito, según se concluyó por la señal de titanio (Figura 28)

REIVINDICACIONES

1. Un método para la modificación de un componente biocompatible, que comprende las etapas de
- a) proveer un componente biocompatible cubierto al menos parcialmente por un óxido metálico; y
 - b) tratar al menos una parte de dicho componente, cuya parte esté cubierta por dicho óxido metálico, con una composición acuosa que comprende ácido oxálico;
- 5 por lo que se obtiene un ácido metálico modificado
- caracterizado por** la etapa adicional de
- c) tratar al menos una parte de dicho óxido metálico modificado con una segunda composición acuosa que comprende
 - (i) al menos un material seleccionado del grupo que comprende fluor ionizado y cloro ionizado; y
 - 10 (ii) al menos un ácido.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que la etapa c se realiza antes de que se forme un óxido de pasivación sobre dicho óxido metálico modificado.
3. Un método según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la etapa c se realiza dentro de las 180 horas o menos después de la terminación de la etapa b, contados como el tiempo que dicho componente se mantiene a 0° C y a la presión atmosférica normal en una atmósfera que contenga oxígeno.
- 15 4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha segunda composición acuosa comprende ácido fluorhídrico.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha segunda composición acuosa tiene un pH en el intervalo desde 0,5 hasta 5, preferiblemente en el intervalo desde 1 hasta 3, y con más preferencia alrededor de 2; una concentración de dicho al menos un material seleccionado del grupo que comprende fluor ionizado y cloro ionizado en el intervalo desde 0,01 hasta 0,5 molar, preferiblemente en el intervalo desde 0,05 hasta 0,3 molar, y con más preferencia alrededor de 0,1 molar; y el tratamiento de la etapa c se realiza para un tiempo de tratamiento activo en el intervalo desde 10 segundos hasta 3 minutos, y con más preferencia en el intervalo desde 10 segundos hasta 50 segundos.
- 20 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha composición acuosa de la etapa c comprende un material intensificador del crecimiento del hueso.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha segunda composición acuosa comprende un material intensificador del crecimiento del hueso.
8. Un método según las reivindicaciones 6 ò 7, en el que dicho material intensificador del crecimiento del hueso comprende iones metálicos o una sal de los mismos.
- 30 9. Un método según la reivindicación 8, en el que dichos iones metálicos comprenden iones seleccionados del grupo que consiste en iones de titanio, iones de magnesio, iones de calcio, iones de litio, iones de estroncio o cualquiera de sus combinaciones.
10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho componente consiste al menos en parte en titanio o en una aleación de titanio.
- 35 11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho óxido metálico comprende óxido de titanio.
12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho óxido metálico comprende óxido de titanio de pasivación.
- 40 13. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho componente antes de la etapa b se somete a un tratamiento mecánico de superficie.
14. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho componente biocompatible es un componente dental seleccionado del grupo que consiste en un implante, un portapieza, un apoyo, o un implante de una sola pieza, o en una combinación de los mismos.
- 45 15. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho componente biocompatible es un componente ortopédico.

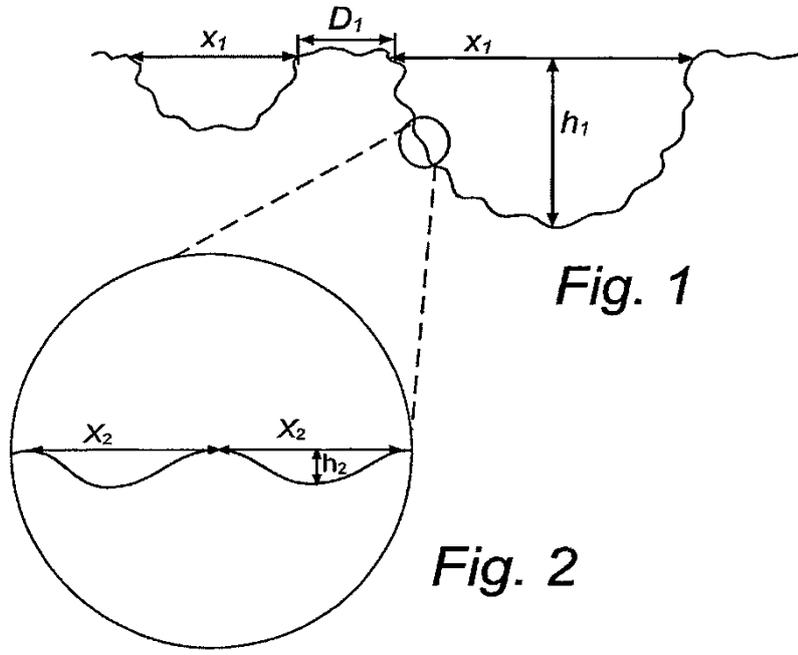


Fig. 1

Fig. 2

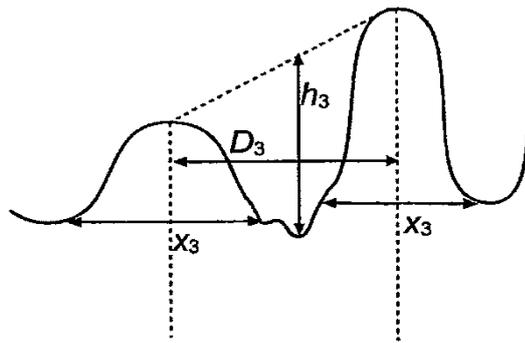


Fig. 3

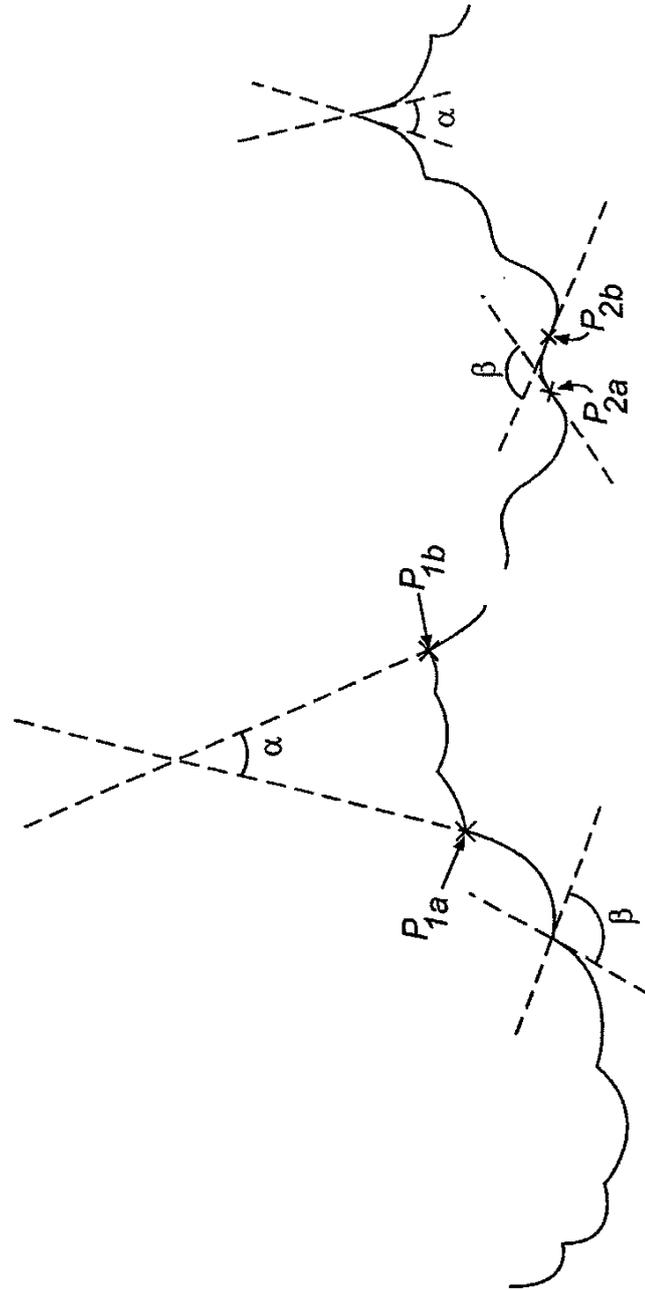


Fig. 4

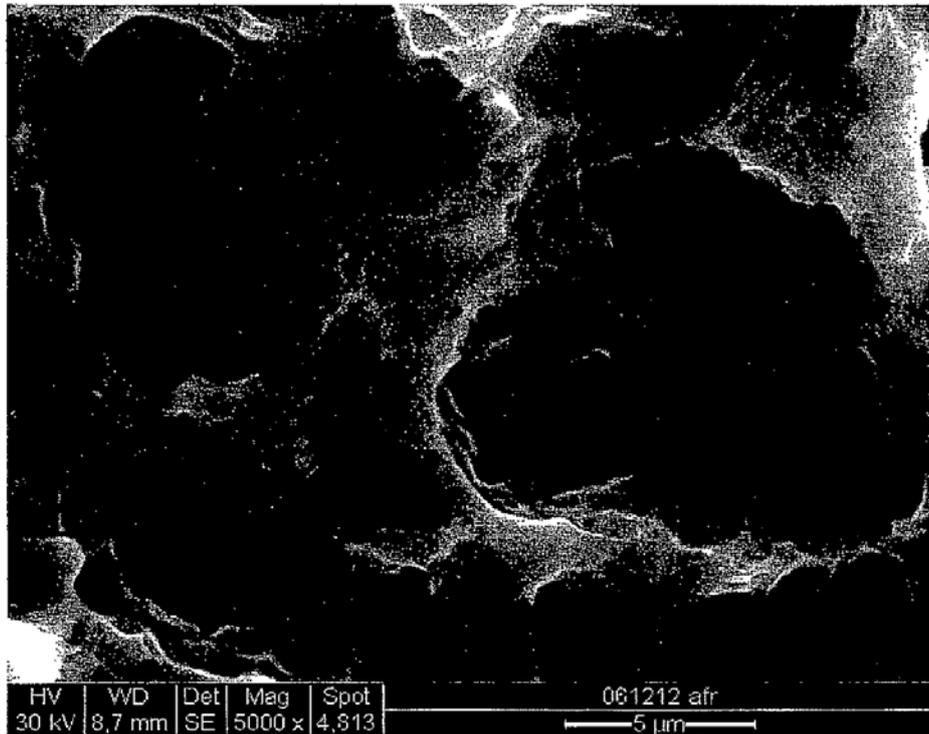


Fig. 5a

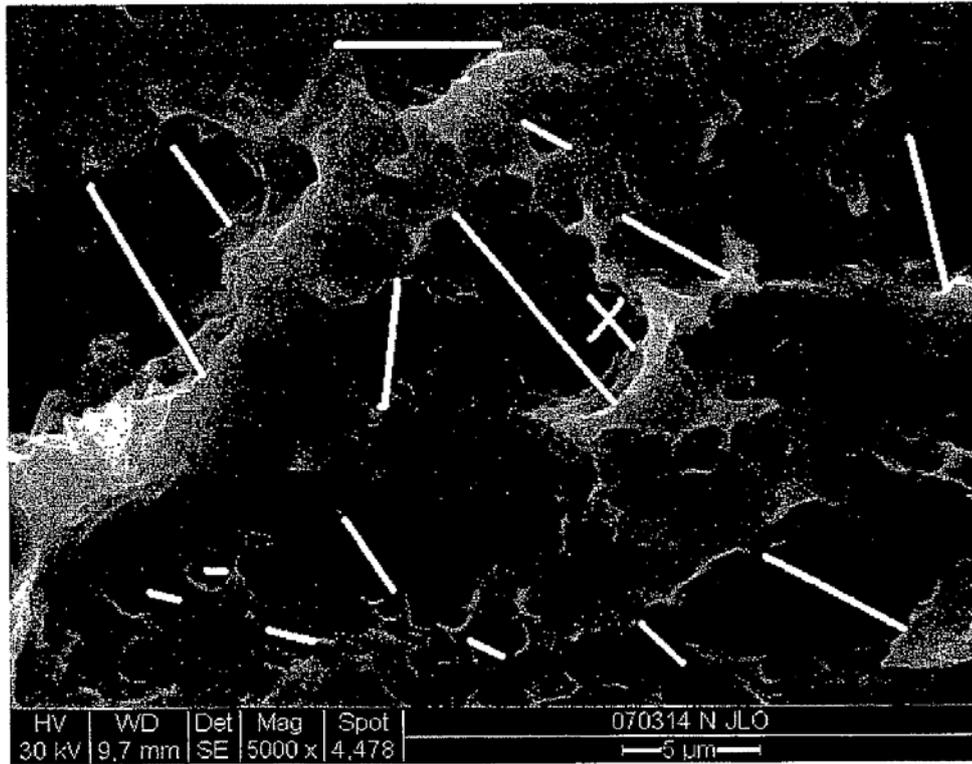


Fig. 5b

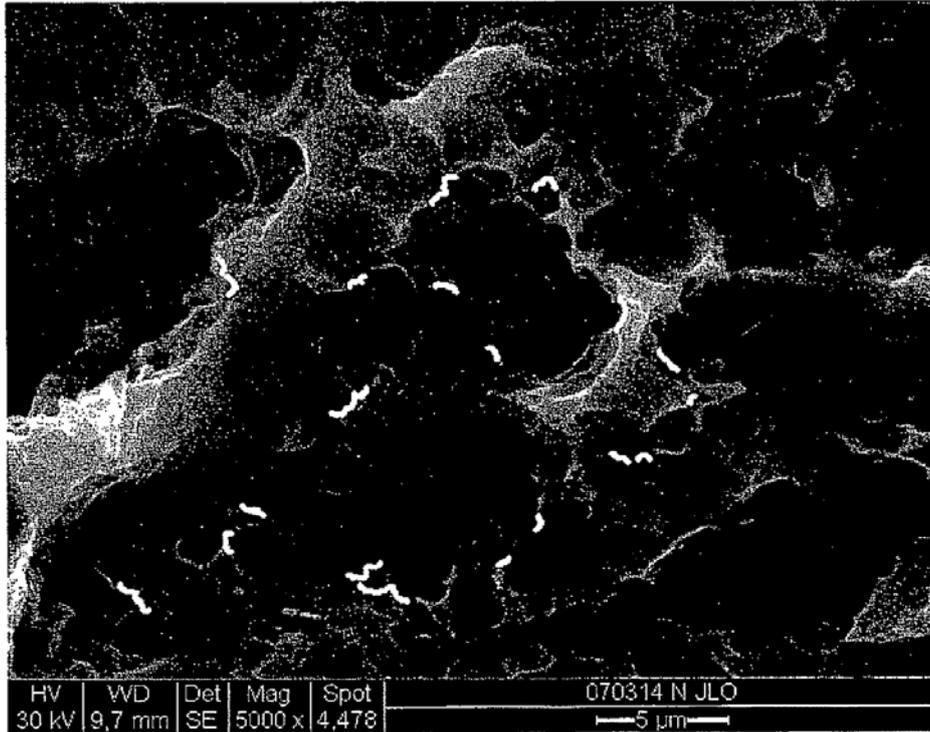


Fig. 6a

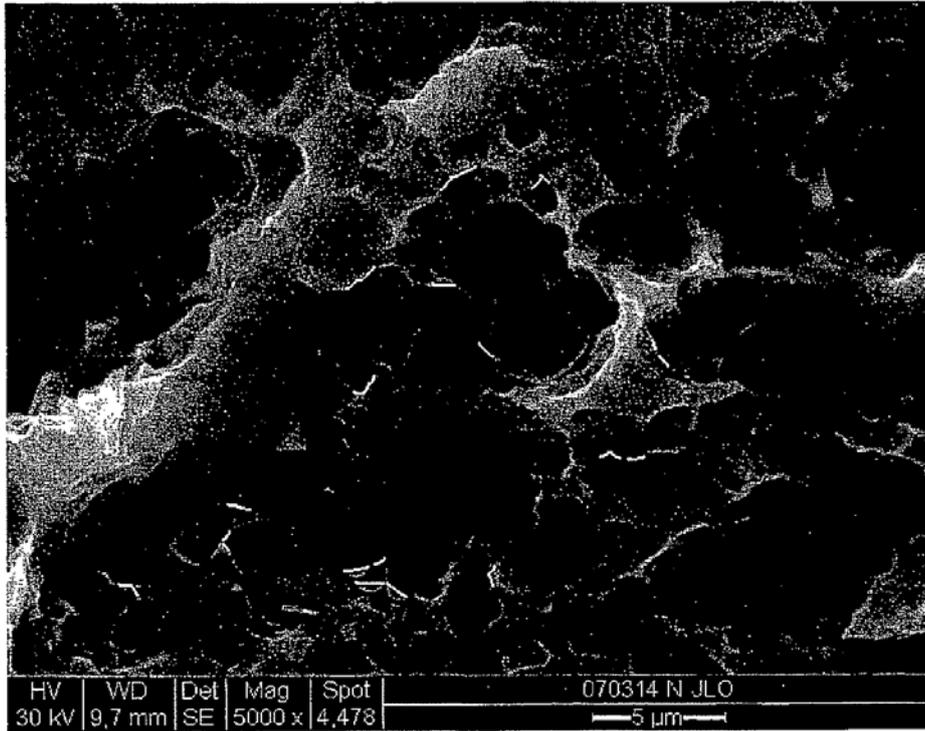


Fig. 6b

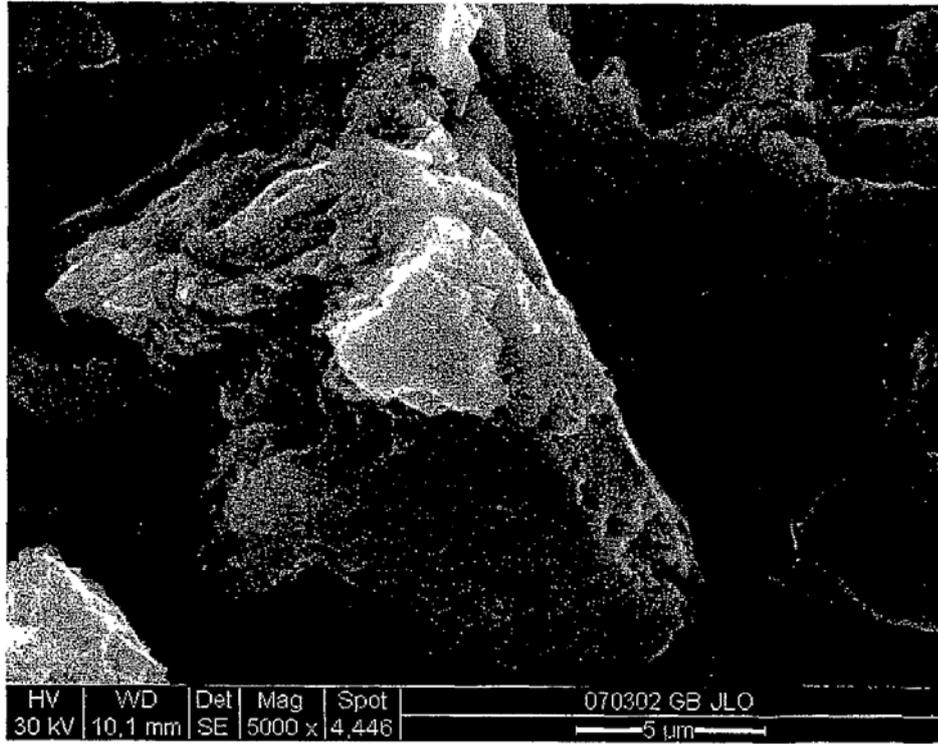


Fig. 7

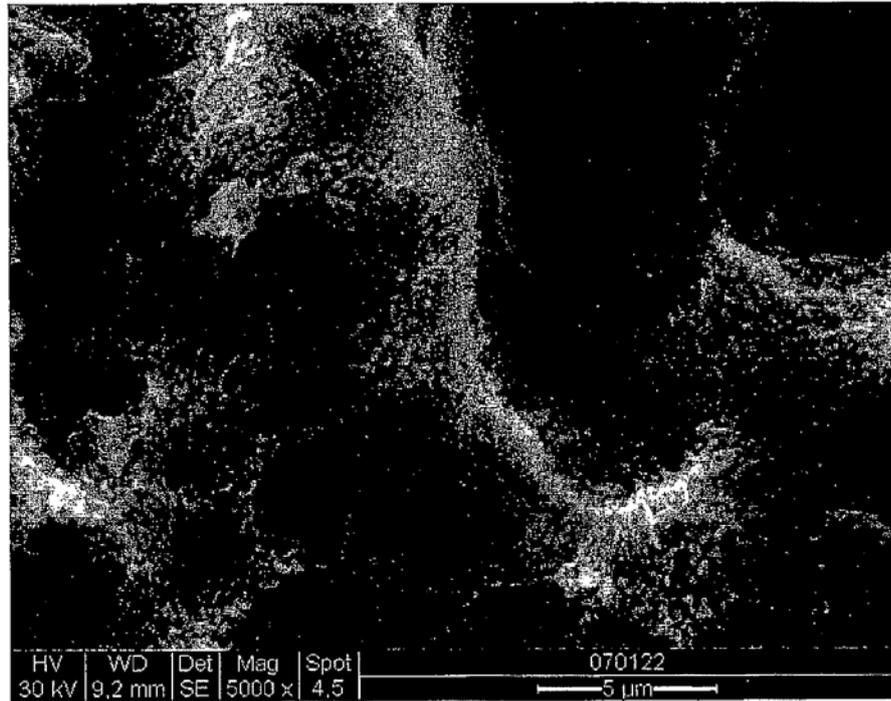


Fig. 8

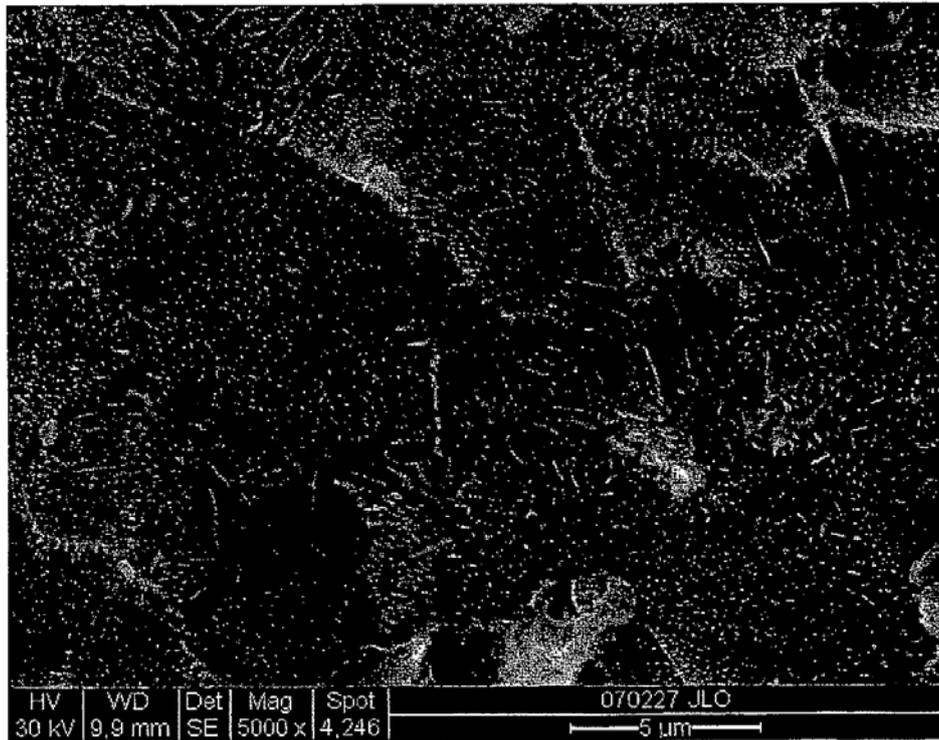


Fig. 9

Nanoscopio de Digital instruments
Tamaño de barrido 2,000 μm
Tasa de barrido 0,7978 Hz
Número de muestras 256
Datos de imagen Altura
Escala de datos 100,0 nm

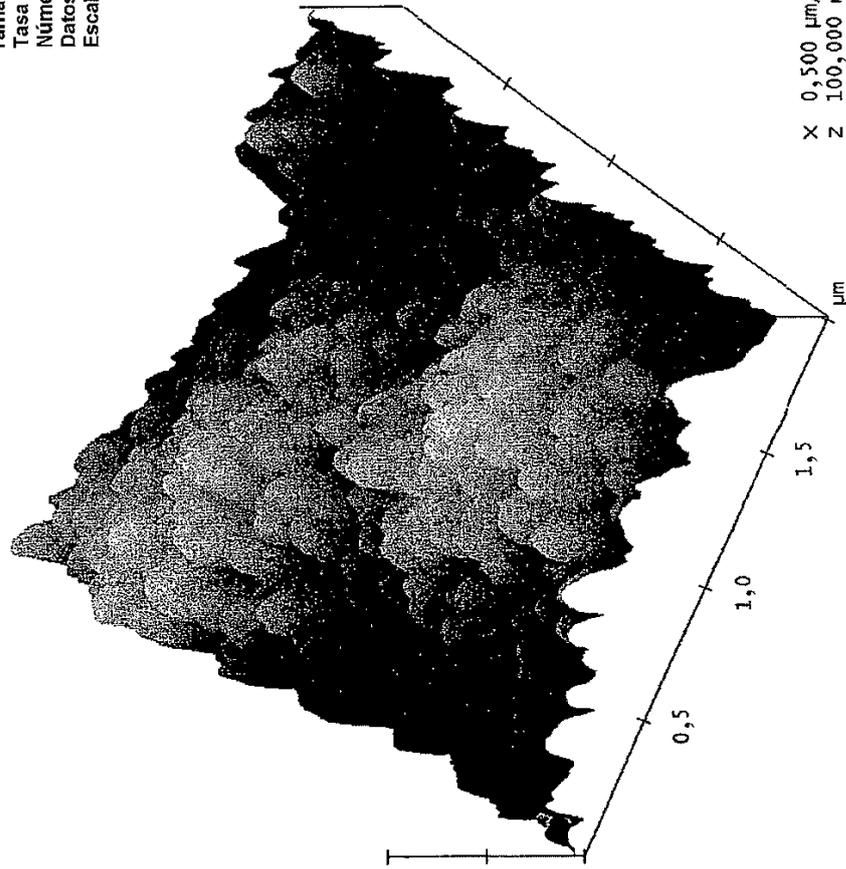


Fig. 10

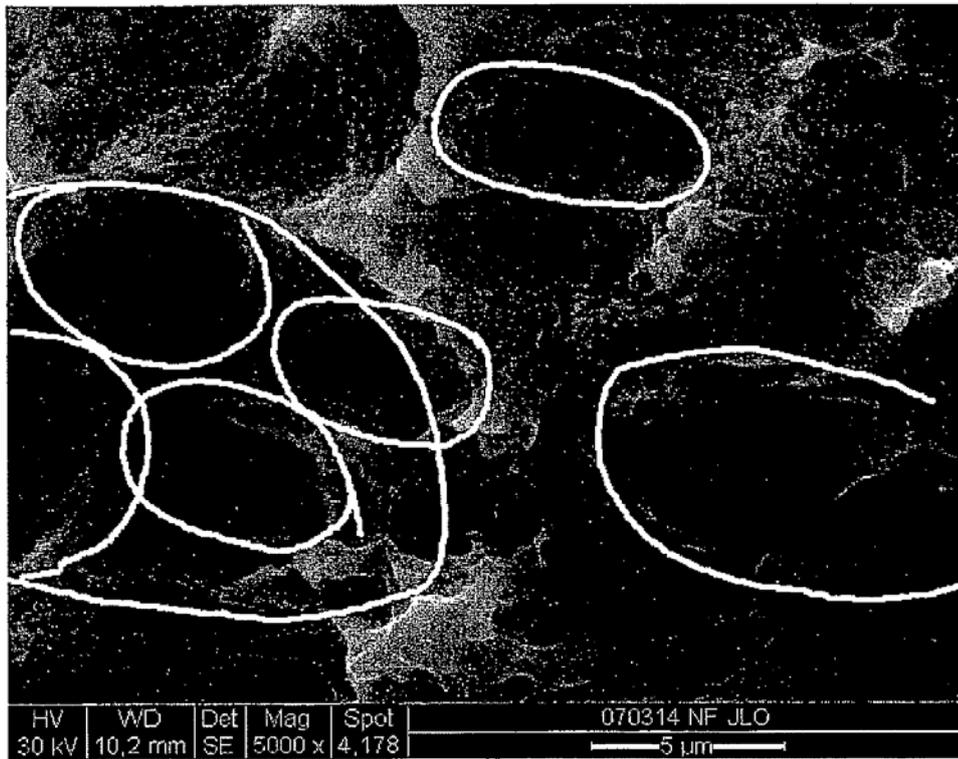


Fig. 11

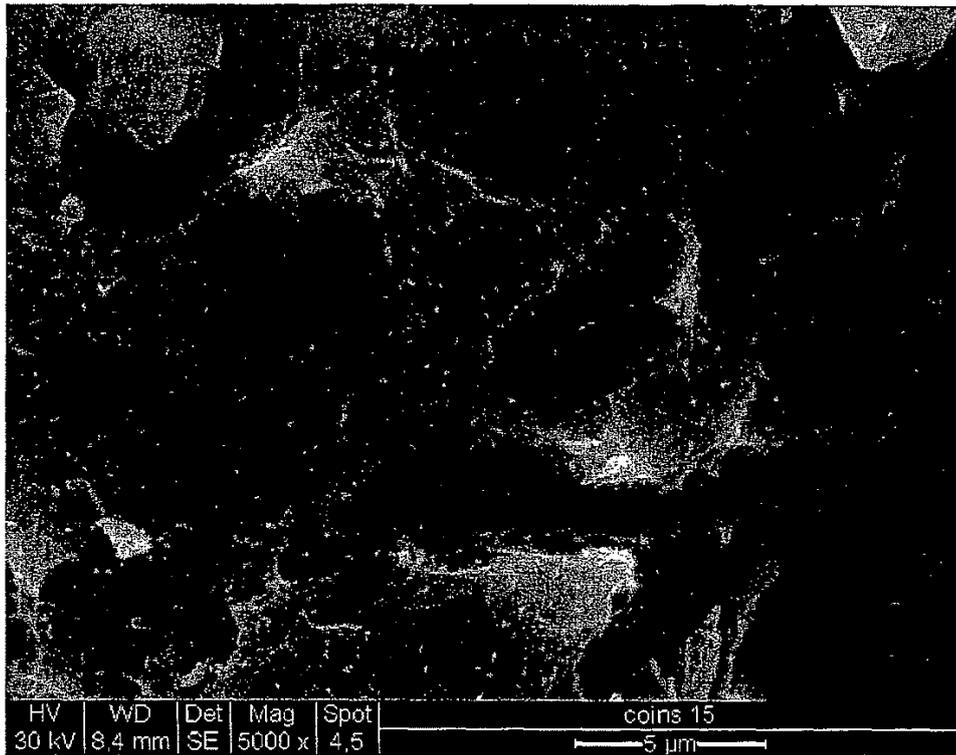


Fig. 12a

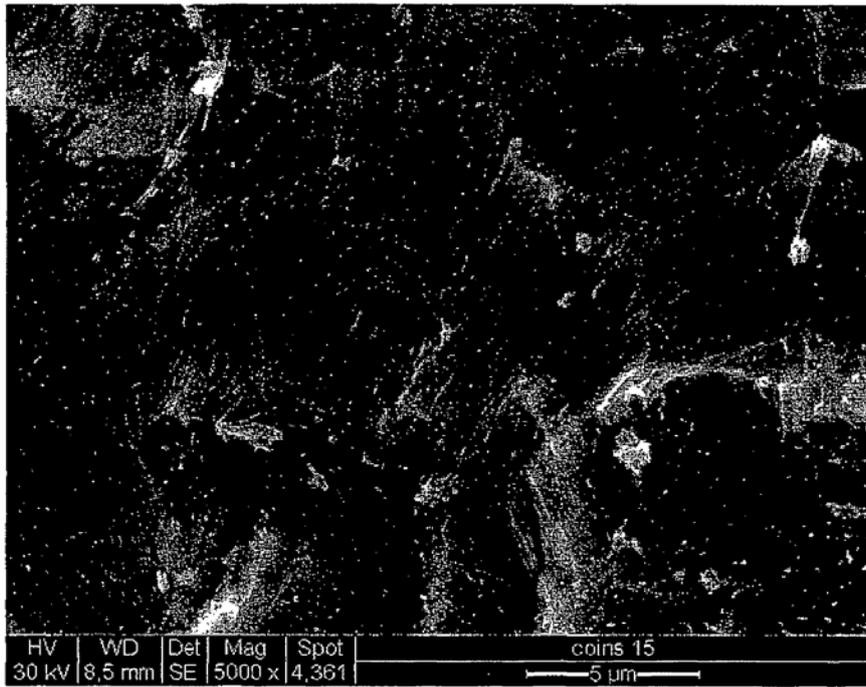


Fig. 12b

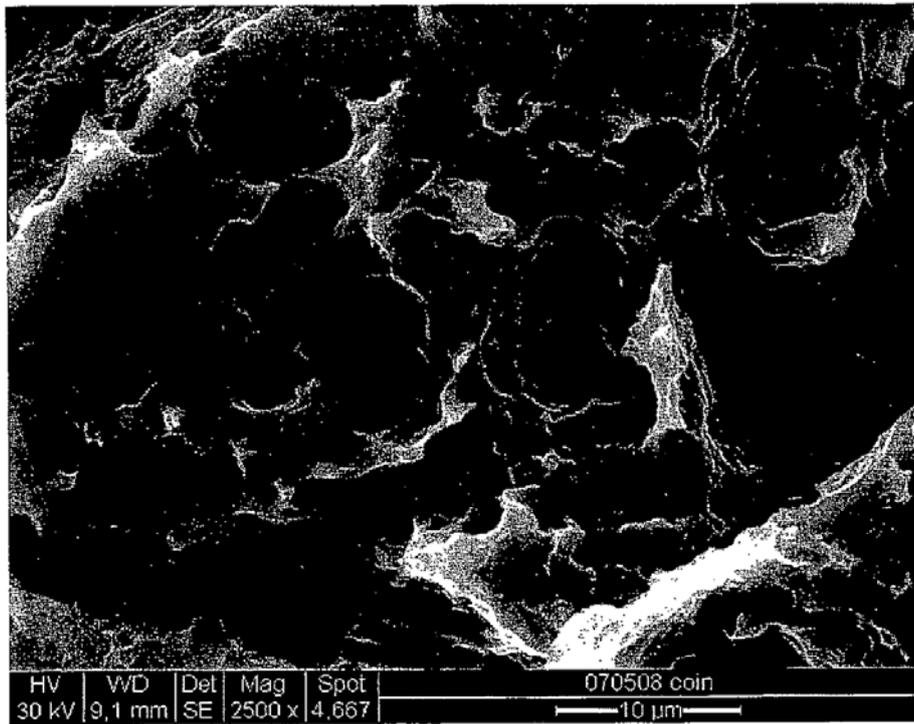


Fig. 12c

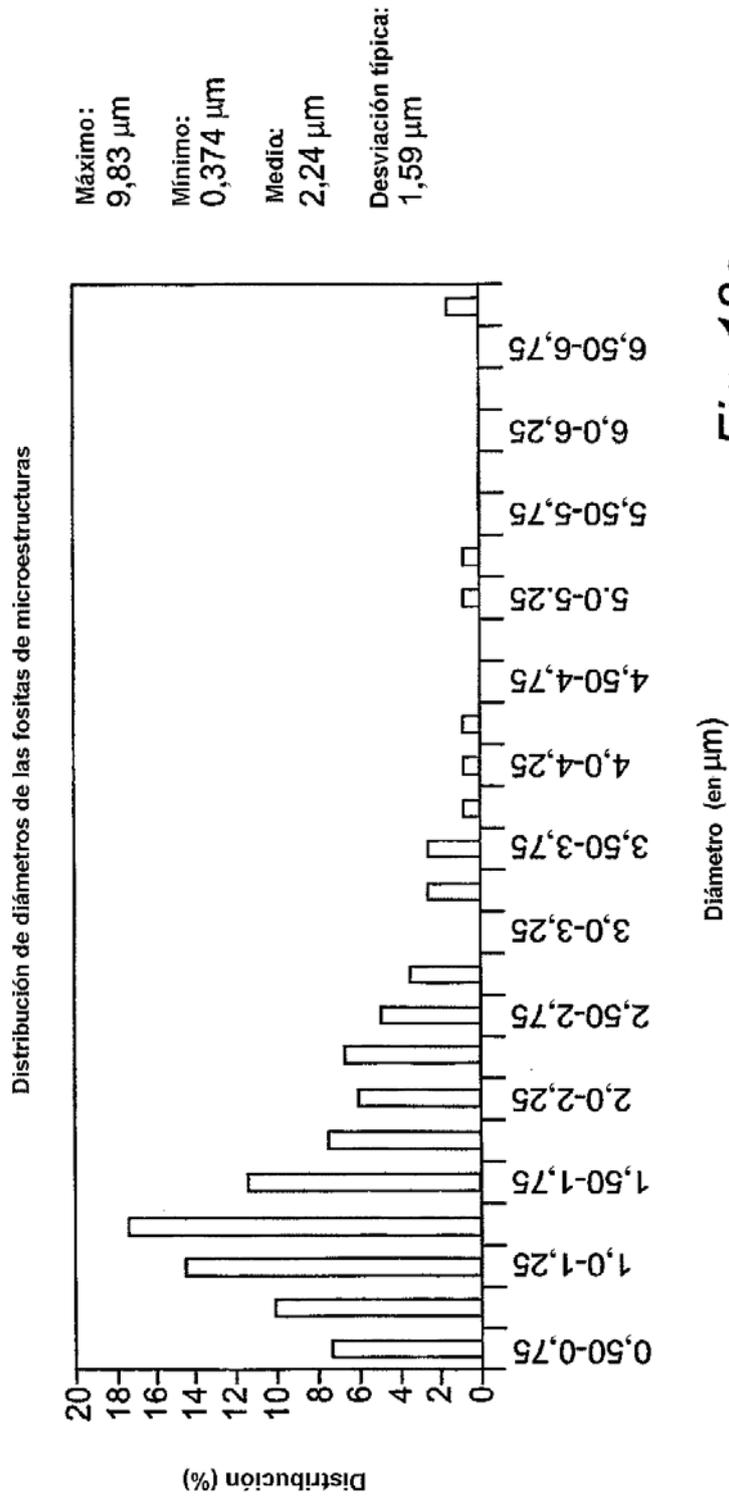


Fig. 13a

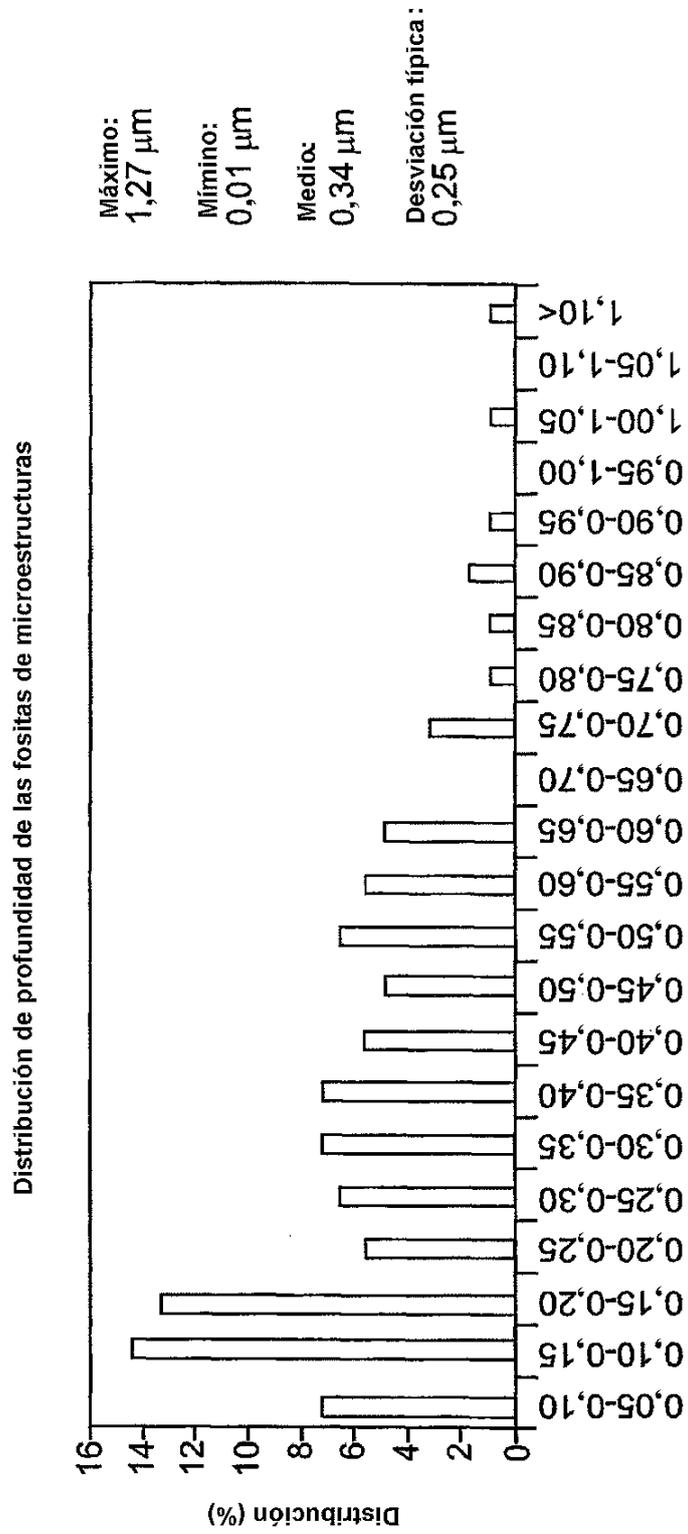
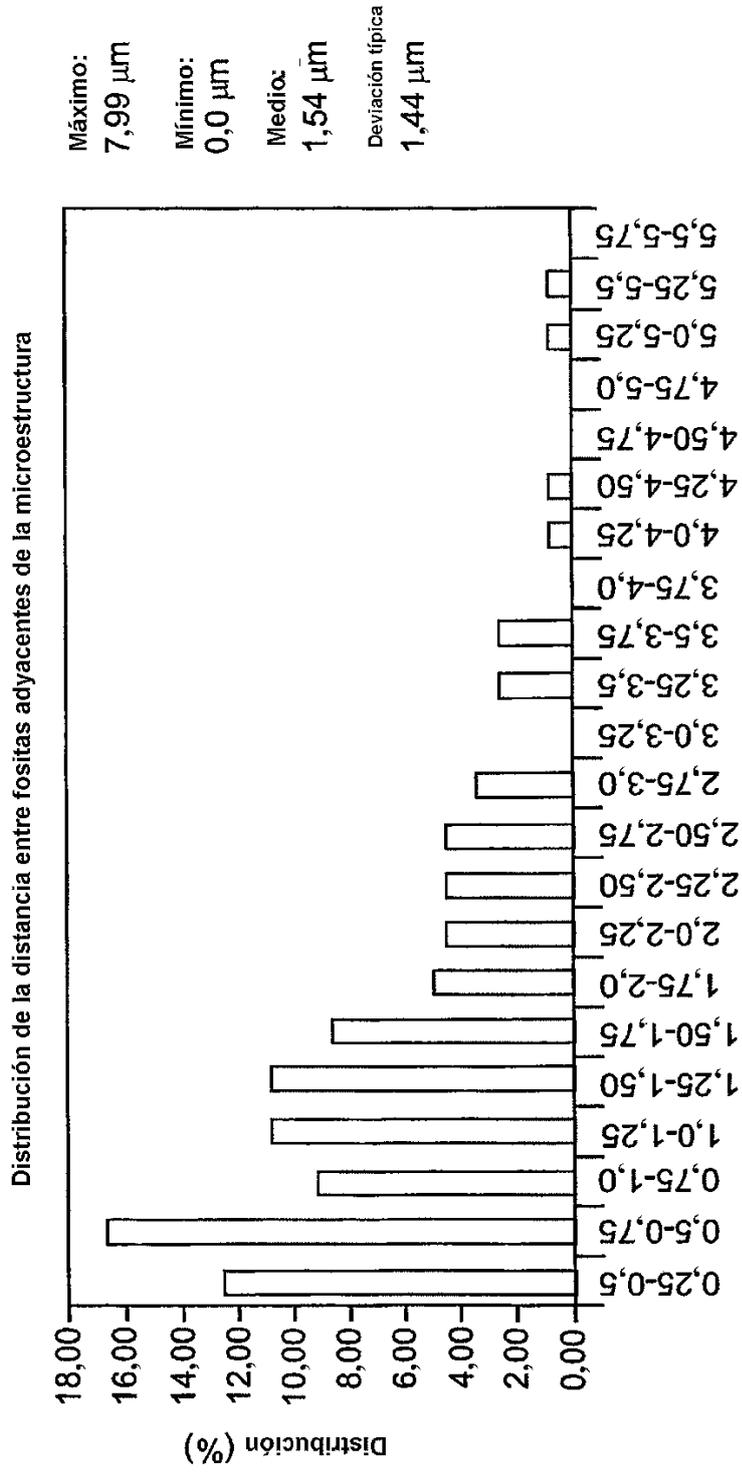


Fig. 13b

Profundidad (µm)



Distancia (µm) **Fig. 13c**

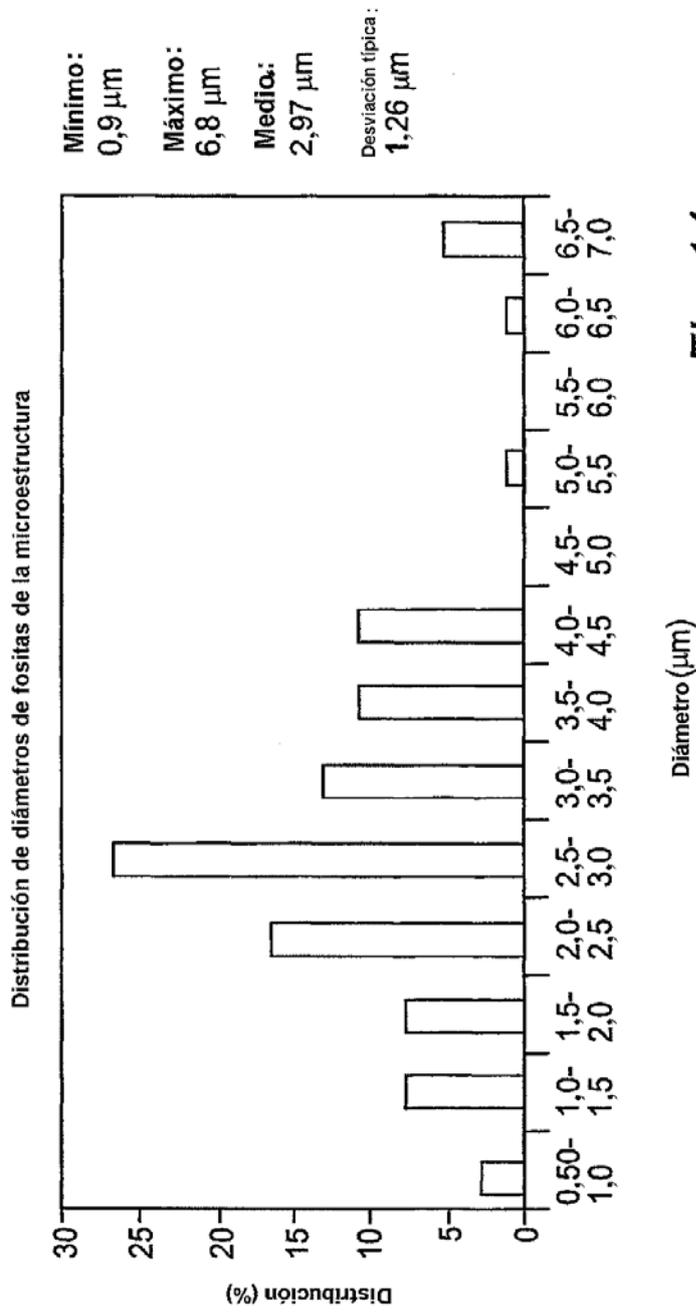
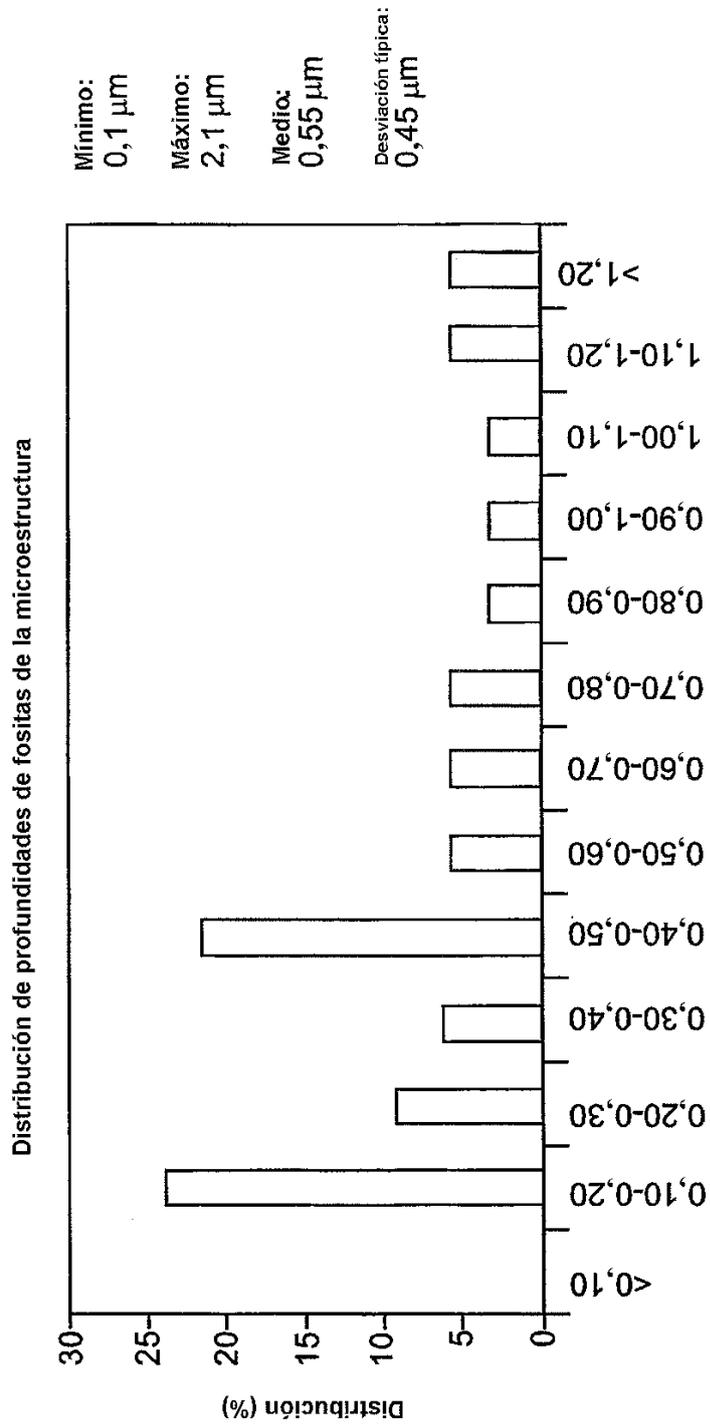


Fig. 14a



Profundidad (μm)

Fig. 14b

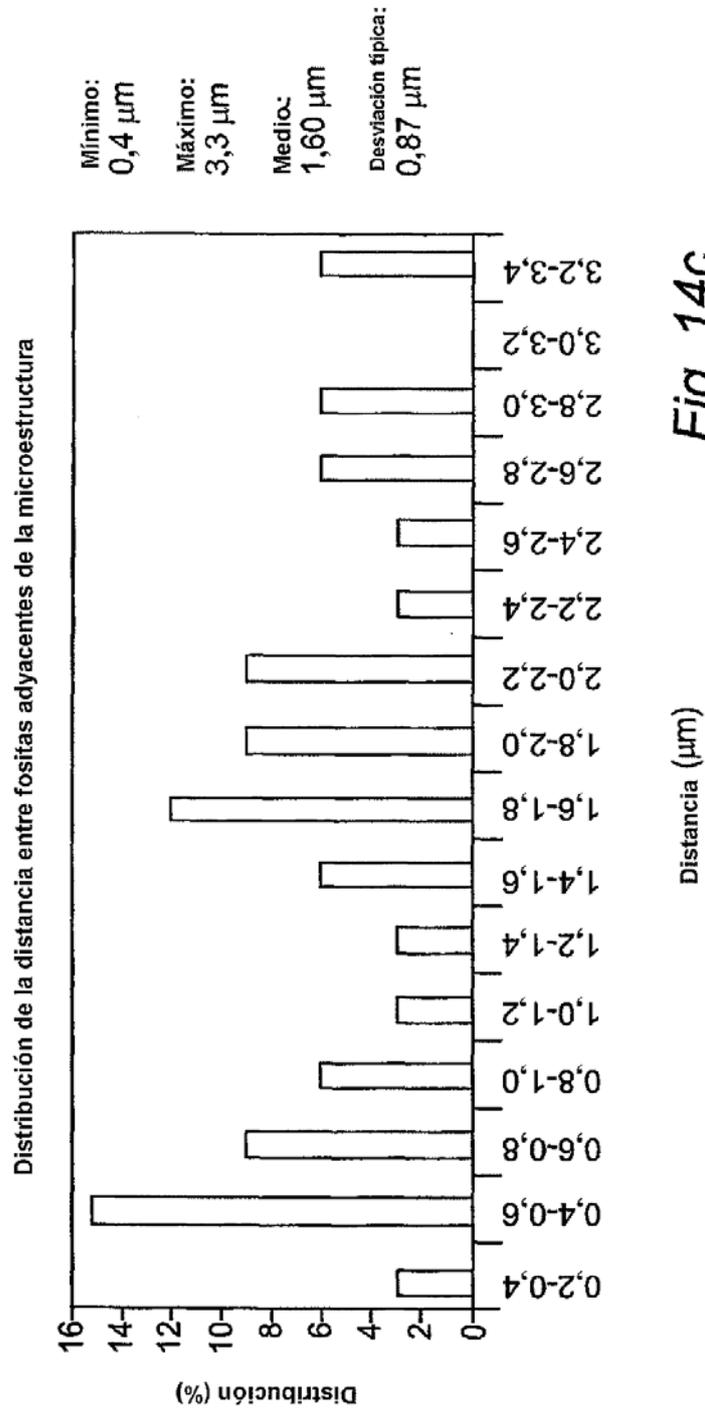


Fig. 14C

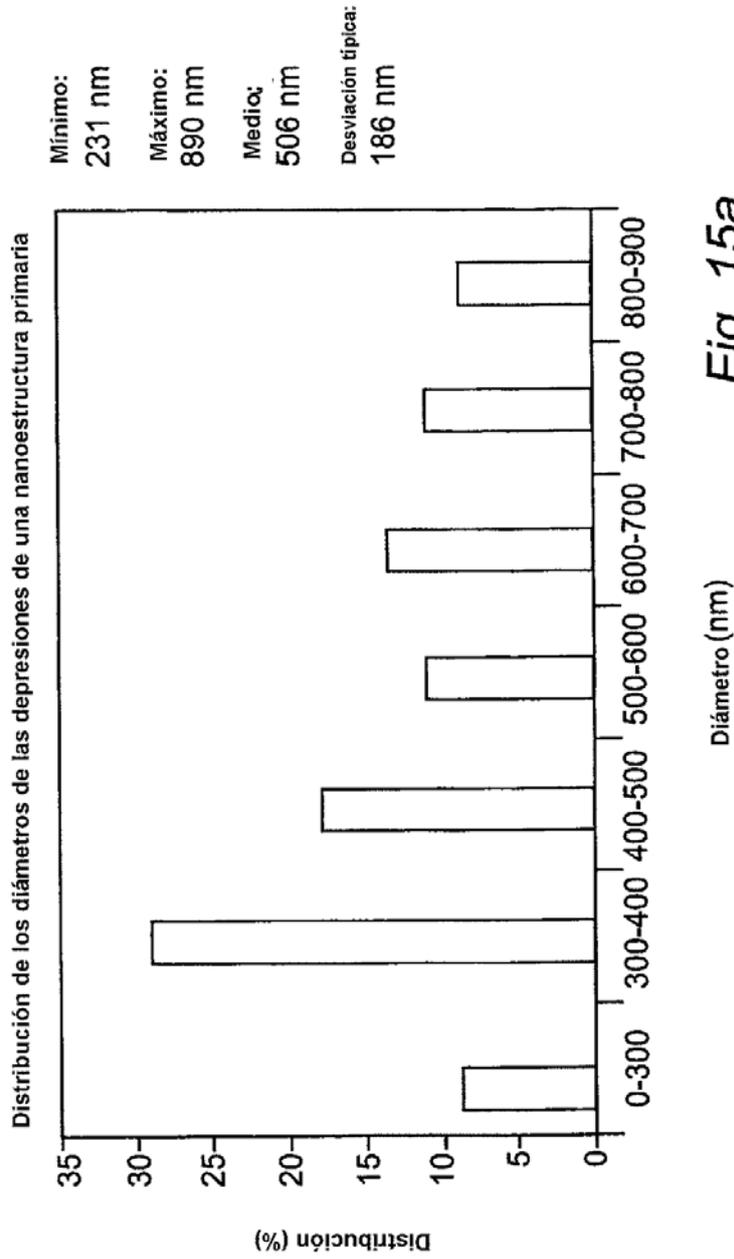


Fig. 15a

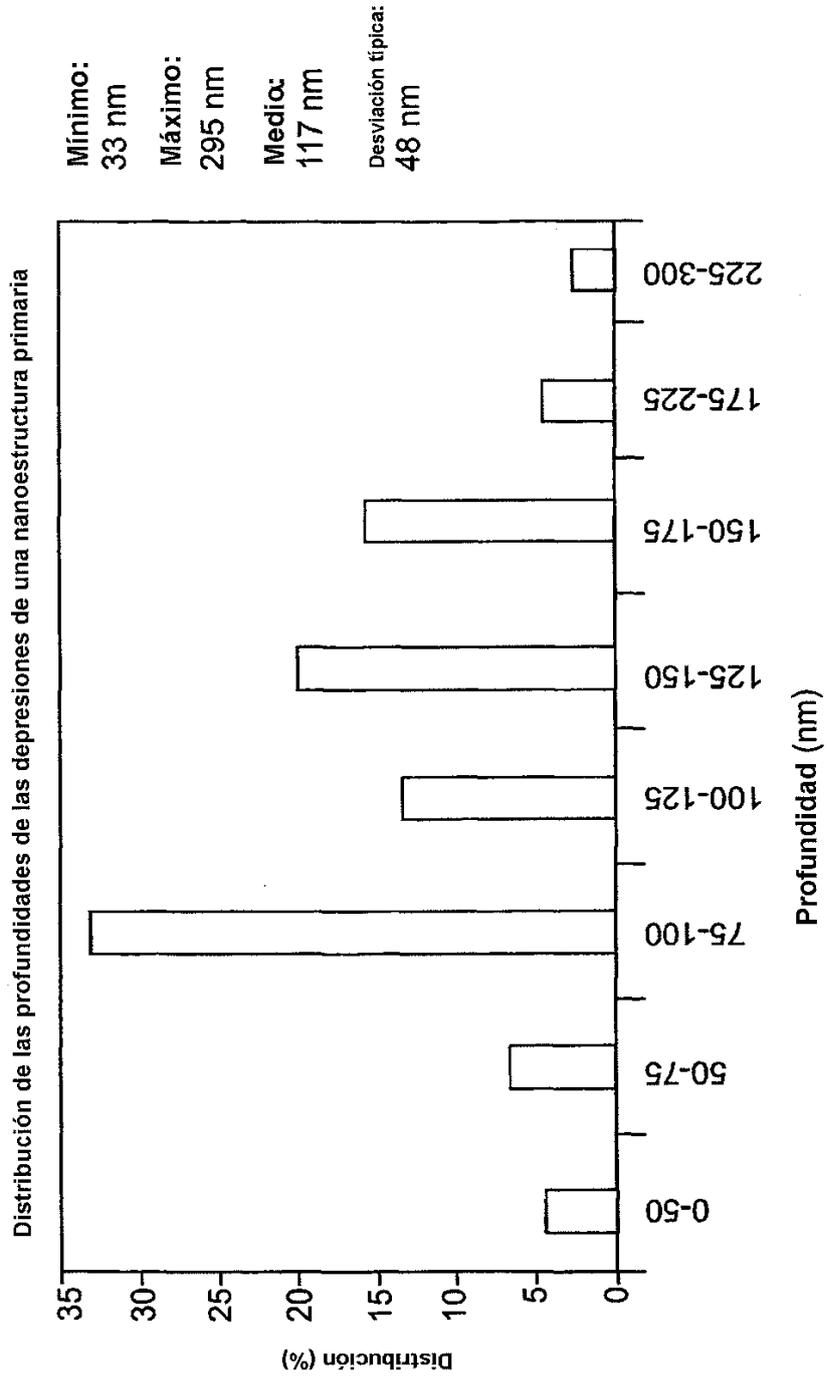


Fig. 15b

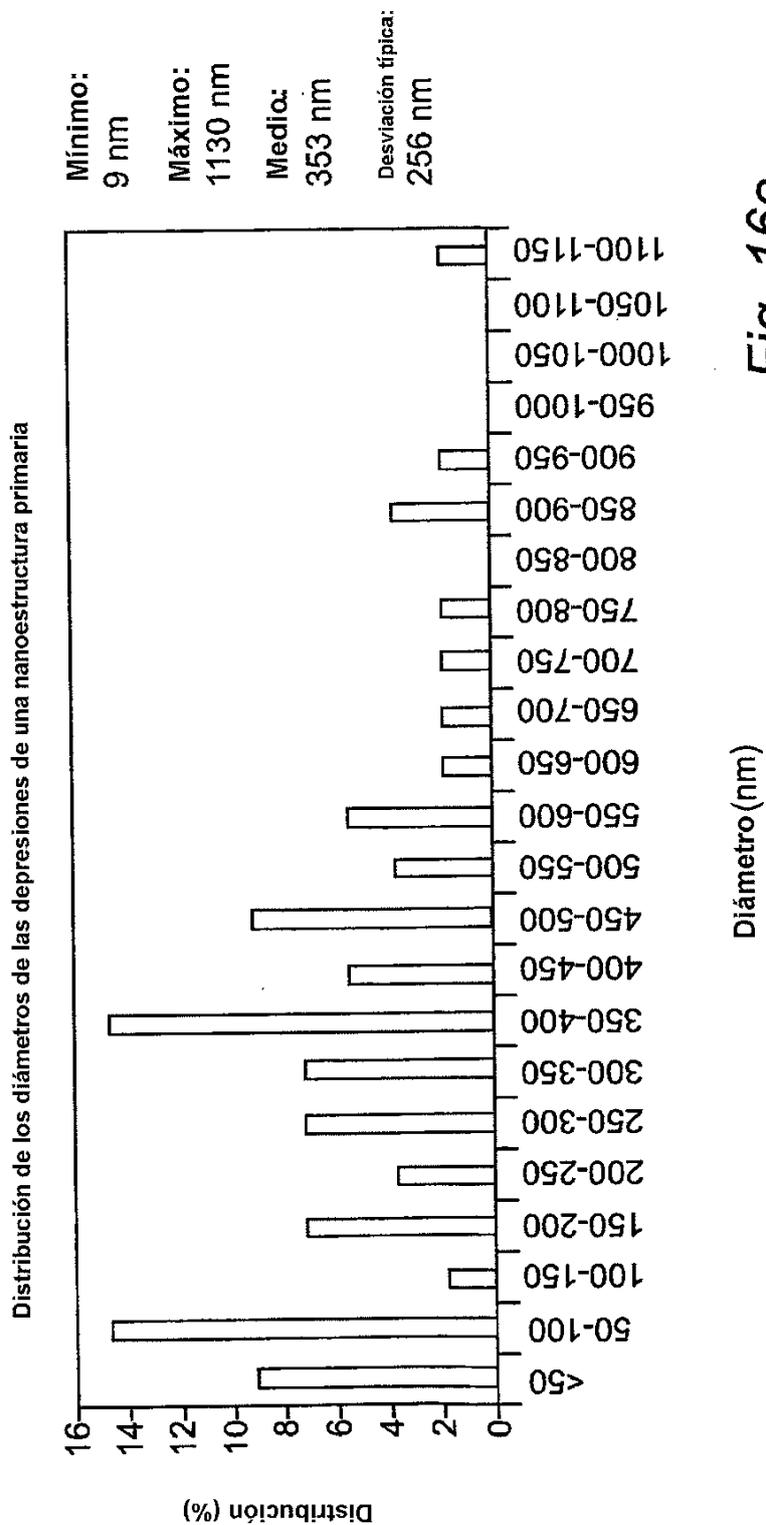


Fig. 16a

Diámetro (nm)

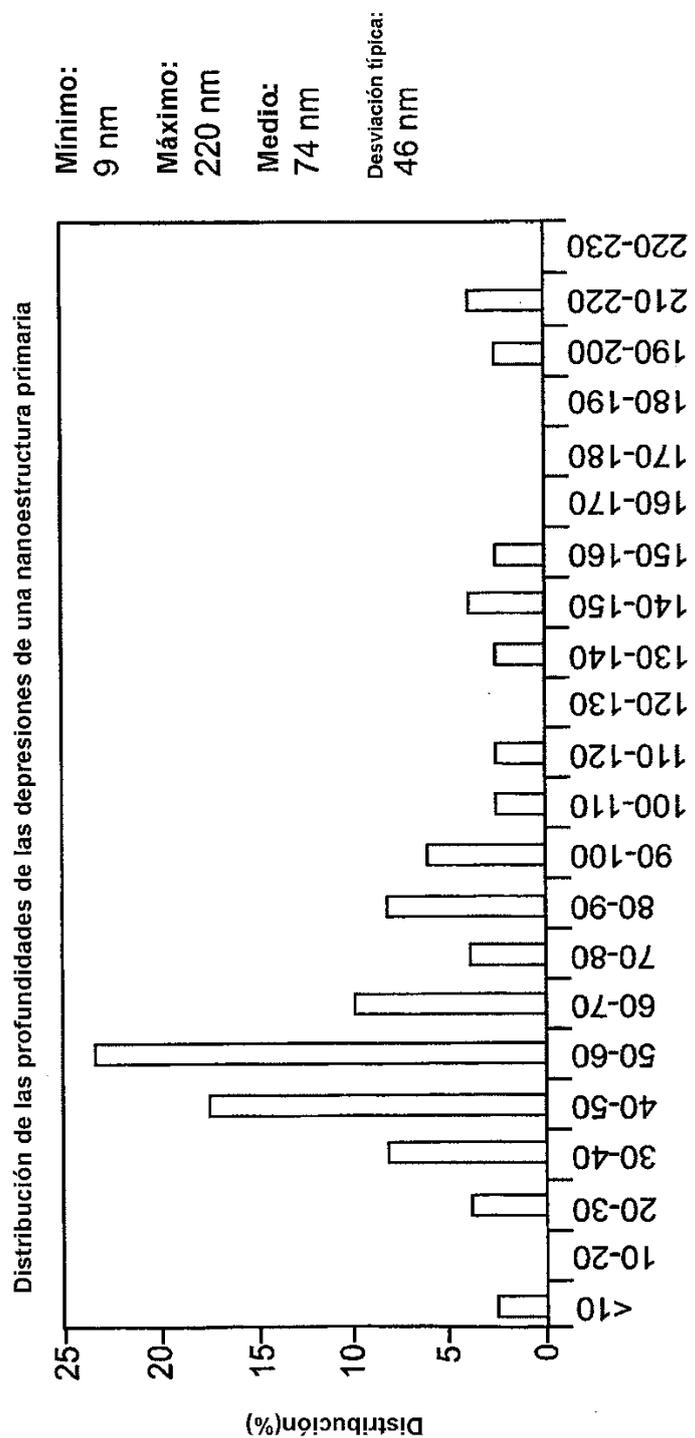


Fig. 16b

Profundidad (nm)

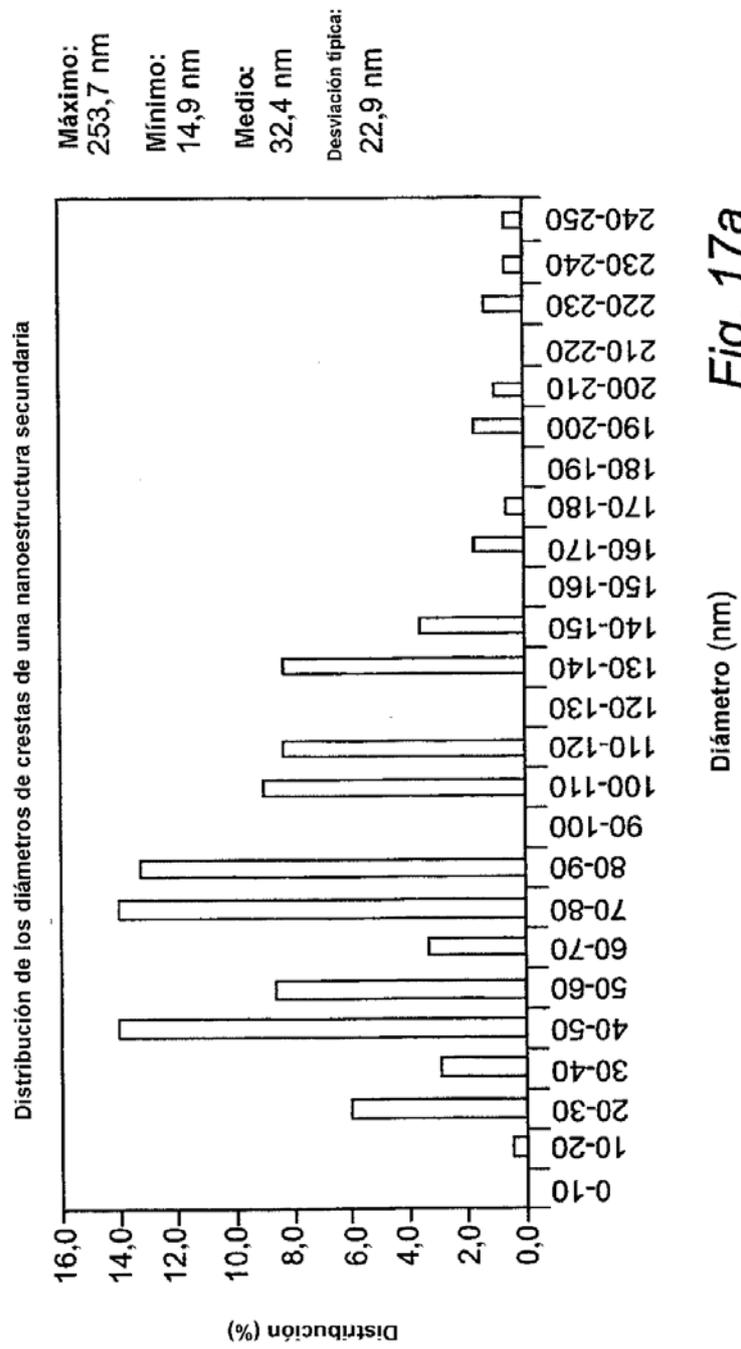


Fig. 17a

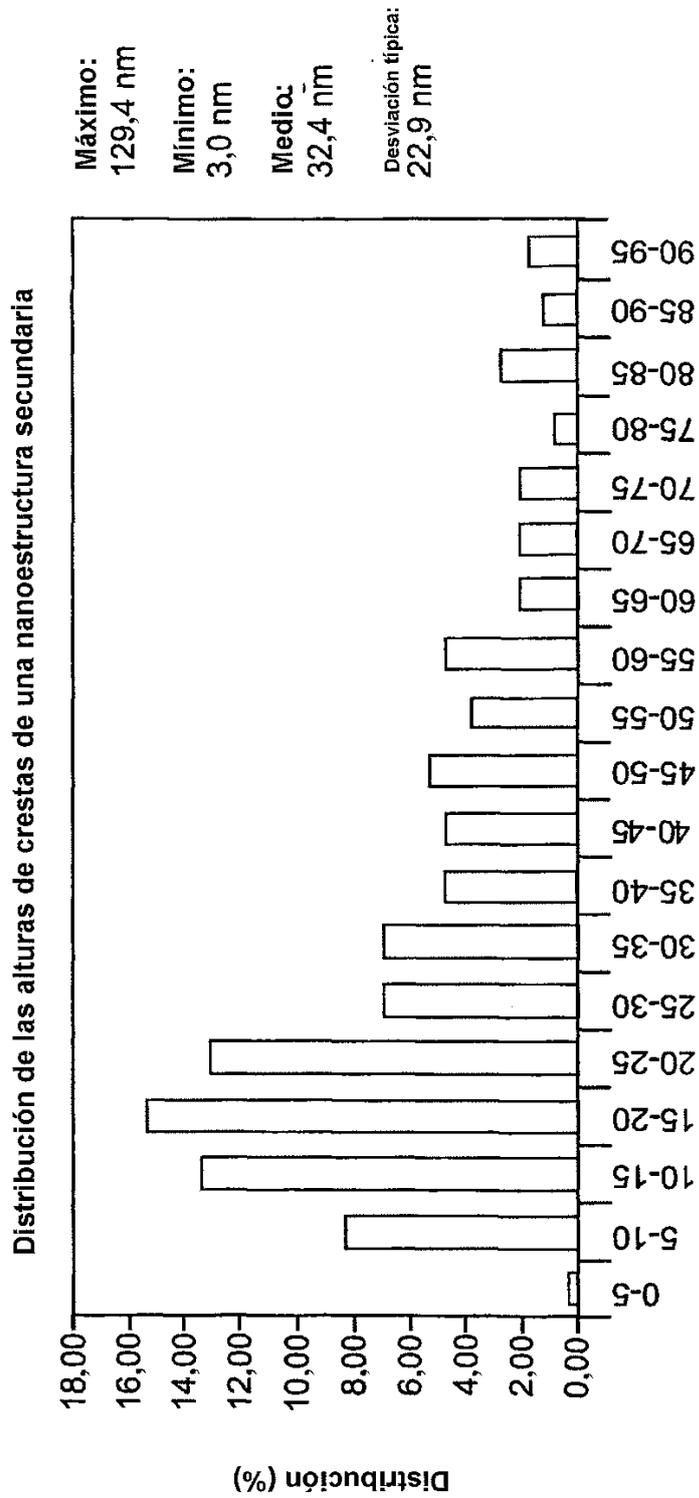


Fig. 17b

Altura (nm)

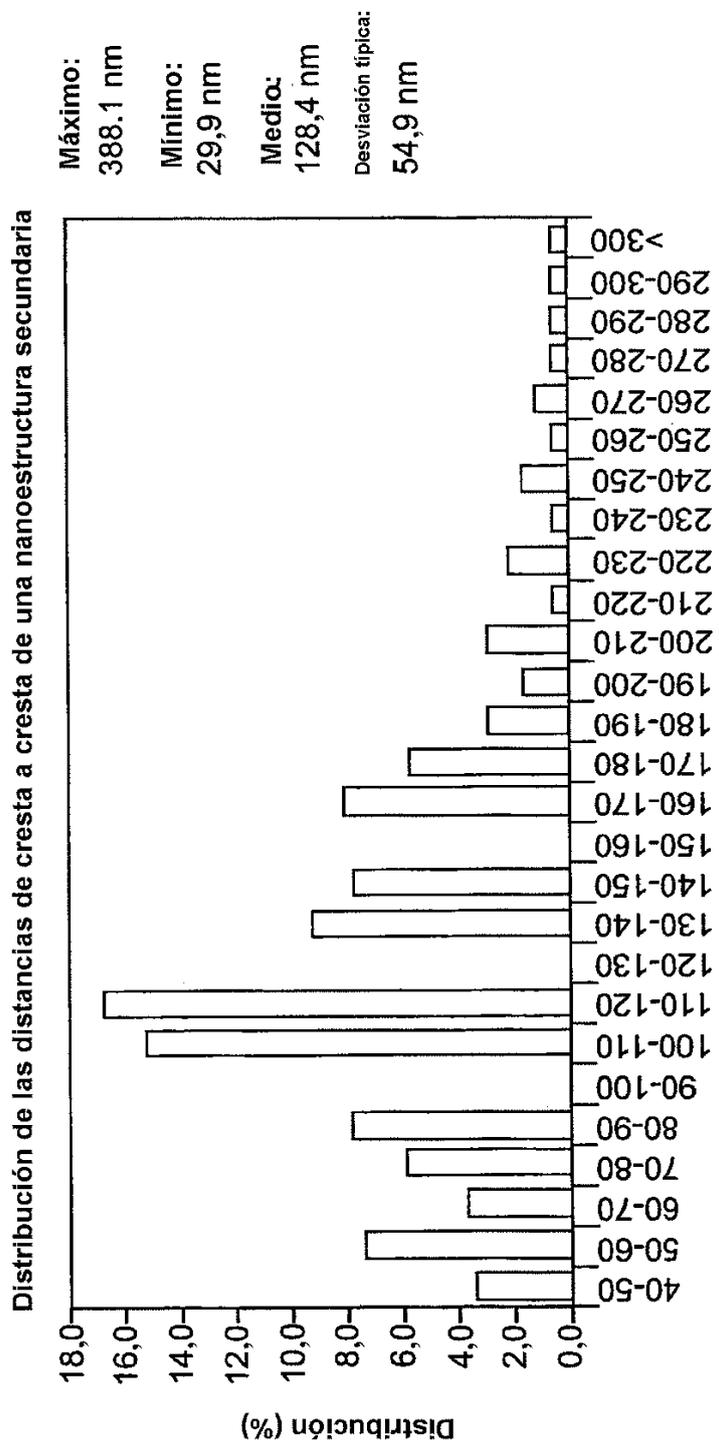


Fig. 17c

Distancia (nm)

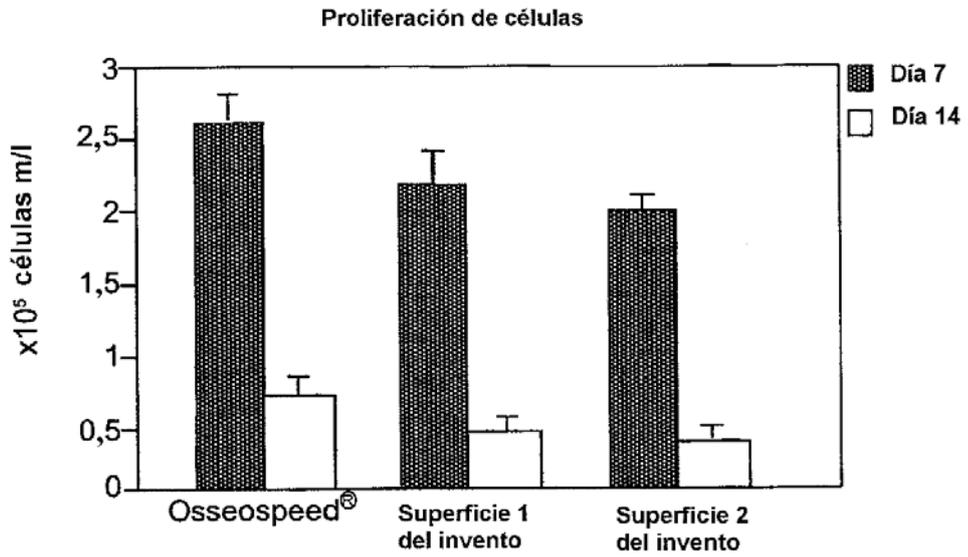


Fig. 18

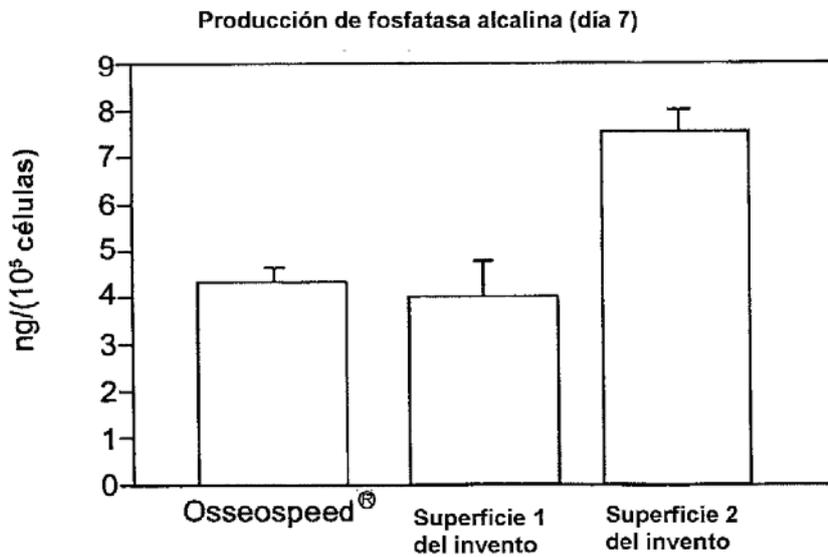


Fig. 19

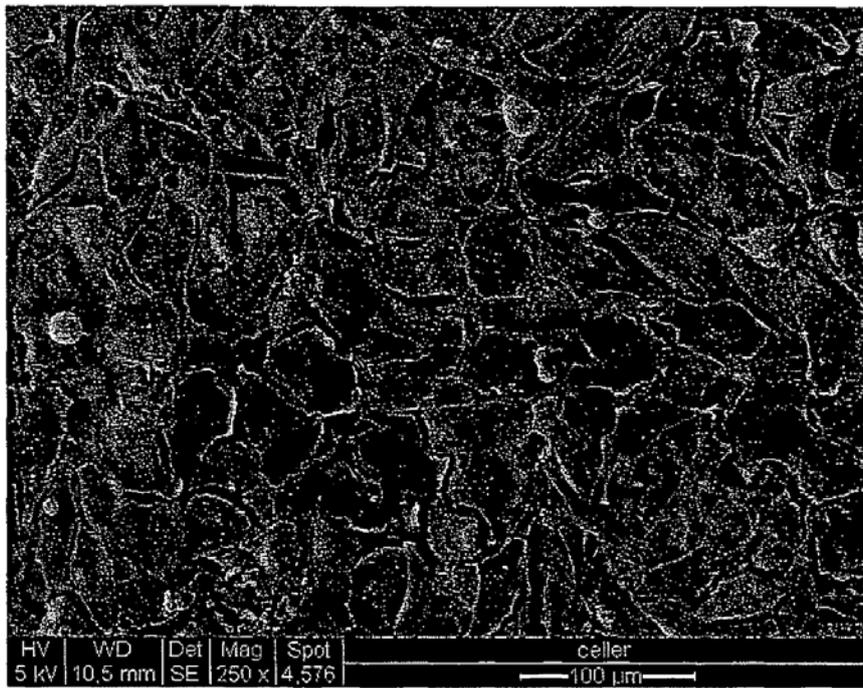


Fig. 20a

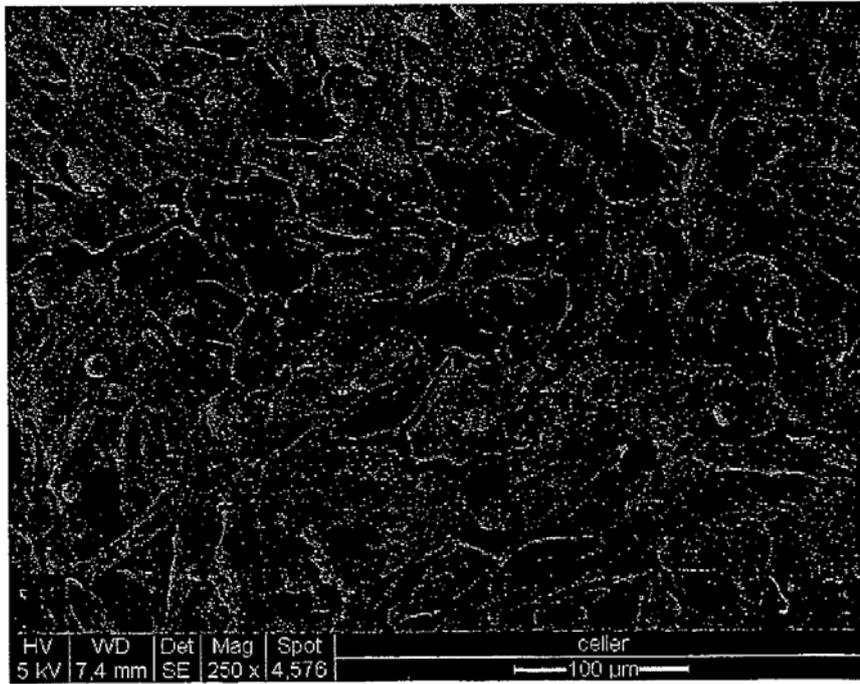


Fig. 20b

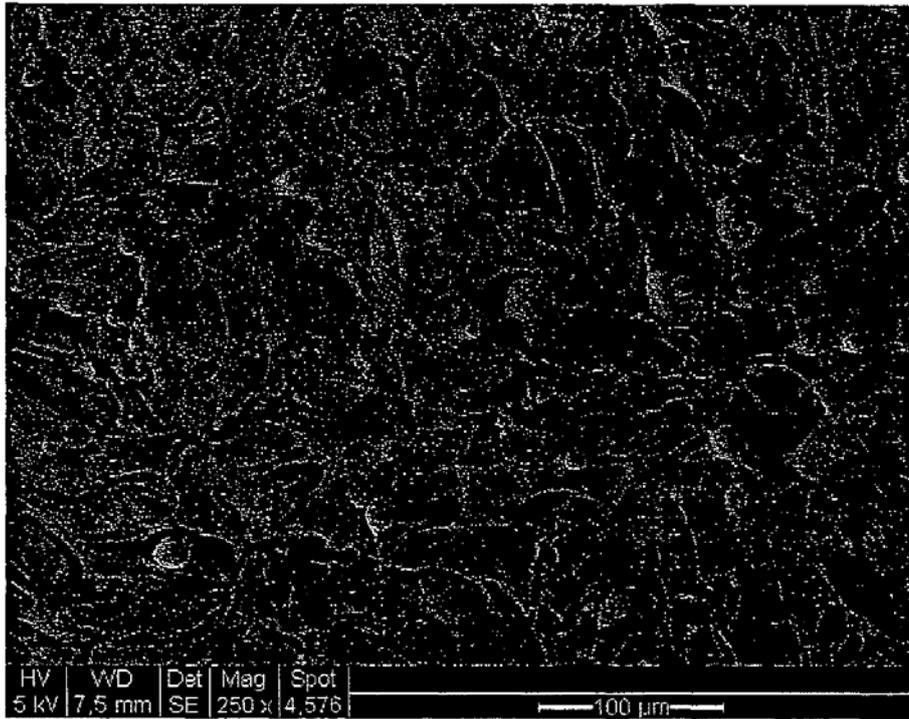


Fig. 20c

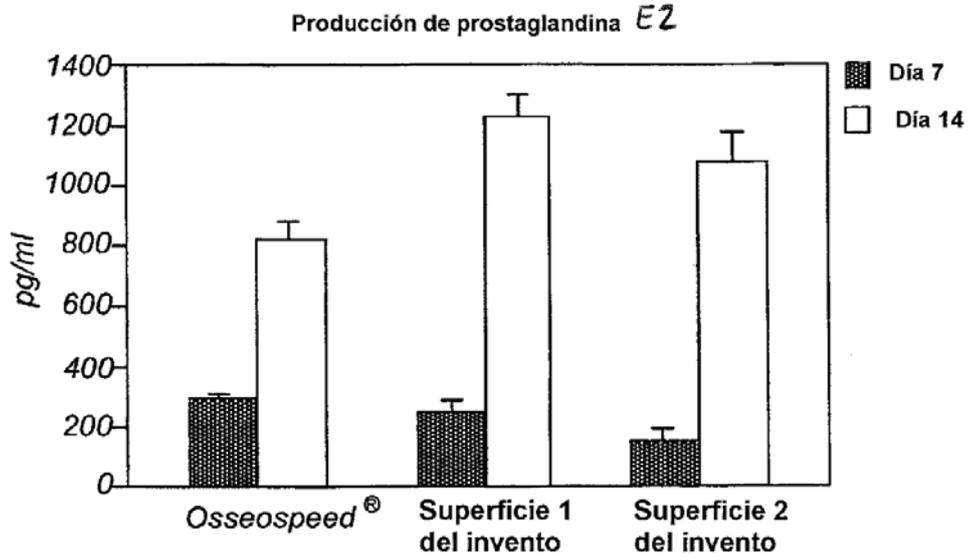


Fig. 21

Ensayo de par de desinserción tras 6 semanas de implantación en tibia de conejo

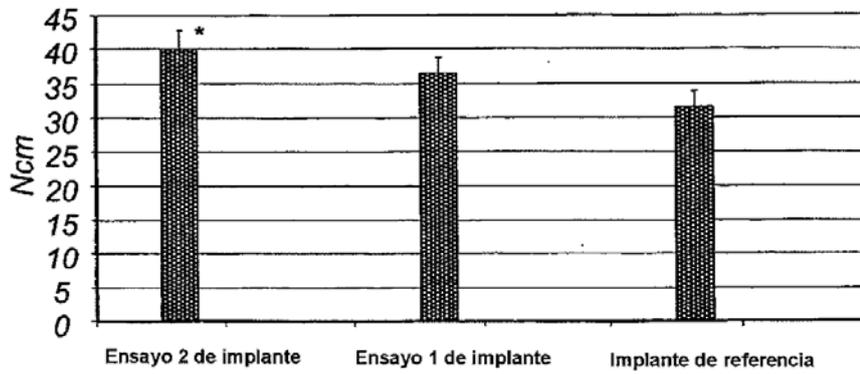


Fig. 22

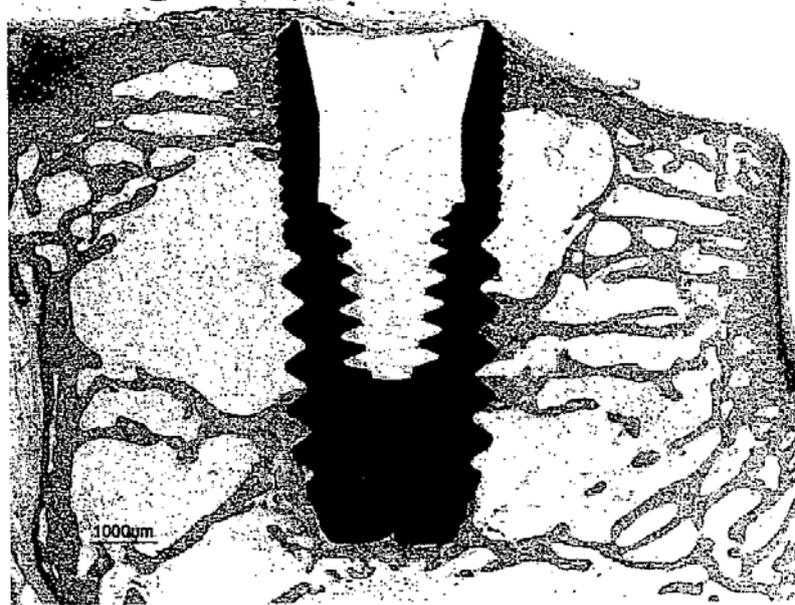


Fig. 23a

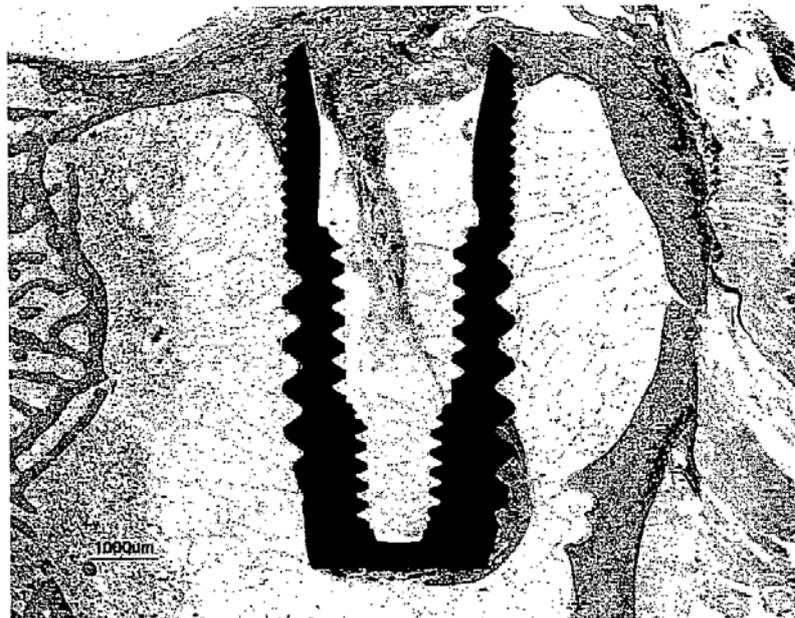


Fig. 23b

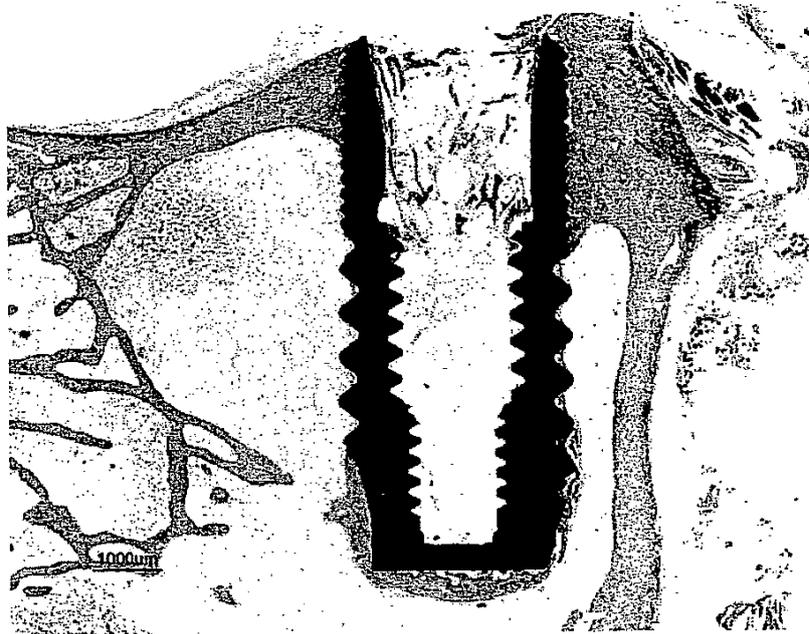


Fig. 24a

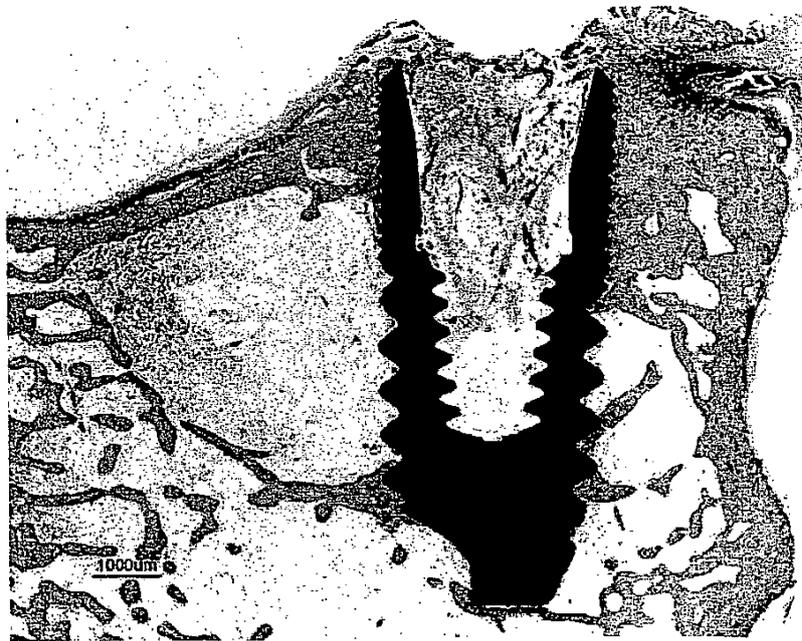


Fig. 24b

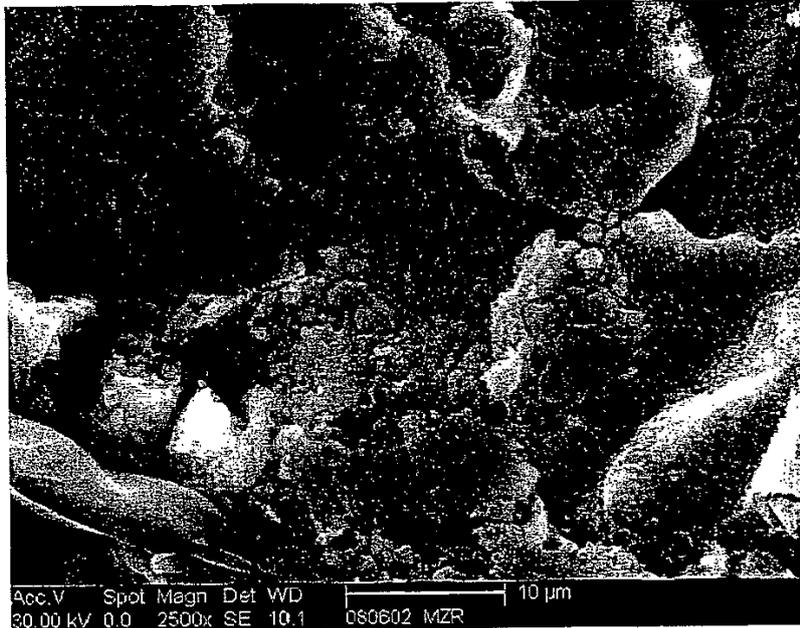


Fig. 25a

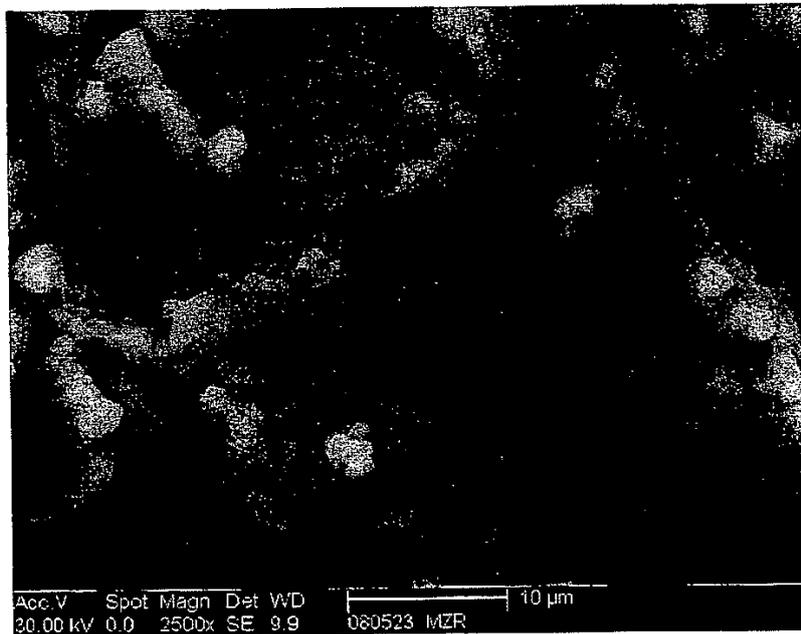


Fig. 25b

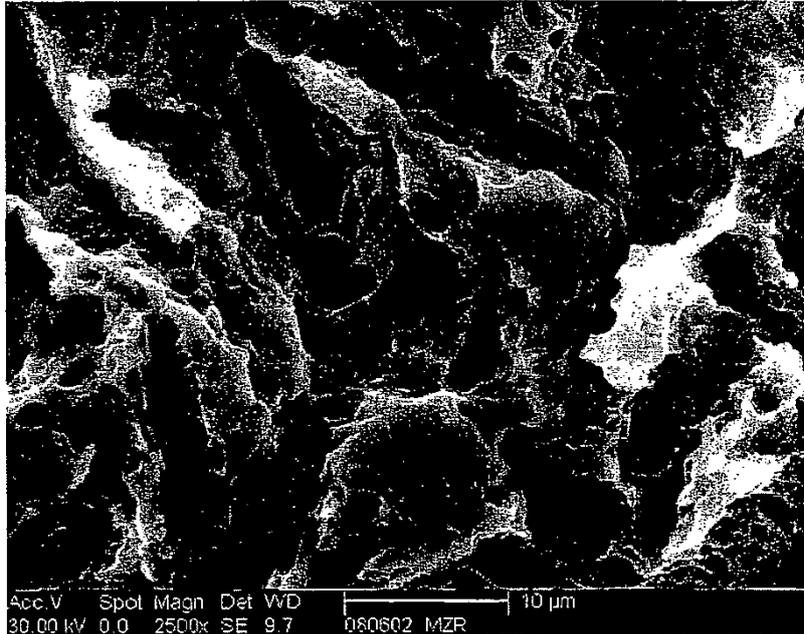


Fig. 26a

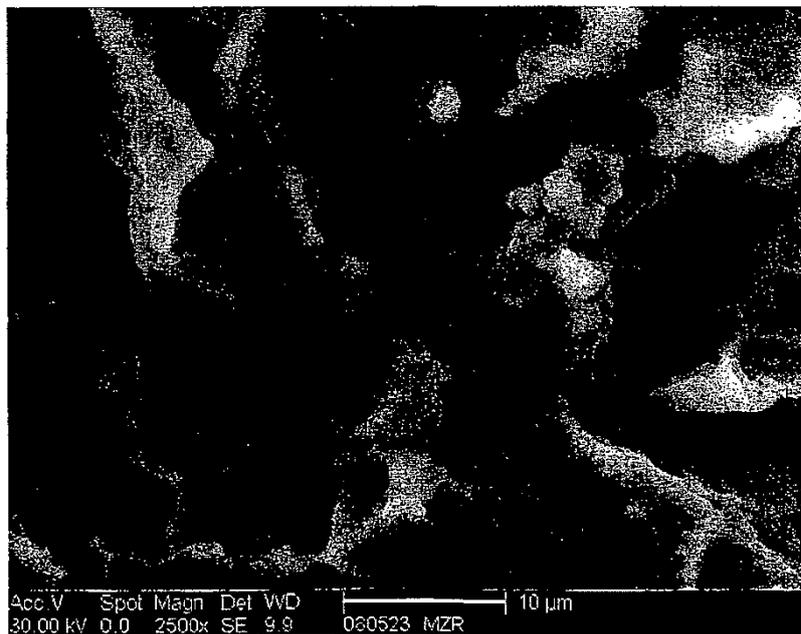


Fig. 26b

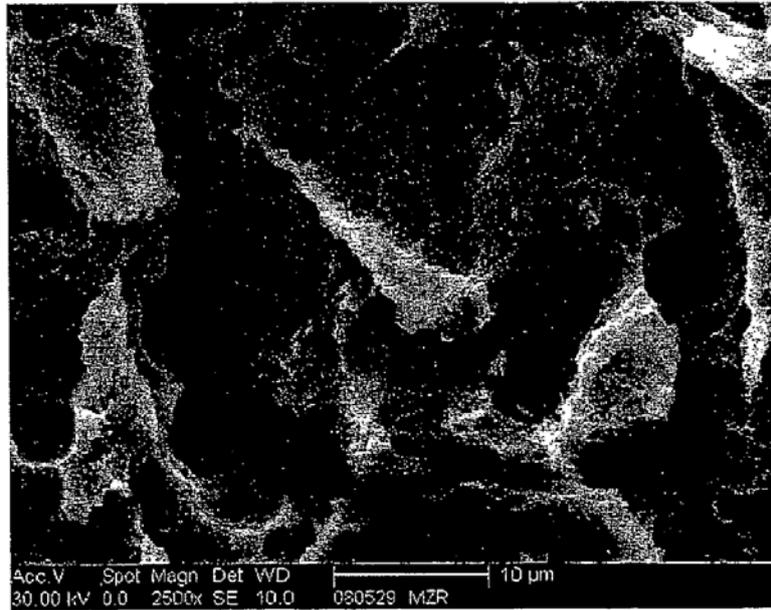


Fig. 27a

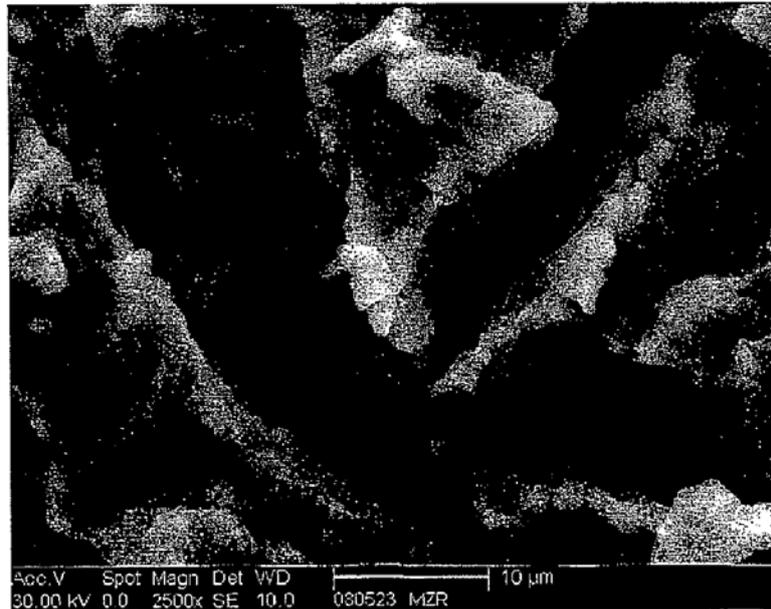


Fig. 27b

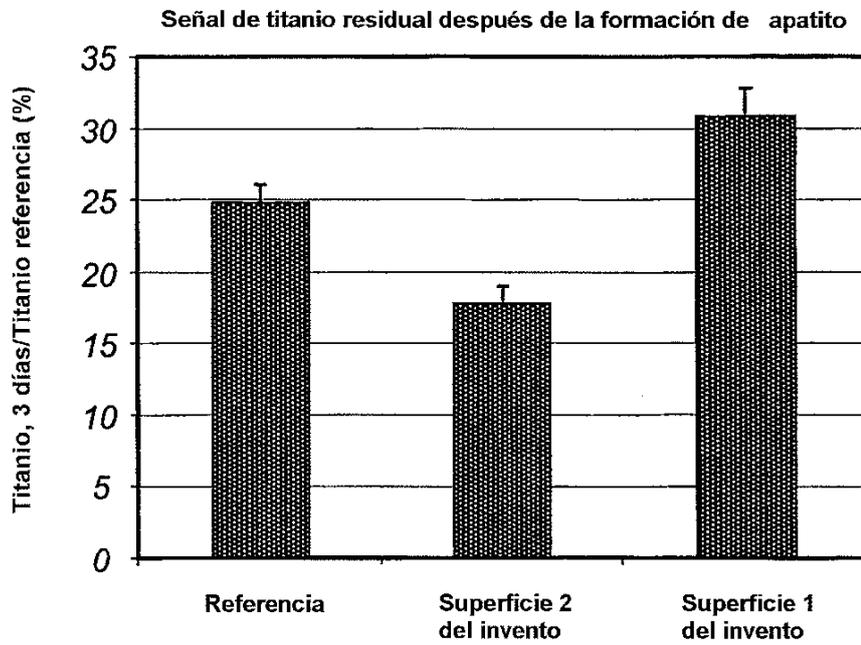


Fig. 28

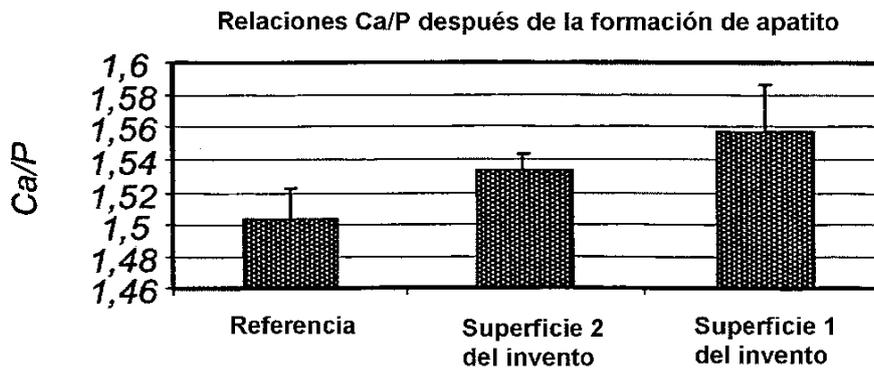


Fig. 29