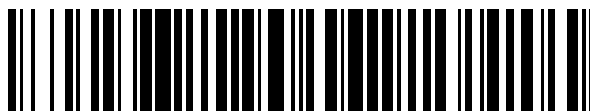


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 438**

51 Int. Cl.:  
**C25D 11/26** (2006.01)  
**A61F 2/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09802579 .4**  
96 Fecha de presentación: **27.07.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2307594**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.04.2011**

54 Título: **Tratamiento biomimético basado en silicio para la osteointegración de sustratos metálicos**

30 Prioridad:  
**29.07.2008 IT MI20081399**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.07.2012**

73 Titular/es:  
**Politecnico di Milano  
Piazza Leonardo da Vinci 32  
20133 Milano, IT**

72 Inventor/es:  
**CHIESA, Roberto;  
CIGADA, Alberto;  
DELLA VALLE, Cinzia;  
RONDELLI, Gianni;  
CANDIANI, Gabriele y  
GIORDANO, Carmen**

74 Agente/Representante:  
**Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 385 438 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**

Tratamiento biomimético basado en silicio para la osteointegración de sustratos metálicos.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para la modificación de superficies de titanio, tántalo y aleaciones respectivas por medio de un tratamiento electroquímico de oxidación de ánodo. Este método es particularmente útil para la modificación de la superficie de prótesis e implantes.

Técnica antecedente

10 En el campo de la prostodoncia y las prótesis articulares ortopédicas se ha descubierto que la compatibilidad de los materiales usados para las prótesis con los tejidos biológicos es de vital importancia para permitir un tratamiento adecuado de los pacientes.

Los materiales usados comúnmente en estos campos consisten sustancialmente en sustratos metálicos de acero, titanio o tántalo, que tienen excelentes propiedades mecánicas pero requieren tiempos prolongados para la integración en los tejidos biológicos de los pacientes en los que se implantan y para la curación de la región de implantación.

15 Para evitar estos inconvenientes, se han desarrollado métodos que son adecuados para modificar la superficie de los sustratos metálicos mediante la introducción en los mismos de grupos químicos o elementos químicos capaces de interaccionar con tejidos biológicos y de esta forma permitir la integración entre la prótesis y los tejidos. Estos métodos generalmente se conocen como tratamientos biomiméticos.

20 Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.385.662 en nombre de Kurze et al. describe la modificación de superficies metálicas por medio de un tratamiento con peróxido de hidrógeno para depositar una capa de óxidos metálicos en dichas superficies. Sin embargo, este método no se describe para uso en el campo biomédico.

25 La Patente de Estados Unidos 5.152.993 en nombre de Lars-Magnus et al. y la Patente de Estados Unidos 5.885.612 en nombre de Ohthuki et al. describen el tratamiento de superficies metálicas mediante el uso de peróxido de hidrógeno y opcionalmente iones metálicos, para modificar las superficies de prótesis metálicas mediante la introducción de grupos hidroxilo (-OH) en las mismas.

Por otra parte, la Patente EP0678300 en nombre de Kokubo describe el tratamiento de superficies metálicas por inmersión en una solución alcalina de NaOH, seguida del lavado y tratamiento térmico a alta temperatura. Además, este método introduce grupos -OH, que son adecuados para la interacción con tejidos óseos, en la superficie metálica tratada.

30 Además, la Patente de Estados Unidos 5.478.237 en nombre de Ishizawa et al. describe el uso de deposición anódica en la superficie de implantes óseos, con el objeto de modificar la composición y morfología del sustrato metálico. Aunque no se describe la introducción de grupos -OH, el proceso del documento US 5.478.237 conduce a la formación de una capa porosa que es rica en calcio y fósforo en la superficie de los implantes, lo cual facilita su osteointegración.

35 Finalmente, la patente EP1515759 en nombre de Politecnico di Milano enseña el uso de una doble etapa de deposición anódica para depositar en la superficie de implantes metálicos una capa microporosa de calcio y fósforo, al mismo tiempo que se introducen grupos -OH.

A pesar de estas tecnologías, sin embargo, existe la necesidad de proporcionar nuevos métodos capaces de facilitar la integración de sustratos metálicos en tejidos biológicos, que sean más eficaces y más sencillos de realizar.

40 Sumario de la invención

El objetivo principal de la presente invención es proporcionar un nuevo método para el tratamiento biomimético de sustratos metálicos.

45 Dentro del alcance de este objetivo, un objeto de la invención es proporcionar un método que pueda introducir grupos químicos funcionales y elementos químicos específicos en la superficie de sustratos metálicos, que puedan facilitar la integración en tejidos biológicos.

Otro objeto de la invención es proporcionar un método capaz de modificar la morfología de los sustratos metálicos, que les proporcione una estructura que sea más adecuada para la interacción con tejidos biológicos.

Otro objeto de la invención es proporcionar un método para el tratamiento biomimético de sustratos metálicos que sea altamente fiable, relativamente fácil de proporcionar y con un coste competitivo.

50 Este objetivo y estos y otros objetos que serán evidentes en lo sucesivo se consiguen por un método para el

tratamiento biomimético de un sustrato metálico, seleccionándose dicho metal del grupo que consiste en titanio, tántalo, aleaciones de titanio y aleaciones de tántalo, que comprende las etapas de:

5 (a) someter el sustrato metálico a un tratamiento de deposición por chispa anódica (ASD) en una solución acuosa que comprende silicato sódico hidratado ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP), acetato cálcico hidratado ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e hidróxido sódico (NaOH); y

(b) sumergir el sustrato metálico sometido al tratamiento de deposición por chispa anódica ASD en una solución de hidróxido sódico (NaOH).

10 El objetivo y los objetos de la invención también se consiguen por una solución acuosa de deposición que comprende silicato sódico hidratado ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP), acetato cálcico hidratado ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e hidróxido sódico (NaOH).

Breve descripción de los dibujos

Otras características y ventajas de la invención se harán patentes tras la descripción detallada del método de acuerdo con la invención y los dibujos adjuntos, en los que:

15 La Figura 1A es una micrografía SEM (microscopía electrónica de barrido) de una muestra de titanio sometida a tratamiento ASD de acuerdo con el método de la invención, antes de la inmersión en NaOH;

La Figura 1B es el espectro obtenido después del microanálisis EDS (espectroscopía de dispersión de energía de rayos x) de una muestra de titanio sometida a tratamiento ASD de acuerdo con el método de la invención, antes de la inmersión en NaOH;

20 La Figura 2A es una micrografía SEM de una muestra de titanio tratada de acuerdo con el método de la presente invención;

La Figura 2B es el espectro obtenido después del microanálisis EDS de una muestra de titanio tratada de acuerdo con el método de la presente invención;

25 La Figura 3A es un gráfico de la cantidad de calcio ( $\mu\text{g}$  de  $\text{Ca}/\text{cm}^2$  de muestra) que está presente en las muestras sometidas a tratamiento ASD de acuerdo con el método de la invención, antes (SUMNa sin NaOH) y después (SUMNa) de la inmersión en NaOH y la muestra de referencia (BS);

La Figura 3B es un gráfico de la cantidad de fósforo ( $\mu\text{g}$  de  $\text{P}/\text{cm}^2$  de muestra) que está presente en las muestras sometidas a tratamiento ASD de acuerdo con el método de la invención, antes (SUMNa sin NaOH) y después (SUMNa) de la inmersión en NaOH y en la muestra de referencia (BS);

30 La Figura 4A es un difractograma XRD (difractometría de rayos x) de una muestra preparada de acuerdo con el método de la invención (SUMNa);

La Figura 4B es un difractograma XRD de una muestra de referencia (BS);

35 La Figura 5A es un gráfico de los resultados del análisis del perfil para el parámetro  $R_a$  (datos expresados como media  $\pm$  desviación típica) de una muestra preparada de acuerdo con el método de la invención (SUMNa) y las muestras de referencia (Ti y BS);

La Figura 5B es un gráfico de los resultados del análisis del perfil para el parámetro  $R_t$  (datos expresados como media  $\pm$  desviación típica) de una muestra preparada de acuerdo con el método de la invención (SUMNa) y las muestras de referencia (Ti y BS);

40 La Figura 5C es un gráfico de los resultados del análisis del perfil para el parámetro  $R_{\text{máx}}$  (datos expresados como media  $\pm$  desviación típica) de una muestra preparada de acuerdo con el método de la invención (SUMNa) y las muestras de referencia (Ti y BS);

La Figura 5D es una tabla que resume los valores medios de los parámetros  $R_a$ ,  $R_t$  y  $R_{\text{máx}}$  obtenidos a partir del análisis del perfil de las muestras;

45 La Figura 6 es un gráfico de los resultados del ensayo de microdureza Vickers para muestras sometidas a tratamiento ASD de acuerdo con el método de la invención antes (SUMNa sin NaOH) y después (SUMNa) de la inmersión en NaOH y para las muestras de referencia (Ti y BS);

La Figura 7A es una micrografía SEM de una muestra de titanio preparada de acuerdo con el método de la invención después del ensayo de flexión a  $15^\circ$  con respecto al plano de anclaje;

- La Figura 7B es una micrografía SEM de una muestra de titanio preparada de acuerdo con el método de la invención después del ensayo de flexión a 45° con respecto al plano de anclaje;
- La Figura 8A es una micrografía SEM de una muestra de referencia de titanio (Ti) después de 14 días de inmersión en SBF;
- 5 La Figura 8B es un espectro obtenido después del microanálisis EDS de una muestra de referencia de titanio (Ti) después de 14 días de inmersión en SBF;
- La Figura 8C es una micrografía SEM de una muestra de referencia de titanio (BS) después de 14 días de inmersión en SBF;
- 10 La Figura 8D es un espectro obtenido después del microanálisis EDS de una muestra de referencia de titanio (BS) después de 14 días de inmersión en SBF;
- La Figura 8E es una micrografía SEM de una muestra de titanio preparada de acuerdo con el método de la invención después de 14 días de inmersión en SBF;
- La Figura 8F es un espectro obtenido después del microanálisis EDS de una muestra de titanio tratada de acuerdo con el método de la presente invención después de 14 días de inmersión en SBF;
- 15 La Figura 9A es un difractograma XRD de una muestra de referencia (Ti) después de 14 días de inmersión en SBF;
- La Figura 9B es un difractograma XRD de una muestra de referencia (BS) después de 14 días de inmersión en SBF;
- 20 La Figura 9C es un difractograma XRD de una muestra preparada de acuerdo con el método de la invención (SUMNa) después de 14 días de inmersión en SBF;
- La Figura 10A es una metalografía óptica de una muestra de referencia (Ti) después de 14 días de inmersión en SBF;
- La Figura 10B es una metalografía óptica de una muestra de referencia (BS) después de 14 días de inmersión en SBF;
- 25 La Figura 10C es una metalografía óptica de una muestra preparada de acuerdo con el método de la invención (SUMNa) después de 14 días de inmersión en SBF;
- La Figura 11 muestra los resultados del ensayo Azul Alamar después de 7 días de cultivo de células MG63 en muestras sometidas al tratamiento ASD de acuerdo con el método de la invención antes (SUMNa sin NaOH) y después (SUMNa) de la inmersión en NaOH y en las muestras de referencia (Ti y BS); los datos, indicados como unidades arbitrarias (ABU), proceden de la media de tres cultivos diferentes para cada muestra  $\pm$  desviación típica;
- 30 La Figura 12A es una micrografía SEM de una muestra de referencia (Ti) después de 7 días de cultivo de células MG63;
- La Figura 12B es una micrografía SEM de una muestra de referencia (BS) después de 7 días cultivo de células MG63;
- 35 La Figura 12C es una micrografía SEM de una muestra preparada de acuerdo con el método de la invención (SUMNa) después de 7 días de cultivo de células MG63;
- La Figura 13 es un gráfico del contenido de CACP (secuencia de colágeno C-terminal de tipo I) en las muestras sometidas al tratamiento ASD de acuerdo con el método de la invención antes (SUMNa sin NaOH) y después (SUMNa) de la inmersión en NaOH y en las muestras de referencia (Ti y BS) después de 7 días de cultivo de células MG63; los datos se indican como valores medios en cuatro muestras  $\pm$  desviación típica;
- 40 La Figura 14 es un gráfico de la deposición de osteocalcina después de 7 días de cultivo de células MG63 en las muestras sometidas al tratamiento ASD de acuerdo con el método de la invención antes (SUMNa sin NaOH) y después (SUMNa) de la inmersión en NaOH y en las muestras de referencia (Ti y BS); los datos se indican como valores medios en cuatro muestras  $\pm$  desviación típica;
- 45 La Figura 15 es un gráfico de la relación entre absorción de fibronectina y albúmina sérica en las muestras sometidas al tratamiento ASD de acuerdo con el método de la invención antes (SUMNa sin NaOH) y después (SUMNa) de la inmersión en NaOH y en las muestras de referencia (Ti y BS); los datos, indicados como unidades arbitrarias (ABU) proceden de la media de cuatro muestras  $\pm$  desviación típica.

## Formas de realizar la invención

5 Para proporcionar los sustratos metálicos con los que se realizan las prótesis e implantes con mejores propiedades de integración en tejidos biológicos, estos sustratos se modifican por medio de tratamientos biomiméticos. El método de la presente invención conduce a una modificación morfológica y química de la superficie de los sustratos metálicos por medio de una serie de pasos descritos con más detalle más adelante.

10 El primer paso del método de acuerdo con la invención (etapa (a)) proporciona medios para el uso de la técnica de deposición por chispa anódica (ASD), una técnica para la pasivación anódica de metales gracias a la cual es posible depositar en la superficie metálica una capa de óxido metálico. Junto con la técnica ASD, se usa una solución acuosa de agentes químicos con la que se modifica la superficie de los sustratos metálicos, seleccionándose el metal del grupo que consiste en titanio (Ti), tántalo (Ta), aleaciones de titanio y aleaciones de tántalo. Preferiblemente, el sustrato metálico puede ser titanio.

En particular, durante la etapa (a) un sustrato metálico se somete a tratamiento ASD en una solución acuosa de deposición que comprende silicato sódico hidratado ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP), acetato cálcico hidratado ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e hidróxido sódico (NaOH).

15 En una realización, la solución acuosa de deposición puede comprender silicato sódico hidratado a una concentración de 0,005 M a 0,1 M, preferiblemente 0,03 M,  $\beta$ -glicerofosfato a una concentración de 0,03 M a 0,2 M, preferiblemente 0,1 M, acetato cálcico hidratado a una concentración de 0,05 M a 0,6 M, preferiblemente 0,3 M, y NaOH a una concentración de 0,005 M a 0,4 M, preferiblemente 0,036.

20 Preferiblemente, la etapa de tratamiento ASD se realiza a una temperatura comprendida en un intervalo de  $0 \pm 0,5$  °C.

25 En otra realización, la etapa de tratamiento ASD preferiblemente se realiza trabajando a un primer valor de densidad de corriente de 5 a 50  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , preferiblemente 10  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , con un potencial que aumenta libremente hasta un valor de 210 a 310 V, preferiblemente 300 V, durante un periodo de tiempo necesario para alcanzar dicho valor de potencial y un segundo valor de densidad de corriente del 50% al 5%, preferiblemente del 20%, de dicho primer valor de densidad de corriente.

30 La segunda fase del método de la invención (etapa (b)) consiste en sumergir el sustrato metálico sometido al tratamiento de deposición anódica ASD en una solución de hidróxido sódico (NaOH). Esta inmersión conduce a un ataque químico producido por la solución alcalina en la superficie del metal, gracias al cual es posible optimizar la relación cuantitativa entre los elementos químicos depositados durante la etapa (a) e introducir grupos -OH en la superficie del sustrato metálico.

Preferiblemente, la inmersión del sustrato en la solución de NaOH después de la deposición anódica ASD puede realizarse a una temperatura de  $60 \pm 2$  °C durante un periodo de tiempo de 0,25 a 6 horas, más preferiblemente de 2 horas. Además, la solución de NaOH usada puede tener una concentración de 0,5 a 10 M, preferiblemente 5 M, de NaOH.

35 En otra realización, el método de la presente invención puede comprender además una etapa de limpieza del sustrato metálico antes de la etapa de deposición anódica ASD, sumergiendo el sustrato en una bandeja de ultrasonidos que contiene acetona durante un primer periodo de tiempo de 3 a 5 minutos, y agua destilada durante un segundo periodo de tiempo de 3 a 5 minutos.

40 Esta etapa de limpieza es útil para retirar cualquier impureza presente en la superficie del sustrato metálico antes de realizar el tratamiento ASD.

Además, en otra realización, el método de acuerdo con la invención puede comprender además, independientemente entre sí, las etapas de limpieza del sustrato metálico por inmersión en agua destilada después del tratamiento de deposición anódica y/o después de la inmersión del sustrato en la solución de NaOH.

45 La etapa de limpieza adicional en agua destilada después del tratamiento ASD y/o después de la inmersión en la solución de NaOH es útil para retirar de la superficie del sustrato cualquier residuo contaminante.

50 Por lo tanto, al realizar las etapas (a) y (b) del método de acuerdo con la invención es posible obtener, solo en dos etapas, la deposición en la superficie del sustrato metálico de una capa de óxido metálico enriquecida con calcio (Ca), fósforo (P), silicio (Si) y sodio (Na) que tiene una morfología microporosa, resistente, adherente y que al mismo tiempo se caracteriza por la presencia de grupos químicos -OH, proporcionando de esta manera al sustrato propiedades biomiméticas considerables.

En otro aspecto, la presente invención se refiere también a una solución acuosa de deposición que comprende silicato sódico hidratado ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP), acetato cálcico hidratado ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e hidróxido sódico (NaOH). Esta solución puede usarse ventajosamente en el método descrito en el presente documento para el tratamiento de deposición anódica ASD de sustratos metálicos.

Preferiblemente, la solución acuosa de deposición puede comprender  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a una concentración de 0,005 M a 0,1 M, preferiblemente 0,03 M,  $\beta$ -GP a una concentración de 0,03 M a 0,2 M, preferiblemente 0,1 M,  $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  a una concentración de 0,05 M a 0,6 M, preferiblemente 0,3 M, y NaOH a una concentración de 0,005 M a 0,4 M, preferiblemente 0,036 M.

- 5 Ventajosamente, esta solución de deposición hace que sea posible introducir en la superficie de sustratos metálicos sometidos a tratamiento anódico ASD elementos químicos que son adecuados para aumentar las propiedades biomiméticas del sustrato sin recurrir a múltiples ciclos de deposición anódica.

### Ejemplo

10 Se sometieron muestras metálicas de titanio al método de la presente invención de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. limpieza de la superficie de muestras de titanio CP de calidad 2, usando una bandeja de ultrasonidos, durante 3-5 minutos en acetona y 3-5 minutos en agua destilada;
- 15 2. tratamiento ASD en solución acuosa de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,03 M,  $\beta$ -GAP 0,1 M,  $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,3 M y NaOH 0,036 M; la solución se mantiene a aproximadamente  $0^\circ \pm 0,5^\circ \text{C}$ , a una densidad de corriente de  $10 \text{ mA/cm}^2$ , y a un potencial libre para elevarse a 300 V; el tratamiento ASD se termina cuando el valor del potencial alcanza 300 V y la densidad de corriente se reduce al 20% del valor establecido;
3. lavado en agua destilada;
4. tratamiento de ataque químico con solución alcalina de NaOH 5 M a una temperatura de  $60 \pm 2^\circ \text{C}$  durante 2 horas,
- 20 5. lavado en agua destilada y secado.

Las muestras obtenidas por medio del procedimiento descrito en el presente documento, denominadas en lo sucesivo muestras SUMNa, después se compararon con dos series distintas de muestras de comparación. La primera serie de muestras de comparación consiste en muestras de titanio no tratado, simplemente limpiadas usando una bandeja de ultrasonidos durante 3-5 minutos en acetona y 3-5 minutos en agua destilada, denominadas en lo sucesivo muestras Ti. La segunda serie de muestras de comparación se obtiene por medio de un proceso en tres pasos, que consiste en: tratamiento ASD en una solución 0,015 M de glicerofosfato cálcico ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{CaO}_6\text{P}$ ) a una densidad de corriente de  $7 \text{ mA/cm}^2$  hasta un voltaje máximo de 350 V; segundo tratamiento ASD en una solución 0,1 M de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a una densidad de corriente de  $7 \text{ mA/cm}^2$  y a un voltaje máximo de 370 V; tratamiento posterior térmico/químico en KOH 5 M a  $60 \pm 2^\circ \text{C}$  durante 24 horas. Las muestras de comparación de la segunda serie se denominan en lo sucesivo muestras BS.

Las muestras preparadas de acuerdo con el método de la invención y los procedimientos de comparación se han examinado y caracterizado por medio de los siguientes procedimientos experimentales:

- 35 - Microscopía electrónica de barrido (SEM): análisis de la morfología de la superficie (ZEISS-EVO 50 EP y Cambridge - Stereoscan 360). Para la observación de las células desarrolladas en las muestras, la superficie de cada muestra se recubrió con oro (Edwards, Sputter Coater S150B) y la observación se realizó en condiciones de alto vacío ( $1 \times 10^{-5} \text{ mm Hg}$ ).
- Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS): el microanálisis (Oxford, Inca Energy 200) se realizó a 500 aumentos en una parte de muestra de tamaño micrométrico.
- 40 - Perfilometría láser: las muestras se sometieron a tres mediciones de la rugosidad de la superficie realizadas con un perfilómetro láser (UBM Microfocus, modelo 5600).
- Difractometría de rayos X de película delgada (TF-XRD): la estructura de las películas se analizó por medio de un difractómetro (Philips PW 3710) con ánodo de cobre, poniendo 40 mA de corriente y un voltaje de 40 kV. Para las presentes investigaciones se usó la configuración de película delgada.
- 45 - Espectroscopía de emisión óptica de plasma (ICP-OES): se realizó un análisis cuantitativo de la composición en cada muestra individual después del ataque químico con 5 ml de ácido sulfúrico al 96 % a  $60^\circ \text{C}$  durante 24 horas. El análisis espectroscópico de emisión de plasma se realizó en la muestra resultante después de la dilución a 50 ml.
- Análisis de microdureza Vickers: los ensayos de microdureza se realizaron por medio de un microdurómetro (Leitz, Wetzlar, Alemania) mientras se aplicaba una carga de 50 g en la superficie.
- 50 - Análisis de adherencia de óxido: se doblaron muestras rectangulares de titanio anodizado (30 x 70 mm) a  $15^\circ$  y  $45^\circ$ . Se realizó un análisis con un microscopio electrónico en la superficie doblada para evaluar el daño en la película de la superficie.

- Metalografía óptica: se realizaron análisis metalográficos en las muestras después de 14 días de incubación en solución SBF de tipo Kokubo, para evaluar el espesor del depósito de cualquier fosfato cálcico que pudiera estar presente.
- 5 - Ensayos *in vitro* (para evaluar la bioactividad del tratamiento): las muestras tratadas se sumergieron en una solución SBF (fluido corporal simulado) adecuada para evaluar el crecimiento y recubrimiento de fosfatos cálcicos presentes en la solución. La presencia y grado de dichos recubrimientos se considera un indicador significativo de bioactividad del tratamiento y del potencial como tratamiento biomimético para osteointegración. La solución SBF usada tiene la siguiente composición (elaborada por Kokubo) por litro de solución: 8 g de NaCl, 0,353 g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,224 g de KCl, 0,231 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0,311g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,368 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,071 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Al final, se añadieron 6,057 g de tris-(hidroximetil)-aminometano ((HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>)tris) y finalmente el pH se ajustó a 7,40 añadiendo HCl. Cada muestra se puso en un pocillo de una placa de múltiples pocillos y se cubrió con 12 ml de solución SBF. Las placas, selladas con Parafilm, se pusieron en un horno a la temperatura constante de 36,5 ± 1,5 °C durante 1, 5, 7, 11 y 14 días. Cada 24 horas, la solución se reemplazó por solución nueva, precalentada a 37 °C. La morfología de la superficie de las  
10  
15 muestras se analizó por SEM para determinar el grado de cualquier depósito de fosfato cálcico.

Los ensayos celulares *in vitro* usaron células MG63 (Colección Europea de Cultivos Celulares Animales, ECACC) cultivadas con Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) (M2279, Sigma) que contenía un 10% (p/p) de suero bovino fetal (FBS) (Sigma), un 1% (p/p) de aminoácidos no esenciales (NEAA) (Sigma), una concentración 2 mM de glutamina (Sigma), 100 unidades/ml de penicilina (Sigma) y 0,1 mg/ml de estreptomina (Sigma) en una incubadora (ThermoForma, mod3111) a 37 °C, con una humedad relativa del 95% y un 5% p/p de CO<sub>2</sub>.  
20

- Esterilización: las muestras se esterilizaron por exposición ultravioleta después del paso a través de etanol al 70%.
- Siembra de células: se administraron 50 µg (1x10<sup>4</sup> células) de la suspensión celular obtenida previamente en cada muestra con una micropipeta.
- 25 - Extracción de sobrenadantes y lisados celulares: para cada intervalo de tiempo, se tomó el sobrenadante de cada muestra y después se crioconservó a -80 °C. Después de lavar en PBS, se extrajeron las proteínas intracelulares y extracelulares de las muestras. La centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos produjo el lisado celular, que posteriormente se crioconservó a -80 °C.
- Análisis directo de citotoxicidad (ensayo Alamar): en condiciones estériles, para cada intervalo de tiempo de 1, 3 y 7 días, el medio de cultivo se reemplazó por 500 µl de solución Alamar (Azul Alamar al 10% (p/p) en EMEM), que se dejó en incubación durante 4 horas. De esta manera, se administraron 100 µl de sobrenadante que contenía Azul Alamar en una placa de múltiples pocillos y se usó un espectrofotómetro (Tecan, modelo Genios Plus) para leer la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm.
- 30 - Determinación del contenido total de proteína: partiendo de los lisados celulares resultantes, el contenido total de proteína presente en cada muestra se cuantificó por medio de un Kit de Ensayo de Proteínas BCA™ (Pierce).

Colágeno I: Se usó un Kit ELISA EIA de CICP (Colágeno I C-Terminal) (Metra-Quidel) para determinar en el sobrenadante el nivel de péptido C-terminal liberado en cantidad estequiométrica con respecto a la producción de Colágeno I por las células en el medio de cultivo (sobrenadante) después de 1, 3 y 7 días de cultivo.  
40

- Osteocalcina: el nivel de osteocalcina depositada por las células después de 1, 3 y 7 días de cultivo se determinó por medio de un Kit ELISA EIA de Osteocalcina de tipo Gla (Zymed) en los lisados celulares respectivos.
- 45 - Adsorción de proteínas en suero humano: las muestras se incubaron a 37 °C con 300 µl de suero durante 2 horas. Después de lavar en PBS, las proteínas se extrajeron usando un tampón de extracción y un escalpelo. La centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos produjo el extracto de proteínas, que posteriormente se crioconservó a -80 °C.
- Determinación del contenido total de proteínas en suero: partiendo de los extractos de proteína, se cuantificó el contenido de proteínas en suero adsorbidas en cada muestra mediante el Kit de Ensayo de Proteínas BCA™ (Pierce).
- 50 - Fibronectina: el nivel de fibronectina adsorbida en las superficies, después de la incubación en suero humano, se investigó por medio de un Kit ELISA de FIBRONECTINA HUMANA QuantiMatrix™ (Chemicon) en los diversos extractos de proteína.
- Albúmina: el nivel de albúmina adsorbida en las superficies, después de la incubación en suero humano, se investigó por Transferencia de Western. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de Acrilamida al  
55

10%/Bisacrilamida (35,7/1) y después se transfirieron a una membrana de PVDF. Se realizó una incubación con el anticuerpo primario (Policlonal de Cabra contra Albúmina de Suero Humano - ab 19180; Abcam) y finalmente con el secundario (anticuerpo de Ratón Anti-Cabra AffinPure conjugado con peroxidasa). La presencia de albúmina se detectó por medio de una Estación de Imágenes Kodak.

5 Los resultados de los procedimientos de análisis son los siguientes.

El análisis de la morfología de la superficie por SEM mostró, para la superficie de las muestras SUMNa, tanto antes (Figura 1A) como después (Figura 2A) de la inmersión en NaOH, la presencia de poros micrométricos redondeados; el aspecto global de la superficie es uniforme. Antes de la inmersión en NaOH (ataque químico), el análisis EDS destaca la presencia en la superficie de calcio, silicio y fósforo (Figura 1B), mientras que la inmersión en NaOH hace que sea posible aumentar la relación de calcio/fósforo y enriquecer la superficie con sodio (Figura 2B).

El análisis ICP/OES confirma lo que se descubrió mediante los microanálisis EDS. De hecho, la Figura 3A permite ver que las cantidades de calcio y fósforo que están presentes en las muestras SUMNa son mayores que las presentes en la BS de control. También se puede observar que el ataque químico en NaOH aumenta la relación de calcio/fósforo.

El análisis XRD destaca que el óxido de titanio que está presente en la superficie después del tratamiento con SUMNa tiene la estructura cristalográfica de anatasa, a un ángulo  $2\theta$  de  $25^\circ$  (Figura 4A). Esta característica puede observarse también en la BS de control, aunque es menos llamativa en esta última (Figura 4B). Para la superficie SUMNa, puede observarse que el pico de anatasa es mayor que el pico de titanio y, por lo tanto, en la superficie hay una capa de óxido gruesa. Esto es un factor positivo, ya que la anatasa tiene importantes propiedades catalíticas que, *in vitro*, estimulan la nucleación del cristal de hidroxiapatita, permitiendo un alto rendimiento *in vivo*. Además, induce una reducción importante en la adhesión bacteriana sin comprometer la actividad de las células eucariotas.

La perfilometría láser mostró, para las muestras SUMNa, un aumento en rugosidad ( $R_a$ ,  $R_{m\acute{a}x}$  y  $R_t$ ) con respecto a los materiales de control (Figuras 5A, 5B y 5C). Se ha demostrado ampliamente en la bibliografía que la rugosidad de la superficie de un material afecta al comportamiento celular en términos de diferenciación y proliferación. El análisis perfilométrico demuestra que las muestras SUMNa tienen una superficie nano-rugosa.

El análisis de microdureza Vickers muestra que la superficie de las muestras preparadas de acuerdo con el método de la invención tiene una mayor dureza que las superficies de control (Figura 6). Este descubrimiento sugirió una evaluación de si el recubrimiento producido era frágil y susceptible de delaminación y, por lo tanto, se realizaron ensayos de adherencia del recubrimiento con flexión a  $15^\circ$  y  $45^\circ$  con respecto al plano de anclaje de la muestra. La Figura 7A muestra que la superficie presenta pequeñas grietas, que se vuelven más llamativas después de la flexión a  $45^\circ$  (Figura 7B). A pesar de la condición de flexión extrema aplicada, el recubrimiento permanece adherente a la superficie del titanio subyacente, sin presentar ninguna región delaminada sin óxido.

Para establecer la bioactividad del recubrimiento obtenido por medio del método de acuerdo con la invención y para confirmar las capacidades de osteointegración del mismo, se evaluó la cantidad de fosfatos cálcicos depositados en las muestras SUMNa después de 14 días de inmersión en solución SBF. Después de 14 días de inmersión, se observa que las superficies de las muestras SUMNa muestran una mayor cantidad de fosfatos cálcicos que los controles (Figuras 8A, 8C y 8E). Además, los análisis EDS realizados en las muestras después de 14 días de inmersión en SBF muestran la presencia de calcio y fósforo en todas las superficies (Figuras 8B, 8D y 8F). En particular, la muestra de titanio no tratada (muestra Ti) muestra un pico de titanio mucho más intenso. Esto indica que el recubrimiento de fosfato cálcico en la superficie es limitado (Figura 8B).

El análisis XRD realizado después de 14 días de inmersión de las muestras en SBF muestra la presencia de hidroxiapatita (HA) en la superficie de las muestras SUMNa y de las muestras BS, pero no en el titanio no tratado (Figuras 9A, 9B y 9C). Los picos de la fase cristalina de HA no destacan mucho debido a la presencia de HA en la fase amorfa.

Las investigaciones metalográficas hacen que sea posible mejorar la comprensión de la medida del fenómeno de mineralización en cada muestra. Estas investigaciones no muestran la presencia de HA en el titanio no tratado (Ti), revelan la presencia de una capa de HA con un espesor de  $5\ \mu\text{m}$  en las muestras BS y la presencia de una superficie mucho más bioactiva en las muestras SUMNa, con un espesor de HA de  $12\ \mu\text{m}$  (Figuras 10A, 10B y 10C). Por lo tanto, las muestras tratadas con el método de acuerdo con la invención tienen un mayor potencial de mineralización que la BS de control y tienen características químicas y morfológicas capaces de inducir una mayor deposición de fosfatos cálcicos. Este mecanismo constituye una etapa fundamental en el fenómeno de osteointegración.

Los resultados celulares obtenidos confirman que la superficie sometida al tratamiento con SUMNa no es citotóxica, proporciona a las células puntos de anclaje preferentes para la adhesión gracias a la rugosidad de la superficie y constituye un entorno favorable para la realización de sus actividades metabólicas.

El ensayo Azul Alamar muestra que con las muestras SUMNa se observa una mayor vitalidad celular que con la BS de control. El tratamiento en NaOH experimentado por las muestras SUMNa es decisivo para aumentar la vitalidad



de las células. Antes de este ataque alcalino, la vitalidad celular en las muestras SUMNa efectivamente es comparable a la de los controles (Figura 11). El tratamiento con solución alcalina en general interviene modificando tanto las propiedades morfológicas como las propiedades químicas del recubrimiento: la hidroxilación de la superficie con enriquecimiento de grupos -OH es uno de los efectos típicos producidos.

- 5 El análisis SEM de la morfología celular muestra que las células MG63 se han adherido fuertemente a la superficie de los diversos materiales. En particular, en las muestras SUMNa y BS las células forman una estructura uniforme y de múltiples capas (Figuras 12B y 12C). Solo son visibles cuerpos celulares aislados en el titanio no tratado (Figura 12A). En vista de la morfología porosa particular de las muestras SUMNa, es difícil poder identificar los cuerpos celulares, ya que se confunden con las porosidades (Figura 12C).
- 10 Con respecto a la cantidad de colágeno I depositado por las células después de 7 días de cultivo celular, no se observan variaciones significativas entre las diversas superficies (Figura 13).

El nivel de osteocalcina depositada por las células MG63 después de 7 días de cultivo en las diversas muestras es mayor en muestras SUMNa que en los controles, que muestran una menor deposición (Figura 14). Como la osteocalcina es uno de los marcadores bioquímicos más significativos de la neoformación y remodelación ósea, estos datos indican que el método de acuerdo con la presente invención es el que mejor promueve los mecanismos ligados a la diferenciación celular y la osteogénesis.

- 15 Se realizaron ensayos de la adsorción de proteínas en suero humano basándose en el hecho de que el primer mecanismo después de la implantación en un medio biológico consiste en el contacto entre proteínas de la sangre y la superficie del material del implante. La película de proteínas que se deposita como consecuencia de este primer contacto es fundamental para guiar el proceso posterior de osteointegración del implante y la respuesta celular. Los ensayos realizados investigaron los niveles de fibronectina y albúmina adsorbida en las superficies. El indicador más interesante es la relación entre la fibronectina y la albúmina adsorbidas; este indicador demuestra que las muestras SUMNa tienen una adsorción selectiva y preferente de la fibronectina con respecto a los controles, lo cual implica un mayor potencial de osteointegración del tratamiento innovador (Figura 15).
- 20

- 25 En la práctica, se ha descubierto que el método biomimético de acuerdo con la invención consigue completamente el objetivo y los objetos deseados, ya que hace que sea posible proporcionar sustratos metálicos a usar como prótesis, caracterizados por altas capacidades de integración en tejidos biológicos.

- Además, se ha descubierto que el método de acuerdo con la invención hace que sea posible introducir en la superficie del sustrato metálico tanto grupos químicos funcionales como elementos químicos específicos capaces de facilitar la integración del sustrato en tejidos biológicos y al mismo tiempo modificar la morfología de los sustratos metálicos, proporcionándoles una estructura microporosa.
- 30

Finalmente, se ha descubierto que el método de acuerdo con la invención hace que sea posible proporcionar sustratos a usar como prótesis, caracterizados por la simplicidad de ejecución y los costes competitivos.

- 35 Las divulgaciones de la Solicitud de Patente Italiana N° MI2008A001399, de la que esta solicitud reivindica prioridad, se incorporan en el presente documento como referencia.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para el tratamiento biomimético de un sustrato metálico, seleccionándose dicho metal del grupo que consiste en titanio, tántalo, aleaciones de titanio y aleaciones de tántalo, que comprende las etapas de:
  - 5 (a) someter el sustrato metálico a un tratamiento de deposición por chispa anódica (ASD) en una solución acuosa que comprende silicato sódico hidratado ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP), acetato cálcico hidratado ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e hidróxido sódico (NaOH); y
  - (b) sumergir el sustrato metálico sometido al tratamiento de deposición anódica ASD en una solución de hidróxido sódico (NaOH).
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tratamiento de deposición anódica ASD se realiza en una solución acuosa que comprende  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a una concentración de 0,005 M a 0,1 M,  $\beta$ -GP a una concentración de 0,03 M a 0,2 M,  $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  a una concentración de 0,05 M a 0,6 M, y NaOH a una concentración de 0,005 M a 0,4 M.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la solución acuosa comprende  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,03 M,  $\beta$ -GP 0,1 M,  $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,3 M y NaOH 0,036 M.
- 15 4. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la deposición anódica se realiza a una temperatura de  $0 \pm 0,5$  °C.
5. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la deposición anódica ASD se realiza a un primer valor de densidad de corriente de 5 a 50  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , con un potencial que aumenta libremente hasta un valor de 210 a 310 V, durante un periodo de tiempo necesario para alcanzar dicho valor de potencial, y un  
20 segundo valor de densidad de corriente del 50% al 5% de dicho primer valor de densidad de corriente.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la deposición anódica ASD se realiza a un primer valor de densidad de corriente de 10  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , con un potencial que aumenta libremente hasta un valor de 300 V, durante un periodo de tiempo necesario para alcanzar dicho valor de potencial, y un segundo valor de densidad de corriente del 20% de dicho primer valor de densidad de corriente.
- 25 7. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la inmersión del sustrato en la solución de NaOH después de la deposición anódica ASD se realiza a una temperatura de  $60 \pm 2$  °C durante un periodo de tiempo de 0,25 a 6 horas.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la inmersión del sustrato en la solución de NaOH se realiza durante un periodo de tiempo de 2 horas.
- 30 9. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución de NaOH tiene una concentración 5 M de NaOH.
10. Una solución acuosa de deposición que comprende silicato sódico hidratado ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP), acetato cálcico hidratado ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e hidróxido sódico (NaOH).



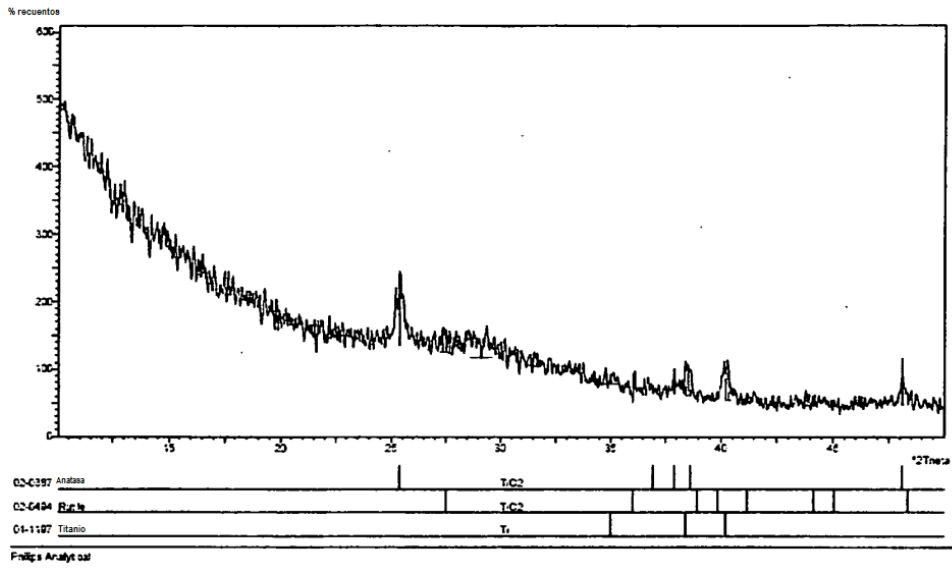


Fig. 4A

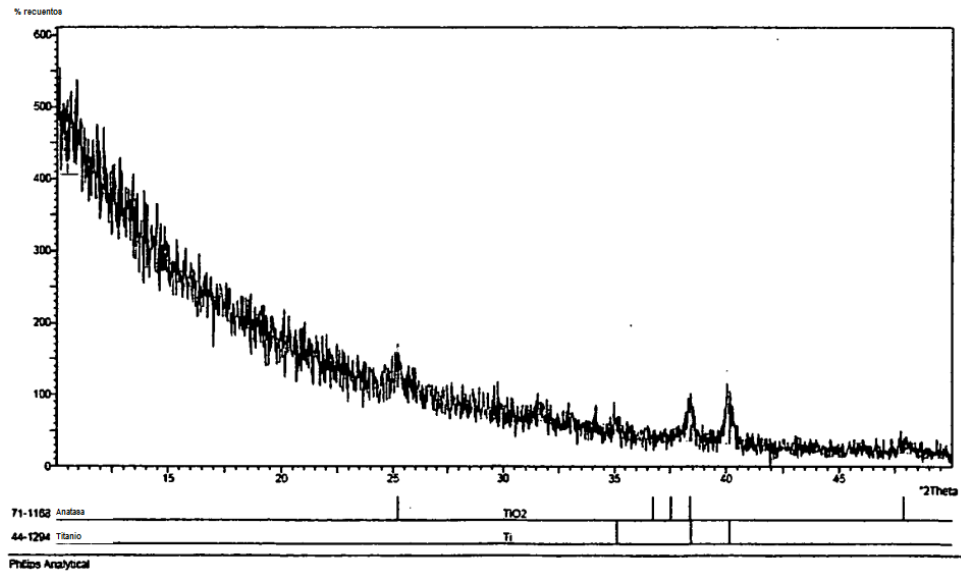
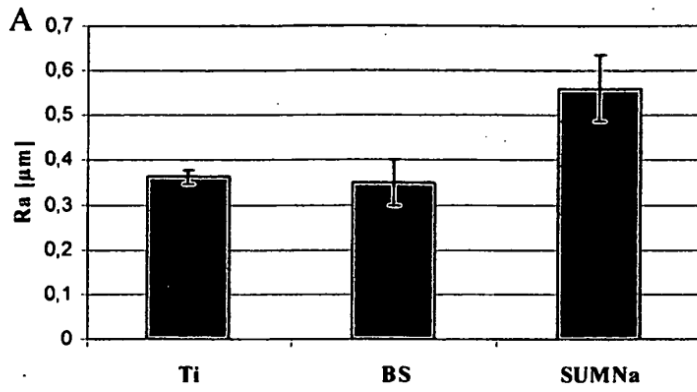
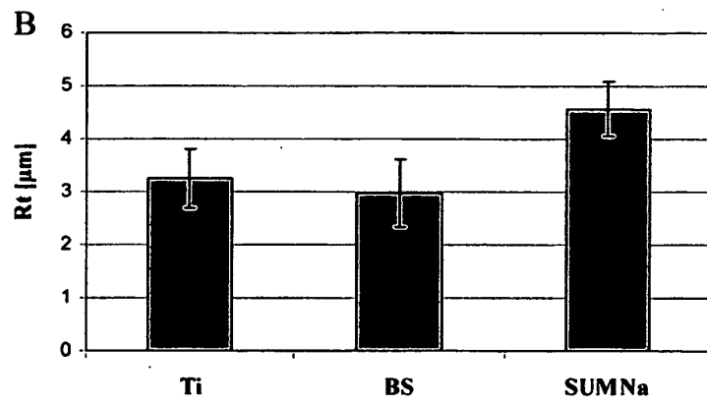


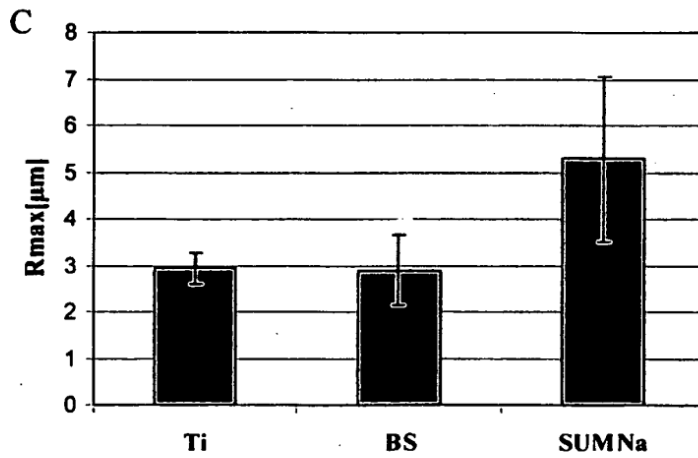
Fig. 4B



*Fig. 5A*



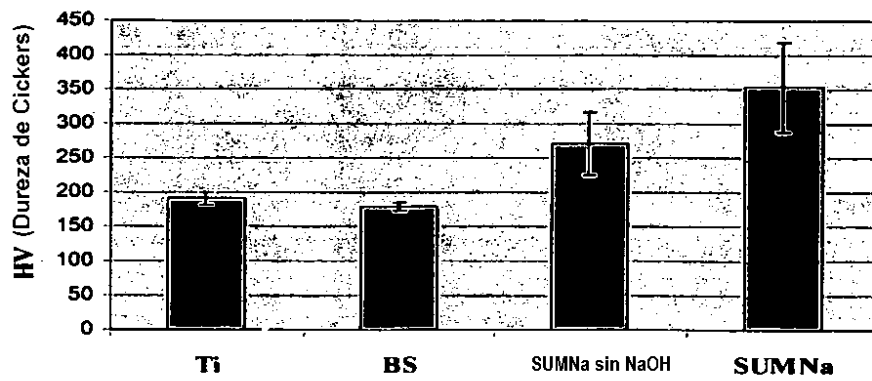
*Fig. 5B*



*Fig. 5C*

	$R_a$	$R_t$	$R_{max}$
<b>Ti</b>	0,3624	2,9434	3,2434
<b>BS</b>	0,3494	2,8856	2,9745
<b>SUMNa</b>	0,5610	5,2933	4,568

*Fig. 5D*



*Fig. 6*

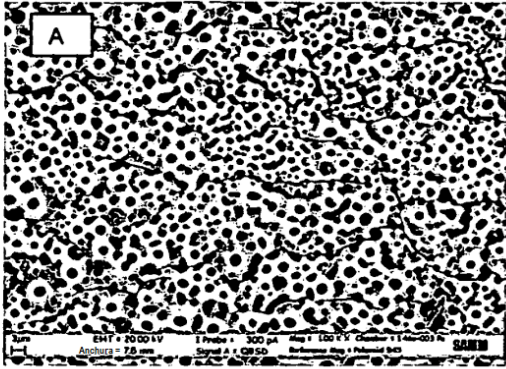


Fig. 7A

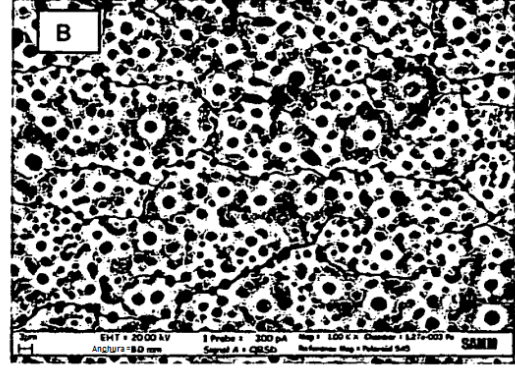


Fig. 7B

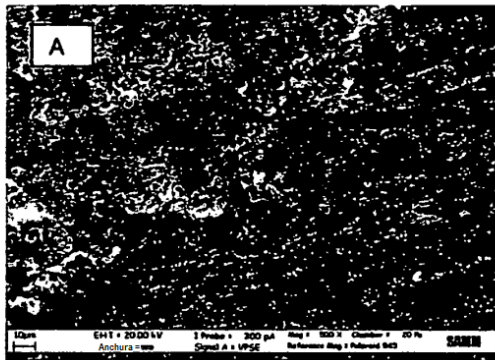


Fig. 8A

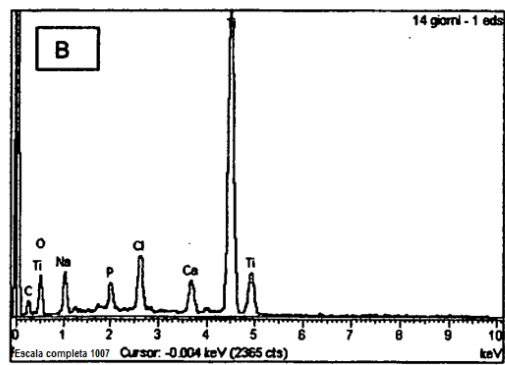


Fig. 8B

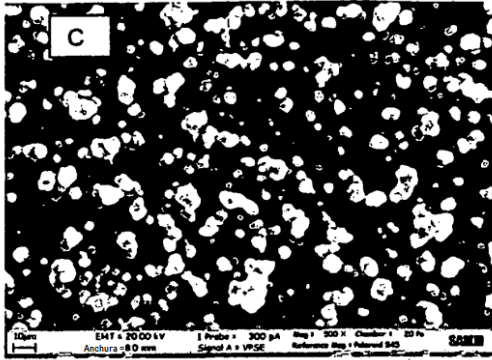


Fig. 8C

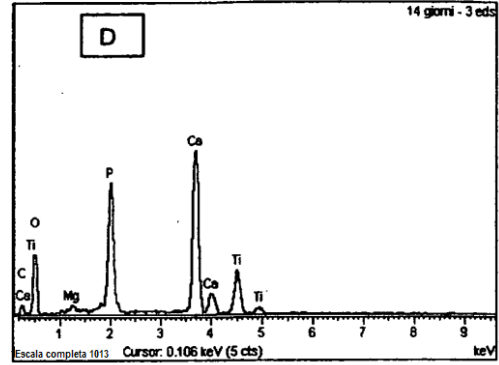


Fig. 8D

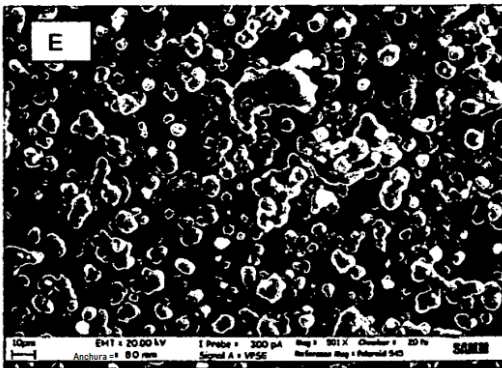


Fig. 8E

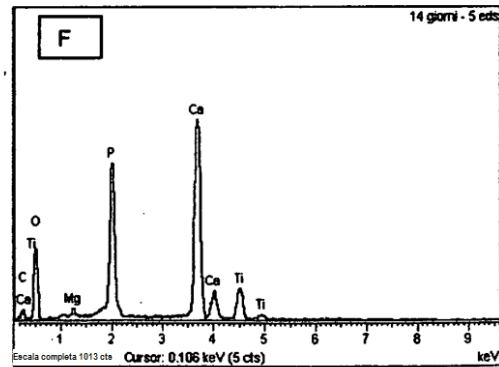


Fig. 8F



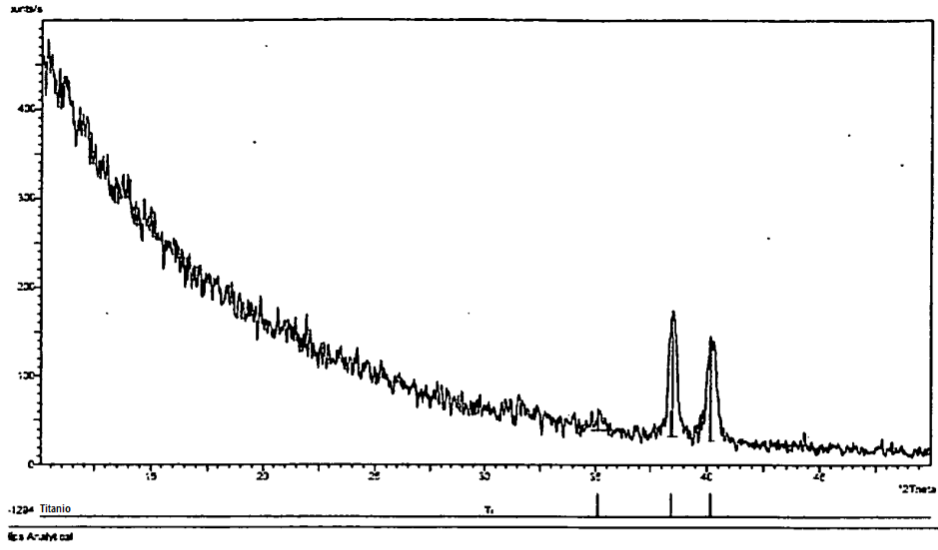


Fig. 9A

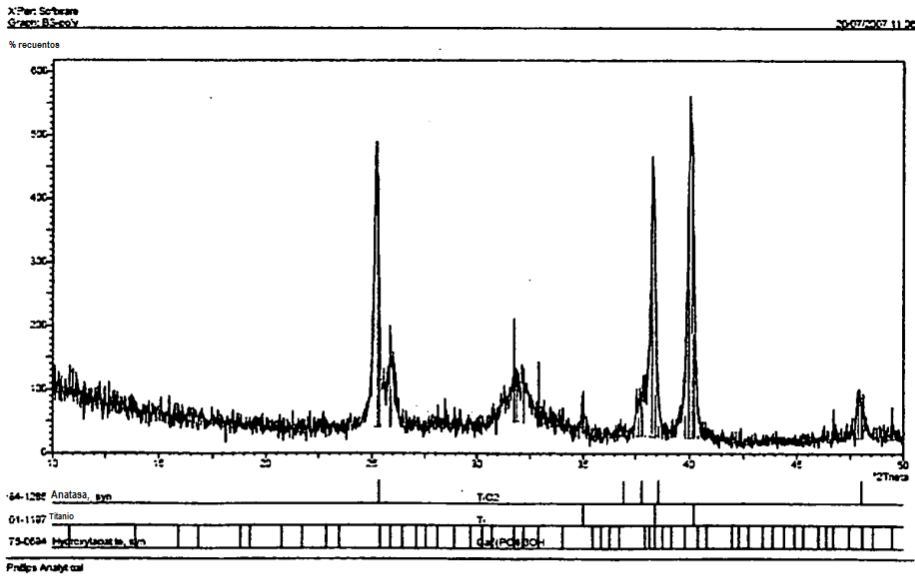
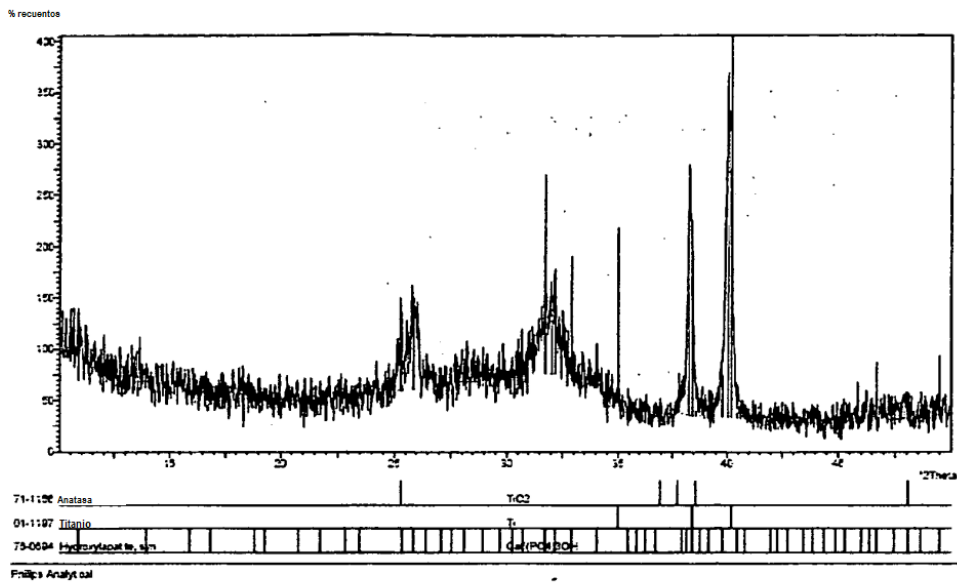
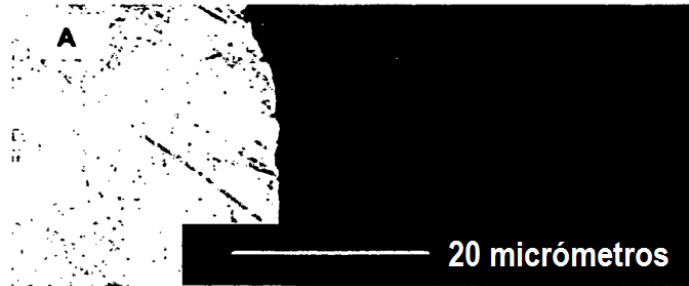


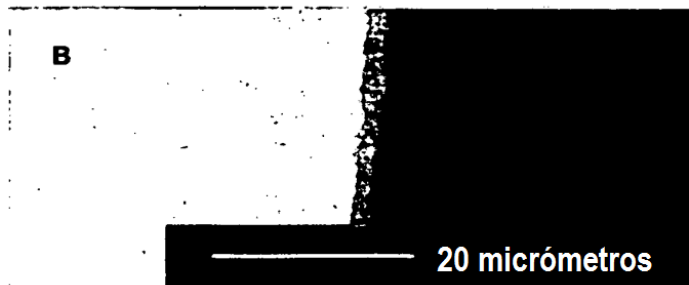
Fig. 9B



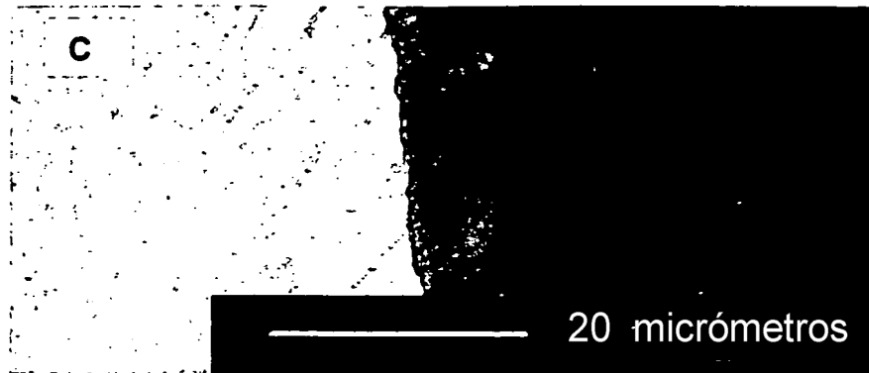
*Fig. 9C*



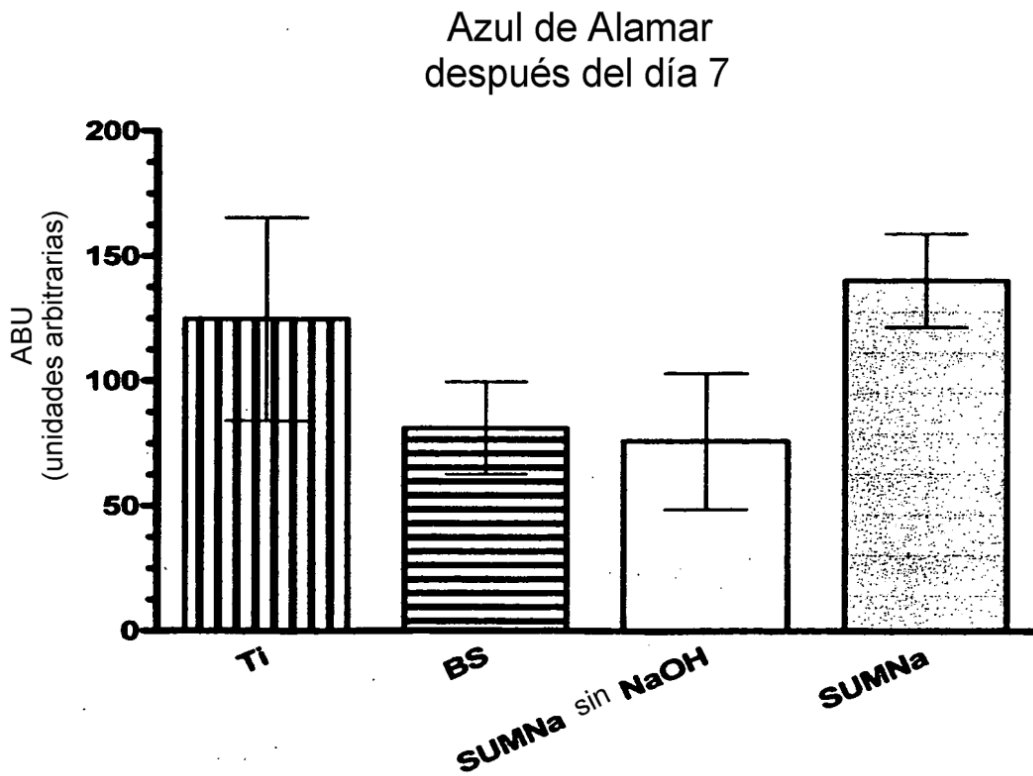
*Fig. 10A*



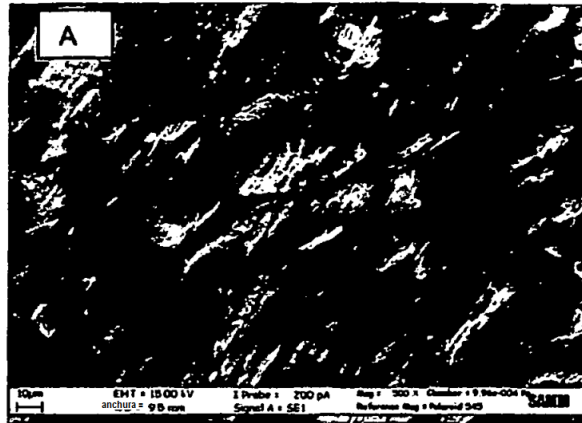
*Fig. 10B*



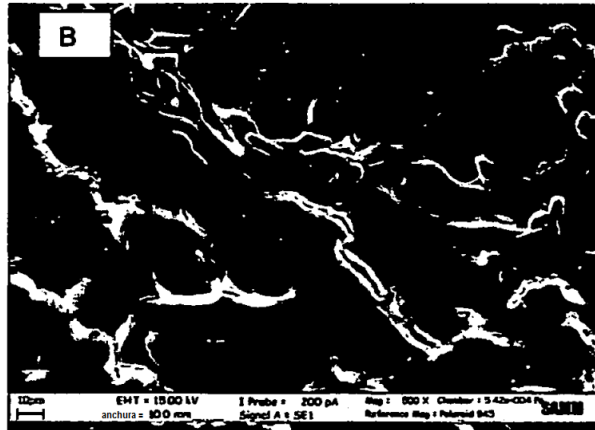
*Fig. 10C*



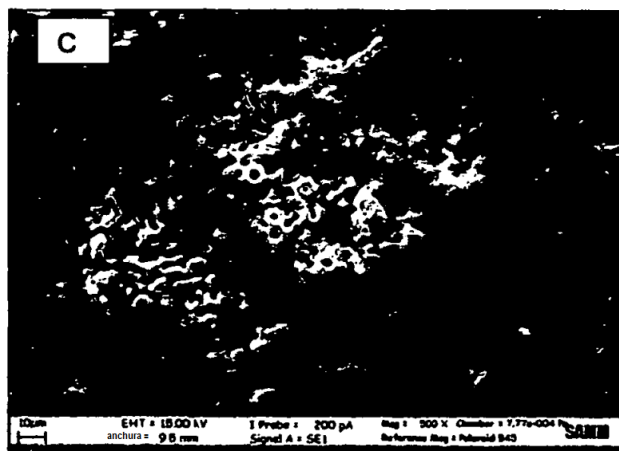
*Fig. 11*



*Fig. 12A*



*Fig. 12B*



*Fig. 12C*

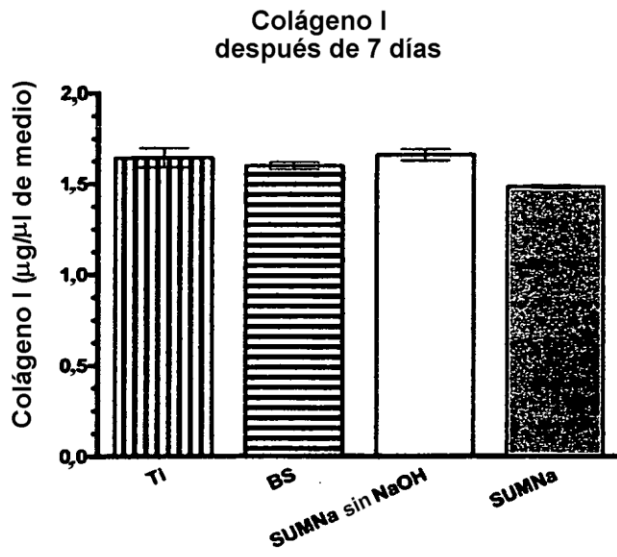


Fig. 13

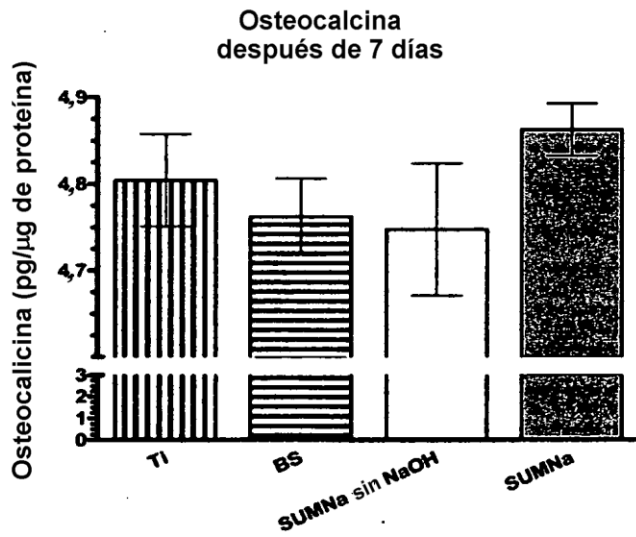


Fig. 14

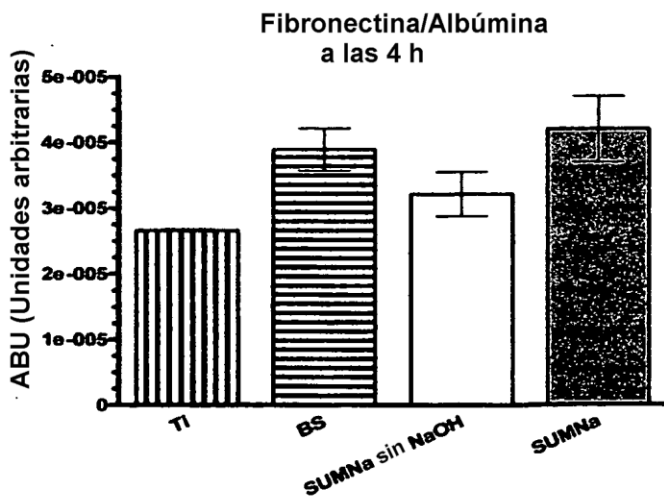


Fig. 15